

**POTENCIAL DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
(RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE E HETERORHABDITIDAE)
PARA O CONTROLE DE *Diabrotica speciosa* Germar, 1824
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)**

VIVIANE SANTOS

2009

VIVIANE SANTOS

**POTENCIAL DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
(RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE E HETERORHABDITIDAE)
PARA O CONTROLE DE *Diabrotica speciosa* Germar, 1824
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)**

Dissertação 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 obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Alcides Moino Junior

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Viviane.

Potencial de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diabrotica speciosa* Germar, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae) / Viviane Santos. – Lavras : UFLA, 2009.

46 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Alcides Moino Junior.

Bibliografia.

1. Vaquinha. 2. Virulência. 3. *Steinernema*. 4. *Heterorhabditis*. 5. Larva. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 595.754

VIVIANE SANTOS

**POTENCIAL DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS
(RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE E HETERORHABDITIDAE)
PARA O CONTROLE DE *Diabrotica speciosa* Germar, 1824
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)**

Dissertação 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 obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 06 de fevereiro de 2009.

Dr. Luis Garrigós Leite

Instituto Biológico/ Campinas

Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

Universidade Federal de Lavras

Prof. Dr. Alcides Moino Junior
DEN/ UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

Ao meu pai José (*in memoriam*) por ter sido um verdadeiro “mestre” para mim,

Ofereço.

A minha mãe Myrian, ao meu padrasto Márcio e aos meus irmãos Geyse, Geovani e Isabely pelo incentivo, apoio e carinho em todos os momentos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o maior responsável por todas as minhas conquistas, fazendo-se presente em “todos” os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Alcides Moino Junior pelos ensinamentos transmitidos nestes dois anos, pela paciência, compreensão e orientação neste trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste Crébio José Ávila por todo o apoio que vêm me dando desde a iniciação científica, tanto profissional quanto pessoal, e pela sincera amizade.

À UFLA e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade de fazer o curso de pós-graduação.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Entomologia da UFLA pelos conhecimentos adquiridos no decorrer do curso.

Ao professor do Departamento de Biologia da UFLA, Magno Antonio Patto Ramalho pela disponibilização das áreas cultivadas com feijão para a realização das coletas de insetos.

Aos colegas da turma do Mestrado Valquíria, Jader, Rodrigo, Lívia, Muriel, Alexandre, Ricardo, Bruno, Cristiana, Natália, Michele, André e Isabella pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do laboratório Vanessa, Grazielle, Camila, Érica, Marcela, Ricardo, Marco Aurélio, Iuri e Cristiane pela paciência e agradável convivência neste período e por todos os conhecimentos adquiridos que muito me auxiliaram na execução deste trabalho.

Aos amigos da república Alexandre e Carol pela convivência divertida, agradável e familiar que foi fundamental para o meu crescimento pessoal e que me ajudou a suportar a distância de casa e ausência da família.

Aos amigos Juracy, Fernando e Fabrício pelas bobearas compartilhadas.

Aos amigos Vaneska, Cleide, Simone, Alessandra, Aline, Elaine, Ana Garfi e Dionísio pela amizade e pelos vários momentos alegres compartilhados “extra - UFLA”.

À vizinha Dona Erilda pela amizade, pelo acolhimento e pelas comidas alemãs e mineiras deliciosas que preparava.

À Dona Cidinha da Pensão que me recebeu com muito carinho em Lavras, além de preparar um feijão tropeiro maravilhoso todos os dias.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 <i>Diabrotica speciosa</i> | 3 |
| 2.1.1 Caracterização, importância econômica e danos..... | 3 |
| 2.1.2 Aspectos bioecológicos..... | 5 |
| 2.1.3 Métodos de controle de larvas | 6 |
| 2.2 Nematoides entomopatogênicos: modo de ação e sua utilização no controle biológico de larvas de crisomelídeos..... | 7 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 10 |
| 3.1 Criação de <i>Diabrotica speciosa</i> | 10 |
| 3.2 Criação de <i>Galleria mellonella</i> e multiplicação dos nematoides entomopatogênicos..... | 13 |
| 3.3 Teste de virulência de nematoides entomopatogênicos a larvas de terceiro instar de <i>Diabrotica speciosa</i> | 16 |
| 3.4 Efeito de diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos sobre ovos, larvas e pupas de <i>Diabrotica speciosa</i> | 18 |
| 3.4.1 Teste com ovos..... | 18 |
| 3.4.2 Teste com larvas de terceiro instar..... | 19 |
| 3.4.3 Teste com pupas | 19 |
| 3.5 Efeito da temperatura sobre a mortalidade de larvas de <i>Diabrotica speciosa</i> por nematoides entomopatogênicos..... | 20 |
| 3.6 Susceptibilidade de larvas de <i>D. speciosa</i> a nematoides entomopatogênicos, em condições de casa de vegetação | 21 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 22 |
| 4.1 Teste de virulência | 22 |
| 4.2 Efeito de diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos sobre ovos, larvas e pupas de <i>D. speciosa</i> | 24 |
| 4.2.1 Teste com ovos..... | 24 |
| 4.2.2 Testes com larvas de terceiro instar | 26 |
| 4.2.3 Testes com pupas | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3 Efeito da temperatura sobre a mortalidade de larvas de <i>D. speciosa</i> por nematoides entomopatogênicos | 30 |
| 4.4 Susceptibilidade de larvas de <i>D. speciosa</i> a nematoides entomopatogênicos em condições de casa de vegetação | 32 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 37 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 38 |

RESUMO

SANTOS, Viviane. **Potencial de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diabrotica speciosa* Germar, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae).** Lavras: UFLA, 2009. 46 p. (Dissertação de Mestrado em Agronomia/Entomologia). *

Os nematóides entomopatogênicos (NEP) são utilizados no controle biológico de insetos de solo, sendo promissores para o controle de *D. speciosa*. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar a virulência de diferentes NEP sobre larvas de *D. speciosa*, verificar sua ação sobre ovos, larvas de terceiro ínstar e pupas de *D. speciosa* em diferentes concentrações, verificar a influência da temperatura sobre a mortalidade de larvas, bem como a ação dos NEP sobre larvas em casa-de-vegetação. Foi avaliada a virulência de dezessete isolados de NEP sobre larvas. O bioensaio consistiu de cinco repetições, contendo dez larvas e 1 mL de suspensão na concentração de 1500 juvenis infectantes (JI)/repetição. Dois isolados selecionados foram testados sobre ovos e larvas. O bioensaio com ovos consistiu de cinco repetições, contendo dez ovos cada e 0,3 mL de suspensão nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 JI/inseto. O bioensaio com larvas consistiu de cinco repetições, contendo dez larvas cada e 1 mL de suspensão nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 JI/inseto. Um isolado foi selecionado e testado sobre pupas. O bioensaio consistiu de quatro repetições, com oito pupas cada e 1 mL de suspensão nas concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 JI/inseto. Os dois isolados selecionados foram testados sobre larvas nas temperaturas de 15, 20, 22, 25 e 28°C. Os bioensaios consistiram de cinco repetições, com oito larvas cada e 1 mL de suspensão contendo 200 JI/inseto. Foi avaliada a susceptibilidade de larvas a um isolado de NEP em casa-de-vegetação. O bioensaio consistiu de seis repetições com vinte larvas cada e 50 mL de suspensão nas concentrações de 6.500, 13.000, 26.000 e 52.000 JI/repetição. Verificou-se que todos os NEP causaram mortalidade larval. Os mais virulentos foram *Heterorhabditis* sp. RSC01 (94%), *Steinernema glaseri* (84%), *Heterorhabditis* sp. JPM04 (82%) e *Heterorhabditis* sp. RSC05 (78%). Não houve efeito dos isolados *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri* sobre ovos. A mortalidade larval por *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri* foi crescente até a concentração de 200 JI/inseto. O isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 causou mortalidade de pupas superior a 80% na concentração de 250 JI/inseto. A virulência de *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri* foi diretamente proporcional ao aumento da temperatura. *Heterorhabditis* sp. RSC01 causou redução na sobrevivência de larvas em condições de casa-de-vegetação.

* Orientador: Alcides Moino Junior

ABSTRACT

SANTOS, Viviane. **Potential of entomopatogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the control of *Diabrotica speciosa* Germar, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae).** Lavras: UFLA, 2009. 46 p. (Dissertation – Master in Agronomy/Entomology).*

Entomopathogenic nematodes (EPN) are used in the biological control of soil insects, being promising for *D. speciosa* control. Considering that, the objectives of this work were to evaluate the virulence of different EPN on *D. speciosa* larvae, verify its action on eggs, larvae of third instar and pupae of *D. speciosa* in different concentrations, verify the influence of the temperature on larvae mortality, as well as the action of EPN on larvae when in greenhouse condition. The virulence of seventeen EPN strains was evaluated on larvae. The bioassay was composed of five replicates each one composed of ten larvae and 1 mL of suspension with concentration of 1500 infective juveniles (IJ)/replicate. Two selected strains were tested on eggs and larvae. The bioassay with eggs consisted of five replicates, each one containing ten eggs and 0.3 mL of suspension with concentrations of 25, 50, 100, 150, 200 and 250 IJ/insect. The bioassay with larvae consisted of five replicates, each one containing ten larvae and 1 mL of suspension with concentrations of 50, 100, 150, 200, 250 and 300 IJ/insect. One strain was selected and tested on pupae. The bioassay consisted of four replicates, each one with eight pupae and 1 mL of suspension with concentrations of 100, 150, 200, 250 and 300 IJ/insect. The evaluations were made after three days. Both selected strains were tested on larvae in temperatures of 15, 20, 22, 25 and 28°C. The bioassays consisted of five replicates, each one with eight larvae and 1 mL of suspension containing 200 IJ/insect. The susceptibility of larvae to one strain of EPN was evaluated in greenhouse. The bioassay consisted of six replicates with twenty larvae each and 50 mL of suspension with concentrations of 6,500, 13,000, 26,000 and 52,000 IJ/replicate. It was verified that all EPN caused larval mortality. The most virulent were *Heterorhabditis* sp. RSC01 (94%), *Steinernema glaseri* (84%), *Heterorhabditis* sp. JPM04 (82%) and *Heterorhabditis* sp. RSC05 (78%). There was no effect of *Heterorhabditis* sp. RSC01 and *S. glaseri* on eggs. Larval mortality caused by *Heterorhabditis* sp. RSC01 and *S. glaseri* was increased until the concentration of 200 IJ/insect. *Heterorhabditis* sp. RSC01 strain caused pupae mortality higher than 80% with concentration of 250 IJ/insect. The virulence of *Heterorhabditis* sp. RSC01 and *S. glaseri* was directly proportional to the increase of temperature. *Heterorhabditis* sp. RSC01 caused reduction in larvae survival in greenhouse conditions.

