



LUCAS MACHADO DE SOUZA

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E SUA
COMPATIBILIDADE COM O
NEONICOTINOIDE IMIDACLOPRIDE
VISANDO O CONTROLE DE *Spodoptera
frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera:
Noctuidae) EM VIVEIRO FLORESTAL**

LAVRAS – MG

2011

LUCAS MACHADO DE SOUZA

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E SUA COMPATIBILIDADE
COM O NEONICOTINOIDE IMIDACLOPRIDE VISANDO O
CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae) EM VIVEIRO FLORESTAL**

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 a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Alcides Moino Júnior

LAVRAS – MG

2011

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

Souza, Lucas Machado de.

Nematoides entomopatogênicos e sua compatibilidade com o
neonicotinoide imidaclopride visando o controle de *Spodoptera*
frugiperda (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em
viveiro florestal / Lucas Machado de Souza. – Lavras : UFLA, 2011.
56 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Alcides Moino Júnior.

Bibliografia.

1. Controle microbiano de pragas. 2. Heterorhabditidae. 3.
Steinernematidae. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9696

LUCAS MACHADO DE SOUZA

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E SUA COMPATIBILIDADE
COM O NEONICOTINOIDE IMIDACLOPRIDE VISANDO O
CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae) EM VIVEIRO FLORESTAL**

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 a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em _____ de julho de 2011.

Dr. Ronald Zanetti

UFLA

Dr. Luís Garrigós Leite

Instituto Biológico/Campinas

Dr. Alcides Moino Júnior

Orientador

LAVRAS-MG

2011

Aos meus pais, José Mario e Maria José, pela confiança, carinho, companheirismo, dedicação, preocupação e amor incondicional durante toda a vida. A meu irmão, Thiago; cunhada, Jordânia; sobrinha, Maria Clara e minha irmã, Marcelle, pela amizade e bons momentos que sempre passamos juntos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Entomologia e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, pelos ensinamentos e convivência.

Ao professor Dr. Alcides Moino Júnior, pela oportunidade em poder trabalhar com nematoides entomopatogênicos. Obrigado pela orientação, conselhos e ensinamentos de grande relevância na condução deste trabalho e ao meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Ronald Zanetti, pelas sugestões e parceria na elaboração desta dissertação e apoio em todas as fases dos trabalhos.

Ao professor Dr. Luís G. Leite, pela participação como membro da banca de defesa.

À Natalia e ao Marco Aurélio, pela parceria na realização deste trabalho e amigos incondicionais que foram durante essa jornada.

Aos colegas e bolsistas de Iniciação Científica do Laboratório de Patologia, Flavio e Pedro, pela ajuda nos experimentos.

Aos pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Dr. Edison R. Sujii, Dra. Joseane P. Silva e Dr. Rogério B. Lopes, por toda colaboração na leitura da dissertação e sugestões estatísticas.

A todos os colegas da pós-graduação da UFLA, em especial aos da minha turma de mestrado pelo companheirismo nos momentos tanto de estudo e quanto de lazer.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia (DEN), por toda a cooperação neste mestrado.

A todos os colegas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, que me receberam tão bem no novo ambiente de trabalho e apoiaram a conclusão da presente dissertação.

RESUMO

A patogenicidade e a virulência de diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos (NEP) do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foi avaliada em laboratório. Além disso, avaliaram-se a viabilidade e a infectividade dos isolados mais virulentos combinados com o produto fitossanitário imidaclopride (700WG), visando à utilização sinérgica em mudas de *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) em viveiros florestais. O primeiro bioensaio foi composto de 30 tratamentos provenientes de 6 isolados de NEP testados em cinco concentrações distintas: 0 (testemunha), 70, 150, 300 e 600 juvenis infectivos (JI) em suspensão com 0,5 mL de água destilada, aplicados topicamente em lagartas. Cada tratamento consistiu de 42 lagartas individualizadas dispostas em sete repetições com seis sub-repetições. Durante cinco dias de exposição, verificou-se diariamente a sobrevivência das lagartas com registro de mortalidade e armazenamento das mortas para confirmação do agente causal. Os dados obtidos foram submetidos à análise de agrupamento e, criou-se um modelo com distribuição binomial. A compatibilidade dos melhores isolados do experimento anterior (*H. amazonensis* RSC05, *Heterorhabditis* sp. (JPM4) e *H. bacteriophora* HP88), com o inseticida imidaclopride, foi avaliada usando a metodologia sugerida por Negrisoli Júnior, Barbosa e Moino Júnior (2008), com modificações. Um litro da formulação de imidaclopride foi preparado proporcionalmente à concentração recomendada em alta infestação (500g/100L de água). Os tratamentos foram realizados em cinco repetições, formados cada um por placa de Petri com 20 mL da calda do inseticida e 2.500 JI suspensos em 1 mL de água destilada dos respectivos isolados. Como testemunha, 1 mL da suspensão do isolado foi misturado a 20 mL de água destilada. A viabilidade dos nematoides foi avaliada 48 horas após a exposição ao produto. Para tanto, pequenas alíquotas foram retiradas da suspensão e observados 100 JI de cada repetição em microscópio estereoscópico, para determinar a mortalidade. Para verificar a infectividade, os nematoides foram lavados em 200 mL de água destilada, em peneiras para retirar o inseticida e uma alíquota de 0,2 mL foi pipetada em oito lagartas de *S. frugiperda* individualizadas em copos plásticos por repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. Todas as concentrações do gênero *Heterorhabditis* causaram mortalidade, com exceção da testemunha. Os isolados *H. amazonensis* RSC 05, *Heterorhabditis* sp. (JPM 4) e *H. bacteriophora* HP88 são patogênicos a lagartas de *S. frugiperda*, em laboratório, sendo que o isolado *H. amazonensis* RSC 05 foi o mais virulento. Além disso, verificou-se que os isolados do gênero *Heterorhabditis* são mais virulentos que os *Steinernema*. O produto imidaclopride não afetou a viabilidade

nem a infectividade dos NEP, quando comparado com os tratamentos testemunha sem o produto.

Palavras-chave: Compatibilidade. Controle Microbiano de Pragas. Heterorhabditidae. Steinernematidae.

ABSTRACT

The pathogenicity and virulence of different isolates of entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) were evaluated in laboratory. In addition, the viability and infectivity of the most virulent isolates combined with the insecticide imidacloprid (700WG) were verified, aiming synergistic use in *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) in forest nurseries. The first bioassay was carried out with 30 treatments from 6 isolates of NEP tested in five different concentrations: 0 (control), 70, 150, 300, 600 infective juvenile (JI) in 0.5 mL of distilled water applied topically on caterpillars. Each treatment consisted of 42 individual caterpillar arranged in seven replications with six subreplicates. During five days of exposure, the larvae survival and daily mortality were registered. The dead individuals were storage to confirm the death agent. The data were subjected to cluster analysis and then created a model with binomial distribution. The compatibility of the best strains from the previous experiment (*H. amazonensis* RSC05 *Heterorhabditis* sp. (JPM4) and *H. bacteriophora* HP88) with imidacloprid insecticide was based on the methodology suggested by Negrisoni Júnior, Barbosa e Moino Júnior (2008) with modifications. One liter of insecticide formulation was prepared in the concentration recommended in high infestation (500g/100L water). Experiments were carried out in five replicates each formed by a Petri dish with 20 mL of insecticide formulation and 2500 JI of each isolate contained in 1 mL of distilled water. As a control, 1 mL of the suspension of the isolate was mixed with 20 mL of distilled water. The viability of nematodes was assessed 48 hours after exposure. For this, small aliquots were took away from the suspension and observed 100 JI of each replicate in a stereoscopic microscope to determine the mortality. To verify the infectivity, the nematodes were washed in 200 mL of distilled water in sieves to remove the insecticide and a aliquot of 0.2 mL was pipetted into eight larvae of *S. frugiperda* kept individually in plastic cups per replicate. The data were subjected to ANOVA. All concentrations of the genus *Heterorhabditis* caused mortality, except for control. The isolated *H. amazonensis* RSC05, *Heterorhabditis* sp. (JPM 4) and *H. bacteriophora* HP88 are pathogenic to larvae of *S. frugiperda* in the laboratory and the isolate *H. amazonensis* RSC05 was the most virulent. Moreover, the isolates of the genus *Heterorhabditis* are more virulent than the *Steinernema*. Imidacloprid did not affect the viability and infectivity of NEP compared with the control treatments without the insecticide.

keywords: Compatibility Biological Control of Pests. Heterorhabditidae. Steinernematidae.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Aspectos gerais de viveiros de mudas de <i>Eucalyptus spp.</i>	14
2.2	<i>Spodoptera frugiperda</i>	16
2.3	Controle microbiano de pragas.....	18
2.4	Nematoides entomopatogênicos	19
2.4.1	Aspectos biológicos e biodiversidade	19
2.4.2	Estratégia de forrageamento.....	22
2.4.3	Importância dos nematoides entomopatogênicos no controle microbiano.....	23
2.5	Interação entre entomopatógenos e produtos fitossanitários.....	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Obtenção de isolados de nematoides entomopatogênicos.....	28
3.2	Criação de <i>Galleria mellonella</i>	28
3.3	Multiplicação e manutenção de nematoides entomopatogênicos	29
3.4	Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i>	30
3.5	Patogenicidade e virulência de isolados de nematoides entomopatogênicos a <i>S. frugiperda</i>	32
3.6	Compatibilidade de isolados de NEP com produto fitossanitário	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Patogenicidade e virulência de isolados de nematoides entomopatogênicos a <i>S. frugiperda</i>	36
4.2	Compatibilidade de isolados de NEP com produto fitossanitário	44
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta área total de florestas plantadas de 6.310.450 hectares, dos quais 4.516.000 hectares correspondem a espécies do gênero *Eucalyptus* L'Hér, 1788 (Magnoliophyta: Myrtaceae). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas - ABRAF (2010), o plantio de eucalipto no Brasil se destina, basicamente, à produção de celulose e papel e ao carvão vegetal que abastece as siderúrgicas.

A estimativa total de empregos (primários e no processamento industrial) no segmento de florestas plantadas, em 2009, foi de 3,9 milhões, incluindo os diretos (535,0 mil), os indiretos (1,26 milhão) e aqueles resultantes do efeito-renda (2,16 milhões). Em relação aos tributos arrecadados em 2009, a contribuição do setor foi estimada em R\$ 8,15 bilhões, representando 0,75% de participação deste setor no total do Brasil (ABRAF, 2010).

Em 2007, a indústria de base florestal brasileira apresentou um PIB de 44,6 bilhões de reais, representando uma participação significativa de 3,4% do PIB nacional (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA - SBS, 2008). No mesmo período, as exportações de produtos de base florestal geraram US\$ 9,1 bilhões, correspondendo a 5,6% do total exportado pelo país.

