

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ESTUDOS  
DE COMPATIBILIDADE DE PRODUTOS  
FITOSSANITÁRIOS COM NEMATÓIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA:  
HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE)**

**ALDOMARIO SANTO NEGRISOLI JUNIOR**

2005

**ALDOMARIO SANTO NEGRISOLI JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ESTUDOS DE  
COMPATIBILIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS COM  
NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA:  
HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação “stricto sensu” Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Alcides Moino Junior

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

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

**Negrisola Junior, Aldomario Santo**

**Avaliação de técnicas para estudos de compatibilidade de produtos  
fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida:**

**Heterorhabditidae, Steinernematidae / Aldomario Santo Negrisola Junior. -- Lavras  
: UFLA, 2005.**

**79 p. : il.**

**Orientador: Alcides Moino Junior.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. *Heterorhabditis*. 2. *Steinernema*. 3. Seletividade. 4. Controle microbiano. 5.  
Metodologia. 6. Defensivo agrícola. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

**CDD-595.182**

**ALDOMARIO SANTO NEGRISOLI JUNIOR**

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS PARA ESTUDOS DE  
COMPATIBILIDADE DE PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS COM  
NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA:  
HETERORHABDITIDAE, STEINERNEMATIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação “stricto sensu” Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 10 de fevereiro de 2005

Profa. Dra. Marineide Mendonça Aguilera

UFSCar

Dr. Luis Garrigós Leite

Instituto Biológico Campinas



Prof. Dr. Alcides Moino Junior

UFLA

(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência e pela oportunidade de aprendizado neste mundo.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de trabalho e conhecimento.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alcides Moino Junior, pela amizade e valiosíssima orientação colocando-se sempre à disposição.

A todo corpo docente do Departamento de Entomologia da UFLA, em especial aos professores doutores Américo I. Ciociola, Brígida Souza, Geraldo A. Carvalho, Vanda Helena P. Bueno e Julio Louzada, bem como aos secretários Fábio P. Carriço e Lisiane O. Orlandi.

Ao Prof. Antonio João dos Reis, do Departamento de Administração da UFLA pela importante contribuição na análise de custo das metodologias.

Ao Dr. Elifas N. de Alcântara e Dr. Paulo Rebelles Reis, da EPAMIG e ao Prof. Mário Sobral, do Departamento de Fitopatologia/UFLA, pelo fornecimento das amostras dos produtos fitossanitários utilizados nos experimentos.

Aos colegas de turma Leonardo Pierre, Jean Patrick Bonani, Marçal Pedro Neto, Marcelo Reis, Paulo Henrique da Silva, Fabrícia Zimmerman, Ester Azevedo, Danila Neri e Viviane S. Alves e, principalmente, a Lúcia Mendonça pelo valioso auxílio nas análises estatísticas.

Aos colegas de Laboratório Vanessa A. de Carvalho, Giselle Souza, Flaviane de Carvalho e Ricardo Cavalcanti, pela amizade e companheirismo.

Em especial a minha grande amiga Carla Ruth de Carvalho Barbosa, pela grande contribuição neste trabalho e pela sincera amizade em todos os momentos.

Aos doutores Luis Garrigós Leite e Marineide Mendonça Aguilera, sendo esta última a grande responsável pela conclusão dessa etapa de minha vida.

A todos aqueles que porventura não foram citados aqui, mas que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
CAPÍTULO 1 .....	01
1 Introdução Geral .....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 Importância dos Nematóides Entomopatogênicos.....	03
2.1.1 Principais grupos .....	04
2.2 Uso no controle microbiano: vantagens e desvantagens.....	06
2.3 Interação entre entomopatógenos e produtos fitossanitários .....	07
2.3.1 Interações positivas .....	08
2.3.2 Interações negativas.....	13
2.4 Métodos de avaliação da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários.....	16
2.4.1 Em laboratório .....	16
2.4.2 Em casa de vegetação e campo.....	17
3 Referências Bibliográficas .....	19
CAPITULO 2 .....	24
1 Resumo .....	24
2 Abstract.....	25
3 Introdução.....	26
4 Material e Métodos.....	28
4.1 Metodologia de Krishnayya & Grewal (2002) .....	29
4.2 Metodologia de Rovesti et al. (1988).....	30
4.3 Metodologia de Hara & Kaya (1983).....	32
4.4 Protocolo de Vainio (1992).....	33
5 Análise de custo das metodologias .....	35
5.1 Custo total para a realização das metodologias .....	35
5.1.1 Componentes do custo total.....	35
5.1.1.1 Custo fixo (CF).....	35
5.1.1.2 Componentes do custo fixo.....	36
5.1.1.3 Custo variável (CV).....	38
5.1.2 Dados para análise econômica simplificada .....	39
5.1.2.1 Custo operacional (Cop) .....	39
5.1.2.2 Custo total (CT).....	40
6 Resultados e Discussão.....	41
6.1 Metodologia de Krishnayya & Grewal (2002) .....	41
6.2 Metodologia de Rovesti et al. (1988) .....	45
6.3 Metodologia de Hara & Kaya (1983).....	48

6.4 Protocolo de Vainio (1992).....	54
7 Análise de custo das metodologias.....	56
7.1 Custo fixo (CF).....	56
7.2 Custo variável (CV).....	59
7.3 Custos totais das metodologias.....	61
8 Conclusões.....	63
9 Referências Bibliográficas.....	64
CAPITULO 3.....	66
1 Resumo.....	66
2 Abstract.....	67
3 Introdução.....	68
4 Material e Métodos.....	70
5 Resultados e Discussão.....	72
6 Conclusões.....	77
7 Referências Bibliográficas.....	78



## RESUMO

NEGRISOLI JUNIOR, Aldomario Santo. **Avaliação de técnicas para estudos de compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae).** 2005. 79p. Dissertação – (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras\*

Nematóides entomopatogênicos são eficientes agentes de controle biológico utilizados no controle de pragas em todo o mundo, em programas de manejo integrado. O manejo integrado de pragas preconiza o uso associado de diferentes estratégias de controle de pragas e, para que isso ocorra a contento, é importante o conhecimento da interação entre os diferentes produtos fitossanitários e os entomopatogênicos. Assim, objetivou-se, neste trabalho, a avaliação de técnicas para estudos de compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários para a seleção da melhor metodologia e aplicação desta com diferentes produtos comumente utilizados no Brasil. Para isso, compararam-se as metodologias de Krishnayya & Grewal (2002), Rovesti et al. (1988), Hara & Kaya (1983) e Vainio (1992), utilizando como padrão o herbicida glifosato e os nematóides *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*. Com base nos resultados de viabilidade e infectividade, bem como a análise do custo total para a realização de cada metodologia, selecionou-se como a melhor técnica o protocolo de Vainio (1992) modificado. Posteriormente, foram testados 18 produtos fitossanitários, dentre inseticidas, nematicidas, acaricidas, herbicidas e fungicidas, utilizando-se a metodologia selecionada com os mesmos nematóides. Os produtos fitossanitários tiofanate metil e aldicarbe foram considerados incompatíveis com *S. carpocapsae*, provocando redução de viabilidade e infectividade. Tiametoxan, tiofanate metil, aldicarbe e carbofuran foram incompatíveis com *H. bacteriophora*, provocando redução de viabilidade e infectividade do mesmo. Os demais produtos fitossanitários foram compatíveis com *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*.

---

\* Orientador: Alcides Moino Junior - UFLA

## ABSTRACT

NEGRISOLI JUNIOR, Aldomario Santo. Techniques evaluation for compatibility studies of agrochemicals with entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). 2005. 79p. Dissertation – (Master in Entomology) – Federal University of Lavras, Lavras\*

The entomopathogenic nematodes are efficient biological control agents, used to control pest in the whole world in integrated management programs. The Integrated Pest Management praises the associated use of different strategies to pest control and, in order to perform this satisfactorily, it is important to know the interaction among the different agrochemicals and the entomopathogens. Thus, it was aimed in this study the techniques evaluation for compatibility studies of the entomopathogenic nematodes with agrochemicals to choose the best methodology and its application with different products commonly used in Brazil. With this objective, Krishnayya & Grewal, (2002), Rovesti et al. (1988); Hara & Kaya (1983) and Vainio (1992) methodologies were compared, utilizing as standard the glifosato herbicide and the nematodes *H. bacteriophora* and *S. carpocapsae*. Based on the results of viability and infection, as well as the analysis of the total cost to perform each methodology, the Vainio's modified protocol was chosen as the best technique (1992). Later, 18 agrochemicals among insecticides, nematicides, acaricides, herbicides and fungicides were tested utilizing the selected methodology with the same nematodes species. The products tiofanate metil and aldicarbe were considered incompatible with *S. carpocapsae*, provoking reduction of viability and infection. Tiametoxan, tiofanate metil, aldicarbe and carbofuran were incompatible with *H. bacteriophora*, provoking reduction of viability and infection. The other agrochemicals were compatible with *H. bacteriophora* and *S. carpocapsae*.

---

\* Adviser: Alcides Moino Junior - UFLA

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Há algumas décadas, a preocupação decorrente do uso indiscriminado de produtos químicos, os quais têm ocasionado o aparecimento de insetos resistentes a tais produtos, bem como problemas de contaminação ambiental, tem conduzido à crescente busca de agentes de controle biológico que possam eficazmente substituir os produtos fitossanitários. Dessa forma, vários agentes de controle biológico, tanto nativos quanto exóticos, têm sido estudados e alguns utilizados na prática com sucesso (Friedman, 1990; Georgis, 1990; Klein, 1990).