*Adviser: Alcides Moino Junior - UFLA

INTRODUÇÃO GERAL

A ocorrência de pragas de solo causando perdas, em maior ou menor proporção, é uma realidade da agricultura a nível mundial (Santos, 1997). Dentre os insetos de solo destacam-se alguns coleópteros, como *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1971) (Coleoptera: Chrysomelidae), *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae), *Mygdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae), *Sternechus subsignatus* Boheman, 1836 (Coleoptera: Curculionidae), *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae), *Anomala flavipennis* Burmeister, 1844 (Coleoptera: Scarabaeidae), *Phyllophaga* sp. Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae) e *Diloboderus abderus* Sturm, 1826 (Coleoptera: Melolonthidae) (Salvadori et al., 2004).

O controle de pragas de solo no Brasil tem recebido maior atenção por parte da pesquisa, principalmente após a proibição do uso dos inseticidas clorados, em 1985. Além desse aspecto, a adoção do sistema de plantio direto, por volta da década de 1970, apesar de tantos benefícios para o solo e o ambiente, favoreceu o aumento de algumas pragas, principalmente pela reduzida ação de máquinas agrícolas e a modificação do nicho ecológico, em razão da manutenção da palha na superfície do solo (Menezes & Pasini, 2001).

O crisomelídeo *D. speciosa* tem causado grande preocupação aos agricultores, devido à sua vasta ocorrência e ao seu hábito polífago (Ávila, 1999). Os adultos alimentam-se, preferencialmente, de folhas, brotações, frutos e pólen de plantas cultivadas e silvestres, enquanto as larvas preferem as raízes. Em ataques precoces no milho, as larvas de *D. speciosa* podem broquear o caulículo das plântulas, causando o secamento e a morte das folhas centrais; já em plantas mais desenvolvidas, preferem se alimentar das raízes adventícias (Gassen, 1989). A perda dessas raízes reduz a capacidade da planta de absorver

água e nutrientes, tornando-a menos produtiva e mais susceptível a doenças e ao tombamento, o que intensifica os prejuízos durante a colheita (Ávila & Gomez, 2001).

Esse inseto, na fase larval, apresenta grande dificuldade de controle e a alternativa mais indicada tem sido o controle preventivo com o uso dos inseticidas químicos (Waquil et al., 2004). Contudo, poucos são os trabalhos realizados visando à utilização de agentes de controle biológico para suprimir as populações de *D. speciosa* nesta fase de desenvolvimento.

Nematoides entomopatogênicos (NEP) das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae (Rhabditida) são agentes de controle biológico promissores e particularmente efetivos, quando aplicados a insetos que habitam ou que passam uma fase de vida no solo (Aguillera et al., 2001). Trabalhos utilizando NEP vêm sendo realizados em outros países com outras espécies do gênero *Diabrotica* e têm apresentado bons resultados, tanto em condições de laboratório quanto de campo (Journey & Ostlie, 2000; Jackson & Brooks, 1989; Kurtz et al., 2007; Wright et al., 1993). Diante disso, os objetivos deste trabalho foram:

- avaliar a patogenicidade e a virulência de isolados nativos e exóticos de NEP sobre larvas de terceiro instar de *D. speciosa* e selecionar os mais virulentos para estudos posteriores;
- avaliar a susceptibilidade das diferentes fases de desenvolvimento de *D. speciosa* (ovo, larva e pupa) aos NEP selecionados;
- avaliar o efeito de diferentes concentrações de NEP sobre a mortalidade de ovos, larvas de terceiro instar e pupas de *D. speciosa*;
- avaliar a influência da temperatura na virulência dos NEP sobre larvas de terceiro instar de *D. speciosa*;
- avaliar a eficiência dos NEP para o controle de *D. speciosa* em condições de casa de vegetação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Diabrotica speciosa*

2.1.1 Caracterização, importância econômica e danos

As espécies subterrâneas consideradas fitófagas alimentam-se principalmente de tecidos vivos das raízes e caules subterrâneos das plantas, mastigando-os ou absorvendo seus sucos, embora seus hábitos possam ser bastante diversos. Por exemplo, algumas espécies comportam-se como brocas de raízes, caules ou tubérculos, formando galerias, enquanto outras cortam os tecidos, aproveitando diferentes partes do sistema radicular, de acordo com suas etapas de crescimento, podendo causar grandes danos nas culturas (Salvadori et al., 2004).

Dentre essas pragas destaca-se a espécie *D. speciosa*, cujos adultos são conhecidos popularmente como vaquinhas-verde-amarelas, brasileirinhos ou patriotas e as suas larvas são conhecidas como larvas-alfinete. Este inseto ocorre praticamente o ano todo e é encontrado amplamente distribuído por toda a América Central e América do Sul (Zucchi et al., 1993). No Brasil, ocorre em abundância principalmente nas regiões sul e sudeste (Ávila & Milanez, 2004).

Os adultos de *D. speciosa* têm de 5 a 6 mm de comprimento, são de coloração verde-clara, cabeça marrom, élitros lisos com seis manchas castanhas dispostas transversalmente e tíbias pretas. São muito semelhantes aos da espécie *Diabrotica viridula* (Fabricius, 1801) (Coleoptera: Chrysomelidae), que possui a cabeça verde, as tíbias marrons e os élitros com pontuações mais grossas (Zucchi et al., 1993). Os ovos são branco-amarelados e colocados isoladamente. As larvas, depois de completamente desenvolvidas, têm 10 mm de comprimento, são de coloração branco-leitosa, cabeça marrom e possuem, no último segmento abdominal, uma placa escura, quase preta. A pupa tem 5 mm de comprimento, é

branca e fica protegida numa câmara pupal que a larva de terceiro instar constrói logo abaixo da superfície do solo (Ferreira & BARRIGOSI, 2006).

Os adultos são polívoros, alimentando-se de folhas de hortaliças de modo geral (solanáceas, cucurbitáceas, crucíferas, gramíneas, etc.) (Zucchi et al., 1993). Têm preferência por leguminosas (folhas largas), como o feijão e a soja (Marques et al., 1999), podendo causar redução na quantidade ou na qualidade da produção, seja pelo efeito direto por meio da injúria causada à planta ou indireto, por atuarem como agente transmissor de fitopatógenos, especialmente de vírus (Ávila & Milanez, 2004).

As fêmeas desta espécie ovipositam no solo, próximo às plantas e as larvas, logo que eclodem, alimentam-se das raízes, preferencialmente de milho ou tubérculos de batata (Zucchi et al., 1993). As plantas de milho, quando atacadas pelas larvas de *D. speciosa*, ficam com um aspecto recurvado, caracterizando o sintoma conhecido como “pescoço de ganso” (Waquil et al., 2004), o que compromete a arquitetura das plantas e a sua eficiência para realizar a fotossíntese, intensificando as perdas quando a colheita é realizada mecanicamente (Ávila & Milanez, 2004).

Grützmacher & Link (2000), realizando um levantamento da entomofauna associada a cultivares de batata em duas épocas de cultivo (safra de verão e safrinha), verificaram que, no período da safrinha, a família Chrysomelidae representa 92,59% dos coleópteros coletados nesta cultura, sendo a espécie *D. speciosa* a mais abundante.

Marques et al. (1999) observaram que o dano ao sistema radicular do milho causado pela larva-alfinete proporcionou um reflexo na parte aérea da planta, reduzindo a sua altura e, conseqüentemente, o seu peso seco, quando comparado à testemunha (sem infestação).

No Brasil, o impacto econômico causado por larvas e adultos de *D. speciosa* na agricultura e o montante de recursos gastos para o seu controle não

foram ainda estimados, embora se aplique, anualmente, uma expressiva quantidade de inseticidas para o controle dessa praga nas culturas da batata e do milho, especialmente nas regiões sudeste e sul (Ávila & Milanez, 2004).

2.1.2 Aspectos bioecológicos

Milanez & Parra (2000a), trabalhando com *D. speciosa* em condições de laboratório, verificaram que o período de incubação dos ovos foi, em média, de 8,8 dias e o período de desenvolvimento de larva a adulto de 25,2 dias, à temperatura de 25°C.

As fases imaturas de *D. speciosa* em laboratório são menores quando os insetos são alimentados com raízes de milho (25,1 dias) do que quando são alimentados com tubérculos de batata (36,5 dias). Entretanto, ambas as culturas são nutricionalmente adequadas para o inseto, garantindo sua sobrevivência nesta fase de desenvolvimento (Ávila & Parra, 2002). Já as raízes de soja e de feijoeiro não são adequadas para o desenvolvimento das fases imaturas deste inseto, pois, quando alimentados com estas culturas, apresentam sua viabilidade larva-adulto reduzida.

Ávila & Parra (2002) verificaram também que adultos de *D. speciosa* alimentados com folhas de batata e de feijoeiro apresentam capacidade de postura superior à daqueles mantidos em folhas de soja ou milho. Em milho, os insetos ovipositaram menos do que 2% do que aqueles alimentados com folhas de batata ou feijoeiro.

Ávila et al. (2000) verificaram que este inseto, quando alimentado com dieta artificial no laboratório, apresenta período de desenvolvimento larva a adulto mais longo do que os insetos alimentados com raízes de milho no substrato vermiculita.

Milanez & Parra (2000b) observaram que os solos de coloração escura e que possuem maior porcentagem de matéria orgânica e maior teor de umidade

são preferidos para oviposição pelas fêmeas de *D. speciosa*. Esse aspecto justifica sua maior incidência e ocorrência como praga em áreas de produção de milho irrigado, onde as condições de umidade dos solos favorecem o desenvolvimento do inseto.

As larvas de primeiro instar de *D. speciosa* são atraídas pelo CO₂ produzido pelas raízes no momento da respiração, que funciona como um estímulo de localização da planta hospedeira. As plantas mais atrativas às larvas são o milho pipoca, o milho e a aveia, em comparação às culturas do feijão, da soja, do trigo e do sorgo (Pereira et al., 2005).

O período de maior atividade dos adultos na cultura do milho é entre 17 e 19 horas, independente do sexo. Por isso, recomenda-se que as coletas para a manutenção de criações em laboratório ou a aplicação de inseticidas em pulverizações para o controle de adultos sejam realizadas neste horário, ocasião em que o inseto ficaria mais exposto, proporcionando assim melhor eficiência de controle químico (Nava et al., 2004).