O processo de propagação vegetativa por miniestaquia em tubetes de plástico para atender ao processo de produção massal de mudas de *Eucalyptus* em viveiros florestais é uma das fases mais importantes no processo de implantação de povoamentos florestais. Esse processo tem sido adotado pela maioria das empresas eucaliptocultoras brasileiras, devido ao menor custo e às vantagens de operação (ALFENAS et al., 2004).

A qualidade das mudas de viveiros no momento do plantio no campo a fim de garantir uma floresta de alta produtividade, depende, dentre outros

fatores, de um manejo adequado de pragas, como *Spodoptera frugiperda* Smith & Abbot, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae).

As lagartas de *S. frugiperda* têm o hábito de decepar a muda de eucalipto no coleto, carregando-a para abrigos entre os recipientes ou em túneis feito pelas mesmas. Os danos são mais sérios nos primeiros dias após a germinação das sementes ou em brotações novas de jardins clonais cultivadas em canteiros de areia (ZANETTI, 2008). Em condições favoráveis para essa praga, entre 50% a 100% das mudas podem ser destruídas ou severamente danificadas (ANJOS; SANTOS; ZANUNCIO, 1986).

Poucos produtos à base de inimigos naturais das pragas estão disponíveis para as indústrias de viveiros florestais, bem como as áreas de plantio, justificando grandes investimentos em insumos, estimados em R\$ 7,2 bilhões de reais de 2009 a 2014, que geram problemas ambientais, econômicos e sociais (ABRAF, 2010).

O controle microbiano de insetos à base de nematoides entomopatogênicos torna-se uma alternativa viável, eficiente e segura, com características que os tornam vantajosos em relação a outros agentes de controle biológico (KOPPENHÖFER, 2007). Por isso, verifica-se a necessidade de se desenvolver um produto biológico às condições dos viveiros florestais e que possa ser compatível com produtos fitossanitários no combate de pragas.

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de:

- a) avaliar a patogenicidade e a virulência de diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* a lagartas de *S. frugiperda* em laboratório;
- b) avaliar a viabilidade e a infectividade dos isolados mais virulentos combinados com imidaclopride em lagartas de *S. frugiperda* em laboratório.

Associado aos objetivos, as seguintes hipóteses científicas foram propostas:

- a) hipótese nula (H_0): não existe a possibilidade de uso de nematoides entomopatogênicos como bioinseticidas contra *S. frugiperda*, devido às baixas taxas de mortalidade que eles provocam;
- b) hipótese alternativa (H_1): existe a possibilidade de uso de nematoides entomopatogênicos como bioinseticidas contra *S. frugiperda*, devido às altas taxas de mortalidade que eles provocam;
- c) hipótese nula (H_0): não existe a possibilidade de uso de nematoides entomopatogênicos como bioinseticidas contra *S. frugiperda*, devido à incompatibilidade com o produto imidaclopride, utilizado no manejo da praga;
- d) hipótese alternativa (H_1): existe a possibilidade de uso de nematoides entomopatogêncios como bioinseticidas contra *S. frugiperda*, devido à compatibilidade com imidaclopride utilizado no manejo da praga.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais de viveiros de mudas de *Eucalyptus* spp.

O eucalipto foi introduzido no Brasil no início do século XX, com o objetivo de ajudar a produção de dormentes para as linhas férreas. O gênero *Eucalyptus* L'Hér, 1788 é nativo da Austrália, pertencente à família Myrtaceae e, segundo Oliveira (2001), abrange cerca de 720 espécies e subespécies.

No entanto, Silva e Matos (2003) afirmam que quatro espécies e poucos híbridos são responsáveis por aproximadamente 94% dos plantios brasileiros: *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden (55%), *E. saligna* Smith (17%), *E. urophylla* S.T. Blake (9%), *E. viminalis* Labill. (2%) e híbridos de *E. grandis* x *E. urophylla* (11%).

As florestas com eucalipto estão em franca expansão na maioria dos estados brasileiros com tradição na silvicultura deste grupo de espécies (destaque para Minas Gerais com a maior área de plantio) ou em estados considerados como novas fronteiras da silvicultura. O crescimento médio no país foi de 7,1% ao ano, entre 2004-2009 (ABRAF, 2010).

No Brasil, o plantio de eucalipto destina-se basicamente à produção de celulose, papel e carvão vegetal que abastece as siderúrgicas. Em 2009, por exemplo, o Brasil tornou-se o quarto maior fabricante mundial de celulose, passando à frente de tradicionais países produtores, como Finlândia e Suécia (ABRAF, 2010).

Os produtos florestais brasileiros são considerados muito competitivos no mercado internacional. As exportações de produtos oriundos das florestas plantadas têm apresentado crescimento contínuo nos últimos anos, devido, principalmente, às vantagens competitivas do setor e ao aumento do consumo

mundial por produtos florestais, notadamente de celulose e compensado de *Pinus* spp. (Pinophyta: Pinaceae) (SBS, 2008).

A alta competitividade deve-se à silvicultura clonal, principalmente de *Eucalyptus*, iniciada no Brasil na década de 1970, sendo uma das melhores formas de maximização da produtividade das florestas por meio da propagação vegetativa de genótipos selecionados. O estabelecimento de florestas clonais proporcionou maior uniformidade, melhor adaptação dos clones aos ambientes de plantio, maior produção de madeira, racionalização das atividades operacionais e redução na idade de corte e nos custos de colheita e transporte (SILVA, 2001).

O processo de propagação vegetativa do eucalipto por miniestaquia em tubetes de plástico, para atender ao processo de produção massal de mudas em viveiros florestais, tem sido adotado pela maioria das empresas eucaliptocultoras brasileiras, devido ao menor custo e às vantagens de operação (ALFENAS et al., 2004).

A utilização de mudas saudáveis a fim de garantir uma floresta de alta produtividade depende, dentre outros fatores, de um manejo integrado de pragas e doenças em viveiros florestais. Segundo Gallotti (2008), diversas são as doenças que acometem o cultivo em viveiros florestais. As doenças fúngicas são as mais importantes, causando tombamento de mudas, podridão de raízes e estacas e ressecamento de folhas. Raramente, nematoides fitopatogênicos têm sido encontrados e, quando ocorrem, não causam sérios danos.

Por outro lado, a incidência de insetos praga pode levar à perda de um grande número de mudas por morte ou deformações. Em viveiros florestais, os principais insetos que danificam mudas são lagartas-rosca, como as dos gêneros *Agrotis* Ochsenheimer, 1816 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae); grilos, *Gryllus assimilis* (Fabricius, 1775) (Orthoptera: Gryllidae); paquinhos, *Gryllotalpa hexadactyla* (Perty, J.A.M.,

1832) (Orthoptera: Gryllotalpidae); cupins do gênero *Syntermes* Holmgren, 1910 (Isoptera: Termitidae); formigas cortadeiras, *Atta* Fabrícus, 1804 e *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae); mosca-minadora, *Liriomyza* Dik, 1894 (Diptera: Agromyzidae) e mosca-dos-fungos, *Bradysia* Winnertz, 1867 (Diptera: Sciaridae) (ANJOS; SANTOS; ZANUNCIO, 1986).

Dentre as lagartas que têm causado danos às mudas em viveiros florestais, destacam-se *Spodoptera frugiperda* Smith & Abbot, 1797, *Spodoptera latifascia* Walker, 1856, *Spodoptera eridania* Stoll, 1781, *Agrotis repleta* Walker, 1857, *Agrotis subterranea* Fabricius, 1794 e *Agrotis ipsilon* Hüfnagel, 1766 (ANJOS; SANTOS; ZANUNCIO, 1986).

O manejo adequado dessas pragas pode garantir a qualidade final necessária das mudas de viveiros florestais, apresentando, assim, um diâmetro de coleto adequado, raízes bem formadas, proporcionalidade entre a parte aérea e o sistema radicular e bom estado nutricional (PAIVA, 2004).

2.2 Spodoptera frugiperda

Spodoptera frugiperda (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida no estágio larval como lagarta-do-cartucho-do-milho, é uma das mais importantes pragas da cultura do milho do Brasil, alimentando-se da planta em todas as fases de crescimento, embora tenha preferência por cartuchos de plantas jovens (CLARK et al., 2007).

Sua coloração é escura e, com o passar do tempo, apresenta faixa dorsal com pontos pretos (pináculos) na base das cerdas. A cabeça é preta, com uma linha clara em forma de Y, nitidamente perceptível. A mariposa mede aproximadamente 35 mm de envergadura, com as asas anteriores pardo-escuras e posteriores branco-acinzentadas. As fêmeas realizam a postura sobre as folhas, em grupos de 50 a 300 ovos, podendo chegar a 1000 ovos. Os períodos de

duração das fases de ovo, larva, pupa e adulto são, em média, de 3, 25, 11 e 12 dias, respectivamente, podendo, a partir do segundo estágio de desenvolvimento larval, apresentar canibalismo (GALLO et al., 2002).

Em viveiros florestais, *S. frugiperda* é chamada de lagarta-rosca, devido ao hábito de se enrodilhar em forma de rosca, quando tocada. As lagartas abrigam-se em túneis ou galerias entre os recipientes ou entulhos, decepam a muda de eucalipto no coleto, carregando-a para o abrigo ou desfolham as plantas, principalmente em reboleira. Os danos são maiores nos primeiros dias após a germinação das sementes ou em brotações novas de matrizes clonais cultivadas em canteiros de areia. Verifica-se a presença de fezes e folhas entre os recipientes e fios de seda nas mudas, denunciando a presença das lagartas. A ocorrência é anual, com picos populacionais em períodos de maior disponibilidade de mudas com poucos dias ou semanas de idade (ZANETTI, 2008). Nessa situação, quando as mudas apresentam caules tenros, uma única lagarta pode cortar dezenas delas e, em condições favoráveis para essa praga, entre 50% a 100% das mudas podem ser destruídas ou severamente danificadas (ANJOS; SANTOS; ZANUNCIO, 1986).

A principal forma de controle dessa praga é por meio de produtos fitossanitários, como acephate (Orthene[®] 750 BR), deltametrina (Decis[®] 25 CE) e imidaclopride (Evidence[®]), e biológicos, como *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Dipel PM) por meio de pulverizadores costais ou água de irrigação em viveiros abertos (ZANETTI, 2008). Com exceção de *Bacillus*, a consequência dessa prática é a seleção de populações resistentes às principais classes de inseticidas (DIEZ-RODRIGUES; OMOTO, 2001).

Pesquisas com controle biológico mostram inimigos naturais, como *Telenomus remus* Nixon, 1937 (Hymenoptera: Scelionidae), atuando como potencial agente no controle de *S. frugiperda* ao parasitar seus ovos e *Doru*

luteipes (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forficulidae), conhecido como “tesourinha”, um predador eficiente na cultura do milho (CRUZ, 2009).