Nematóides entomopatogênicos são eficientes agentes de controle biológico, com os quais instituições de pesquisa no mundo todo estão desenvolvendo intensivos estudos. Os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são particularmente interessantes e, como resultado de toda a pesquisa já desenvolvida, encontram-se disponíveis para a aquisição como produtos comerciais no exterior, a preços competitivos com os produtos químicos (Smart, 1995).

No manejo integrado de pragas (MIP), em estratégias envolvendo o uso de nematóides entomopatogênicos (Steinernematidae e Heterorhabditidae) e produtos fitossanitários químicos é importante conhecer o grau em que estes nematóides podem ser afetados pelos produtos (Gordon et al., 1996). Assim, o uso conjunto de produtos fitossanitários químicos e dos agentes de controle biológico no MIP tem sido alvo de intensa pesquisa. O MIP objetiva maximizar o efeito dos pesticidas contra o organismo alvo, enquanto minimiza seus efeitos adversos sobre os agentes de controle biológico e outros organismos não alvo (Hara & Kaya, 1982).

Espécies de nematóides podem ser diferentes quanto à sensibilidade a diferentes formulações do mesmo produto. Assim, informações que consideram a compatibilidade entre os nematóides entomopatogênicos e os mais comuns produtos fitossanitários e suas formulações são necessárias para atingir os sistemas de culturas (Krishnayya & Grewal, 2002). Várias são as metodologias para a avaliação da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários, dificultando a comparação entre os resultados pela falta de padronização do método.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- comparar diferentes metodologias de avaliação da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários visando selecionar o melhor método de avaliação;
- apresentar os custos totais envolvidos em cada metodologia para auxiliar na seleção do melhor método;
- analisar a compatibilidade de produtos de diferentes classes (inseticidas, herbicidas, acaricidas, fungicidas e nematicidas) com a metodologia selecionada.

## 2 REREFENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância dos nematóides entomopatogênicos

Nematóides são vermes alongados, mais ou menos cilíndricos ao longo do comprimento do corpo. Seu corpo é coberto por uma cutícula não celular que difere quimicamente da cutícula quitinosa dos artrópodes. Embora possuam estrias transversas ou anulações que freqüentemente ocorrem na cutícula, estas são superficiais e não segmentações verdadeiras. Estes organismos possuem sistemas excretor, nervoso, digestivo, reprodutivo e muscular, ausentando-se os sistemas respiratório e circulatório. O canal alimentar consiste em uma cavidade bucal, esôfago, intestino e reto com o ânus localizado ventralmente (Tanada & Kaya, 1993).

São organismos tão diversificados que, depois dos insetos, é o grupo que possui os habitats mais variados, sendo encontrados desde o deserto árido até as regiões mais frias, em água salgada e até no gelo do Ártico (Tanada & Kaya, 1993). Exploram o modo de sobrevivência parasítica de forma mais eficiente que qualquer outro grupo animal. Algumas ilustrações mostram nematóides parasitos de animais com mais de um metro de comprimento, enquanto os de vida livre não excedem um ou dois centímetros (Welch, 1963).

Nematóides pertencentes a diversos gêneros têm sido encontrados em associações com insetos, com os quais estabelecem relações dos tipos: forésia, parasitismo - facultativo ou obrigatório. Em se tratando de forésia, juvenis de terceiro estágio associam-se aos insetos externamente ou internamente, apenas com o objetivo de serem transportados e, dessa forma, disseminados. O parasitismo tem sido citado desde o século XVII. Neste tipo de associação, podem ser citados nematóides da família Mermithidae, conhecidos parasitos de Orthoptera, Lepidoptera e de mosquitos (Diptera, Culicidae), bem como da

família Neotylenchidae, representado por *Beddingia siricidicola*, parasito de *Sirex noctilio* (Hymenoptera: Siricidae). No entanto, os nematóides entomopatogênicos mais estudados são os da ordem Rhabditida (Steinernematidae e Heterorhabditidae), os únicos a manter associação mutualística com bactérias simbiotes (Ferraz, 1998).

### 2.1.1 Principais grupos

O grupo com maior potencial de uso como agente de controle biológico e que tem despertado maior interesse de pesquisadores em várias partes do mundo, é aquele que reúne nematóides capazes de parasitar insetos, mas que conservam a habilidade de se desenvolver e reproduzir sob condições de vida livre, nutrindo-se de fungos e bactérias disponíveis no ambiente (parasitismo facultativo). No caso da família Neotylenchidae, encontram-se nematóides que alimentam-se de fungo e que podem, eventualmente, apresentar comportamento entomopatogênico. Neste caso, tem-se um exemplo de utilização de nematóides para o controle biológico no Brasil, com a espécie *B. siricidicola* (Tylenchida: Allantonematidae), que vem sendo aplicada para o controle da vespa da madeira (*S. noctilio*), em plantações de *Pinus* spp., na região sul do país.

As principais famílias de nematóides entomopatogênicos parasitos obrigatórios de insetos são as seguintes, segundo Maggenti (1981; 1991):

- Tetradonematidae: representado por *Tetradonema plicans*, um parasita obrigatório de *Sciaridae* spp. (Diptera) que se apresenta como potencial agente de controle destes insetos em casa de vegetação;

- Mermithidae: tendo como principal espécie *Romanomermis culicivorax*, agente de controle de larvas de culicídeos, comercializado na década de 1970, abandonado por dificuldades na produção, estocagem e transporte dos nematóides, mas ainda utilizado no controle de larvas de culicídeos, em pequena escala, em todo o mundo;

- Allantonematidae<sup>1</sup>: a espécie mais estudada é *Thripinema nicklewoodi*. um potencial agente de controle biológico de tripes (*Frankliniella occidentalis*) e *Thripinema fusca*, podendo ser utilizado no controle de *Frankliniella fusca*, importante vetor do tospovirus causador de vira-cabeça em tomate e amendoim;

- Sphaerulariidae: não representado por nenhuma espécie potencial agente de controle de pragas, sendo a espécie *Sphaerularia bombi* patogênica a insetos do gênero *Bombus*, conhecidas vulgarmente por mamangavas.

Nematóides entomopatogênicos da ordem Rhabditida, ou seja, aqueles que atuam em associação com bactérias patogênicas, têm sido estudados intensivamente desde a sua descoberta quando foram encontrados parasitando inseto da ordem Diptera, em 1923. Travassos, em 1927, descreveu o gênero *Steinernema* (syn. *Aplectana*; *Neoaplectana*), que se constitui no gênero mais estudado em todo o mundo (Poinar, 1979). Atualmente, conhecem-se três gêneros de nematóides entomopatogênicos, os quais vivem em associação com bactérias, as quais são os agentes causais da morte dos insetos hospedeiros. O gênero *Steinernema* Travassos, 1927, contém 25 espécies e é associado a bactérias do gênero *Xenorhabdus*; o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976, contém nove espécies e é associado a bactérias do gênero *Photorhabdus* e, finalmente, o gênero *Neosteinerema*, Nguyen e Smart, 1994, contém, até o momento, uma única espécie (Nguyen & Smart, 1994; Smart, 1995; Burnell & Stock, 2000).

Com relação à biologia deste grupo, juvenis infectivos (JIs) de nematóides entomopatogênicos carregam no interior do trato digestivo bactérias simbióticas, as quais são liberadas na hemolinfa do hospedeiro logo após a

---

<sup>1</sup>- Incluindo as famílias Neotylenchidae e Iotonchiidae. Por causa da instabilidade de várias famílias dentro da superfamília Sphaerularioidea, as espécies destas famílias são colocadas com os Allantonematidae

invasão do corpo do inseto pelos nematóides. Dentro de um período de 24 a 72 horas, ocorre a morte do hospedeiro e os nematóides, alimentando-se de células da bactéria simbiote e de tecidos do inseto, desenvolvem-se em adultos e reproduzem-se. No caso de *Heterorhabditis*, na primeira geração que desenvolve-se no hospedeiro, há a formação de fêmeas hermafroditas. Da segunda geração em diante, há a formação de machos e fêmeas que acasalam-se e dão continuidade ao ciclo de vida. No caso de *Steinernema*, os machos estão presentes desde a primeira geração no hospedeiro. Quando a fonte de alimento começa a se exaurir, ocorrem alterações no terceiro estágio de juvenis, os quais retêm a cutícula do segundo estágio e encapsulam células da bactéria simbiote no intestino, enquanto a cavidade bucal e o esôfago entram em colapso, fechando-se. Forma-se, então, a fase conhecida como juvenil infectivo (JI), que não se alimenta, resiste a condições adversas e se locomove no solo à procura de um novo hospedeiro. A invasão do corpo do inseto pode ocorrer através de aberturas naturais, como em *Steinernema*, ou também diretamente através da cutícula, como em *Heterorhabditis* visto que os juvenis infectivos deste gênero possuem denticulos, um dorsal, maior e dois ventrais, menores, com os quais perfuram a cutícula do hospedeiro (Poinar, 1990).

## 2.2 Uso no controle microbiano: vantagens e desvantagens

O interesse cada vez maior dos pesquisadores brasileiros pelos nematóides entomopatogênicos advém do fato destes organismos possuírem características que se tornam vantagens quando comparados com outros agentes de controle biológico de insetos. Algumas destas características foram evidenciadas por Ferraz (1998):

- resistem a um grande número de produtos fitossanitários, podendo ser utilizados em programas de controle integrado;



- têm ação sinérgica com outros entomopatógenos, como exemplo *Bacillus thuringiensis*, aumentando a eficiência e economia do método;

- apresentam alta capacidade de adaptação a novos ambientes, a não ser em condições adversas extremas;

- possuem capacidade de busca de hospedeiro, com possibilidade de difusão pelo ambiente;

- são específicos a insetos, não causando dano às plantas cultivadas;

- algumas vezes, a mortalidade da praga é maior com o uso de nematóides comparando-se com outros entomopatógenos.