2.1.3 Métodos de controle de larvas

O controle químico de larvas de *D. speciosa* deve ser preventivo. O tratamento de sementes tem se mostrado ineficiente para proteger o sistema radicular. Todavia, alguns inseticidas, quando aplicados na formulação granulada ou em pulverização no sulco de semeadura, são eficazes no controle dessa espécie na cultura milho (Waquil et al., 2004; Salles & Grützmacher, 1999; Schmidt et al., 2004; Viana & Marochi, 2002; Salles, 2000; Cruz et al., 1999) (Tabela 1).

Apesar de, na prática, o controle químico ser a única opção utilizada pelos agricultores para controlar as larvas de *D. speciosa*, foram realizados alguns trabalhos visando testar a eficiência de organismos entomopatogênicos sobre esses insetos.

Consolo et al. (2003) verificaram, em condições de laboratório, mortalidade de 70% de larvas de terceiro instar de *D. speciosa*, utilizando-se o fungo *Beauveria bassiana* (FHD13) (Balsamo) Vuillemin, 1912, na concentração de 1×10^8 conídios/mL e a DL₅₀ de $3,48 \times 10^{10}$ conídios/mL.

Silva-Werneck et al. (1995) realizaram um bioensaio em laboratório, visando avaliar a susceptibilidade de *D. speciosa* a bactérias e fungos entomopatogênicos. Foram avaliados 21 isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 e 6 de *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, 1887 sobre larvas de *D. speciosa*, porém, nenhum se mostrou patogênico. No entanto, em testes realizados com 13 isolados de *B. bassiana* e 9 de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, foi constatada pequena porcentagem de infecção (30%) para *M. anisopliae*, utilizando o isolado CG 293.

Paron et al. (2002) testaram os nematoides *Steinernema glaseri* Steiner, 1929, *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) e *Heterorhabditis* sp. CCA na concentração de 100 II/inseto sobre larvas de *D. speciosa* em laboratório e observaram mortalidade acumulada de 95% após sete dias de inoculação para *S. carpocapsae* e de 72,5% para *Heterorhabditis* sp. CCA. Isso demonstra que esses organismos apresentam grande potencial para o controle deste inseto na fase larval.

2.2 Nematoides entomopatogênicos: modo de ação e sua utilização no controle biológico de larvas de crisomelídeos

Os NEP são agentes de controle biológico promissores e particularmente efetivos quando aplicados a insetos que habitam ou que passam a fase de pupa no solo. Estão reunidos nas famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae (Rhabditida), nas quais incluem-se as espécies dos gêneros *Heterorhabditis* Poinar, 1976 e *Steinernema* Travassos, 1927, que têm sido mais intensivamente pesquisadas visando o emprego comercial (Ferraz et al., 2008). Estes nematoides

agem em associação com bactérias em uma relação simbiótica mutualística e, por meio de diferentes estratégias de busca, localizam hospedeiros potenciais, invadindo-os através de aberturas naturais. Uma vez na hemocele, liberam as bactérias associadas, as quais matam o hospedeiro entre 24 e 72 horas após a invasão. Bactérias e nematoides se multiplicam no interior do corpo do inseto e, após duas a três gerações, tem início a formação de juvenis infectantes (JI), os quais abandonam o cadáver à procura de novos hospedeiros (Aguillera et al., 2001).

Diversos trabalhos vêm sendo realizados em vários países, visando testar a eficiência dos NEP e vários deles têm relatado resultados de controle satisfatórios, tanto em condições de laboratório, quanto no campo.

Yang et al. (2003), visando testar a eficiência dos NEP sobre larvas do crisomelídeo *Luperomorpha suturalis* Chen, 1938 (Coleoptera: Chrysomelidae), uma das principais pragas da cebolinha na China, em condições de laboratório, verificaram que *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), *Steinernema ceratophorum* Jian, Reid & Hunt, 1997 e *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955), na concentração de 100 JI/inseto, foram patogênicos às larvas e às pupas deste inseto, causando mortalidade de larvas entre 79,2% e 95,8% e de pupas, entre 55,8% e 97,1%.

Segundo Ellers-Kirk et al. (2000), *S. riobravis* Cabanillas et al. 1994 foi capaz de causar aproximadamente 50% de redução na sobrevivência de larvas de *Acalymma vittatum* Fabricius, 1775 (Coleoptera: Chrysomelidae), em condições de campo, tanto em sistema de cultivo orgânico quanto em sistema de cultivo comercial. Isso demonstra que esta espécie apresenta grande potencial como agente de controle biológico desta praga na cultura do pepino.

Os NEP *Steinernema glaseri* Steiner, 1929, *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967), *Steinernema abassi* Elawad et al. 1997, *Steinernema bicornutum* Tallosi et al. 1995, *Steinernema feltiae*, *Steinernema kraussei*

(Steiner, 1923), *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 foram patogênicos às larvas de terceiro instar de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 1868 (Coleoptera: Chrysomelidae), praga do milho nos EUA. Entretanto, raramente infectaram os adultos desta espécie (Toepfer et al., 2005). O mesmo estudo demonstrou que, em concentrações de 7,9 e 15,9 JI/cm², as espécies *Steinernema glaseri*, *Steinernema arenarium*, *Steinernema abassi* e *Heterorhabditis bacteriophora* causaram mortalidade larval superior a 77%.

Kurtz et al. (2007) demonstraram, em um experimento de campo com NEP realizado na cultura do milho, que *H. bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis* Poinar et al. 1988 e *Steinernema feltiae* sobreviveram no solo após as pulverizações e persistiram por 2 a 5 meses no campo. Assim, larvas de *D. v. virgifera* podem ser controladas por estes nematoides durante a estação de cultivo em que foi realizada a aplicação, no entanto, não há efeito de controle de um ano para o outro.

No Brasil, os NEP têm sido avaliados para o controle de insetos, apresentando resultados promissores para o controle de algumas pragas, como *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) (Leite et al., 2005), *M.fryanus* (Machado et al., 2005), *Dysmicoccus texensis* (Tinsley, 1900) (Hemiptera: Pseudococcidae) (Andaló et al., 2004) e *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) (Leite et al., 2007), entre outras. Entretanto, nenhum produto comercial à base de nematoides foi registrado ainda para o controle dessas pragas e os trabalhos em campo são escassos.

Os NEP podem ser facilmente produzidos em larga escala e aplicados com equipamentos convencionais de pulverização. Esses organismos têm ampla gama de hospedeiros e são inócuos ao ambiente, oferecendo uma opção segura e limpa para o controle de pragas agrícolas (Nardo et al., 2001; Grewal et al., 2001). Atualmente, no mercado mundial, já existem vários produtos à base de

NEP, comercializados principalmente nos Estados Unidos e na Europa, em especial para o controle de pragas de solo que ocorrem em ambientes protegidos, campos de golfe, hortas e jardins domésticos, entre outros (Gaugler et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi executada no Laboratório de Patologia de Insetos e na casa de vegetação do Departamento de Entomologia (DEN) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no período de dezembro de 2007 a dezembro de 2008.

3.1 Criação de *Diabrotica speciosa*

Para a manutenção de adultos e a obtenção de ovos e larvas de *D. speciosa*, foi utilizada a metodologia descrita por Ávila & Milanez (2004) modificada. Adultos de *D. speciosa* foram coletados em lavouras de feijão no campo experimental da UFLA, no município de Lavras, MG, e na Fazenda Palmital, no município de Ijaci, MG.

Os insetos foram mantidos em potes de vidro cilíndricos de 17cm de altura, 10cm de largura e 10cm de diâmetro, com tampa plástica perfurada (Figura 1) e foram mantidos em câmara climatizada (temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas).



FIGURA 1. Potes de vidro utilizados para a manutenção de adultos de *Diabrotica speciosa*.

Os potes foram forrados com papel toalha cortados em formato circular, para evitar o excesso de umidade. No seu interior, foram colocadas folhas de feijão, para a alimentação dos insetos e uma placa de Petri com diâmetro de 5 cm, contendo, no fundo, um pedaço de gaze de coloração preta, umedecido com radículas seminais de milho na superfície, onde os insetos realizavam a oviposição (Figura 2).



FIGURA 2. Placa de Petri com gaze preta para a oviposição de *Diabrotica speciosa*.

Os ovos foram retirados do substrato de oviposição, lavando-se a gaze em água corrente sobre um tecido fino (*voil*), onde ficavam retidos. Para evitar a contaminação por fungos durante o período de incubação, os ovos foram tratados com solução de sulfato de cobre (CuSO_4) a 1%, durante dois minutos e, em seguida, foram transferidos para placas de Petri com diâmetro de 9 cm, forradas com papel filtro umedecido, que foram mantidas em câmara climatizada ($25\pm 1^\circ\text{C}$, umidade $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas) até a eclosão das larvas.

As larvas neonatas foram transferidas para os recipientes de “infestação” que consistiram de potes plásticos de 4,5 cm de profundidade, 12 cm de comprimento e 7 cm de largura, contendo vermiculita de tamanho médio, esterilizada e umedecida com água destilada, e radículas seminais de plântulas de milho para a alimentação das larvas neonatas (Figura 3).



FIGURA 3. Potes plásticos utilizados para a manutenção de larvas de *Diabrotica speciosa*.

Para evitar a contaminação por fungos, as sementes de milho foram tratadas com o fungicida Vitavax[®]-Thiram 200SC (carboxina + tiram), na dosagem de 2g pc./kg de semente e colocadas para germinar em bandejas

plásticas contendo vermiculita esterilizada e mantidas em casa de vegetação por três a cinco dias.

Após dez dias de desenvolvimento, as larvas que já estavam no segundo ou terceiro instar foram transferidas para um recipiente com 24 cm de comprimento, 8 cm de altura e 16,5 cm de largura, que continha o dobro de vermiculita esterilizada e umedecida e novas radículas seminais de milho, onde foram mantidas até completarem o desenvolvimento ou até serem utilizadas na instalação dos experimentos.

3.2 Criação de *Galleria mellonella* e multiplicação dos nematoides entomopatogênicos

Os adultos de *Galleria mellonella* Linnaeus 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) foram mantidos em laboratório em potes de vidro cilíndricos de 17 cm de altura, 10 cm de largura e 10 cm de diâmetro e tampa plástica perfurada. No seu interior havia folhas de papel jornal dobradas em forma de sanfona, onde as fêmeas realizavam a oviposição.