Certos entomopatógenos, como o vírus *Baculovirus spodoptera*, são muito eficientes para o controle de *S. frugiperda* em laboratório. As atuais linhas de pesquisa estão voltadas para o desenvolvimento de um sistema de produção que possibilite a obtenção de um bioinseticida à base do baculovírus que seja eficiente em condição de campo (VALICENTE; TUELHER, 2009).

Por outro lado, estudos envolvendo nematoides entomopatogênicos (NEP) concentram-se em testes de patogenicidade/virulência e compatibilidade com produtos fitossanitários registrados para *S. frugiperda* em cultura do milho (NEGRISOLI JÚNIOR; GARCIA; NEGRISOLI, 2010), obtendo resultados favoráveis à aplicação sinérgica.

2.3 Controle microbiano de pragas

O controle microbiano de insetos pode ser uma alternativa viável, eficiente e segura ao uso de inseticidas químicos, visto que os agentes entomopatogênicos destacam-se pela especificidade ao hospedeiro, a seletividade aos insetos benéficos e a inocuidade a animais endotérmicos. Além disso, não poluem o meio ambiente e apresentam formas de resistência que aumentam sua persistência no campo (ALVES, 1998).

Dentre os organismos passíveis de utilização como agentes de controle, destacam-se fungos, vírus, bactérias e nematoides entomopatogênicos, devidamente disponíveis em grandes quantidades para sua aplicação como bioinseticidas, a fim de desencadear o processo de doença numa determinada população de insetos (MOINO JÚNIOR, 2009).

A utilização desses organismos para o controle de pragas tomou grande impulso, principalmente após a proibição do uso dos inseticidas organoclorados,

e também em decorrência do estabelecimento do manejo integrado de pragas (MIP) como prática racional. Com isso, houve maior inserção do controle microbiano como parte de um conjunto de medidas que, em harmonia entre si e com o meio ambiente, tornou-se capaz de reduzir a população de insetos-praga a níveis abaixo dos danos econômicos em sistemas agrícolas e florestais (MOINO JÚNIOR, 2009).

2.4 Nematoides entomopatogênicos

Nematoides são vermes alongados com aspecto cilíndrico ao longo do comprimento do corpo e não-segmentados, abrangendo desde 0,1 mm até vários metros. Esses organismos possuem sistemas digestivo, reprodutor e muscular, e um simples sistema excretor e nervoso, porém, não apresentam sistemas respiratório e circulatório. O canal alimentar consiste em cavidade bucal, esôfago, intestino e reto, com o ânus localizado ventralmente (KOPPENHÖFER, 2007).

Muitas espécies de nematoides são associadas a insetos e o tipo de relação ecológica abrange desde foresia até parasitismo. Nematoides que possuem associação parasítica com insetos podem ser descritos em 23 famílias, das quais 7 contêm espécies em potencial para controle biológico de insetos: Mermithidae e Tetradonematidae (Ordem: Stichosomida); Allantonematidae, Phaenopsitylenchidae e Sphaerulariidae (Ordem: Tylenchida); Heterorhabditidae e Steinernematidae (Ordem: Rhabditida). Atualmente, as duas últimas são utilizadas como bioinseticidas e produzidas comercialmente, por diversas empresas estrangeiras (KOPPENHÖFER, 2007). No Brasil, os estudos com nematoides estão focados principalmente na ordem Rhabditida.

2.4.1 Aspectos biológicos e biodiversidade

Estima-se que 61 espécies do gênero *Steinernema* Travassos, 1927

(Rhabditida: Steinernematidae) e 14 de *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) foram descritas até o momento (NGUYEN, 2010). Porém, o número total de espécies foi ampliado após a descrição de *Heterorhabditis sonorensis* STOCK; RIVERA-ORDUÑO; FLORES-LARA, 2009, isolada de estágios ninfais de *Diceroprocta ornea* (Walker) (Hemiptera: Cicadidae), no México por Stock, Rivera-Orduño e Flores-Lara (2009) e de *Steinernema brazilense* Nguyen et al., 2010, espécie isolada de solos de florestais naturais no estado do Mato Grosso do Sul no Brasil por Nguyen et al. (2010).

Os NEP dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são patógenos obrigatórios na natureza e caracterizam-se pela associação com bactérias entomopatogênicas dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas e Poinar, 1979 e *Photorhabdus* Boemare, Akhurst e Mourant, 1993, respectivamente, com exceção de *Photorhabdus asymbiotica* Fischer-Le Saux et al., 1999 que não se associa com NEP (FORST; CLARKE, 2002).

As bactérias do gênero *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* pertencem à família Enterobacteriaceae caracterizados por célula gram-negativa, respiração anaeróbica facultativa, locomoção por flagelo tipo peritríquios (flagelos em toda a periferia) e ausência de esporos. Portanto, não apresentam estágios resistentes, sendo encontrados, em geral, nos nematoides infectantes (terceiro estágio – J3) ou em insetos infectados por nematoides (BRENNER, 1999).

Nessa associação, os nematoides contribuem oferecendo proteção à bactéria fora do corpo do hospedeiro e atuam no seu transporte entre o cadáver de um inseto ao hemoceloma de outro. Por outro lado, as bactérias servem de alimento aos nematoides, provendo-lhes meio nutritivo adequado ao desenvolvimento e à reprodução, sendo, portanto, considerados bacteriófagos (DOWDS; PETERS, 2002).

A fase juvenil dos nematoides é composta por quatro estágios (J1, J2, J3

ou juvenil infectante e J4). O ciclo de vida em *Steinernema* spp. começa quando juvenis infectantes (JI) de terceiro estágio (J3), carregando a bactéria *Xenorhabdus* sp. em uma vesícula especializada localizada na região intestinal, penetram no corpo do hospedeiro através de suas aberturas naturais (aparelho bucal, ânus e espiráculos).

Os juvenis infectantes buscam e localizam seus hospedeiros a partir de produtos de excreção, níveis de CO₂ no ambiente, gradientes de temperatura e substâncias voláteis liberadas por plantas atacadas por insetos (RASMANN et al., 2005).

No interior do hospedeiro, migram para o hemoceloma, onde perdem a cutícula extra e defecam ou regurgitam, liberando as bactérias e passando para o último estágio juvenil (J4), formando os adultos da primeira geração, machos e fêmeas. (SICARD et al., 2004). Adultos de *Steinernema* são quase sempre anfimíticos (sexos separados), com exceção da espécie *Steinernema hermaphroditum* Stock, Griffin, Chaerani, 2004 que é hermafrodita na primeira geração (STOCK; GRIFFIN; CHAENARI, 2004). Os adultos multiplicam-se rapidamente, produzindo ovos, enquanto as bactérias simbiotas sintetizam toxinas e outros compostos que, após curto período (em geral inferior a 48 horas), causam septicemia no hospedeiro (FFRENCH-CONSTANT; BOWEN, 1999). O cadáver torna-se uma verdadeira sopa bacteriana, ou seja, um meio rico em nutrientes constituído pelas bactérias e por tecidos já desorganizados do inseto, a partir do qual os nematoides alimentam-se e desenvolvem-se. O rápido crescimento da bactéria é facilitado pela secreção de toxinas e outras moléculas que danificam os tecidos dos hospedeiros, reduzindo a efetividade do sistema imunológico do inseto (GOODRICH-BLAIR; CLARKE, 2007).

Os juvenis originados por tais ovos ainda possuem à sua disposição apreciável quantidade de alimento, conseguindo completar o ciclo e formar os adultos da segunda geração dentro do inseto. Tal fato ocorre porque a

decomposição do cadáver é retardada, principalmente pela produção pelo simbionte de compostos antimicrobianos contra outras bactérias e fungos (FORST; CLARKE, 2002).

Os juvenis originados de segunda geração geralmente encontram baixa disponibilidade de bactéria e grau de decomposição do inseto avançado. A falta de alimento no cadáver é um sinal aos nematoides para deixá-lo e buscar novos hospedeiros. Assim, os juvenis passam ao terceiro estágio retendo a cutícula do segundo estágio e fechando a sua abertura anal e oral, o que os torna os únicos capazes de persistir fora do cadáver (FORST; CLARKE, 2002). Nesse processo apreendem certa quantidade de células bacterianas e migram para o ambiente externo, conseguindo persistir por meses no solo até a localização e penetração em novos insetos hospedeiros (PATEL; STOLINSKI; WRIGHT, 1997).

Em *Heterorhabditis* spp., o ciclo biológico é bastante semelhante ao de *Steinernema* spp., com a diferença básica de que os adultos da primeira geração reproduzem-se por hermafroditismo e os da segunda, por anfimixia (POINAR, 1990). Outra diferença entre os dois gêneros está na localização da bactéria simbionte no nematoide, regurgitando as células bacterianas em vez de defecá-las (CICHE et al., 2008).

2.4.2 Estratégia de forrageamento

Diferentes estratégias de forrageamento são encontradas na literatura, baseadas em como os JI movem-se no ambiente. A busca de hospedeiros pelos JI do tipo “cruiser”, caracteriza-se por alocar mais o tempo de forrageamento movimentando-se pelo ambiente, permanecendo pouco tempo parado e “ambusher”, caracterizado por ser mais inativo, fixando-se no solo ou em um substrato qualquer (LEWIS et al., 2006).

Essas diferenças são significativas porque influenciam o tipo de recursos

encontrados. Comportamento “cruiser”, por exemplo, tem alta probabilidade de encontrar recursos críticos e sedentários, enquanto “ambusher” é mais eficiente em hospedeiros com alta mobilidade. Os dois tipos de forrageamento são considerados os extremos, podendo existir comportamentos intermediários com nematoides apresentando ambas as características (LEWIS et al., 2006).

2.4.3 Importância dos nematoides entomopatogênicos no controle microbiano

Os estudos de Georgis e Hom (1992) ressaltam que cerca de 90% dos insetos-praga passam pelo menos uma fase do seu ciclo de vida no solo, sendo alvo potencial para os nematoides entomopatogênicos. Estudos em laboratório e campo demonstram uma gama de insetos hospedeiros e aproximadamente 17 ordens e 135 famílias de insetos em diferentes estágios de desenvolvimento são suscetíveis aos NEP (AKHURST; SMITH, 2002), muitos destes são usados em programas de controle biológico de pragas do solo (GREWAL, 2002).