A aplicação em escala comercial destes nematóides ainda é restrita pelo fato de apresentarem algumas limitações quando são aplicados em campo (Ferraz, 1998). Dentre algumas delas podem-se citar:

- dificuldades na criação massal: principalmente quanto ao custo de produção que ainda é elevado, ao armazenamento e à formulação, a exemplo de outros entomopatógenos;

- condições ambientais desfavoráveis: são organismos sensíveis à dessecação condicionando sua aplicação em dias e locais úmidos e, quando aplicados em área foliar, misturados com algum agente que diminua a evaporação;

- mecanismo de defesa do hospedeiro: além das barreiras do ambiente, os nematóides entomopatogênicos (NEPs) muitas vezes, encontram dificuldade no estabelecimento do parasitismo do inseto antes ou após a penetração. A baixa suscetibilidade de alguns insetos geralmente é atribuída aos mecanismos de defesa, principalmente a encapsulação e melanização.

### **2.3 Interação entre entomopatógenos e produtos fitossanitários**

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem dos patógenos, da natureza química dos

produtos e das concentrações utilizadas. Um dos fatores mais limitantes na produção de importantes culturas no Brasil é o aumento da população de pragas provocado pelo uso excessivo de produtos fitossanitários, além dos efeitos dos mesmos sobre o ambiente, o homem e animais de modo geral. Produtos fitossanitários seletivos aos entomopatógenos são necessários, principalmente em culturas nas quais o uso destes produtos é indispensável, diminuindo o impacto entre pragas e seus predadores, parasitos e patógenos, responsáveis pelo controle biológico natural (Alves et al., 1998). A maioria dos trabalhos que visam testar o efeito de produtos fitossanitários sintéticos sobre entomopatógenos foi realizada com fungos entomopatogênicos (Cavalvanti, 2002).

Nematóides entomopatogênicos são freqüentemente aplicados em conjunto com outros produtos fitossanitários químicos e biológicos, fertilizantes e corretivos de solo, sendo mais comum e econômica a mistura de tanque dos nematóides com estes produtos na aplicação (Krishnayya & Grewal, 2002).

Para a obtenção de uma padronização na avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com NEPs do gênero *Steinernema* foi desenvolvido por Vainio (1992) um protocolo que propõe a realização de testes nos quais são avaliadas a viabilidade dos nematóides após contato com produtos fitossanitários por 2, 5 e 7 dias e a sua infectividade, após estes períodos, sobre larvas de *Tenebrio molitor*.

De forma geral, as interações entre produtos e entomopatógenos podem ser positivas (ação sinérgica, aditiva) ou negativas (ação supressiva, antagonista).

### 2.3.1 Interações positivas

Em relação à interação positiva de produtos fitossanitários com fungos e bactérias entomopatogênicas, citam-se os trabalhos mais recentes com

*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, associados com concentrações subletais de imidaclopride, que promoveram efeitos sinérgicos na mortalidade de *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) quando utilizados nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  conídios/mL e o inseticida na concentração de 100 ppm, produzindo mortalidade larval de 90% a 100% (Quintela & McCoy, 1998).

Neves & Alves (1999) verificaram, em condições de campo, a eficiência do controle associado do cupim-de-montículo *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae) com fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e os produtos imidaclopride e fipronil. Os autores constataram sinergismo entre os entomopatógenos e concentrações subletais do inseticida imidaclopride. Estes mesmos autores em (2000) observaram que este sinergismo está associado com a inibição do comportamento de limpeza entre indivíduos do cupim *C. cumulans*. Neste caso, o inseticida imidaclopride funciona como inibidor do comportamento de limpeza, permitindo que os conídios dos fungos germinem, causando a sua morte.

Alguns inseticidas neonicotinóides foram testados quanto ao efeito fungitóxico sobre os fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Paecilomyces* sp., avaliando-se a germinação dos conídios, o crescimento vegetativo e a esporulação dos entomopatógenos. De forma geral, os produtos acetamipride, imidaclopride e tiametoxam foram compatíveis com os três fungos avaliados (Neves et al., 2001).

A influência de produtos adjuvantes quanto à sua compatibilidade com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi estudada por Tanzini et al. (2001). Os produtos Agrimul, Sulfofon NSS, Surfion 950, Surfion PM, Vixil-S e Vixilex foram compatíveis com ambos entomopatógenos.

Bhattacharya et al. (2004) avaliaram a compatibilidade de *B. bassiana*, *Bacillus subtilis* e *B. thuringiensis* com os produtos endossulfam 35 CE, imidaclopride, Plant Boost (regulador de crescimento de plantas), carbaryl 50

WP, mancozeb 75 WP, Tracel-2 (micronutriente), monocrotofós e azadiractina, pelo método *in vitro*. Os resultados obtidos sugeriram que monocrotofós, azadiractina, imidaclopride e carbaryl foram compatíveis com todos os entomopatógenos, podendo ser utilizados conjuntamente no manejo integrado.

Testes em campo foram realizados por Feng et al. (2003), com a aplicação da formulação em óleo emulsionável de *B. bassiana* com diferentes concentrações de imidaclopride para o controle de *Empoasca vitis* (Hemiptera: Cicadellidae) na China. Os resultados indicaram que altas doses do entomopatógeno em combinação com produto fitossanitário provocaram a maior mortalidade da população do inseto em campo. Assim, os autores sugerem o uso da formulação em óleo emulsionável de *B. bassiana* com imidaclopride a 10%, na dose de 375 a 480g/ha no manejo integrado dessa praga.

Apesar de poucos trabalhos versarem sobre o efeito de produtos fitossanitários sobre vírus entomopatogênicos, Gomez & Rumiatto (1989) avaliaram a possibilidade do controle simultâneo da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e de plantas infestantes da cultura da soja com a aplicação associada de AgMNPV e herbicidas pós-emergentes. Os resultados mostraram a não interferência dos herbicidas na ação do vírus sobre as lagartas de *A.gemmatalis*.

Em trabalho desenvolvido por Silva (1995), verificou-se a possibilidade da utilização do AgMNPV conjuntamente com inseticidas em doses subletais utilizados no controle de *A. gemmatalis*. Os produtos diflubenzurom, carbaril, clorpirifós, endossulfam, permetrina, profenofós, tiodicarbe e triclorfom foram compatíveis com AgMNPV, quando utilizados em concentrações abaixo das recomendadas em campo.

Em relação aos nematóides entomopatogênicos, juvenis infectivos destes organismos são tolerantes a curtas exposições (2-6 horas) à maioria dos produtos

fitossanitários químicos, incluindo herbicidas, fungicidas, acaricidas e inseticidas (Rovesti & Deseö, 1990).

Inseticidas carbamatos com diferentes modos de ação (carbofuran e fenoxicarbe) foram avaliados por Gordon et al. (1996) para compatibilidade com *Steinernema carpocapsae* e *S. feltiae*. Ambos os nematóides foram sensíveis ao fenoxicarbe, sendo *S. feltiae* mais afetado pelo carbofuran. A infectividade dos NEPs não foi afetada pela exposição aos produtos após 24 horas de exposição e os valores de CL<sub>50</sub> foram iguais em todos os períodos de exposição. Nenhum dos carbamatos afetou a infectividade dos JIs expostos aos produtos.

Nematóides entomopatogênicos também podem ter efeito sinérgico com produtos fitossanitários. Koppenhöfer & Kaya (1998) avaliaram a combinação de imidaclopride, inseticida utilizado no controle de *Ciclocephala pasadenae* e *C. hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae), com JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* e verificaram a possibilidade de aplicação conjunta desses dois agentes de controle contra a praga. O inseticida foi considerado compatível com o nematóide, causando entre 0,7% e 0,3% mortalidade do nematóide. A mortalidade larval foi elevada no uso combinado do inseticida e do nematóide, sendo maior que a encontrada na testemunha, mostrando um efeito sinérgico entre esta combinação. Em outro trabalho, Koppenhöfer et al. (2000) avaliaram o sinergismo de *S. glaseri* e *H. bacteriophora* com imidaclopride no controle de *C. pasadenae* e *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) e observaram alta mortalidade na combinação de imidaclopride e nematóides, com possibilidade de redução do uso do produto fitossanitário em campo.

A interação entre produtos fitossanitários, nematóides entomopatogênicos e larvas de *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) foi estudada por Nishimatsu & Jackson (1998), utilizando três inseticidas (terbufós, fonofós e teflutim) com *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*. Houve efeito aditivo e antagonismo no caso de terbufós e fonofós, respectivamente e efeito sinérgico

para teflutim para ambos os nematóides, com resultados promissores no uso conjunto desses nematóides com o produto fitossanitário considerado como compatível.

De acordo com Zimmerman & Cranshaw (1990), os fungicidas benomil, clorotalonil, pentacloronitrobenzeno e o herbicida dicamba foram compatíveis com os nematóides testados. Já o inseticida organofosforado diazinom não foi tóxico a *Neoaplectana carpocapsae* e *N. bibionis* Bovien (Rhabditida: Steinernematidae), após 48 horas de exposição, porém, prejudicou *Heterorhabditis* sp. neste mesmo tempo de exposição. O produto mais tóxico, que causou 100% de mortalidade às três espécies, foi o fungicida cloreto de mercúrio.