Os pedaços de papel contendo os ovos foram recortados e transferidos para potes plásticos com capacidade para 300 mL, forrados com papel jornal, contendo dieta artificial (Tabela 1) para servir como alimento para as larvas neonatas.

Após atingirem o segundo instar de desenvolvimento, as larvas foram transferidas para potes de 24 cm de comprimento, 8 cm de altura e 16,5 cm de largura, forrados com papel jornal, contendo dieta artificial para a manutenção dos insetos até completarem o seu desenvolvimento ou até serem utilizados para a multiplicação dos NEP. Os adultos emergidos foram recolhidos e transferidos para os potes de vidro, para a manutenção da criação.

TABELA 1. Composição da dieta artificial utilizada na criação de lagartas de *Galleria mellonella*.

| Ingredientes | Quantidade |
|-----------------------|-------------------|
| Farinha de trigo | 200 g |
| Farelo de trigo | 200 g |
| Leite em pó desnatado | 400 g |
| Levedo de cerveja | 120 g |
| Gérmen de trigo | 200 g |
| Mel | 240 g |
| Glicerina | 130 g |
| Água destilada | 20 mL |

Fonte: Cláudia Dolinski (comunicação pessoal).

Os isolados de NEP utilizados nos experimentos foram obtidos do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Patologia dos Insetos (DEN/UFLA), onde permaneceram armazenados em suspensão aquosa e em condições controladas (temperatura de $15\pm 1^\circ\text{C}$, umidade $70\pm 10\%$, na ausência de luz) (Tabela 2). Quando necessário, os NEP foram multiplicados em larvas de último instar de *G. mellonella*, conforme procedimento descrito por Woodring & Kaya (1988).

Para a multiplicação dos NEP, utilizaram-se cinco larvas de *G. mellonella* provenientes da criação, que foram transferidas para placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo duas folhas de papel filtro e 1,5 mL de suspensão aquosa contendo, em média, 500 JI/mL. As placas de Petri foram mantidas por 48 horas em câmara climatizada à temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, condições essas favoráveis para a multiplicação dos NEP.

TABELA 2. Nematoides entomopatogênicos utilizados no teste de virulência.

| Isolados | Local de origem |
|---|------------------------------|
| <i>Steinernema anomali</i> | Voronezh/Rússia |
| <i>Steinernema carpocapsae</i> A11 | Carolina do Norte/USA |
| <i>Steinernema feltiae</i> SN | Flórida/USA |
| <i>Steinernema riobravis</i> 355 | Texas/USA |
| <i>Steinernema glaseri</i> CCA | Araras, SP/Brasil |
| <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> | New Jersey/USA |
| <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88 | New Jersey/USA |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. JPM 04 | Lavras, MG/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. JPM 03 | Lavras, MG/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. JPM 3.1 | Lavras, MG/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. RSC 01 | Benjamin Constant, AM/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. RSC 02 | Benjamin Constant, AM/Brasil |
| <i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC 05 | Benjamin Constant, AM/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. RSC 03 | Benjamin Constant, AM/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. ALHO | Lavras, MG/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. SORGO | Lavras, MG/Brasil |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. PI | Piauí/Brasil |

Posteriormente, as larvas mortas foram transferidas para câmara seca, que consistiram de placas de Petri plásticas de 9 cm de diâmetro contendo um círculo de acrílico no centro do fundo da placa, coberto com papel filtro, onde as larvas ficaram suspensas (Figura 4). Após quatro dias foram acrescentados 5 mL de água destilada, ficando os nematoides retidos após abandonarem o cadáver do hospedeiro. A água contendo os nematoides era recolhida e transferida para uma proveta com um litro de água destilada, na qual os nematoides permaneciam por

24 horas, para a decantação e a purificação. Os nematoides decantados foram recolhidos e quantificados para serem utilizados nos experimentos.



FIGURA 4. Armadilha de White modificada, com lagartas de *Galleria mellonella* infectadas com nematoides.

3.3 Teste de virulência de nematoides entomopatogênicos a larvas de terceiro instar de *Diabrotica speciosa*

Foi avaliada a virulência de dezessete isolados de NEP (Tabela 2), pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, sobre larvas de *D. speciosa*. O bioensaio consistiu de cinco repetições, cada uma delas constituída por uma placa de Petri com diâmetro de 9 cm, contendo 15 g de vermiculita, 1,5 g de raízes de milho e 9 mL de água, para a qual foram transferidas dez larvas de terceiro instar de *D. speciosa* (Figura 5).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dezoito tratamentos (17 isolados de NEP + testemunha). Foi adicionado 1 mL de suspensão aquosa de NEP na concentração de 1500 JI/mL, correspondente a 150 JI/inseto, enquanto, na testemunha, foi adicionado 1 mL de água destilada.



FIGURA 5. Placa de Petri com vermiculita, raízes de milho e larvas de *Diabrotica speciosa*.

As placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. As avaliações foram realizadas três dias após a aplicação dos nematoides, com a contagem do número de larvas mortas. A sintomatologia das larvas mortas foi verificada para a confirmação da *causa mortis*, de acordo com as características típicas de morte causada pelos nematoides (Figuras 6A e 6B).



FIGURA 6. Larvas de *Diabrotica speciosa* infectadas com nematoides do gênero *Steinernema* (A) e *Heterorhabditis* (B).

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância e comparados, pelo teste de médias Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

3.4 Efeito de diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos sobre ovos, larvas e pupas de *Diabrotica speciosa*

Foram selecionados dois isolados de NEP dentre os mais virulentos obtidos no teste de virulência, *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *Steinernema glaseri*, para serem testados sobre larvas de terceiro instar e ovos em diferentes concentrações e um nematoide para o bioensaio com pupas.

Foi testado apenas o isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 sobre pupas de *D. speciosa*, devido à dificuldade de multiplicação de *S. glaseri* para a instalação do experimento.

Os experimentos foram mantidos em condições controladas à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas.

3.4.1 Teste com ovos

O bioensaio consistiu de cinco repetições, cada uma delas constituída por uma placa de Petri com diâmetro de 5 cm, contendo, no fundo, uma folha de papel filtro, para a qual foram transferidos dez ovos de *D. speciosa* com cinco dias de idade (Figura 7).



FIGURA 7. Placa de Petri com papel filtro e ovos de *D. speciosa*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram adicionados 0,3 mL de suspensão aquosa de NEP, nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 JI/inseto. Na testemunha, foram acrescentados 0,3 mL de

água destilada. A cada dois dias, foram acrescentados 0,25 mL de água destilada/placa de Petri, para manter a umidade. As avaliações foram realizadas diariamente, contando-se as larvas eclodidas dos ovos em cada repetição.

3.4.2 Teste com larvas de terceiro instar

O teste consistiu de cinco repetições, cada uma delas constituída por uma placa de Petri com diâmetro de 9 cm, contendo 15 g de vermiculita, 1,5 g de raízes de milho e 9 mL de água destilada, para a qual foram transferidas dez larvas de terceiro instar de *D. speciosa*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foi adicionado 1 mL de suspensão aquosa de NEP nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 JI por inseto e, na testemunha, foi adicionado 1mL de água destilada. As avaliações foram realizadas três dias após a instalação do experimento, contando-se as larvas mortas em cada repetição. A mortalidade das larvas por nematoides foi confirmada observando-se a sintomatologia.

3.4.3 Teste com pupas

O bioensaio consistiu de quatro repetições, cada uma delas constituída por uma placa de Petri com diâmetro de 9 cm, contendo 15 g de vermiculita e 9 mL de água destilada, para a qual foram transferidas oito pupas de *D. speciosa*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

O número de repetições, bem como o número de insetos por repetição, foi inferior aos utilizados nos testes anteriormente descritos, devido à dificuldade de obtenção de insetos nesta fase de desenvolvimento na criação em laboratório, no período da instalação dos experimentos.

Foi adicionado 1 mL de suspensão aquosa de NEP/placa de Petri nas concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 JI/inseto e, na testemunha, foi adicionado 1mL de água destilada/placa de Petri. As avaliações foram realizadas

três dias após a instalação do experimento, contando-se as pupas mortas por nematoides, em cada repetição. A mortalidade das pupas por nematoides foi confirmada observando-se a sintomatologia.

Os dados de mortalidade (larvas e pupas) ou de viabilidade dos ovos obtidos nas diferentes concentrações testadas de NEP foram submetidos à análise de regressão, a 5% de probabilidade, tendo como variável dependente a mortalidade do inseto e independente, as concentrações do nematoide.

3.5 Efeito da temperatura sobre a mortalidade de larvas de *Diabrotica speciosa* por nematoides entomopatogênicos

Foi realizado um bioensaio para estudar o efeito da temperatura, utilizando-se os nematoides *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri*. Os bioensaios consistiram de cinco repetições/tratamento, cada uma delas constituída por uma placa de Petri com diâmetro de 9 cm, contendo 15 g de vermiculita esterilizada, 1,5g de raízes de milho e 9 mL de água destilada, para a qual foram transferidas oito larvas de terceiro instar de *D. speciosa*. Os tratamentos foram as temperaturas de 15°, 20°, 22°, 25° e 28°C, mantidas constantes em cinco câmaras climatizadas, nas quais as placas de Petri permaneceram por três dias, com UR de 70±10 % e fotofase de 12 horas . Foi adicionado 1 mL de suspensão aquosa padronizada na concentração de 200 JI/inseto, que foi a concentração que causou maior mortalidade de larvas de *D. speciosa*, conforme testes realizados em condições de laboratório. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

As avaliações foram realizadas três dias após a instalação dos experimentos, contando-se as larvas mortas por NEP em cada repetição. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de regressão, 5% de probabilidade, sendo a temperatura a variável independente e a mortalidade de larvas a variável dependente.

3.6 Susceptibilidade de larvas de *D. speciosa* a nematoides entomopatogênicos, em condições de casa de vegetação

O bioensaio consistiu de seis repetições, cada uma delas constituída por um vaso plástico com capacidade para 2,5 litros, contendo solo esterilizado com 1/10 de vermiculita média esterilizada e 500 mL de água destilada. Foram semeadas oito sementes de milho em cada vaso e, após sete dias da semeadura, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas cinco plantas por vaso e transferiram-se vinte larvas de terceiro instar de *D. speciosa* em cada vaso.