O interesse cada vez maior dos pesquisadores brasileiros pelos NEP advém do fato de esses organismos possuírem características vantajosas quando comparados aos outros agentes de controle biológico de insetos. Algumas dessas características foram evidenciadas em diversos trabalhos, como:

- a) compatibilidade a um grande número de produtos fitossanitários, podendo ser utilizados em programas de controle integrado (ANDALÓ; MOINO JÚNIOR; SANTA-CECÍLIA, 2004; KOPPENHÖFER et al., 2000, 2002; KOPPENHÖFER; GREWAL; KAYA, 2000; KOPPENHÖFER; KAYA, 1998; NEGRISOLI JÚNIOR; BARBOSA; MOINO JÚNIOR, 2008; NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2010; NEGRISOLI JÚNIOR; GARCIA; NEGRISOLI, 2010);

- b) ação sinérgica com outros entomopatógenos, como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., 1912; *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, 1883 (ACEVEDO et al., 2007; ANSARI; SHAH; BUTT, 2008; FENG et al., 2003; NEVES; ALVES, 1999; QUINTELA; MCCOY, 1998) e *B. thuringiensis* (BHATTACHARYA; DUTTA; DHAR, 2004; GASSMANN et al., 2008; KOPPENHÖFER; KAYA, 1997), aumentando a eficiência e a economia do método;
- c) alta capacidade de adaptação a novos ambientes, a não ser em condições adversas extremas (GREWAL, 2002; HOMINICK et al., 1996; LEWIS et al., 2006);
- d) capacidade de buscar hospedeiros com possibilidade de difusão pelo ambiente (LEWIS et al., 2006);
- e) específicos a insetos, não causando dano às plantas cultivadas;
- f) aplicados em equipamentos convencionais;
- g) maior facilidade de registro, comparado com outros agentes de controle;
- h) possibilidade de produção em larga escala.

Na literatura científica são encontrados exemplos de sucesso na utilização de NEP no controle biológico. Grewal, Nardo e Aguilera (2001) mostraram que NEP eram utilizados no controle de pragas na América do Norte, Europa, Ásia e Austrália. Em outro exemplo, *S. scapterisci* do Uruguai foi liberado na Flórida, para controle de paquínhas, *Scapteriscus* spp. (Orthoptera: Gryllotalpidae), chegando a se estabilizar na região, reduzindo em até 27% da infestação (PARKMAN; SMART JUNIOR, 1996).

Na América Latina, Stock (2002) mostrou que estudos básicos relativos a *Steinernema* e *Heterorhabditis* eram desenvolvidos na Argentina, Brasil,

Colômbia, Cuba, México e Venezuela, abordando especialmente descrição de espécies, caracterização de isolados, levantamento de ocorrência, multiplicação em larga escala e avaliação da ação patogênica.

2.5 Interação entre entomopatógenos e produtos fitossanitários

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e da linhagem dos patógenos, da natureza química dos produtos e das concentrações utilizadas. Um dos fatores limitantes na produção de importantes culturas no Brasil é o aumento da população de pragas, sendo uma das causas o uso excessivo de produtos fitossanitários, além dos efeitos dos mesmos sobre o ambiente, o homem e os animais, de modo geral. Produtos fitossanitários seletivos aos entomopatógenos são necessários, principalmente em culturas nas quais o uso desses produtos é indispensável, diminuindo o impacto sobre os predadores, parasitos e patógenos responsáveis pelo controle biológico natural (ALVES et al., 1998).

A utilização de agentes de controle biológico com agentes químicos pode resultar em um largo espectro de combinações. Por isso, entender a interação dos componentes de um programa de manejo integrado de pragas pode ajudar a prevenir falhas no controle ou, mesmo, aumentar sua eficácia.

NEP são aplicados em conjunto com outros produtos fitossanitários e biológicos, fertilizantes e corretivos de solo, sendo mais comum e econômica a mistura dos nematoides com estes produtos em tanques na aplicação (KRISHNAYA; GREWAL, 2002).

Koppenhöfer e Kaya (1998) avaliaram a combinação do neonicotinoide imidaclopride, utilizado no controle de *Ciclocephala pasadenae* (Casey, 1915) (Coleoptera: Scarabaeidae) e *C. hirta* (LeConte, 1861) (Coleoptera: Scarabaeidae), com JI de *H. bacteriophora* Poinar, 1975. Para os autores, o

inseticida foi considerado compatível com o nematoide, tanto em casa de vegetação quanto em laboratório, indicando que a interação sinérgica pode favorecer aplicações abaixo das taxas recomendadas de campo, levando a menores gastos econômicos e à redução no potencial do inseticida em afetar insetos benéficos. Além disso, o uso de agentes multifuncionais (imidaclopride, nematoides e a bactéria simbiote) poderia diminuir a possibilidade de desenvolver resistência, devido à independência dos locais de ação de diferentes agentes de controle.

Em trabalhos semelhantes, Koppenhöfer et al. (2000) avaliaram o sinergismo de *S. glaseri* Glaser, 1932 e *H. bacteriophora* com imidaclopride no controle de *C. pasadenae* e *P. japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) e observaram alta mortalidade dos insetos na combinação dos agentes de controle, com possibilidade de redução no uso do produto fitossanitário em campo.

Koppenhöfer, Grewal e Kaya (2000) demonstraram que o principal fator responsável pela interação sinérgica entre os agentes surge de uma disfunção generalizada do sistema nervoso, devido à ação do inseticida em receptores colinérgicos nas membranas pós-sinápticas do inseto, facilitando o ataque e a infecção do JI ao hospedeiro.

A combinação de NEP com imidaclopride, inseticida com baixo impacto ambiental e baixa toxicidade aos vertebrados, pode oferecer uma eficiente alternativa a sua aplicação em larga escala (ELBERT et al., 1991).

Na literatura brasileira são encontrados trabalhos abordando combinações de NEP com produtos fitossanitários. Andaló, Moino Júnior e Santa-Cecília (2004), por exemplo, mostraram que não houve efeito prejudicial sobre a viabilidade das espécies *S. carpocapsae* Weiser, 1955, *S. glaseri*, *S. arenarium* (Artyukhovskii, 1967) e *H. bacteriophora*, quando em contato com o produto imidaclopride. Em relação à infectividade, os mesmos nematoides causaram 100%, 80%, 80% e 80% de mortalidade em lagartas da espécie

Galleria mellonella (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), respectivamente, após dois dias de incubação com imidaclopride.

No caso de Leite et al. (2006), houve a utilização conjunta de nematoides com produtos fitossanitários em subdosagens. A combinação de *Steinernema* sp. (1×10^8 JI/ha) + tiametoxam 250WG (250 g p.c. (produto comercial/ha)) em adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) (bicudo-da-cana-de-açúcar) mostrou mortalidade acima de 70%.

Negrisola Júnior, Barbosa e Moino Júnior (2008) demonstraram que a infectividade de *S. carpocapsae* foi alta em lagartas de *G. mellonella*, quando expostas à maior concentração recomendada pelo fabricante de imidaclopride nas formulações comerciais Confidor e Premier.

Tavares et al. (2009) mostraram, em testes de compatibilidade, que *H. indica* Poinar, Karunakar & David, 1992, *Steinernema* sp. com imidaclopride (Confidor® 700WG), na dose de 1000 g p.c., apresentaram viabilidade acima de 90% após exposição aos produtos, corroborando a compatibilidade desses agentes com o inseticida.

Recentemente, Negrisola Júnior, Garcia e Negrisola (2010) avaliaram a compatibilidade de *H. indica*, *S. carpocapsae* e *S. glaseri* em 18 inseticidas registrados para controle de *S. frugiperda* em cultura do milho. A maioria dos produtos não alterou a infectividade de JI em *G. mellonella*, 48 horas após a imersão em formulações de inseticidas em laboratório.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de isolados de nematoides entomopatogênicos

Isolados de NEP foram obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG e do Instituto Biológico, em Campinas, SP (Tabela 1). Os NEP foram mantidos em suspensão aquosa em frascos de cultura de tecidos armazenados em incubadora do tipo BOD, a 16°C.

A multiplicação foi feita pelo método *in vivo* adaptado de Woodring e Kaya (1988), utilizando-se lagartas do último instar de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae), provenientes de criações estabelecidas.

Tabela 1 Isolados de NEP utilizados nos experimentos

Isolados	Local de origem
<i>Steinernema brazilense</i> IBCB n-06	Porto Murтинho, MT, Brasil
<i>Steinernema carpocapsae</i> All	Carolina do Norte, USA
<i>Steinernema</i> sp. CB n-27	Mogi-Guaçu, SP, Brasil
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC 05	Benjamin Constant, AM, Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. (JPM 4)	Lavras, MG, Brasil
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	New Jersey, USA

3.2 Criação de *Galleria mellonella*

Uma criação de *G. mellonella* foi mantida durante todo o período do experimento para fornecer lagartas de último instar como hospedeiro para a multiplicação dos isolados de NEP.

Esta consistia na manutenção de adultos em frascos de vidro contendo, em seu interior papel tipo “colorset” de cor preta, dobrado em sanfona para postura. O papel com ovos foi retirado e transferido para potes plásticos forrados com uma folha de papel e dieta artificial (Tabela 2). As lagartas permaneceram nestas condições até a fase adulta, quando foram transferidas para frascos de vidros, para acasalamento e postura.

Tabela 2 Composição da dieta artificial para *G. mellonella*

Ingredientes	Quantidade
Farelo de trigo	200 g
Farinha de trigo	200 g
Gérmen de trigo	200 g
Leite em pó desnatado	400 g
Levedura de cerveja	120 g
Glicerina	130 g
Mel	240 g
Água destilada	20 mL (caso necessário)

Fonte: Adaptado de Woodring e Kaya (1988)

A criação foi mantida em sala climatizada, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70\pm 10\%$, e a manutenção era realizada em dias alternados, fazendo-se a limpeza dos recipientes, a coleta de posturas e a reposição da dieta.

3.3 Multiplicação e manutenção de nematoides entomopatogênicos

Em uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo dois papeis filtro foram transferidas 10 lagartas de *G. mellonella* de 5º instar e inoculadas, aproximadamente, 20 JI/lagarta (aproximadamente 2 mL de suspensão). Estas

placas foram mantidas em câmara incubadora do tipo BOD ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR $70\pm 10\%$, 12 horas de fotofase) e, após 48 horas, as lagartas mortas foram transferidas para câmara seca (MOLINA; LÓPEZ, 2001) (placa de Petri de mesmo diâmetro contendo papel filtro), na qual permaneceram durante cinco dias, em condições semelhantes às citadas anteriormente para multiplicação dos NEP.

Após este período, as lagartas foram transferidas para armadilhas de White modificadas (WHITE, 1927), a qual consistiu de uma placa de Petri (9 cm de diâmetro) contendo um pedaço de acrílico fixado no centro, sobre o qual foi colocada uma folha de papel filtro, na qual foram depositadas as lagartas mortas e adicionados 3 mL de água destilada.

Utilizou-se uma proveta de 1.000 mL contendo 800 mL de água destilada para o recolhimento dos nematoides, sobre o qual foi vertida a água da armadilha de White, lavando-se as lagartas até completar o volume da proveta. Essa suspensão foi mantida durante 24 horas para decantação e lavagem dos nematoides. Após este período, o sobrenadante foi descartado e a suspensão de nematoides transferida para frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, adicionando-se água destilada até completar o volume. Os frascos foram mantidos aerados em câmara BOD ($16\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR $70\pm 10\%$, no escuro), pelo prazo máximo de uma semana, a fim de não perderem a viabilidade desejada (95%) até a montagem dos experimentos.