Gaugler & Campbell (1991) avaliaram a resposta comportamental de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, quando expostos ao inseticida oxamil. O produto em baixa concentração provocou a redução da quantidade de nematóides em repouso na ordem de 35%, aumentando o movimento sinusoidal. No entanto, o aumento da atividade dos JIs não resultou na maior busca pelo hospedeiro. Em altas concentrações, oxamil provocou de alta atividade a *paralisia* parcial dos JIs, e, especificamente para *H. bacteriophora*, uma alta atividade dos JIs. Os autores concluíram que o produto fitossanitário é compatível com os NEPs avaliados.

Herbicidas comumente aplicados no solo podem apresentar efeito sobre NEPs, como foi verificado por Forschler et al. (1990), avaliando os herbicidas alaclor, setoxidim, 2,4 D e glifosato, em diferentes concentrações e períodos de exposição. O produto fitossanitário mais tóxico foi alaclor, com até 90% de redução da atividade dos JIs, e redução da viabilidade de no máximo 30% para os outros produtos. A infectividade dos NEPs em *G. mellonella* não foi significativamente reduzida pelos produtos 2,4 D, glifosato e setoxidim, ao contrário de alaclor, que reduziu a atividade e infectividade dos JIs.

Foi observado o impacto de fertilizantes orgânicos e inorgânicos na infectividade, reprodução e dinâmica populacional de nematóides entomopatogênicos. A exposição prolongada (10 a 20 dias) a altas concentrações de fertilizantes inorgânicos inibiu a infectividade e a reprodução dos nematóides em laboratório, enquanto baixas concentrações aumentaram a infectividade. Os nematóides do gênero *Heterorhabditis* mostraram-se mais sensíveis aos efeitos adversos do que as duas espécies do gênero *Steinernema* testadas. Em condições de campo, esterco fresco aumentou a população de *S. feltiae*, enquanto o fertilizante NPK suprimiu a densidade desses organismos (Bednarek & Gaugler, 1997).

Há disponível na internet uma tabela de compatibilidade de NEPs com produtos fitossanitários avaliados pela extinta empresa americana Biosys, sob responsabilidade de Dunn & Smart (1996), na Universidade da Florida. Estão listados cinco bioinseticidas, quatro reguladores de crescimento de insetos, quinze inseticidas, um acaricida, doze fungicidas e três herbicidas considerados como compatíveis, podendo ser utilizados na mistura de tanque com *S. carpocapsae* e *S. riobraviss*.

### 2.3.2 Interações negativas

Para fungos entomopatogênicos, as interações negativas com produtos fitossanitários podem ser vistas em muitos trabalhos recentes. Todorova et al. (1998) avaliaram o efeito *in vivo* de seis fungicidas (clorotalonil, menez, tiofanato-metil, mancozeb, metalaxil+mancozeb e zineb) e dois herbicidas (diquate e glucosinato-amônio) utilizados na cultura da batata sobre o fungo entomopatogênico *B. bassiana*. Os produtos foram utilizados em sua concentração comercial recomendada, dez vezes menor que a recomendada e dez vezes mais elevada, medindo-se o crescimento vegetativo e a esporulação. De forma geral, todos fungicidas causaram inibição do crescimento vegetativo

(> 80%). No segundo parâmetro avaliado, todos os produtos testados, exceto zineb (concentração 10 vezes menor que a recomendada), reduziram a esporulação de *B. bassiana*, 14 dias após o tratamento.

Pachamutu et al. (1999) verificaram a virulência de *etarhizium anisopliae* linhagem ESC-1 contra *Blatella germanica* (Dyctioptera: Blattellidae) com diferentes concentrações de clorpirifós, propetamfós e cyflutrim. Os inseticidas não afetaram a germinação dos conídios do fungo, mas afetaram adversamente o crescimento e esporulação de *M. anisopliae* linhagem ESC-1.

Com relação a nematóides entomopatogênicos, Hara e Kaya (1983) constataram que JIs de *Steinernema (Neoplectana) carpocapsae* foram afetados adversamente em seu comportamento e infectividade contra *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) por organofosforados (mevinfós, fenamifós e triclorfom) e por carbamatos (oxamil e methomil) em várias concentrações, havendo diminuição da virulência e movimentação dos JIs.

Rovesti & Deseö (1991) avaliaram a compatibilidade de 24 fungicidas, 25 herbicidas, 18 inseticidas, 5 acaricidas e 2 nematicidas com *Heterorhabditis bacteriophora*, sendo considerados incompatíveis os herbicidas alaclor e paraquate, os inseticidas paration, forate, terbufós, fonofós, isofenfós+foxim, aldicarbe, carbofuram e metomil, o acaricida flubenzimina e os nematicidas metam sódio e fenamifós. Os mesmos autores, em (1990) avaliaram a compatibilidade destes produtos (exceto isofenfós + foxim) com *S. carpocapsae* e *S. feltiae* e observaram que paration, aldicarbe, metomil, flubenzimina, metam sódio e fenamifós foram os mais tóxicos.

O efeito de fungicidas seletivos e duas formulações de *Azadiractha indica* (nim), na viabilidade e infectividade de *Steinernema feltiae*, foi testado por Krishnayya & Grewal (2002). Extrato de nim e o óleo de nim, ambos misturados com surfactante causaram a mortalidade de 13% a 25% de *S. feltiae*, sendo essa mortalidade causada somente pelo surfactante (24% de mortalidade quando



aplicado individualmente). Após 120 horas de exposição, os fungicidas cinamaldeído e ácido peróxido acético + dióxido de hidrogênio causaram 100% de mortalidade dos JIs. Azoxitrobin foi considerado compatível, sendo o único produto possível de ser utilizado na mistura de tanque.

O nematóide *S. feltiae* foi misturado a inseticidas e aplicado em condições de laboratório em larvas de *G. mellonella* e em campo sobre larvas de *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) (Diptera: Agromyzidae), com a finalidade de avaliar a patogenicidade deste nematóide quando associado a inseticidas. Tanto nos ensaios em laboratório como em campo, mostraram uma redução na patogenicidade do nematóide quando associado aos produtos fitossanitários, ocorrendo um alto índice de sobrevivência das larvas (Head et al., 2000).

O efeito de inseticidas e nematicidas no desenvolvimento *in vitro* de *S. (Neoaplectana) carpocapsae* foi avaliado por Hara & Kaya (1982). Os organofosforados mevinfós, fenamifós e triclorfom, bem como os carbamatos carbofuran, metomil e oxamil, afetaram negativamente a reprodução e o desenvolvimento dos JIs. Formamidina inibiu o desenvolvimento e diflubenzurom, metoxiclor e fenvalerate não reduziram a reprodução significativamente.

O efeito de fertilizantes orgânicos (fezes bovinas frescas ou curtidas/compostas e uréia) na virulência de *S. carpocapsae* sobre lagartas de *G. mellonella* foi observado por Shapiro et al. (1996), que constataram a diminuição da virulência dos JIs com o uso de uréia e fezes bovinas frescas em laboratório. Tanto em laboratório como em campo, fezes bovinas curtidas não afetaram a virulência de *S. carpocapsae*.

## 2.4 Métodos de avaliação da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários

Os efeitos de produtos fitossanitários sobre nematóides entomopatogênicos podem ser avaliados de duas formas: diretamente e indiretamente. Os efeitos diretos são a viabilidade e o comportamento dos JIs quando são expostos a determinadas concentrações e períodos de exposição a determinado produto. Os efeitos indiretos dizem respeito à capacidade destes juvenis serem infectivos a determinado inseto hospedeiro. Assim, os métodos de avaliação da compatibilidade de NEPs com produtos fitossanitários procuram medir, de alguma forma, os efeitos diretos e indiretos desses produtos.

### 2.4.1 Em laboratório

Os juvenis infectivos dos NEPs podem ser expostos de diferentes formas aos produtos. Hara & Kaya (1982) adicionaram diferentes concentrações de diversos inseticidas (organofosforados, carbamatos, reguladores de crescimento de insetos, etc.) no substrato de multiplicação do nematóide *S. (Neoaplectana) carpocapsae* baseado em ração de cachorro mais ágar (Dog food medium) em placas de petri onde posteriormente os JIs (obtidos de cultura monoxênica) eram inoculados. Passados 14 dias, após separação por decantação, fêmeas e machos eram contados. Na maior parte dos trabalhos, os JIs são expostos aos produtos em soluções aquosas em placas de petri (Hara & Kaya, 1983; Rovesti & Deseö, 1990; 1991; Rovesti et al., 1988; Forchler et al., 1990; Zimmerman & Cranshaw, 1990; Gaugler & Campbell, 1991; Ishibashi & Takii, 1993; Gordon et al., 1996), em tubos de ensaio (Vainio, 1992), em erlenmeyer (Koppenhöfer et al., 2002) ou em placas de 24 células utilizadas em cultura de tecidos (Krishnayya & Grewal, 2002; De Nardo & Grewal, 2003).

Os efeitos diretos (viabilidade de JIs) dos produtos sobre os NEPs podem ser observados por meio do agrupamento dos JIs em categorias de

comportamento ou escala de notas (Rovesti & Deseö, 1990; 1991; Rovesti et al., 1988; Gaugler & Campbell, 1991; Ishibashi & Takii, 1993). Porém, na maioria das metodologias, a viabilidade dos JIs é medida pela contagem direta dos mesmos, retirando-se amostras da suspensão aquosa de JIs mais produto, sendo estes estimulados com a ponta de uma agulha para a confirmação da morte e os valores expressos em porcentagem de JIs mortos (Hara & Kaya, 1983; Forchler et al., 1990; Zimmerman & Cranshaw, 1990; Vainio, 1992; Gordon et al., 1996; Koppenhöfer & Kaya, 1998; Koppenhöfer et al., 2002, Krishnayya & Grewal, 2002; De Nardo & Grewal, 2003).