As larvas foram colocadas a uma profundidade de cinco centímetros abaixo do nível do solo e próximo às raízes das plantas. Vinte e quatro horas após a transferência das larvas, foram adicionados 50 mL de suspensão aquosa de NEP, nas concentrações de 6.500, 13.000, 26.000 e 52.000 JI de *Heterorhabditis* sp. RSC01, por repetição (vaso). Os vasos correspondentes à testemunha receberam 50 mL de água destilada. A concentração de 6.500 JI/repetição foi estabelecida de acordo com resultados do teste realizado em condições de laboratório, que determinou a concentração letal máxima de *Heterorhabditis* sp. RSC01 sobre larvas de terceiro instar de *D. speciosa*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

A cultura utilizada foi a do milho, devido à adaptação das larvas criadas no laboratório a esta cultura, evitando maior estresse das mesmas durante o período de execução do experimento. A temperatura média mantida para o experimento foi de 27,4°C e a umidade relativa média de 62%.

As avaliações foram realizadas cinco dias após a instalação do experimento, contando-se as larvas vivas por repetição. Os dados de sobrevivência foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de virulência

Todos os nematoides testados causaram mortalidade de larvas de terceiro instar de *D. speciosa*, diferindo da testemunha, na qual não foi observada mortalidade. Entretanto, a virulência variou entre os diferentes isolados (Tabela 3).

Dentre os dezessete isolados testados, quatorze causaram mortalidade de larvas de *D. speciosa* superior a 50%, e os mais virulentos foram os isolados *Heterorhabditis* sp. RSC01 (94%), *S. glaseri* (84%), *Heterorhabditis* sp. JPM04 (82%) e *Heterorhabditis* sp. RSC05 (78%) (Tabela 3).

Não foi observada nenhuma relação entre o gênero do nematoide e a mortalidade de larvas, já que os nematoides mais virulentos são de gêneros diferentes, bem como os que apresentaram menor virulência (*S. riobravis*, *Heterorhabditis* sp. HP88 e *Heterorhabditis* sp. JPM01) (Tabela 3).

Toepfer et al. (2005) verificaram que o isolado *S. glaseri* NC originário dos EUA foi patogênico a larvas de terceiro instar de *D. v. virgifera*, em condições de laboratório.

Converse & Grewal (1998), visando selecionar NEP para o controle de *Cyclocephala hirta* LeConte, 1861 (Coleoptera: Scarabaeidae), verificaram que o isolado NJ65 de *S. glaseri* foi o mais virulento entre os 22 isolados testados, causando mortalidade larval de 76,5% em condições de laboratório, após três dias de exposição aos JI.

TABELA 3. Porcentagem de mortalidade de larvas de terceiro instar de *D. speciosa* por diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos na concentração de 150 JI/inseto (temperatura de 25±1°C, UR 70±10% e fotofase de 14 horas).

| Tratamento (isolado de NEP) | Mortalidade±EP (%) |
|--|---------------------------|
| <i>Heterorhabditis</i> sp. RSC01 | 94±2,34 a |
| <i>Steinernema glaseri</i> CCA | 84±3,66 a |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. JPM04 | 82±2,89 a |
| <i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05 | 78±3,61 a |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. RSC02 | 74±4,68 b |
| <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> | 72±2,89 b |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. JPM03 | 72±2,89 b |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. RSC03 | 70±3,76 b |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. ALHO | 68±3,61 b |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. PI | 68±4,39 b |
| <i>Steinernema feltiae</i> | 66±2,99 b |
| <i>Steinernema carpocapsae</i> | 64±4,55 b |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. SORGO | 56±2,99 b |
| <i>Steinernema anomali</i> | 54±4,42 b |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. JPM01 | 46±2,34 c |
| <i>Heterorhabditis</i> sp. HP88 | 38±4,66 c |
| <i>Steinernema riobrave</i> | 30±3,98 c |
| Testemunha | 0±0 d |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Rohde (2007), em trabalho que visou selecionar NEP para o controle da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae),

verificou que o isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 causou a maior mortalidade larval (87,5%) dentre os quatorze isolados testados em condições de laboratório, não diferindo estatisticamente apenas do isolado *S. carpocapsae* (86,3%).

Ellers-Kirk et al. (2000), testando os nematoides *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *S. riobraivis* em larvas de *A. vittatum*, praga do pepino, verificaram que todas estas espécies foram virulentas em condições de laboratório.

As características biológicas e comportamentais dos NEP podem afetar a sua capacidade de busca, bem como a capacidade de infectar o inseto hospedeiro, interferindo, dessa forma, na sua virulência e na sua eficiência como agente de controle biológico. Por isso, é fundamental que sejam realizados estudos de seleção de espécies e ou isolados de NEP, com a finalidade de identificar aqueles que apresentam potencial para serem utilizados no manejo integrado da praga-alvo.

Os resultados evidenciam que vários isolados de NEP são virulentos contra larvas de terceiro instar de *D. speciosa* e devem ser investigados, visando ao controle desta praga em condições naturais.

4.2 Efeito de diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos sobre ovos, larvas e pupas de *D. speciosa*

4.2.1 Teste com ovos

Não houve efeito dos nematoides *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri* sobre a mortalidade de ovos de *D. speciosa* em nenhuma das concentrações testadas (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4. Número médio de larvas de primeiro instar de *Diabrotica speciosa* eclodidas do total de dez ovos tratados e não tratados com as diferentes concentrações de JI de *Heterorhabditis* sp. RSC01 (temperatura de 25±1°C, UR 70±10% e fotofase de 14 horas).

| Tratamento | Média de larvas eclodidas/repetição* ± EP |
|-------------------|--|
| Testemunha | 8,6±1,29 |
| 25 JI/ovo | 4,6±0,74 |
| 50 JI/ovo | 5,8±1,64 |
| 100 JI/ovo | 6±1,64 |
| 150 JI/ovo | 6±1,11 |
| 200 JI/ovo | 4,4±1,91 |
| 250 JI/ovo | 8±1,26 |

* Análise de regressão não significativa ($p<0,05$).

TABELA 5. Número médio de larvas de primeiro instar de *Diabrotica speciosa* eclodidas do total de dez ovos tratados e não tratados com as diferentes concentrações de JI de *S. glaseri* (temperatura de 25±1°C, UR 70±10% e fotofase de 14 horas).

| Tratamento | Média de larvas eclodidas/repetição* ± EP |
|-------------------|--|
| Testemunha | 7,6±1,23 |
| 25 JI/ovo | 7,4±1,52 |
| 50 JI/ovo | 7,0±1,26 |
| 100 JI/ovo | 7,8±1,05 |
| 150 JI/ovo | 7,0±1 |
| 200 JI/ovo | 7,6±1,35 |
| 250 JI/ovo | 5,8±1,55 |

* Análise de regressão não significativa ($p<0,05$).

Estes resultados assemelham-se aos relatados por Jackson & Brooks (1995) que, trabalhando *D. v. virgifera*, não verificaram efeito do nematoide *S. carpocapsae* sobre a mortalidade de ovos deste inseto, em condições de laboratório.

Journey & Ostlie (2000), testando *S. carpocapsae* para o controle de *D. v. virgifera* em campo, também verificaram que este isolado não apresentou redução na viabilidade de ovos.

Segundo Jackson & Brooks (1995), a ausência de infectividade de NEP em ovos de vaquinhas pode estar relacionada à impermeabilidade dos ovos por esses organismos. No entanto, Toepfer & Kuhlmann (2004) relataram a ocorrência natural de NEP nativos em ovos de *D. v. virgifera* na Europa Central, entretanto, a identificação dos isolados não foi realizada.

Esses resultados diferem dos observados por Machado et al. (2005) que, trabalhando com *M. fryanus*, verificaram mortalidade de 53,33% de ovos inoculando 60 JI/ovo de *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992, não diferindo da concentração de 600 JI/ovo (60%).

4.2.2 Testes com larvas de terceiro instar

A mortalidade de larvas causada por *S. glaseri* variou entre 34% e 90%, nas concentrações de 50 JI/inseto e 200 JI/inseto e entre 64% e 96%, nas concentrações de 50 e 300 JI/inseto, quando aplicado *Heterorhabditis* sp. RSC01.

Foi encontrada relação entre as diferentes concentrações dos dois isolados estudados e a intensidade de mortalidade de larvas de *D. speciosa*, que foi ajustada pelo modelo quadrático de regressão (Figuras 9 e 10).

O ponto máximo de mortalidade observado para o isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 calculado pela equação resultante da análise de

regressão foi observado na concentração de 217 JI/inseto e, para o isolado *S. glaseri*, na concentração de 237 JI/inseto.

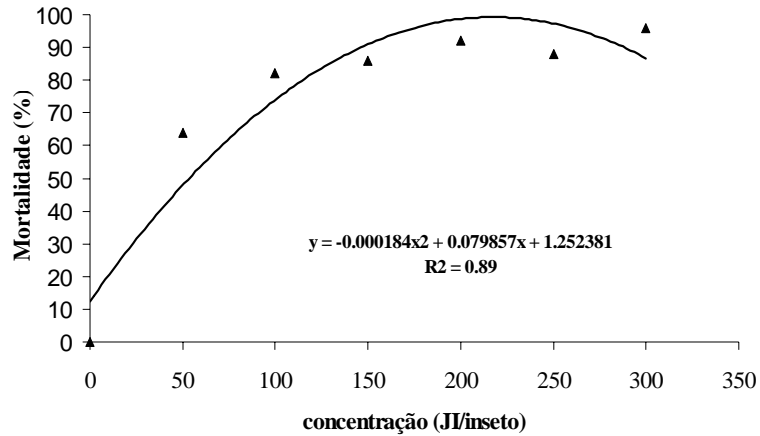


FIGURA 9. Relação entre as diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. RSC01 e a mortalidade de larvas de *Diabrotica speciosa* (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas).

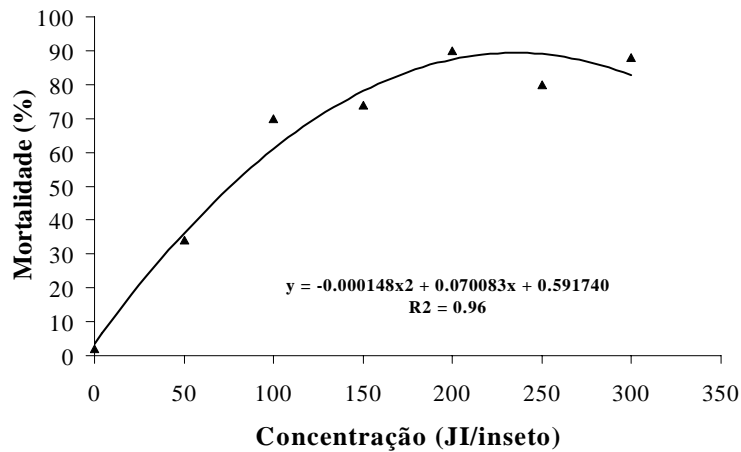


FIGURA 10. Relação entre as diferentes concentrações de juvenis infectantes de *S. glaseri* e a mortalidade de larvas de *Diabrotica speciosa* (temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas).