3.4 Criação de *Spodoptera frugiperda*

A criação foi iniciada com lagartas de primeiro instar provenientes da criação do Departamento de Entomologia da UFLA e colocadas em copos plásticos com capacidade de 50 mL com tampas de acrílico contendo 5 g de dieta artificial (Tabela 3).

Devido ao canibalismo característico da espécie, além de permitir manter as repetições independentes, as lagartas foram mantidas em potes individuais, a partir do segundo instar. A mesma foi mantida até a fase de pupa em câmara incubadora climatizada (BOD) regulada a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas.

As pupas foram colocadas em gaiolas de oviposição feitas de tubo de PVC com 25 cm de altura e 20 cm de diâmetro, com a parede interior forrada com papel sulfite, tendo o formato de um cilindro aberto em ambas as extremidades. A extremidade superior foi coberta com tecido tipo *voil* e a parte inferior apoiada em um prato plástico com 25 cm de diâmetro, forrado com papel de filtro, onde foram colocadas as pupas. As posturas (conjunto de ovos) foram coletadas e transferidas para novos copos plásticos, dando continuidade ao ciclo.

Tabela 3 Composição da dieta artificial para *S. frugiperda*¹

Ingredientes	Quantidade
Feijão	2000,00 g
Levedo de cerveja	608,40 g
Gérmen de trigo	950,40 g
Ácido ascórbico	61,20 g
Metil para-hidroxibenzoato de sódio	37,80 g
Ácido sórbico	19,80 g
Ágar	250,00 g
Formol 40%	49,80 mL
Solução inibidora ²	49,80 mL
Água	16000,00 mL

¹ Quantidade suficiente para criação de 3.600 lagartas

² Preparada com: ácido propiônico (418,00 mL), ácido fosfórico (42,00 mL) e água (540,00 mL)

Fonte: Cruz (2009)

3.5 Patogenicidade e virulência de isolados de nematoides entomopatogênicos a *S. frugiperda*

A patogenicidade e a virulência de isolados de NEP multiplicados em larvas de *G. mellonella*, após, no máximo, dois dias de emergência dos JI, foram avaliadas em copos plásticos (50 mL) com tampas de acrílico.

O bioensaio conduzido em delineamento inteiramente casualizado apresentou a combinação de 6 isolados de NEP em cinco concentrações distintas, 0 (testemunha), 70, 150, 300, 600 JI, em 0,5 mL de água destilada por inseto, aplicadas topicamente com auxílio de uma pipeta. Cada combinação representa um tratamento que consistiu de 42 indivíduos de *S. frugiperda* dispostos em sete repetições com seis indivíduos por repetição.

Considerou-se um isolado patogênico a lagartas de *S. frugiperda* aqueles que mataram no mínimo um indivíduo dentro das combinações, sendo, portanto, a patogenicidade uma variável categórica. Por outro lado, a virulência foi tratada como variável contínua e comparada em diferentes concentrações para cada isolado.

Lagartas de *S. frugiperda* de 10 dias de idade (entre 3° e 4° instares) foram obtidas da criação estabelecida em laboratório. Uma lagarta foi colocada no interior do copo plástico sobre um pedaço de papel filtro (tamanho suficiente para cobrir o fundo do copo) e com dieta artificial suficiente para o inseto se alimentar durante o experimento. É importante salientar que o experimento não foi conduzido com mais de um indivíduo por copo plástico devido ao seu comportamento canibal e à necessidade de repetições independentes.

Durante cinco dias de exposição verificou-se diariamente a sobrevivência das lagartas com registro de mortalidade. Os insetos mortos foram retirados e armazenados em copos plásticos (50 mL), em condições semelhantes a uma câmara seca por cinco dias, tempo necessário para a multiplicação dos

nematoides dentro do cadáver. Após esse período, foram feitas dissecações com auxílio de um bisturi e uma agulha histológica, para confirmação do agente causal.

A mortalidade das lagartas foi utilizada para obter a patogenicidade de cada isolado bem como a virulência em diferentes concentrações. Uma análise de regressão polinomial foi realizada seguido de análise de variância.

Os dados de mortalidade foram analisados em modelos lineares generalizados (função glm) com distribuição binomial, obtendo DL_{50} por "logit". Os modelos foram comparados pela DL_{50} , considerando tratamentos iguais aqueles que possuem intervalos de segurança que se sobrepõem. A variável independente explicativa é concentração (NEP/inseto) e a variável dependente resposta é mortalidade em que as curvas representam o modelo de cada isolado. As análises foram realizadas pelo programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) a 5% de significância.

3.6 Compatibilidade de isolados de NEP com produto fitossanitário

Para determinar a compatibilidade dos três melhores isolados do experimento anterior (isolados que apresentaram as maiores mortalidades de *S. frugiperda*) com o inseticida imidaclopride utilizado em viveiro florestal, foi adotada a metodologia sugerida por Negrisoli Júnior, Barbosa e Moino Júnior (2008), com modificações. Esta é considerada a técnica mais eficiente, pela simplicidade de sua realização, avaliação precisa e baixo custo total. Foram selecionados os isolados *H. amazonensis* RSC05, *Heterorhabditis* sp. (JPM4) e *H. bacteriophora* HP88, para o teste de compatibilidade com o produto imidaclopride. Um litro da formulação do produto comercial foi preparado, proporcionalmente à concentração recomendada em alta infestação (500g/100L de água).

Os tratamentos foram testados em cinco repetições, formados cada uma por placas de Petri (9 cm de diâmetro), com 20 mL da calda do produto e 2.500 JI suspensos em 1 mL de água destilada dos respectivos isolados. A parte de baixo foi fechada com filme PVC e tampada com a parte de cima da placa, a fim de se evitar a evaporação da mistura durante o período de armazenamento. Em seguida, as placas foram acondicionadas em câmara BOD a $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e 12 horas de fotoperíodo. Como testemunha, 1 mL da suspensão do isolado foi misturado a 20 mL de água destilada.

Optou-se por utilizar placas de Petri de 9 cm de diâmetro devido à grande área apresentada, evitando problemas de decantação e não expondo os JI a uma concentração acima do desejado no experimento.

A viabilidade dos nematoides foi avaliada 48 horas após a exposição aos produtos. Para tanto, pequenas alíquotas foram retiradas da suspensão e 100 JI de cada repetição foram observados em microscópio estereoscópico, para determinar a mortalidade. Foram considerados mortos aqueles que não responderam a estímulos com estilete.

A infectividade dos nematoides foi testada no mesmo período que a viabilidade. Os nematoides foram lavados em 200 mL de água destilada, por 30 segundos, para retirar o imidaclopride e utilizaram-se peneiras de 500 mash para evitar perdas de JI. Após a lavagem, uma alíquota de 0,2 mL (cerca de 100 JI) foi pipetada em oito lagartas de *S. frugiperda* individualizadas em copos plásticos (50 mL) com papel filtro e dieta artificial, sendo um copo por repetição.

O bioensaio foi mantido em condições semelhantes aos experimentos anteriores. As lagartas mortas foram transferidas para copos plásticos (50 mL) e mantidas em BOD por mais cinco dias, sendo submetidas à dissecação para confirmação do agente causal.

Os dados de viabilidade de JI e mortalidade de lagartas foram submetidos à análise de variância. Foram verificadas as premissas da ANOVA utilizando-se o teste Shapiro-Wilk como teste de normalidade e teste de Levene para homocedasticidade.

Para o cálculo da eficiência de infectividade (E) houve correção pela fórmula: $E\% = (1 - mt/mc) \times 100$, em que MT = mortalidade do tratamento e mc = mortalidade do controle, de acordo com Peters e Poullot (2004), baseado na International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (IOBC). Os valores de eficiência do inseticida para cada isolado foram classificados como: 1 – não tóxico (<30%); 2 - levemente tóxico (30% a 79%); 3 - moderadamente tóxico (80 a 99%) e 4 - tóxico (>99%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Patogenicidade e virulência de isolados de nematoides entomopatogênicos a *S. frugiperda*

Houve mortalidade em todos os isolados mostrando que são patogênicos, porém detectou-se uma diferença na virulência (Figura 1).

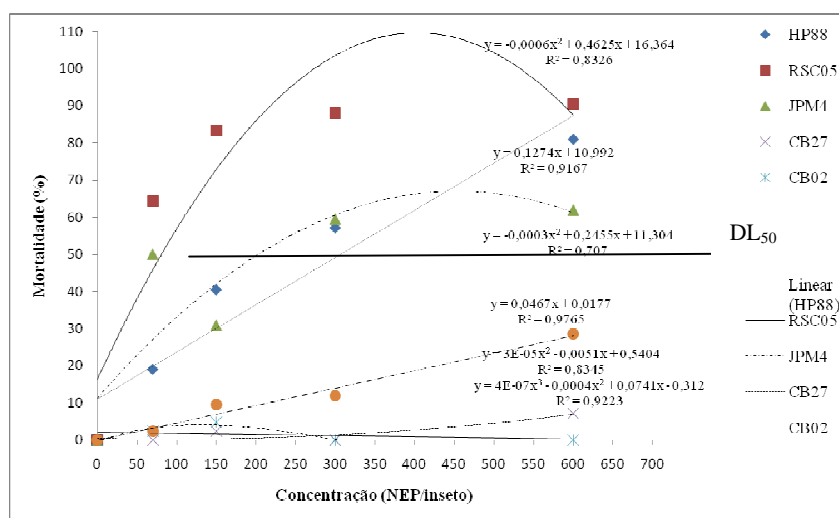


Figura 1 Mortalidade (%) em relação à concentração para cada isolado

Devido à ausência de mortalidade nos tratamentos controle (testemunha) não foi necessário comparar com a mortalidade confirmada. A morte causada por outro agente pode ser considerada baixa o suficiente para não haver diferenças estatísticas entre ambas as mortalidades.

Os valores da DL_{50} mostram que *H. amazonensis* RSC 05, *Heterorhabditis* sp. (JPM 4) e *H. bacteriophora* HP88 foram os mais virulentos às lagartas de *S. frugiperda* em laboratório (Tabela 4). *H. amazonensis* RSC 05 foi o isolado mais virulento, enquanto os outros dois *Heterorhabditis* mostraram

ser iguais devido à sobreposição do intervalo de segurança.

Isolados	DL ₅₀ (EP) NEP/inseto	
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC 05	87.42 ± 20,45	a
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HP88	297.38 ± 28.74	b
<i>Heterorhabditis</i> sp. (JPM 4)	345.28 ± 50.13	b
<i>Steinernema brazilense</i> IBCB n-06	783.03 ± 105.72	c
<i>Steinernema</i> sp. CB n-27	1075.96 ± 304.26	d
<i>Steinernema carpocapsae</i> All	—	

Tabela 4 DL₅₀ para cada isolado.