Os efeitos indiretos, isto é, relativos à infectividade dos JIs após exposição aos produtos fitossanitários, podem ser realizados em placas de petri com papel filtro ao qual são adicionados os JIs e o inseto hospedeiro (Hara & Kaya, 1983; Forchler et al., 1990; Vainio, 1992; Gordon et al., 1996; Koppenhöfer & Kaya, 1998; Koppenhöfer et al., 2002, Krishnayya & Grewal, 2002; De Nardo & Grewal, 2003), em placas de 24 células utilizadas em cultura de tecido (Krishnayya & Grewal, 2002; De Nardo & Grewal, 2003) ou em copos plásticos com areia esterilizada e inseto hospedeiro (Koppenhöfer & Kaya, 1998; Koppenhöfer et al., 2002). Os insetos hospedeiros mais utilizados são lagartas de *G. mellonella*, mas encontra-se o uso de larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Vainio, 1992), *Spodoptera exigua* (Hara & Kaya, 1983), *S. litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Ishibashi & Takii, 1993) e *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) (Koppenhöfer et al., 2002).

#### 2.4.2 Em casa de vegetação e campo

Poucos são os trabalhos que abordam as interações de NEPs e produtos fitossanitários em campo e em casa de vegetação. Os experimentos são direcionados para a avaliação da interação de determinada espécie de NEP e produto fitossanitário no controle de uma ou mais pragas de interesse

econômico. Basicamente, consistem na aplicação de nematóides e produtos no substrato de plantas hospedeiras, onde estão presentes os insetos-praga, mantidos sob condições controladas de umidade e temperatura (de casa de vegetação).

Diferentes tempos de exposição dos JIs aos produtos podem ser utilizados, como visto no trabalho de Nishimatsu & Jackson (1998), utilizando *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* juntamente com três inseticidas no controle de *Diabrotica virgifera*.

Em relação à forma de aplicação dos tratamentos nas plantas atacadas pelas pragas, Head et al. (2000) utilizaram diferentes combinações de aplicação em campo entre produtos, água e *S. feltiae* para cada tipo de inseticida no controle de *Liriomyza huidobrensis*.

Tendo em vista a multiplicidade de metodologias para avaliação do efeito de produtos fitossanitários sobre nematóides entomopatogênicos encontradas na literatura internacional, este trabalho propõe o estabelecimento de um protocolo para a realização de testes de compatibilidade *in vitro* desses organismos, por meio da comparação de diferentes metodologias com eventuais adaptações, baseando-se nos resultados observados.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 8, p.217-238.
- BEDNAREK, A.; GAUGLER, R. Compatibility of soil amendments with entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*, v.29, n.2, p.220-227, 1997.
- BHATTACHARYA, S.; DUTTA, S.; DHAR, T. In vitro compatibility of different entomopathogens to pesticides, plant growth regulators and micronutrients. *Annals of Plant Protection Sciences*, v.12, n.1, p.199-202, 2004.
- BURNELL, A.M.; STOCK, P.S. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts – lethal pathogens to insects. *Nematology*, v.2, p.31-42, 2000.
- CAVALCANTI, R.S. **Compatibilidade e seleção para resistência do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a produtos fitossanitários**. 2002. 82 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- DE NARDO, E.A.B.; GREWAL, P.S. Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) with pesticides and plant growth regulators used in glasshouse plant production. *Biocontrol Science and Technology*, v.13, n.4, p.441-448, 2003.
- DUNN, R.A.; SMART, G.C. **Pesticide compatibility of beneficial nematodes**. Florida University, 1996. Disponível em: <<http://extlab7.entnem.ufl.edu/PestAlert/rad-0812.htm>>. Acesso em: 10.01.2005
- 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*, v.23, p.489-496, 2003.
- FERRAZ, L.C.C.B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.541-569.

- o FORSCHLER, B.T.; ALL, J.N.; GARDNER, W.A. *Steinernema feltiae* activity and infectivity in response to herbicide exposure in aqueous and soil environments. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.55, p.375-379, 1990.
  - o ROVESTI, L. et al. Compatibility of Pesticides with the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). **Nematologica** v.4, p.462-476, 1988.
- FRIEDMAN, M.J. Commercial production and development. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K.(Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p.153-170.
- GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. F. Behavioral response of entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to oxamyl. **Annals of Applied Biology**, v.119, p.131-138, 1991.
- GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R., KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p.173-187.
- \* GOMEZ, S.A.; RUMIATTO, M. Controle da lagarta da soja com *Baculovirus anticarsia* misturado com herbicidas pós-emergentes. In: EMBRAPA-UEPAE. **Resultados de pesquisa da soja. safra 1988-1989**, Dourados, 1989. p.64-66. (Documentos, 42).
  - o GORDON, R.; CHIPPETT, J.; TILLEY, J. Effects of two carbamates on infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* all strain and *Steinernema feltiae* Umea strain. **Journal of Nematology**, v.28, n.3, p.310-317, 1996.
  - o HARA, A.H.; KAYA, H. K. Effects of selected insecticides and nematicides on the *in vitro* development of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae*. **Journal of Nematology**, v.14, n.4, p.486-491, 1982.
  - o HARA, A.H.; KAYA, H.K. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomopatogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida:Steinernematidae). **Environmental Entomology**, v.12, p.496-501, 1983.
- HEAD, J.; WALTERS, K.F.A.; LANGTON, S. Compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* and chemical insecticides for the control of the south american leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. **Biocontrol**, Dordrecht, v.45, n.3, p.345-353, Sept. 2000.

- ⑥ ISHIBASHI, N.; TAKII, S. Effects of insecticides on movement, nictation, and infectivity of *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, v.25, n.2, p.204-213, 1993.
- KLEIN, M. G. Efficacy against soil-inhabitant insect pests. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p.195-214.
- ⑥ KOPPENHÖFER, A.M.; KAYA, H. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to White Grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p.618-623, 1998.
- KOPPENHÖFER, A.M. et al. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. **Biological Control**, v.19, p.245-251, 2000.
- KOPPENHÖFER, A. M. et al. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.24, p.90-97, 2002
- KRISHNAYYA, 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**, v.12, p.259-266, 2002.
- MAGGENTIL, A. **General nematology**. New York: Springer-Verlag. 1981.
- MAGGENTIL, A.R. Nemata: Higher classification. In: NICKLE, W.R (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.147-187.
- 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.
- NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. Grooming capacity inhibition in *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) inoculated with entomopathogenic fungi treated with imidacloprid. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Itabuna, v.29, n.3, p.537-545, set. 2000.

NEVES, P.M.O.J. et al. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoids insecticides. *Neotropical Entomology*, Itabuna, v.30, n.2, p.263-268, jun. 2001.

NISHIMATSU, T.; JACKSON, J.J. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*, Washington, v.91, n.2, p.410-418, Apr. 1998.

NGUYEN, K.B; SMART, G.C.. *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *Journal of Nematology*, v.26, p.162-174, 1994.

PACHAMUTHU, P; KAMBLE, S.T.; YUEN, G.Y. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to the German cockroach (Dyctioptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. *Journal of Economic Entomology*, v.92, n.2, p.30-346, 1999.

POINAR, G.O. Jr. *Nematodes for biological control of insects*. Boca Raton: CRC, 1979. 277 p.

POINAR, G.O.Jr. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: CRC, 1990. p.23-58.

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.

- ① ROVESTI, L.; DESEÖ, K. V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis heliothidis*. *Nematologica*, v.37, 113-122, 1991.
- ② ROVESTI, L.; DESEÖ, K.V. Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*, v.36, p.237-245, 1990.
- ③ ROVESTI, L. et al. Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematologica*, Leiden, v.34, n.4, p.463-476, 1988.



- SHAPIRO, D.I.; TYLKA, G.L.; LEWIS L.C. Effect of fertilizers on virulence of *Steinernema carpocapsae*. *Applied Soil Ecology*, v.3, p.27-34, 1996.
- SILVA, M.T.B. Associação de *Baculovirus anticarsia* com subdosagens de inseticidas no controle de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.25, n.3, p.353-358, 1995.
- SMART, G.C. Jr. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Journal of Nematology*, v.27, n.4S, p.529-534, 1995.
- TANADA, Y.; KAYA, H.K. Nematodes, Nematomorphs and Plathyelminthes. In: TANADA, Y.; KAYA, H.K. (Ed.). *Insect Pathology*. San Diego: Academic, 1993. p.459-491.
- TANZINI, M.R. et al. Compatibilidad de agentes tensoativos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado de Plagas*, San Jose, n.59, p.15-18, 2001.
- TODOROVA, S.I. et al. Compatibility of *Beauveria bassiana* with selected fungicides and herbicides. *Environmental Entomology*, Lanham, v.27, n.2, p.427-433, Apr. 1998.
- VAINIO, A. Guideline for laboratory testing of the side-effects of pesticides on entomophagous nematodes *Steinernema* spp. *IOBC/WPRS Bulletin*, v.15, p.145-147, 1992.
- WELCH, H.E. Nematode infections. In: STEINHAUS, E.A. (Ed.). *Insect pathology*. San Diego: Academic, 1963. v.2. p.363-387.
- © ZIMMERMAN, R.J.; CRANSHAW, W.S. Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. *Journal of Economic Entomology*, Washington, v.83, n.1, p.97-100, Feb. 1990.