Com base na projeção da curva de regressão, observou-se um aumento da mortalidade com o aumento da concentração até a concentração de 200 JI/inseto, decrescendo na concentração de 250 JI/inseto, em ambos os tratamentos (Figuras 9 e 10). Estes resultados podem ser explicados por haver competição entre os nematoides nesta condição, interferindo na taxa de infectividade (Selvan et al., 1993).

Selvan et al. (1993) verificaram que a proporção de nematoides *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* infectando larvas de *G. mellonella* também declinou com o aumento da concentração de JI.

Rohde (2007), trabalhando com o nematoide *Heterorhabditis* sp. RSC01 sobre larvas de *C. capitata* em diferentes concentrações, observou um ponto máximo de mortalidade de 69,88% com a concentração de 293 JI/inseto em condições de laboratório.

Toepfer et al. (2005), testando a virulência de *S. glaseri* sobre larvas de terceiro instar de *D. v. virgifera* em diferentes concentrações, verificaram que houve aumento na mortalidade de larvas com o aumento da concentração, sendo observada uma mortalidade superior a 77% na concentração de 15,9 nematoides por cm².

Thurston & Yule (1990) verificaram que os NEP *S. feltiae* All e *S. bibionis* Sn foram patogênicos às larvas de terceiro instar de *Diabrotica barberi* Smith & Lawrence, 1967 (Coleoptera: Chrysomelidae), em condições de laboratório, sendo verificadas DL₅₀ de 49 e 100 JI/inseto, respectivamente.

Journey & Ostlie (2000), testando *S. carpocapsae* para o controle de *D. v. virgifera* em campo, verificaram que os insetos foram susceptíveis ao nematoide nas fases finais de desenvolvimento, isto é, no segundo e, principalmente, no terceiro instar de desenvolvimento, apresentando controle satisfatório apenas nestas fases do desenvolvimento.

4.2.3 Testes com pupas

O isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 foi patogênico a pupas de *D. speciosa*, causando mortalidade em todas as concentrações estudadas. Entretanto, a maior concentração testada (250 JI/inseto ou 31,44 JI/cm²) causou mortalidade superior a 80% (Figura 11). Da mesma forma que o observado para larvas, verificou-se relação positiva entre as diferentes concentrações do isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 e a mortalidade de pupas de *D. speciosa*, sendo essa relação ajustada pelo modelo quadrático de regressão (Figura 11). O ponto máximo de mortalidade calculado pela equação resultante da análise de regressão foi observado na concentração de 268 JI/inseto.

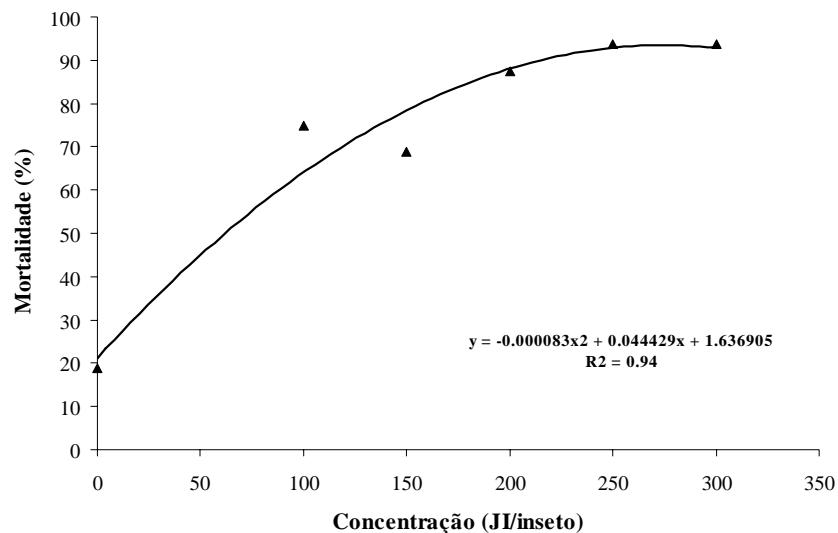


FIGURA 11. Relação entre as diferentes concentrações de juvenis infectantes do isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 e a mortalidade de pupas de *D. speciosa* (temperatura de 25±1°C, UR 70±10% e fotofase de 14 horas).

Jackson & Brooks (1995) verificaram que o nematoide *S. carpocapsae* foi bastante virulento a pupas de *D. v. virgifera*, sendo observada uma DL_{50} de 2,408 JI/inseto.

Yang et al. (2003), trabalhando com *S. feltiae* para o controle *L. suturalis*, verificaram mortalidade de pupas de 97,1% e 83%, em condições de laboratório, nas temperaturas de 25° e 15°C, respectivamente.

O efeito dos nematoides sobre as pupas de *D. speciosa* maximiza a ação desde entomopatógeno na redução da população deste inseto no campo a longo prazo, interferindo no crescimento populacional da praga e, conseqüentemente, evitando reinfestações da praga. Além disso, a redução da população de adultos no campo contribui para a redução das injúrias que estes insetos causam na parte aérea das plantas.

4.3 Efeito da temperatura sobre a mortalidade de larvas de *D. speciosa* por nematoides entomopatogênicos

A temperatura influenciou na infectividade dos nematoides *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri* a larvas de terceiro instar de *D. speciosa*, sendo observado um aumento na mortalidade com o aumento da temperatura.

Na temperatura de 15°C, os nematoides não causaram mortalidade larval, em ambos os tratamentos (isolados de NEP). Nas demais temperaturas, a mortalidade foi crescente com o aumento da temperatura para ambos os NEP estudados, sendo essa relação ajustada pelo modelo linear de regressão (Figuras 12 e 13).

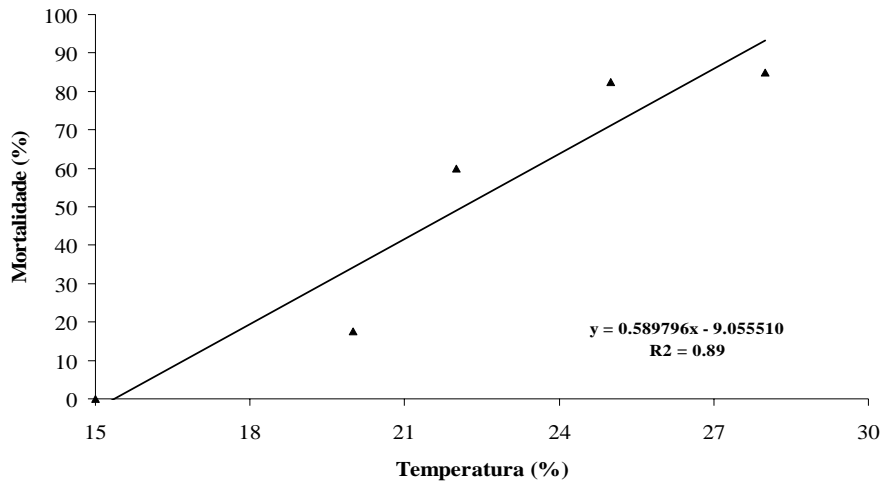


FIGURA 12. Relação entre as diferentes concentrações de juvenis infectantes testadas do isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 e as diferentes temperaturas sobre a mortalidade de larvas de *Diabrotica speciosa* (UR 70±10% e fotofase de 14 horas).

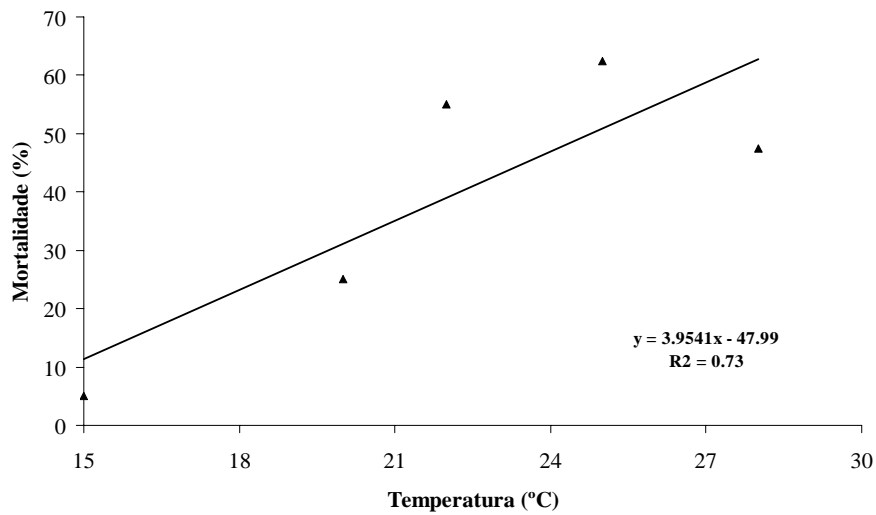


FIGURA 13. Relação entre as diferentes concentrações de juvenis infectantes do isolado *S. glaseri* e as diferentes temperaturas sobre a mortalidade de larvas de *D. speciosa* (UR 70±10% e fotofase de 14 horas).

Rohde (2007) verificou que houve relação diretamente proporcional entre a virulência do entomopatógeno *Heterorhabditis* sp. RSC01 e o aumento da temperatura, observando-se mortalidade máxima de larvas de *C. capitata* de 80% a 31°C, que foi a temperatura mais alta em que o bioensaio foi realizado. Isso confirma a possibilidade de utilização deste entomopatógeno para o controle de insetos-praga de ocorrência em regiões de clima tropical.

Boivin & Belair (1989), trabalhando com *S. feltiae* para o controle de *Listronotus oregonensis* LeConte, 1857 (Coleoptera: Curculionidae), verificaram um decréscimo na TL₅₀ com o aumento da temperatura.

A temperatura é o principal fator que interfere na mobilidade dos nematoides e, conseqüentemente, no gasto das suas reservas nutricionais e na sobrevivência dos JI (Molyneux, 1985). Nas temperaturas mais baixas, os nematoides cessam a movimentação, enquanto que nas temperaturas mais altas permanecem em intenso movimento, gastando assim mais energia (Andaló et al., 2006).