A partir dos resultados obtidos, *H. amazonensis* RSC 05 é o isolado mais adequado a ser utilizado em trabalhos futuros de aplicação de NEP em mudas de eucalipto em viveiros florestais para controle de *S. frugiperda*, devido à alta virulência e à menor concentração de nematoide, o que torna o controle menos dispendioso.

Além disso, os isolados do gênero *Heterorhabditis* são mais virulentos que os *Steinernema* para as condições do experimento. Apesar dos isolados *Steinernema* serem patogênicos, são de baixa virulência em lagartas de 10 dias de *S. frugiperda*.

Por outro lado, Garcia, Raetano e Leite (2008) obtiveram altas taxas de mortalidade de *S. frugiperda* com doses relativamente baixas de *S. brazilense*, sugerindo que algum fato possa ter contribuído para as grande diferenças de mortalidade obtidas. Novos estudos devem ser realizados procurando conhecer a causa (ou causas) que levaram a essas diferenças, contribuindo para a padronização de produtos à base de NEP.

Tol e Raupp (2005) constataram que algumas espécies de insetos são mais suscetíveis aos heterorhabditídeos do que aos steinernematídeos,

corroborando os resultados deste trabalho. Além disso, diferenças na virulência de NEP podem ser atribuídas à especificidade, à morfologia, à origem e à variabilidade genética dos isolados, bem como à tolerância do hospedeiro (STUART et al., 2006).

De forma semelhante, Alves et al. (2009) verificaram que isolados de NEP pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* foram mais virulentos do que isolados de *Steinernema*, com mortalidade máxima de 100% e 34%, respectivamente, à concentração de 100 JI/inseto, no controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley, 1900) (Hemiptera: Pseudococcidae).

Quanto à morfologia do nematoide, Adams e Nguyen (2002) demonstraram que a maioria dos heterorhabditídeos tem tamanho menor que o dos steinernematídeos, o que pode corroborar com o maior sucesso dos isolados de *Heterorhabditis* spp. em relação aos *Steinernema* spp.

Segundo Andaló, Nguyen e Moino Júnior (2006), juvenis infectantes de *H. amazonensis* RSC 05 têm comprimento corporal de 589 (567-612) μm , enquanto *S. brazilense* IBCB n-06 têm 1157 (1023-1284) μm (NGUYEN et al., 2010). Isolados de *H. amazonensis*, proveniente de solos amazônicos, mostram ter quase a metade do tamanho do *S. brazilense*, oriundo do cerrado mato-grossense.

Esses dados auxiliam a explicação da diferença na infectividade entre os isolados dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*. O menor tamanho do JI facilita sua penetração, além de permitir um maior acesso de JI no hospedeiro. Como foram utilizadas lagartas de 10 dias, pertencentes a instares iniciais, as aberturas do corpo (ânus, abertura bucal, traqueias) são proporcionalmente menores, dificultando a penetração dos JI maiores dos isolados de *Steinernema*.

Portanto, baseado no tamanho dos JI, os resultados deste trabalho não descartam a possibilidade de os isolados do gênero *Steinernema*, que não mataram ou mataram poucas lagartas, serem patogênicos e mais virulentos em

outras condições. A possível barreira física imposta pelas lagartas de instares iniciais, com aberturas menores ou, até mesmo, uma dificuldade inerente de penetração dos JI *Steinernema* é superada em instares mais avançados em que as aberturas maiores sejam suficientes para a penetração dos JI, tornando os isolados *Steinernema* mais virulentos. Por isso, é necessária a realização de mais experimentos, verificando a taxa de virulência dos isolados em diferentes instares de desenvolvimento larval de *S. frugiperda*.

Um dado que corrobora a possibilidade de isolados *Steinernema* serem patogênicos foi que, apesar da baixa mortalidade, os poucos JI que penetraram e mataram as lagartas conseguiram se multiplicar em grande número, superior aos isolados de *Heterorhabditis* (observação pessoal), sugerindo que o interior da lagarta é um meio adequado à proliferação da bactéria liberada pelo JI e à multiplicação de JI.

O fato de algumas lagartas mortas por JI *Heterorhabditis* não apresentarem nematoides após dissecadas não descarta totalmente a possibilidade delas terem sido mortas pelo mesmo. A ausência de mortalidade nos tratamentos controle permite inferir que a morte de lagartas causada por outro agente causal é baixa ou inexistente. Portanto, é possível que a lagarta *S. frugiperda* não seja um hospedeiro adequado à multiplicação de JI do gênero *Heterorhabditis* apesar da alta infectividade.

As curvas de mortalidade de *S. frugiperda* dos diferentes tratamentos de *Heterorhabditis* são apresentados nas Figuras 2, 3 e 4. Devido à baixa mortalidade apresentada pelos tratamentos do gênero *Steinernema*, optou-se por representar graficamente apenas as curvas dos isolados *Heterorhabditis*.

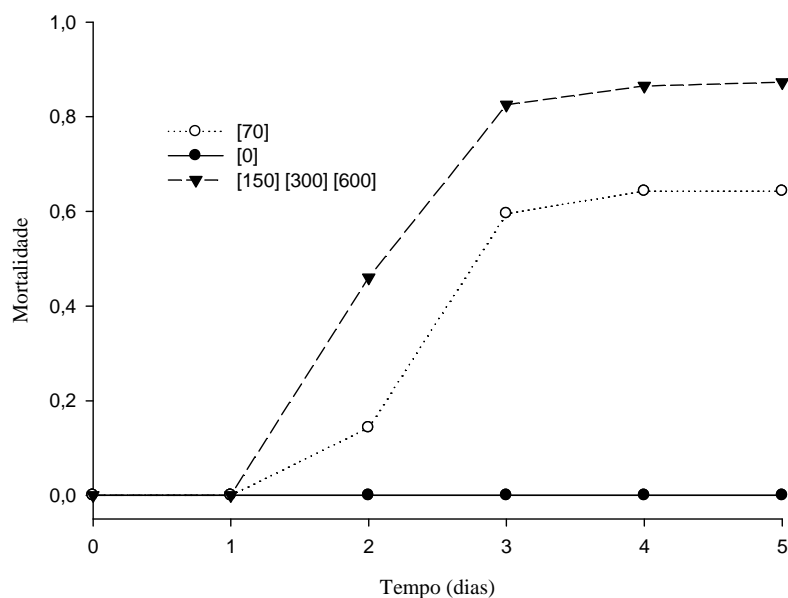


Figura 2 Curvas de mortalidade de *S. frugiperda* submetida ao isolado *H. amazonensis* RSC05, em diferentes concentrações, durante cinco dias

As concentrações 150, 300 e 600 NEP/inseto foram representadas em apenas uma curva de mortalidade ($-0,0292x^3+0,1895x^2-0,0437x-0,0295$) para simplificar o modelo, pois apresentaram TL_{50} iguais. A curva apresentou $TL_{50}=2,12$, enquanto que a curva de mortalidade da concentração 70 NEP/inseto ($-0,0287x^3+0,2081x^2-0,1987x+0,0009$) foi 2,82. Na literatura científica há informações de que NEP têm como característica a capacidade de matar os hospedeiros em até 48 horas (FFRENCH-CONSTANT; BOWEN, 1999), porém, as curvas indicam o início da morte a partir de 24 horas. Como foi feita apenas uma avaliação diária, no primeiro dia não se detectou mortalidade, iniciando-se a partir do segundo dia. Provavelmente, o início da morte ocorreu próximo da segunda avaliação, fato que poderia ser confirmado com uma avaliação no tempo de 36 horas.

A curva das concentrações 150, 300 e 600 NEP/inseto do isolado *H. amazonensis* RSC05 demonstraram uma mortalidade mais rápida e intensa, quando comparada à curva das concentração 70.

A rápida penetração no corpo do hospedeiro, sua morte por septicemia e uma elevada virulência em baixas concentrações são características importantes demonstradas pelo isolado *H. amazonensis* RSC05, principalmente na concentração de 150 NEP/inseto para a seleção do mesmo como possível agente de controle de *S. frugiperda* em viveiros florestais.

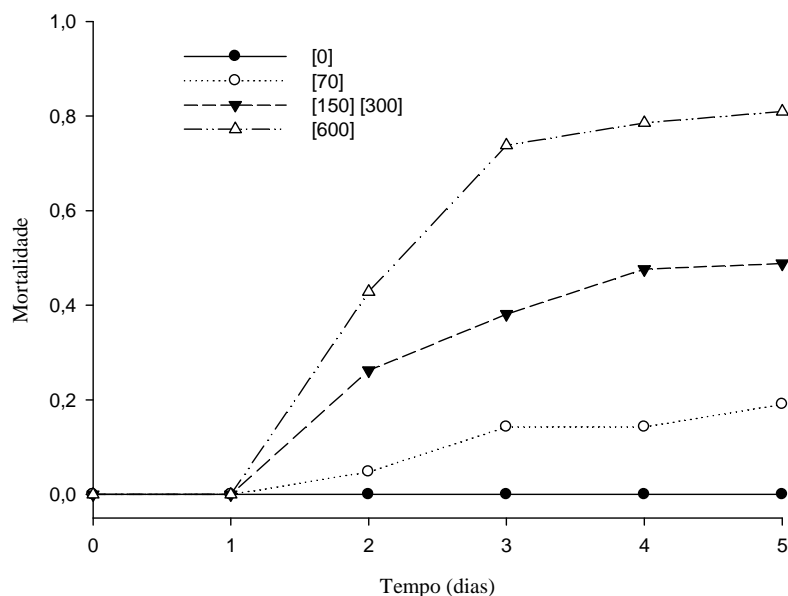


Figura 3 Curvas de mortalidade de *S. frugiperda* submetida ao isolado *H. bacteriophora* HP88, em diferentes concentrações, durante cinco dias

As equações das curvas das concentrações 70, 150-300 e 600 NEP/inseto são $0,01x^2+0,04x-0,01$, $-0,1x^2+0,17x-0,05$ e $-0,02x^2+0,32x-0,10$, respectivamente. TL_{50} das concentrações 150-300 e 600 NEP/inseto foram 5,04 e 2,24 dias, respectivamente. Não se representou o TL_{50} na concentração 70

NEP/inseto por ter extrapolado o número de dias do bioensaio. As curvas de mortalidade dos isolados de *H. bacteriophora* HP88 mostraram mortalidade concentrada no período de 1 a 3 dias, exceto no controle, com pouca queda após esse período (Figura 3). A diferença de mortalidade entre os tratamentos foi maior comparada com a dos tratamentos do isolado *H. amazonensis* RSC05. Houve diferença em mortalidade em todos os tratamentos com nematoides, exceto entre a concentração 150 e 300 NEP/inseto..

Nesse caso, para se obter uma mortalidade semelhante ao observado no isolado anterior, seriam necessárias grandes quantidades de NEP/inseto, podendo demandar um custo maior, pensando em uma produção em larga escala para ser aplicado em viveiro florestal.