## CAPÍTULO 2

### 1 RESUMO

NEGRISOLI JUNIOR, Aldomario Santo. Comparação entre metodologias de avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos. In: \_\_\_\_\_. Avaliação de técnicas para estudos de compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). 2005. p.24-65. Dissertação (Mestrado em Entomologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

Diferentes metodologias para a avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos encontram-se na literatura. Procurando selecionar o método mais eficiente e ao mesmo tempo simples e barato de ser aplicado, objetivou-se comparar as diferentes metodologias. Quatro métodos foram testados: Krishnayya & Grewal, (2002) Rovesti et al. (1988), Hara & Kaya (1983) e Vainio (1992). Todas as metodologias constituíram-se de dois parâmetros de avaliação: a viabilidade dos JIs e a infectividade destes em *G. mellonella*. Algumas adaptações para cada metodologia foram feitas como base para comparação entre as mesmas. Como padrão, em todos os métodos foi utilizado o produto Glifosato 480 CS (Agripec) e os nematóides *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*. O herbicida glifosato foi considerado compatível com JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*. Não existe diferença nos efeitos da concentração de glifosato e do tempo de exposição sobre JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*. A metodologia de menor custo é a descrita por Rovesti et al. (1988), seguida pelo protocolo de Vainio (1992), Krishnayya & Grewal (2002) e Hara & Kaya (1983). A metodologia selecionada foi a de Vainio (1992).

---

\* Orientador: Alcides Moino Junior

## CHAPTER 2

### 2 ABSTRACT

NEGRISOLI JUNIOR, Aldomario Santo. Comparison among methodologies of evaluation of agrochemicals compatibility with entomopathogenic nematodes. In: \_\_\_\_\_. **Techniques evaluation for compatibility studies of agrochemicals with entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae)**. 2005. p.24-65 Dissertation (Master in Entomology)- Federal University of Lavras, Lavras.\*

Different methodologies to evaluate the compatibility of agrochemicals with entomopathogenic nematodes are found in literature. Seeking to choose the most efficient method and at the same time, simple and cheap to be utilized, it was aimed to compare the different methodologies. Four methods were tested: Krishnayya & Grewal, (2002) Rovesti et al. (1988), Hara & Kaya (1983) and Vainio (1992). All the methodologies were constituted by two evaluation parameters: the viability of the IJs and the infection of those in *G. mellonella*. Some adaptations were done for each methodology as a comparison basis among them. As a standard, in all methods the Glifosato product 480 CS (Agripec), and the nematodes *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora*. The herbicide glifosato was considered compatible with IJs of *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora* were utilized. There is not a difference in the effects of the glifosato concentration and the time of exposition on the IJs of *S. carpocapsae* and *H. bacteriophora*. The methodology of the lower cost is the one described by Rovesti et al. (1988), followed by Vainio's protocol (1992), Krishnayya & Grewal (2002) and Hara & Kaya (1983). The chosen methodology was the Vainio (1992).

---

\* Adviser: Alcides Moino Junior

### 3 INTRODUÇÃO

Nematóides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são alternativas biológicas promissoras ao uso dos produtos fitossanitários químicos. Esses nematóides podem penetrar e matar muitas pragas economicamente importantes dentro de 24 a 48 horas. A eficiência no campo destes organismos é limitada pela vulnerabilidade a condições ambientais extremas, tais como a baixa umidade ou a radiação solar e também pela tendência de tornarem-se imóveis após a aplicação. Por outro lado, NEPs são relativamente insensíveis a muitos dos produtos fitossanitários. A compatibilidade com tais produtos indica que estes podem ser aplicados em associação.

O solo, o hábitat natural dos NEPs, varia muito em sua composição química, biológica e estrutura física. O complexo físico, biológico e químico do solo dificulta a condução de estudos sobre a dinâmica populacional desses organismos em campo (Kaya, 1990). Os nematóides entomopatogênicos são comumente aplicados em locais e ecossistemas que rotineiramente recebem outros insumos que, por sua vez, podem interagir com os nematóides, incluindo pesticidas químicos, fertilizantes e corretivos de solo, podendo ser desejável a aplicação conjunta destes para economizar tempo e dinheiro (Grewal, 2002).

Um grande número de estudos mostra que *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* podem sobreviver quando expostos a vários tipos de pesticidas químicos. Em alguns casos, o produto pode ter efeito nematostático, mas, quando removidos por lavagem, os nematóides voltam ao comportamento “normal” (Kaya, 1990). Muitos são os trabalhos que abordam a interação entre NEPs e produtos fitossanitários, avaliando aspectos de viabilidade e comportamento dos JIs, bem como a infectividade, quer seja em um inseto

padrão, sendo mais comum *G. mellonella* ou especificamente para determinada praga agrícola de interesse. Porém, as metodologias para essas avaliações não seguem uma padronização, o que dificulta a comparação entre os resultados.

O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes metodologias de avaliação da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários, avaliando também os custos totais de cada metodologia, visando selecionar o melhor método.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS+

O produto utilizado foi Glifosato 480 Agripec CS (i.a. glifosato, 6L/ha do produto comercial), baseando-se nos resultados obtidos por Carvalho (2003) que avaliou a compatibilidade deste ingrediente ativo e formulação (outro produto comercial) com *S. carpocapsae*. Nesse trabalho o produto foi considerado compatível, apresentando mortalidade dos JIs de até 13,93% e infectividade das lagartas de até 33,3%, 120 horas após os JIs terem sido expostos ao produto.

As espécies de nematóides entomopatogênicos utilizadas nos experimentos foram *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, provenientes do Laboratório de Patologia de Insetos da UFLA, armazenados em suspensões aquosas, conforme as exigências térmicas de cada espécie. A multiplicação de ambos os NEPs foi realizada em lagartas de último instar de *G. mellonella* de acordo com metodologia descrita por Kaya e Stock (1997). Segundo essa metodologia, 1,0 mL da suspensão de JIs na concentração de 200 JIs/mL foi adicionado em uma placa de petri (9 cm de diâmetro) em duas folhas de papel filtro ao fundo. Dez lagartas de *G. mellonella* foram colocadas na placa e mantidas em estufa incubadora (B.O.D) a  $25\pm 1^\circ$  C,  $70\pm 10\%$  U.R. Passados cinco a sete dias, os cadáveres das lagartas foram colocados em armadilha (White 1927) e a coleta diária dos JIs iniciada com a emergência dos JIs. As suspensões de JIs de cada espécie foram concentradas em 200 JIs/mL e armazenadas.

As lagartas de *G. mellonella* foram obtidas da criação de manutenção do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras, criadas em dieta artificial, segundo metodologia descrita por Parra (1998), citando Guerra (1973).

Os bioensaios de infectividade foram realizados em lagartas de último instar de *G. mellonella*, para a comparação dos resultados, mesmo que originalmente os métodos preconizem o uso de outros hospedeiros.

#### 4.1 Metodologia de Krishnayya & Grewal (2002)

Os JIs dos steinernematídeos permaneceram armazenados em suspensão aquosa a  $5 \pm 1^\circ \text{C}$  e os heterorhabditídeos a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ . A concentração da suspensão foi mantida em 1.500 JIs/mL em água destilada e utilizada dentro de um período de quatro a seis semanas após a coleta.

Soluções aquosas do produto fitossanitário foram preparadas com o dobro das concentrações de 0,2 mL e 0,8 mL do produto por mL de água. A testemunha constituiu-se de água destilada. Cerca de 750 JIs de cada espécie de nematóide contidos em 0,5 mL de água foram misturados em outros 0,5 mL de cada solução química, adicionados em placas de 24 células e mantidos em estufa incubadora (B.O.D.) a  $18 \pm 1^\circ \text{C}$  e  $70 \pm 10\% \text{UR}$ . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento.

A viabilidade dos JIs expostos ao produto foi avaliada 4, 24, 72 e 120 horas após a exposição, removendo-se três subamostras de 100 $\mu\text{L}$  (média de 75 JIs/amostra) de cada repetição, observando-se, sob microscópio estereoscópico. Nematóides que não responderam a estímulo foram considerados mortos.

A infectividade dos nematóides após os diferentes períodos de exposição às soluções químicas foi avaliada em lagartas de *G. mellonella* por meio de bioensaio com areia em placas de 24 células, modificado de Grewal et al. (1999). Cerca de 50 JIs em 100  $\mu\text{L}$  de água foram colocados em cada célula de cada placa contendo 1,5 g de areia seca (peneirada;  $\leq 1\text{mm}$  de diâmetro e esterilizada em estufa). Uma lagarta foi adicionada em cada célula de cada placa e incubada a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  e  $70 \pm 10\% \text{UR}$ . A mortalidade das lagartas de *G. mellonella* foi avaliada 72 horas após a inoculação.

Os valores de mortalidade de lagartas e nematóides foram submetidos à análise de variância. A diferença na viabilidade e infectividade das espécies de NEPs foi determinada utilizando-se o teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). A interação entre tempo de exposição e concentração do produto foi determinada pela regressão polinomial em cada espécie de NEP.

#### 4.2 Metodologia de Rovesti et al. (1988)

Os JIs obtidos de lagartas de *G. mellonella* foram coletados de armadilhas de White. Os JIs dos steinernematídeos foram armazenados em suspensão aquosa a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  e, no caso dos heterorhabditídeos, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e mantidos nessas condições até uma semana antes de serem utilizados. Soluções aquosas do produto fitossanitário foram preparadas com o dobro das seguintes concentrações: 0 (testemunha), 0,001, 0,01, 0,1 e 0,4 (recomendada pelo fabricante) mL do produto por mL de água. Cerca de 2,0 mL de suspensão contendo 1.000 JIs de cada espécie de nematóide foram misturados em outros 2,0 mL de cada concentração de produto, adicionados em tubos de ensaio cobertos por filme plástico de PVC (Magipack<sup>®</sup>) e mantidos em estufa incubadora (B.O.D.) a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  UR.