A redução na mortalidade de larvas de *D. speciosa* nas temperaturas mais baixas, para ambos os isolados testados, é um fator que deve ser levado em consideração no momento de utilização deste entomopatógeno no campo, tendo em vista a sua ampla distribuição territorial e as diferentes condições climáticas nas regiões em que este inseto se desenvolve. Em ambientes mais frios, a mortalidade dos insetos em curto período de tempo poderá ser afetada.

4.4 Susceptibilidade de larvas de *D. speciosa* a nematoides entomopatogênicos em condições de casa de vegetação

O nematoide *Heterorhabditis* sp. RSC01 reduziu a sobrevivência de larvas de *D. speciosa* no solo em todas as concentrações testadas, quando comparado à testemunha, sem, no entanto, diferirem entre si (Figura 14).

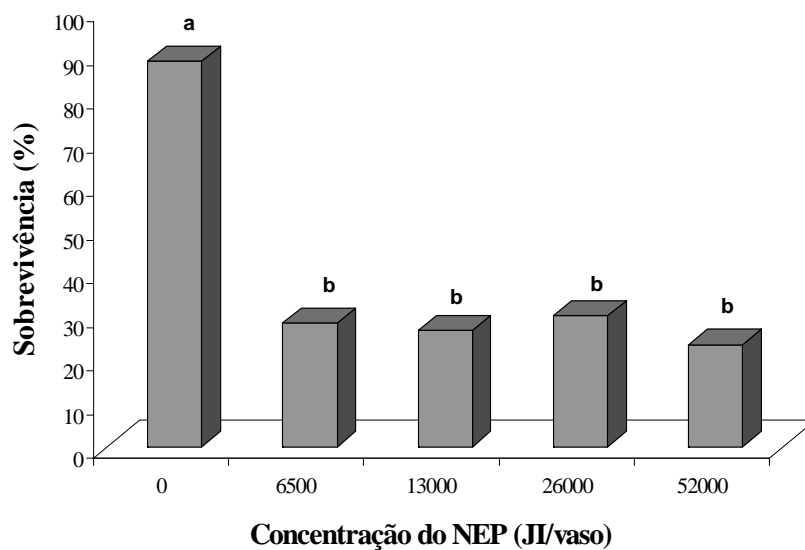


FIGURA 14. Porcentagem média de sobrevivência de larvas de *D. speciosa* nas diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis* sp. RSC01 por vaso, em condições de casa de vegetação.

A não constatação de diferenças de mortalidade de larvas de *D. speciosa* entre as quatro concentrações testadas evidencia que a concentração de 6.500 JI foi suficiente para causar a mortalidade máxima em casa de vegetação, sendo desnecessária a utilização de concentrações mais elevadas nesta condição.

Nos vasos tratados com nematoides, observou-se a sobrevivência média de 28,35%, 26,66%, 30% e 23,35% de larvas de *D. speciosa*, para as concentrações de 6.500 (31,44 JI/cm²), 13.000 (62,88 JI/cm²), 26.000 (125,76

JI/cm²) e 52.000 (251.52 JI/cm²) JI/repetição, respectivamente. Na testemunha, a sobrevivência média larval foi de 88,35%.

Estes resultados assemelham-se aos observados por Riga et al. (2001). Testando a eficiência dos nematoides *S. glaseri* e *S. feltiae* contra quatro espécies de pragas do milho, dentre elas as larvas de vaquinhas, em condições de laboratório e casa de vegetação, estes autores verificaram que ambas as espécies testadas apresentaram efeito sobre a mortalidade de todas as espécies de pragas, resultando em menor incidência de injúrias nas plantas de milho nas parcelas que receberam os tratamentos com NEP em relação à testemunha.

A concentração de *Heterorhabditis* sp. RSC01 que causou a mortalidade máxima de larvas de *D. speciosa* em condições de laboratório e casa de vegetação (31,41 JI/cm², equivalente a $3,1 \times 10^7$ JI/ha.) aproxima-se da concentração utilizada por Yang et al. (2003) que, trabalhando com *S. feltiae* para o controle de *L. suturalis* no campo, verificaram redução larval de 77,8% na concentração de 30 JI/cm², após 38 dias de tratamento e 92,4%, após cem dias de tratamento. Entretanto, Wright et al. (1993), trabalhando com *S. carpocapsae* para o controle de *D. v. virgifera* aplicados no campo, no sistema de irrigação com pivô-central na cultura do milho, observaram redução na taxa de injúrias nas plantas, bem como na emergência dos adultos, com a aplicação de nematoides nas concentrações de $1,2$ e $2,5 \times 10^9$ JI/ha., superiores à mencionada nesta pesquisa. Da mesma forma, Thurston & Yule (1990), testando os nematoides *S. feltiae* All e *S. bibionis* Sn contra larvas de *D. barberi* no campo, na cultura do milho, observaram que ambas as espécies de NEP testadas reduziram o número de larvas no solo com relação à testemunha, nas concentrações de $1,3 \times 10^8$ JI/ha e $1,3 \times 10^9$ JI/ha, não constatando diferença entre as espécies ou entre as concentrações testadas.

Toepfer et al. (2008), trabalhando com NEP para o controle de larvas de *D. v. virgifera* em condições de campo na cultura do milho, constataram que

todas as espécies de nematoides testadas (*H. bacteriophora*, *S. feltiae* e *H. megidis*) causaram redução na população do inseto no solo. Entretanto, a espécie mais virulenta foi *H. bacteriophora*, que causou redução de 81%. Os mesmos autores verificaram também que as espécies testadas reduziram a porcentagem de injúrias nas plantas, comprovando o potencial dos NEP para o controle de larvas de vaquinhas na cultura do milho.

Kurtz et al. (2007) também demonstraram que as espécies *H. bacteriophora*, *H. megidis* e *S. feltiae* apresentam capacidade de estabelecimento na cultura do milho por um período de até cinco meses, sendo promissoras para o controle de *D. v. virgifera* nesta cultura, com aplicações inundativas desses NEP no campo.

O sucesso que os NEP vêm demonstrando em estudos de laboratório, casa de vegetação e campo no controle de larvas de vaquinhas, bem como os resultados obtidos neste estudo em laboratório e casa de vegetação, confirma o grande potencial de *Heterorhabditis* sp. RSC01 para o controle de larvas de *D. speciosa*. Pode ser viável a sua utilização em estudos de campo visando ao controle desta praga em culturas tais como do milho irrigado e, especialmente, na da batata que, além de ser cultivada em áreas menores, requer bastante umidade para seu desenvolvimento, característica que favorece a sobrevivência e o desempenho dos NEP.

Apesar de esta pesquisa ter sido instalada somente em cultura de milho, é importante que este tipo de estudo seja realizado também com a cultura da batata, ou com outras culturas de interesse prático. A mudança de cultura em que se deseja controlar a praga pode também influenciar o desempenho do entomopatógeno, principalmente em condições de campo, pois os tratamentos culturais, como uso de agrotóxicos, irrigação, o tipo de solo, as características morfológicas das plantas, entre outros fatores, são diferentes entre as culturas.

O estudo em casa de vegetação foi realizado apenas com o isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01, devido à maior facilidade de multiplicação. Entretanto, a investigação em estudos posteriores com *S. glaseri*, bem como dos demais NEP que foram virulentos às larvas de *D. speciosa* é viável, pois o desempenho de um nematoide em condições de casa de vegetação e campo pode ser diferente do desempenho apresentado em condições de laboratório ou entre as diferentes regiões de ocorrência da praga.

O nematoide *S. glaseri* apresenta grande tolerância às condições adversas de temperatura e à falta de alimento (Molyneux, 1985; Grewal et al., 1994), além de apresentar o comportamento de busca do tipo “*cruiser*”, que permite o seu deslocamento à procura do inseto hospedeiro (Lewis et al., 1992; Kaya & Gaugler, 1993). Esta espécie de nematoide também tem sido utilizada em estudos visando o controle de outras pragas de solo, como o besouro japonês *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae) (Selvan et al., 1994), a vaquinha *D. v. virgifera* (Toepfer et al., 2005), o coró *C. hirta* (Converse & Grewal, 1998) e a lagarta *Pseudaletia unipuncta* Haworth (Lepidoptera: Noctuidae) (Medeiros et al., 2000), entre outras.

É importante ressaltar que a utilização de nematoides nativos deve ter prioridade sobre os exóticos e eles devem ser aplicados em último caso, respeitando-se as condições impostas pela legislação vigente. Além disso, os isolados nativos apresentam maiores chances de adaptação às condições ambientais do Brasil, bem como à entomofauna local (Dolinski & Moino Jr., 2006).

Nesta pesquisa, vários isolados nativos foram utilizados e apresentaram potencial para o controle de larvas *D. speciosa*. Estes devem ser também investigados com relação à sua especificidade, procurando utilizar comercialmente somente aqueles que apresentarem maior seletividade aos inimigos naturais (Dolinski & Moino Jr., 2006).

5 CONCLUSÕES

1. Todos os isolados de nematoides entomopatogênicos testados são patogênicos às larvas de terceiro instar de *D. speciosa*.
2. Os isolados *Heterorhabditis* sp. RSC01, *S. glaseri*, *Heterorhabditis* sp. JPM04 e *Heterorhabditis* sp. RSC05 são os mais virulentos para larvas de terceiro instar de *D. speciosa*.
3. A fase de ovo de *D. speciosa* não é susceptível aos isolados *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri*.
4. A fase de pupa de *D. speciosa* é susceptível ao nematoide *Heterorhabditis* sp. RSC01.
5. A virulência de *Heterorhabditis* sp. RSC01 e *S. glaseri* para larvas de *D. speciosa* é diretamente proporcional ao aumento da temperatura no intervalo de 15° e 28°C.
6. O isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 causa redução na sobrevivência de larvas de terceiro instar de *D. speciosa* no solo, em condições de casa de vegetação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILLERA, M. M.; VOSS, M.; PARON, M. J. F. O.; SALVADORI, J. R. Controle biológico de *Diloboderus abderus* (Coleoptera: Melolonthidae): estudos preliminares com nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 202-207. (Embrapa Soja. Documentos, 172).

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; MENDONÇA, L. A. Influência do tempo e da temperatura na reserva lipídica de juvenis infectantes de nematóides entomopatogênicos em armazenamento. In: CARVALHO, V. A. M. **Estudos taxonômicos e armazenamento de nematóides entomopatogênicos (Rhabditidae)**. 2006. 195 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 181-187, abr./jun. 2004.