As curvas de sobrevivência do isolado *Heterorhabditis* sp. JPM4 (Figura 4) mostram o período de mortalidade das lagartas entre o segundo e o quinto dia de avaliação. As curvas indicam demora em iniciar a mortalidade, além de mostrarem maior tempo de mortalidade. Nesse caso, o crescimento das lagartas durante os cinco dias ou a idade da mesma possa ter sido um fator desfavorável à infectividade desse isolado.

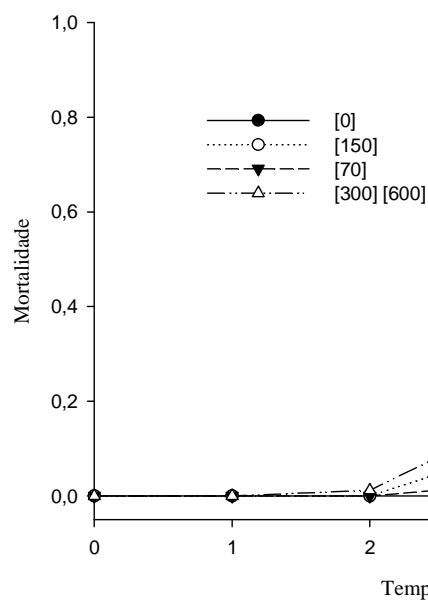


Figura 4 Curvas de mortalidade de *S. frugiperda* submetida ao isolado *Heterorhabditis* sp. JPM4, em diferentes concentrações, durante cinco dias

As equações das curvas das concentrações 70, 150 e 300-600 NEP/inseto do isolado *Heterorhabditis* sp. JPM4 são $0,02x^2-0,06x-0,02$, $0,03x^2-0,05x+0,01$ e $-0,03x^2-0,04x-0,01$, respectivamente. TL_{50} das concentrações 150 e 300-600 NEP/inseto foram 5,02 e 4,30 dias, respectivamente. Não se representou o TL_{50} na concentração 70 NEP/inseto por ter extrapolado o número de dias do bioensaio.

Segundo Boff et al. (2000), a duração do ciclo do NEP no hospedeiro depende de vários fatores, como a espécie do inseto-hospedeiro, o tamanho do JI, a temperatura do ambiente e a quantidade de JI que penetra no inseto, sendo, portanto, alguns indicativos do maior intervalo sem mortes desse isolado e sua menor virulência.

A partir disso, o isolado *Heterorhabditis* sp. JPM4 não apresenta as melhores características para ser trabalhado em testes em viveiros florestais, pois, além de apresentar baixa mortalidade, é um isolado lento em sua ação.

4.2 Compatibilidade de isolados de NEP com produto fitossanitário

A viabilidade dos isolados *H. amazonensis* RSC 05, *H. bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis* sp. (JPM 4) imediatamente antes da montagem dos experimentos foi de 99,43% (M) \pm 0,38% (DP), 95,84% \pm 0,97% e 83,43% \pm 1,10%, respectivamente.

Foi realizada uma comparação estatística entre os isolados, mas a análise principal é a comparação dentro do mesmo isolado, verificando-se apenas o efeito do produto fitossanitário na viabilidade dos JI.

A análise de variância mostrou que pelo menos um tratamento analisado difere estatisticamente dos outros ($F_{5,24}=131,05$; $p=2,2^{-16}$). O teste de normalidade Shapiro-Wilk e o teste de homocedasticidade Levene foram favoráveis à aplicação da análise de variância: $W=0,927$, $p=0,061$; $F=1,42$, $p=0,25$, respectivamente.

Não houve diferença na viabilidade dos JI entre os tratamentos com os isolados *H. amazonensis* RSC 05 e *H. bacteriophora* HP88, após dois dias de exposição ao produto imidaclopride e testemunha (nematóide sem exposição ao produto). Entretanto, houve diferença na viabilidade, quando comparada à da testemunha e do tratamento imidaclopride do isolado *Heterorhabditis* sp. (JPM4) (Tabela 5).

O protocolo IOBC sugere classificação 1 (não -tóxico) para inseticidas que resultem em uma Eficiência de Mortalidade (E) abaixo de 30% em avaliações de infectividade, não havendo aplicação dessa escala para a variável viabilidade. Porém, apesar de verificada diferença estatística no teste de

viabilidade do isolado *Heterorhabditis* sp. (JPM4), a diferença foi inferior a 30%, comparada à do tratamento controle, o que permitiria classificá-lo como produto não-tóxico, se fosse levada em conta a mesma classificação utilizada para a infectividade.

Resultados semelhantes foram obtidos por Andaló, Moino Júnior e Santa-Cecília (2004), em que não houve efeito prejudicial sobre a viabilidade do nematoide *S. arenarium*, quando em contato com o produto imidaclopride.

Tabela 5 Porcentagem de viabilidade (M±DP) após dois dias de exposição ao produto fitossanitário dos NEP *Heterorhabditis*

Tratamento	Viabilidade (%)		
	<i>H. amazonensis</i> RSC 05	<i>H. bacteriophora</i> HP88	<i>Heterorhabditis</i> sp. (JPM 4)
Testemunha	98,23±0,20 a	93,16±0,54 a	78,46±3,15 a
imidaclopride	97,33±0,77 a	91,70±2,39 a	68,34±4,24 b

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si.

A infectividade dos nematoides testados em lagartas de 3º a 4º instar de *S. frugiperda* não foi afetada pela exposição dos JI ao produto fitossanitário imidaclopride (Tabela 6). A partir do teste de Shapiro-Wilk, aceitou-se a hipótese de normalidade dos dados de infectividade ($W=0,96$; $p=0,27$) e do teste de Levene aceitou-se a homogeneidade dos dados ($F=0,31$; $p=0,90$), permitindo a realização do teste de análise de variância ($F_{5,24}=1,41$; $p=0,26$).

Tabela 6 Porcentagem de infectividade ($M \pm EP(M)$) dos NEP *Heterorhabditis* após dois dias em contato com imidaclopride a lagartas de *S. frugiperda* de dez dias.

Tratamentos	Mortalidade		
	Total (%)	E% ¹	C ²
<i>H. bacteriophora</i> HP88 + imidaclopride	80,00±18,96 a	<1,00	1
<i>H. bacteriophora</i> HP88	72,50±18,54 a	-	
<i>H. amazonensis</i> RSC 05	65,00±20,54 a	-	
<i>Heterorhabditis</i> sp. (JPM 4) + imidaclopride	62,50±26,52 a	<1,00	1
<i>Heterorhabditis</i> sp. (JPM 4)	62,00±12,50 a	-	
<i>H. amazonensis</i> RSC 05 + imidaclopride	60,92±20,92 a	11,54	1

¹ Eficiência de mortalidade calculada pela fórmula: $E\% = 100 - (1 - mt/mc) \times 100$

² Classificação toxicológica do inseticida: 1- não-tóxica (<30%)

Como os tratamentos são iguais estatisticamente apenas um modelo foi criado para representar as curvas de sobrevivência (Figura 5). Baseado no protocolo pela IOBC, o neonicotinoide imidaclopride é compatível com os isolados de *Heterorhabditis* testados e pode ser utilizado em aplicações sinérgicas.

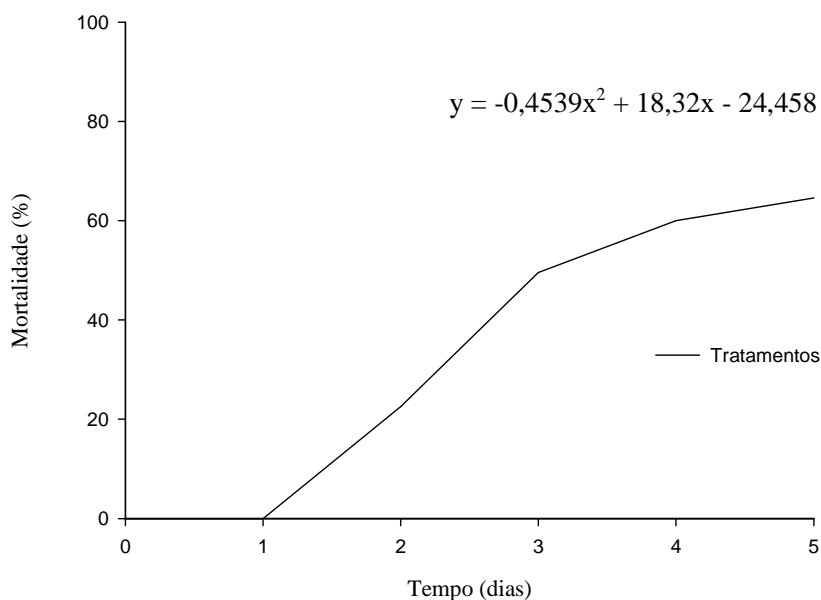


Figura 5 Curvas de sobrevivência da mortalidade de *S. frugiperda* submetida aos isolados de *Heterorhabditis* após dois dias de exposição ao produto fitossanitário imidaclopride

O mesmo foi observado por Koppenhöfer et al. (2000) e Koppenhöfer, Grewal e Kaya (2000), os quais mostraram que a combinação entre nematoides e inseticidas neonicotinoides não afeta a infectividade, a patogenicidade do nematoide, a reprodução no hospedeiro e nem a infectividade e a patogenicidade da progênie. Mesmo sob condições extremas que o nematoide poderia encontrar quando misturados em tanques com os inseticidas, essas variáveis resposta avaliadas não foram afetadas.

Além disso, a compatibilidade do inseticida imidaclopride com JI de *H. bacteriophora* foi avaliada por Koppenhöfer e Kaya (1998), os quais observaram a inviabilidade entre 0,7% e 3% de NEP, considerando o produto compatível com aquela espécie de nematoide.

Andaló, Moino Júnior e Santa-Cecília (2004) verificaram que *S. arenarium* causou 80% de mortalidade em lagartas de *G. mellonella*, quando em contato com o produto imidaclopride. Estes resultados corroboram com os dados obtidos no presente estudo, entretanto, considera-se a utilização da praga alvo, *S. frugiperda*, como hospedeiro para os testes de infectividade, como uma importância prática maior em relação aos objetivos finais do estudo do que utilizar *G. mellonella*, o hospedeiro para multiplicação dos NEP.

Um dos motivos que justificam a compatibilidade mostrada nesses trabalhos é que imidaclopride é um inseticida neonicotinoide com toxicidade a vertebrados relativamente baixa e baixo efeito negativo a invertebrados benéficos (KUNKEL; HEALD; POTTER, 2001).

Negrisola Júnior et al. (2010) demonstraram a interação de diversos produtos registrados para a cultura do milho (não inclui imidaclopride) em dose subletal com NEP para controle de *S. frugiperda*, representando a possibilidade de utilizar esse sinergismo com as tecnologias de aplicações atuais. Entretanto, os autores registraram baixa eficiência da mistura para o controle da praga, necessitando de mais estudos para determinar a concentração ótima de produto e NEP a ser utilizada em campo.