A avaliação da viabilidade foi feita com base no comportamento dos JIs. Assim, 0,15 mL (média de 70 JIs/amostra) de cada tubo de ensaio (repetição) foram extraídos e observados os JIs sob microscópio estereoscópico, 24 e 72 horas após exposição dos NEPs aos produtos, classificando-os pela seguinte escala:

- JIs aparentemente mortos (pouco ativos, postura reta, não respondem a estímulo);
- ++++ JIs imóveis, enrolados, postura reta ou enrolada, geralmente não respondem a estímulo;
- +++ Menos que 50% dos JIs móveis, geralmente enrolados, com movimento lento ou limitado;



- ++ Mais que 50% dos JIs imóveis, no entanto parcialmente paralisados em postura enrolada com movimentos reduzidos e lentos;
- + Pouco afetados, com a viabilidade pouco reduzida comparada com a testemunha;
- 0 Como o controle (incluindo também aqueles que aparentemente parecem ser estimulados pelo produto).

A infectividade foi determinada após 72 horas de exposição dos JIs ao produto, transferindo-se os conteúdos dos tubos de ensaio para copos plásticos de 25 mL; os copos plásticos foram completados com água destilada e os JIs decantados por 30 minutos. Os primeiros 20 mL foram descartados completando-se o copo com outros 20 mL de água destilada. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a terceira vez, 0,4mL (média de 100 JIs/aliquota) foram pipetados de cada copo plástico e inoculados em placas de petri (9 cm de diâmetro) contendo duas folhas de papel de filtro. Dez lagartas de *G. mellonella* foram adicionadas nas placas e mantidas em estufa incubadora (B.O.D.) a  $23 \pm 1^\circ \text{C}$  e  $70 \pm 10\% \text{UR}$ .

A primeira avaliação foi feita três dias após a inoculação nas placas. As lagartas ainda vivas foram mantidas por outros três dias, adicionando-se água destilada quando necessário. Lagartas mortas, com coloração típica correspondente ao gênero do nematóide, foram colocadas em armadilhas de White (1927) para observação da emergência; as lagartas que não apresentaram sintomatologia foram dissecadas para a constatação da presença de nematóides.

A infectividade foi também observada após 72 horas de exposição dos NEPs aos produtos. Para isso, areia fina esterilizada foi umedecida com água destilada (130 mL/kg de areia) e 70 g colocados em recipientes plásticos cilíndricos (4 cm altura; 6 cm de diâmetro). Duas lagartas de *G. mellonella* foram colocadas na superfície do copo com areia, imobilizadas dentro de armadilhas confeccionadas com tubo ependorff perfurado (1,5 mL) para

promover a penetração dos JIs. O conteúdo de cada tubo de ensaio foi removido com auxílio de uma seringa e 1 mL injetado no fundo de cinco recipientes (repetições) do lado oposto ao das lagartas. Dessa forma, os nematóides injetados (1.000 JIs/recipientes) foram inoculados a 4 cm de distância das lagartas. Os recipientes foram mantidos em estufa incubadora (B.O.D) a  $20 \pm 1^\circ$  e C  $70 \pm 10\%$  UR por seis dias. A mortalidade das lagartas foi observada 144 horas após inoculação; os JIs foram considerados infectivos nas repetições em que pelo menos uma lagarta foi parasitada.

Apesar do método não preconizar análise estatística, os valores de mortalidade de lagartas foram submetidos à análise de variância. A diferença na infectividade das espécies de NEPs foi determinada utilizando-se o teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). A interação entre tempo de exposição e método de inoculação foi determinada pela regressão polinomial em cada espécie de NEP.

#### 4.3 Metodologia de Hara & Kaya (1983)

Os JIs foram obtidos de lagartas de *G. mellonella* coletados de armadilhas de White. Os JIs dos steinernematídeos foram armazenados em suspensão aquosa a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no caso dos heterorhabditídeos e mantidos em suspensão aquosa na concentração de 400 JIs por mL por um período de três ou quatro semanas. Soluções aquosas do produto fitossanitário foram preparadas com o dobro das seguintes concentrações: 0 (testemunha), 0,001, 0,01, 0,1 e 0,4 (recomendado pelo fabricante) mL do produto por mL de água; 2,0 mL da suspensão aquosa de JIs foram pipetados em placas de petri (6 cm de diâmetro) e a quantidade correspondente de produto colocada em cada placa.

A viabilidade e a infectividade foram observadas 24, 72, 120 e 168 horas após a exposição dos JIs ao produto. Para cada período de exposição, a suspensão de nematóides foi submetida à centrifugação por duas vezes, a 1.700 rpm por 1 minuto e o sobrenadante removido e repostado com água destilada a fim

de remover o produto fitossanitário. Os tubos de ensaio foram divididos em dois grupos. Com o primeiro, observou-se a viabilidade retirando-se 0,25 mL (cerca de 100 JIs) de cada placa, submetendo os JIs a estímulo mecânico com um estilete. Nematóides que responderam ao estímulo foram considerados vivos e aqueles que não responderam considerados como afetados ou mortos.

A infectividade foi avaliada em lagartas de último instar de *G. mellonella*. Dez lagartas foram colocadas em placas de petri (9 cm de diâmetro) contendo duas folhas de papel filtro, adicionando-se 200 JIs. Após 48 horas, as lagartas mortas foram lavadas com solução aquosa de hipoclorito de sódio 0,5% e colocadas em outra placa de petri com papel filtro umedecido. Sete dias após a inoculação, cada lagarta foi dissecada e verificada a presença dos nematóides.

O experimento foi conduzido em estufa incubadora (B.O.D.) a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  UR, com quatro repetições por tratamento. Os valores de mortalidade de lagartas e nematóides foram submetidos à análise de variância. A diferença na viabilidade e infectividade das espécies de NEPs foi determinada utilizando-se o teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). A interação entre tempo de exposição e concentração do produto foi determinada pela regressão polinomial em cada espécie de NEP.

#### **4.4 Protocolo de Vainio (1992)**

Os nematóides foram obtidos de lagartas de *G. mellonella*, mantidos em suspensão aquosa a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , no caso dos steinernematídeos, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , no caso dos heterorhabditídeos e estocados por até uma semana antes da utilização no experimento. O produto fitossanitário foi preparado com o dobro da maior concentração de ingrediente ativo recomendado pelo fabricante, isto é, 0,8 mL do produto por mL de água. Desta solução foi retirada uma alíquota de 1 mL e colocada em cinco tubos de vidro por tratamento, nos quais foram adicionados

2.500 JIs em 1 mL de água destilada e agitados. O bioensaio foi conduzido em estufa incubadora (B.O.D) a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de  $70 \pm 10\%$ .

A viabilidade dos nematóides foi avaliada 48, 120 e 168 horas após exposição aos produtos. Assim, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão foi retirada e observados 100 JIs para a determinação da mortalidade. Foram considerados mortos aqueles que não responderam a estímulo com estilete.

A infectividade dos nematóides foi testada nos mesmos períodos que a viabilidade. Os tubos foram completados com água destilada (3 mL) e deixados para decantar por meia hora na geladeira. O sobrenadante (cerca de 3mL) foi descartado e a lavagem repetida por três vezes. Após a lavagem, 0,2 mL (cerca de 100 JIs) foram retirados do fundo de cada tubo e pipetados em cinco placas de placas de petri (9 cm de diâmetro) com papel filtro por tratamento. Cada placa recebeu dez lagartas de último instar de *G. mellonella* e mantida em câmaras climatizadas nas mesmas condições que o teste anterior, durante cinco dias. As lagartas mortas foram transferidas para placas de petri (9 cm de diâmetro) contendo uma folha de papel filtro seco e mantidas no escuro por mais três dias, sendo submetidas à dissecação para a avaliação da presença de nematóides.

Os valores de mortalidade de lagartas e nematóides foram submetidos à análise de variância. A diferença na viabilidade e infectividade das espécies de NEPs foi determinada usando o teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ). A interação entre tempo de exposição e concentração do produto foi determinada pela regressão polinomial em cada espécie de NEP.

Originalmente, o método preconiza que valores de mortalidade de nematóides ou redução de infectividade maiores de 50% caracterizam o produto como incompatível com os nematóides testados. No entanto, para melhor comparação entre as metodologias, não se utilizou essa classificação.

## 5 Análise de custo das metodologias

Foram estimados os custos envolvidos na realização de cada uma das metodologias descritas anteriormente para o fornecimento de subsídio para a seleção da melhor metodologia de avaliação de compatibilidade de produtos fitossanitários químicos com nematóides entomopatogênicos.

### 5.1 Custo total para a realização das metodologias

O custo total envolvido em cada metodologia é o resultado da soma do custo fixo total (CFT) e o custo variável total (CVT). Estes custos referem-se aos insumos (recursos) e operações (mão-de-obra) utilizados durante todo o desenrolar da aplicação da metodologia, incluindo o respectivo custo alternativo ou de oportunidade (Reis, 2004).

#### 5.1.1 Componentes do custo total

##### 5.1.1.1 Custo fixo (CF)

Corresponde aos recursos que têm duração maior a uma aplicação da metodologia isto é, não são totalmente gastos em uma única aplicação desta. É o custo de cada recurso fixo calculado, somando-se a depreciação e o custo de oportunidade.