ÁVILA, C. J.; GOMEZ, S. A. Ocorrência de pragas de solo no estado de Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001. Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 36-41. (Embrapa Soja. Documentos, 172).

ÁVILA, C. J.; MILANEZ, J. M. Larva-alfinete. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004. p. 211-232.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes hospedeiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 739-743, set./out. 2002.

ÁVILA, C. J.; TABAI, A. C. P.; PARRA, J. R. P. Comparação de técnicas para a criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 257-267, jun. 2000.

ÁVILA, C. J. **Técnica de criação e influência do hospedeiro e da temperatura no desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 1999. 103 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

BOIVIN, G.; BELAIR, G. Infectivity of two strains of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in relation to temperature, age, and sex of carrot weevil (Coleoptera: Curculionidae) adults. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 82, n. 3, p. 762-765, 1989.

CONSOLO, V. F.; SALERNO, G. L.; BERON, C. M. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. **BioControl**, Dordrecht, v. 48, n. 6, p. 705-712, Dec. 2003.

CONVERSE, V.; GREWAL, P. S. Virulence of entomopathogenic nematodes to the western masked chafer *Cyclocephala hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 2, p. 428-432, 1998.

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Manejo as pragas iniciais de milho mediante o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, 2004. 541 p.

DOLINSKI, C.; MOINO JÚNIOR, A. Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos ou exóticos : o perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 139-149, 2006.

ELLERS-KIRK, C. D.; FLEISCHER, S. J.; SNYDER, R. H.; LYNCH, J. P. Potential of entomopathogenic nematodes for biological control of *Acalymma vittatum* (Coleoptera: Chrysomelidae) in cucumbers grown in conventional and organic soil management systems. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 93, n. 3, p. 602-612, May 2000.

ELLSBURY, M. M.; JACKSON, J. J.; WOODSON, W. D.; BECK, D. L.; STONGE, K. A. Efficacy, application, distribution, and concentration by stem flow of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) suspensions applied with a lateral move irrigation system for corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) control in maize. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, n. 1, p. 74-81, 1996.

FERRAZ, L. C. C. B.; LEITE, L. G.; LOPES, R. B.; MOINO JÚNIOR, A.; DOLINSKI, C. Utilização de nematóides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 414p.

FERREIRA, E.; BARRIGOSI, A. F. **Insetos orizívoros da parte subterrânea**. Passo Fundo, Embrapa Trigo, 2006. 52 p (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 190).

GASSEN, D. N. **Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil**. Passo Fundo: Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, 1989. 49 p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 13).

GAUGLER, R.; GREWAL, P.; KAYA, H.; SMITH-FIOLA, D. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological CONTROL**, San Diego, v. 17, n.1, p. 100-109, Jan. 2000.

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

GREWAL, P. S.; SELVAN, S.; GAUGLER, R. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes : Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**, v. 19, n.4, p. 245-253, Aug. 1994.

GRÜTZMACHER, A. D.; LINK, D. Levantamento da entomofauna associada a cultivares de batata em duas épocas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 653-659, mar. 2000.

JACKSON, J. J.; BROOKS, M. A. Parasitism of western corn rootworm larvae and pupae by *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 27, n. 1, p. 15-20, Mar. 1995.

JACKSON, J. J.; BROOKS, M. A. Susceptibility and immune response of western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae) to the entomogenous nematode, *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, p. 1073–1077, 1989.

JACKSON, J. J. Field performance of entomopathogenic nematodes for suppression of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, n. 2, p. 366-372, 1996.

JOURNEY, A. M.; OSTLIE, K. R. Biological control of the western corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae) using the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 29, p. 822-831, 2000.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 38, p. 181-206, Jan.1993.

KURTZ, B.; TOEPFER, S.; EHLERS, R. U.; KUHLMANN, U. Assessment of establishment and persistence of entomopathogenic nematodes for biological control of western corn rootworm. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 131, n. 6, p. 420-425, July 2007.

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

LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; BÚSSOLA, R. A.; AMORIM, D. S.; AMBRÓS, C. M.; HARAKAVA, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 em substratos orgânicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 4, p. 337-342, out./dez. 2007.

LEWIS, E. E.; GAUGLER, R.; HARRISON, R. Entomopathogenic nematode host finding: Response to host contact cues by cruise and ambush foragers. **Parasitology**, New York, v. 105, n. 2, p. 309-316, 1992.

MACHADO, L. A.; HABIB, M.; LEITE, L. G.; CALEGARI, L. C.; GOURLART, R. M.; TAVARES, F. M. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 221-226, abr./jun. 2005.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 1983-1986, nov. 1999.

MEDEIROS, J.; ROSA, J. S.; TAVARES, J.; SIMÕES, N. Susceptibility of *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) isolated in the azores: Effect of nematode strain and host age. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 5, p. 1403-1408, Oct. 2000.

MENEZES, J. R.; PASINI, A. Perspectivas para o uso do controle biológico por parasitóides e predadores no manejo de pragas de solo. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 115-132. (Embrapa Soja. Documentos, 172).

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Biologia e exigências térmicas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 23-29, mar. 2000a.

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Preferência de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) para oviposição em diferentes tipos e umidade de solos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 155-158, mar. 2000b.

MOLYNEUX, A. S. Survival of infective juveniles *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. **Revue Nematology**, v. 8, n. 2, p. 165-170, 1985.

NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. M.; GREWAL, P. S. Pragas brasileiras de solo com potencial de serem controladas com nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 8., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 273-278. (Embrapa Soja. Documentos, 172).

NAVA, D. E.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. **Atividade diurna de adultos de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho e de *Cerotoma arcuatus* na cultura da soja.** Dourados, MS: Centro de Pesquisa Agropecuária Oeste, 2004. 25 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 64).

PARON, M. J. F. O.; ITO, R. M.; AGUILERA, M. M.; RODRIGES, R. C. D. Controle biológico de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae): estudos preliminares com nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae). In: CONGRESSO NACIONAL DE

PESQUISA DE FEIJÃO, 7, Viçosa, **Resumos...** Viçosa, MG: UFV, 2002. 842 p.

PEREIRA, T.; VENTURA, M. U.; MARQUES, F. A. Comportamento de larvas de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em resposta ao CO₂ e a plântulas de espécies cultivadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 981-985, set./out. 2005.

RIGA, E.; WISTLECRAFT, J.; POTTER, J. Potential of controlling insect pests of corn using entomopathogenic nematodes. **Canadian Journal of Plant Sciences**, Ottawa, v. 81, n. 4, p. 783-787, Oct. 2001.

ROHDE, C. **Avaliação de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida) para o controle da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SALLES, L. A. Eficiência do inseticida thiametoxan (Actara) no controle das pragas de solo da batata, *Diabrotica speciosa* (Col. Chrysomelidae) e *Heteroderes* spp. (Col. Elateridae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 2, p. 149-151, 2000.

SALLES, L. A.; GRÜTZMACHER, A. D. Eficiência do inseticida clorpirifós no controle de larvas de *Diabrotica speciosa* (Germ.) (Coleoptera: Chrysomelidae) na cultura da batata. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 195-197, maio/jun. 1999.

SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotriga, 2004. 541 p.

SANTOS, B. Ocorrência de pragas de solo no Estado do Paraná. In: REUNIÃO SUL-BRASILEIRA DE INSETOS DO SOLO, 4., 1993, Passo Fundo. **Anais e Ata...** Passo Fundo: Embrapa-CNPT/SEB, 1997. p. 51-56.

SCHMIDT, W.; DOURADO NETO, D.; FANCELLI, A. L.; MANFRON, P. A. Ensaio de dose-resposta de clorpirifós no controle de larvas alfinete (*Diabrotica speciosa*) (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho, aplicado por pivô central. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 153-160, 2004.

SELVAN, S.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, n. 3, p. 278-284, Nov. 1993.

SELVAN, S.; GREWAL, P. S.; GAUGLER, R.; TOMALAK, M. Evaluation of steinernematid nematodes against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: species, strains, and rinse after application. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 87, n.3, p. 605-609, 1994.

SILVA-WERNECK, J. O.; FARIA, M. R.; ABREU NETO, J. R. M. V.; MAGALHÃES, B. P.; SCHMIDT, F. G. V. Técnica de criação de *Diabrotica speciosa* (Germ) (Coleoptera: Chrysomelidae) para bioensaios com bacilos e fungos entomopatogênicos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 1, p. 45-52, 1995.

THURSTON, G. S.; YULE, W. N. Control of larval northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*) with two Steinernematid nematode species. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 1, p. 127-131, Jan. 1990.

TOEPFER, S.; GUELLENZOPH, C.; EHLERS, R. U.; KUHLMANN, U. Screening of entomopathogenic nematodes for virulence against the invasive western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 95, n.5, p. 473-482, Oct. 2005.

TOEPFER, S.; KUHLMANN, U. Survey for natural enemies of the invasive alien chrysomelid, *Diabrotica virgifera virgifera*, in Central Europe. **BioControl**, Dordrecht, v. 49, n.4, p. 385-395, Aug. 2004.

TOEPFFER, S.; PETERS, A.; EHLERS, R. U.; KUHLMANN, U. Comparative assessment of the efficacy of entomopathogenic nematode species at reducing western corn rootworm larvae and root damage in maize. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 132, n. 5, p. 337-348, June 2008.

VIANA, P. A.; MAROCHI, A. I. Controle químico da larva de *Diabrotica* spp. na cultura do milho em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 1-11, 2002.

WAQUIL, J. M.; ÁVILA, C. J.; VIANA, P. A. **Ocorrência e controle de pragas na cultura do milho no Mato Grosso do Sul - Safrinha**. Sete Lagoas, MG: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo, 2004. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 46).

WOODRING, L.; KAYA, H. K. **Steinernematid and heterorhabditid nematodes** : a handbook of techniques cooperative. Arkansas: Arkansas Agricultural Experiment Station Fayetteville, 1988. v. 331, 30 p (Series Bulletin).

WRIGHT, R. J.; WITKOWSKI, J. F.; ECHTENKAMP, G.; GEORGIS, R. Efficacy and persistence of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) applied through a center-pivot irrigation system against larval corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 86, n. 5, p. 1348-1354, 1993.

YANG, X.; JIAN, H.; LIU, Z.; YANG, H.; YUAN, J.; QUANLI, Z.; SHYANGYUE, L. Evaluation of entomopathogenic nematodes for control of the beetle, *Luperomorpha suturalis* Chen (Col., Chrysomelidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 127, n. 7, p. 377-382, Aug. 2003.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba: Fealq, 1993. 139 p.