Os resultados deste trabalho demonstram que não há necessidade de aplicar grandes quantidades de NEP para se obter um resultado satisfatório e igual às maiores concentrações na mortalidade das lagartas em laboratório. Sugere-se que, em campo, os resultados possam ser semelhantes ao observado em laboratório e o isolado *H. amazonensis* RSC05, considerado o mais virulento, possa também ser utilizado em baixas concentrações.

Os resultados deste trabalho ganham maior expressão ao considerar que o isolado *H. amazonensis* RSC05 é um isolado nativo e pode ser produzido em escala industrial para gerar um produto que passe por menores barreiras no processo de registro.

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho, é possível a associação do produto fitossanitário imidaclopride com os isolados *Heterorhabditis* testados. O isolado *H. amazonensis* RSC05 apresentou-se o mais aconselhável a ser utilizado em viveiros florestais para controle de *S. frugiperda*.

Porém, é importante a continuidade de uma avaliação criteriosa em viveiro florestal para a inserção desses organismos compatíveis com imidaclopride para verificar possíveis efeitos aditivos ou sinérgicos em programas de manejo integrado de pragas para o controle de *S. frugiperda*.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, J. P. M. et al. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 96, n. 2, p. 187-192, Oct. 2007.
- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematic. In: GAULER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New Jersey: Rutgers University, 2002. p. 1-28.
- AKHURST, R. J.; SMITH, K. Regulations and safety. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI, 2002. p. 311-332.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2004. 442 p.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: _____. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.
- ALVES, V. S. et al. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 67-73, jan./fev. 2009.
- _____. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ-USP, 1998. p. 637-710.
- ANDALÓ, V.; MOINO JÚNIOR, A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. R. Compatibilidade de nematóide entomopatogênico com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 149-158, 2004.
- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO JÚNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, College Park, v. 8, n. 6, p. 853-867, Dec. 2006.
- ANJOS, N.; SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, J. C. Pragas do eucalipto e seu controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 12, n. 141, p. 50-58, 1986.

ANSARI, M. A.; SHAH, F. A.; BUTT, T. M. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 129, n. 3, p. 340-347, Dec. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico da ABRAF 2010, ano base 2009**. Brasília, 2010. 140 p.

BHATTACHARYA, S.; DUTTA, S.; DHAR, T. In vitro compatibility of different entomopathogens to pesticides, plant growth regulators and micronutrients. **Annals of Plant Protection Sciences**, New Delhi, v. 12, n. 1, p. 199-202, Jan. 2004.

BOFF, M. I. C. et al. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E87.3 in *Galleria mellonella*. **Nematology**, College Park, v. 2, n. 3, p. 303-308, 2000.

BRENNER, D. J. Additional genera of Enterobacteriaceae. In: DWORKIN, M. et al. (Ed.). **The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community**. New York: Pringer, 1999. p. 2673-2695.

BUENO, V. H. P. **Controle biológico de pragas**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. 429 p.

CICHE, T. A. et al. Cell invasion and matricide during *Photorhabdus luminescens* transmission by *Heterorhabditis bacteriophora* nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 8, p. 2275-2287, Apr. 2008.

CLARK, P. L. et al. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, Wallingford, v. 7, n. 5, p. 1-10, Jan. 2007.

CRUZ, I. Métodos de criação de agentes entomófagos de *Spodoptera frugiperda*. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. p. 237-275.

DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, June 2001.

- DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI, 2002. p. 79-98.
- ELBERT, A. et al. Imidacloprid: a new systemic insecticide. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, Leverkusen, v. 44, n. 2, p. 113-136, 1991.
- FENG, M. G. et al. Field trials of an oil-based emulsifiable formulation of *Beauveria bassiana* conidia and low application rates of imidacloprid for control of false-eye leafhopper *Empoasca vitis* on tea in southern China. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 6, p. 489-496, June 2003.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H.; BOWEN, D. J. *Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 284-288, June 1999.
- FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI, 2002. p. 57-77.
- GALLO, D. et al. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GALLOTTI, G. J. M. **Doenças em viveiros florestais de *Eucalyptus* spp., *Corymbia* spp., *Pinus* spp. E *Ilex paraguariensis*, micorrização e estragérias de controle**. Florianópolis: EPAGRI, 2008. 45 p.
- GASSMANN, A. J. et al. Synergism between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* crops: integrating biological control and resistance management. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 957-966, Feb. 2008.
- GEORGIS, R.; HOM, A. Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. **Nematropica**, Bradenton, v. 22, n. 1, p. 81-98, Apr. 1992.
- GOODRICH-BLAIR, H.; CLARKE, D. J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 64, n. 2, p. 260-268, Apr. 2007.
- GREWAL, P. G.; NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, 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. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI, 2002. p. 265-287.

HOMINICK, W. M. et al. Entomopathogenic nematodes: biodiversity, geographical distribution and de convention on biological diversity. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 317-331, Sept. 1996.

KOPPENHÖFER, A. M. Nematodes. In: LACEY, L. A.; KAYA, H. K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. New York: Springer, 2007. p. 249-266.

KOPPENHÖFER, A. M. et al. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Orlando, v. 24, n. 1, p. 90-97, May 2002.

_____. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. **Biological Control**, Orlando, v. 19, n. 3, p. 245-252, Nov. 2000.

KOPPENHÖFER, A. M.; GREWAL, P. S.; KAYA, H. K. Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: the mechanism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 94, n. 3, p. 283-293, Mar. 2000.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. **Biological Control**, Orlando, v. 8, n. 2, p. 131-137, Feb. 1997.

_____. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 91, n. 3, p. 618-623, 1998.

KRISHNAYA, P. V.; GREWAL, P. S. Effect of neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 259-266, 2002.

KUNKEL, B. A.; HEALD, D. W.; POTTER, D. A. Lethal and sublethal effects of bendiocarb, halofenozide, and imidacloprid on *Harpalus pennsylvanicus* (Coleoptera: Carabidae) following different modes of exposure in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, Gainesville, v. 94, n. 1, p. 60-67, 2001.

LEITE, L. G. et al. Nematóides entomopatogênicos no controle de pragas. In: PINTO, A. de S. et al. (Org.). **Controle biológico de pragas na prática**. Piracicaba: ESALQ, 2006. p. 45-54.

LEWIS, E. E. et al. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, San Diego, v. 38, n. 1, p. 66-79, July 2006.

MOINO JÚNIOR, A. Produção de agentes entomopatogênicos. In: BUENO, V. H. P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2009. p. 278-296.

MOLINA, J. P.; LÓPEZ, N. J. C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, Santafé de Bogotá, v. 27, n. 1/2, p. 73-78, 2001.

NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; BARBOSA, C. R. C.; MOINO JÚNIOR, A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, n. 2, p. 111-116, 2008.

NEGRISOLI JÚNIOR, A. S. et al. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) and insecticide mixtures to control *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn crops. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 7, p. 677-683, Sept. 2010.

NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; GARCIA, M. S.; NEGRISOLI, C. R. C. B. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 6, p. 545-549, 2010.

NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S. B. Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e imidacloprid. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 2, p. 305-311, abr./jun. 1999.

NGUYEN, K. B. **Morphology and taxonomy of entomopathogenic nematodes**. Disponível em:
<<http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/kbnstein.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2010.

NGUYEN, K. B. et al. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 103, n. 1, p. 8-20, Jan. 2010.

OLIVEIRA, J. T. S. Experiência mundial com a madeira de eucalipto. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 54, p. 98-100, 2001.

PAIVA, P. E. B. Moscas-dos-fungos: praga potencial de mudas cítricas em São Paulo. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, n. 8, p. 18-19, 2004.

PARKMAN, J. P.; SMART JUNIOR, G. C. Entomopathogenic nematodes, a case study: introduction of *Steinernema scapterisci* in Florida. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 413-419, Sept. 1996.

PATEL, M. N.; STOLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, Lancaster, v. 114, n. 5, p. 489-496, May 1997.

PETERS, A.; POULLOT, D. Side effects of surfactants and pesticides on entomopathogenic nematodes assessed using advanced IOBC guidelines. **IOBC/WPRS Bulletin**, Zurich, v. 27, n. 6, p. 67-72, Dec. 2004.

POINAR, G. O. Taxonomy and biology of *Steinernematidae Heterorhabditidae*. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 23-61.

QUINTELA, E. D.; MCCOY, C. W. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 91, n. 1, p. 110-122, Feb. 1998.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing: reference index version 2.12.1. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

RASMANN, S. et al. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, London, v. 434, n. 7034, p. 732-737, Apr. 2005.

SICARD, M. et al. Stages of infection during the tripartite interaction between

Xenorhabdus nematophila, its nematode vector, and insect hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 11, p. 6473-6480, Nov. 2004.

SILVA, J. C.; MATOS, J. L. M. A madeira de eucalipto na indústria moveleira. **Revista da Madeira**, Curitiba, n. 70, p. 36-40, 2003.

SILVA, L. F. Propagação vegetativa do eucalipto: experiência da Internacional Paper do Brasil. **IPEF Notícias**, Piracicaba, v. 25, n. 156, p. 4-5, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. **Fatos e números do Brasil florestal**. São Paulo, 2008. 93 p.

STOCK, S. P. Entomopathogenic nematode diversity in South America: opportunities for exploration. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8., 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Foz do Iguaçu: UFPR, 2002. p. 105-109.

STOCK, S. P.; GRIFFIN, C. T.; CHAENARI, R. Morphological and molecular characterization of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationship with other closely related taxa. **Nematology**, College Park, v. 6, n. 3, p. 401-412, Dec. 2004.

STOCK, S. P.; RIVERA-ORDUÑO, B.; FLORES-LARA, Y. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a natural pathogen of the seasonal cicada *Diceroprocta ornea* (Walker) (Homoptera: Cicadidae) in the Sonoran desert. **Journal of Invertebrate Pathology**, Riverside, v. 100, n. 3, p. 175-184, Mar. 2009.

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.

TAVARES, F. M. et al. Efeitos sinérgicos de combinações entre nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e inseticida químicos na mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae). **Bioassay**, Londrina, v. 4, n. 7, p. 1-10, 2009.

TOL, R. W. H. M. van; RAUPP, M. J. Nursery and tree applications. In: GREWAL, P. S.; EHLERS, R. U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Ed.). **Nematodes as biocontrol agents**. Cambridge: CABI, 2005. p. 167-190.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculorívus***. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2009. 14 p. (Circular Técnica, 114).

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, New York, v. 66, p. 302-303, 1927.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. **Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques**. Fayetteville: Arkansas Experiment Station, 1988. 28 p. (Southern Cooperatives Series Bulletin, 331).

ZANETTI, R. Manejo de pragas de viveiros florestais. In: DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. da (Ed.). **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. Lavras: UFLA, 2008. p. 125-139.