- Depreciação: é o valor necessário para substituir os bens de capital quando considerados inutilizados, seja pelo desgaste físico ou econômico. O cálculo da depreciação é baseado no tempo de vida útil de cada recurso, pela seguinte equação, segundo Reis (2004):

$$\text{Depreciação} = \frac{\text{Valor atual do recurso} - \text{Valor residual do recurso}}{\text{Vida útil do recurso}}$$

No presente trabalho adotou-se, em todas metodologias, a vida útil de benfeitorias de vinte anos e de dez anos para máquinas e equipamento (Reis, 2004). Considerou-se o valor final do bem após ser utilizado no caso do valor residual, conhecido também por “valor de sucata”, isto é, o valor do bem, se fosse comercializado. Neste caso, todos os equipamentos foram considerados como novos.

- Custo alternativo ou de oportunidade (CA): é considerado como o retorno do valor do capital empregado na atividade que seria conseguido se fosse aplicado em outra alternativa econômica. Para isso foi considerado como base de retorno o valor anual da caderneta de poupança (6,00% a.a), calculado para o custo fixo da seguinte forma:

$$CFAIt = \text{valor atual} \times \text{taxa de juros}$$

#### 5.1.1.2. Componentes do custo fixo

**Equipamentos e instrumentos:** todos os equipamentos e instrumentos utilizados em todas as metodologias, bem como a descrição da finalidade de cada um, como visto na Tabela 1.

**TABELA 1. Equipamentos e instrumentos utilizados nas metodologias.**

Equipamentos/ instrumentos	Unidade	Quantidade	Finalidade
B.O.D	unidade	1	Temperatura e umidade constantes do inóculo e experimentos
Refrigerador	unidade	1	Armazenamento de JIs de <i>S. carpocapsae</i>
Microscópio estereoscópico	unidade	1	Contagem e verificação da viabilidade de JIs
Destilador	unidade	1	Água destilada para os experimentos
Estufa	unidade	1	Esterilização de material e vidraria

Equipamentos e materiais: todos os equipamentos e materiais de cada uma das metodologias, apresentando a finalidade de cada um, constam nas Tabelas 2 a 5.

**TABELA 2. Metodologia de Krishnayya & Grewal (2002).**

Equipamentos e materiais	Unidade	Quantidade	Finalidade
Placa de 24 células	Unidade	64	Testes de viabilidade e infectividade
Armadilha de White	Unidade	6	Multiplicação de JIs
Micropipetas	Unidade	2	Inoculação e quantificação de JIs
Pipeta, pissetas, pinça, estiletes	-	-	Procedimentos diversos
Erlenmeyer (500mL)	Unidade	6	Armazenamento de JIs
Contador manual	Unidade	1	Contagem de JIs
Mesa com fórmica	Unidade	1	Manipulação do experimento

**TABELA 3. Metodologia de Rovesti et al. (1988).**

Equipamentos e materiais	Unidade	Quantidade	Finalidade
Placa de petri (9 cm Ø)	unidade	40	Bioensaio de infectividade
Armadilha de White	unidade	6	Multiplicação de JIs
Micropipetas	unidade	2	Inoculação e quantificação de JIs
Pipeta, pissetas, pinça, estiletes	-	-	Procedimentos diversos
Erlenmeyer (500mL)	unidade	6	Armazenamento de JIs
Contador manual	unidade	1	Contagem de JIs
Tubo de ensaio	unidade	80	Exposição dos NEPs aos produtos
Grade para tubo ensaio	unidade	2	Suporte para os tubos de ensaio
Ependorff	unidade	40	Bioensaio de infectividade
Mesa com fórmica	unidade	1	Manipulação do bioensaio

**TABELA 4. Metodologia de Hara & Kaya (1983).**

Equipamentos e materiais	Unidade	Quantidade	Finalidade
Placa de petri (9 cm Ø)	unidade	80	Bioensaio de infectividade
Placa de petri (5 cm Ø)	unidade	80	Exposição dos NEPs aos produtos
Armadilha de White	unidade	6	Multiplicação de JIs
Micropipetas	unidade	2	Inoculação e quantificação de JIs
Pipeta, pissetas, pinça, estiletes	-	-	Procedimentos diversos
Erlenmeyer (500mL)	unidade	6	Armazenamento de JIs
Contador manual	unidade	1	Contagem de JIs
Mesa com fórmica	unidade	1	Manipulação do bioensaio
Centrifuga	unidade	1	Separação dos NEPs do produto

**TABELA 5. Protocolo Vainio (1992).**

Equipamentos e materiais	Unidade	Quantidade	Finalidade
Placa de petri (9 cm Ø)	unidade	60	Bioensaio de infectividade
Tubo de ensaio	unidade	60	Exposição dos NEPs aos produtos
Armadilha de White	unidade	6	Multiplicação de JIs
micropipetas	unidade	2	Inoculação e quantificação de JIs
Pipeta, pissetas, pinça, estiletes	-	-	Procedimentos diversos
Erlenmeyer (500mL)	unidade	6	Armazenamento de JIs
Contador manual	unidade	1	Contagem de JIs
Mesa com fórmica	unidade	1	Manipulação do experimento

### 5.1.1.3 Custo variável (CV)

São os recursos com duração menor a uma aplicação da metodologia, isto é, não são reaproveitados em uma nova aplicação da metodologia. Este custo foi calculado pelos gastos com produtos e serviços, discriminados nas Tabelas 6 a 9. No caso do custo alternativo variável, temos:

*Custo alternativo variável (CVAlt.) = valor do subtotal do custo variável x taxa de juros*

Componentes do custo variável:

- Insumos: são os gastos imediatos com a realização de cada metodologia e descritos nas Tabelas 6 a 9.
- Mão-de-obra: foi considerada mão-de-obra de um técnico de laboratório (laboratorista) fazendo-se o cálculo proporcional do tempo gasto para cada metodologia (h.homem) e o salário médio de um profissional dessa categoria. Não foram considerados os encargos sociais. Dessa forma temos:

*Custo variável = insumos + mão-de-obra + custos de oportunidade*

TABELA 6. Metodologia de Krishnaya & Grewal (2002).

Recursos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	Unidade	768	Bioensaio de infectividade
Material limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente, esponja e afins.
Areia esterilizada	Kg	1	Teste de infectividade
Produto fitossanitário	-	-	Avaliar a compatibilidade com NEPs



**TABELA 7. Metodologia de Rovesti et al. (1988).**

Recursos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	Unidade	480	Bioensaio de infectividade
Material limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente, esponja e afins.
Areia esterilizada	Kg	4	Bioensaio de infectividade
Produto fitossanitário	-	-	Avaliar a compatibilidade com NEPs
Filme plástico pvc	Unidade	1	Recobrir os tubos de ensaio
Copos plásticos com tampa	Unidade	40	Bioensaio de infectividade
Papel filtro (9cm Ø)	Unidade	80	Bioensaio de infectividade

**TABELA 8. Metodologia de Hara & Kaya (1983).**

Recursos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	unidade	800	Bioensaio de infectividade
Material limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente, esponja e afins.
Produto fitossanitário	-	-	Avaliar a compatibilidade com NEPs
Papel filtro (9cm Ø)	unidade	80	Bioensaio de infectividade

**TABELA 9. Protocolo de Vainio (1992).**

Recursos	Unidade	Quantidade	Finalidade
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	unidade	600	Bioensaio de infectividade
Material limpeza	-	-	Álcool, detergente, papel absorvente, esponja e afins.
Produto fitossanitário	-	-	Avaliar a compatibilidade com NEPs
Papel filtro (9cm Ø)	unidade	80	Teste de infectividade (placas)

## 5.1.2 Dados para análise econômica simplificada

### 5.1.2.1 Custo operacional

Considera o custo de todos os recursos para a realização de cada experimento que exigem desembolso por parte do interessado. Inclui praticamente todos os recursos fixos que exigem reposição por meio de aquisições, sem considerar os custos alternativos.

Em relação à interação entre o tempo e a concentração do produto na viabilidade dos NEPs, os efeitos de concentração e tempo foram significativos para ambas as espécies de NEPs ( $F = 7,16; 24,18; 31,10$  e  $P = 0,01; 0,0; 0,0$  para *H. bacteriophora*;  $F = 5,03; 8,25; 6,11$  e  $P = 0,02; 0,006; 0,017$  para *S. carpocapsae*) (Figuras 1 e 2).

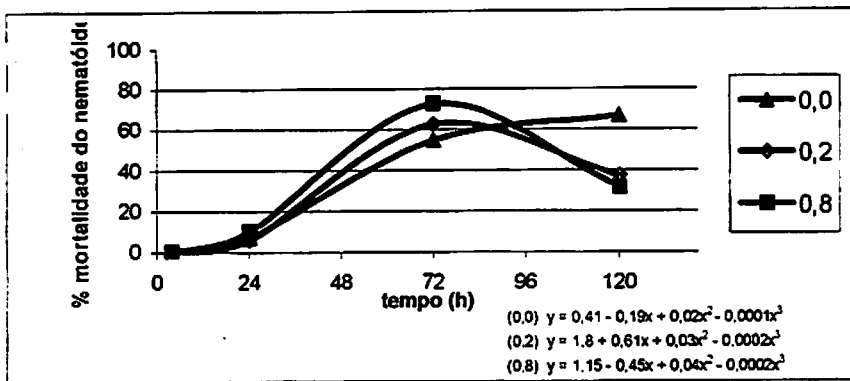


FIGURA 1. Mortalidade de *Heterorhabditis bacteriophora* na interação tempo x concentração, exposto a Glifosato 480 Agripec CS.

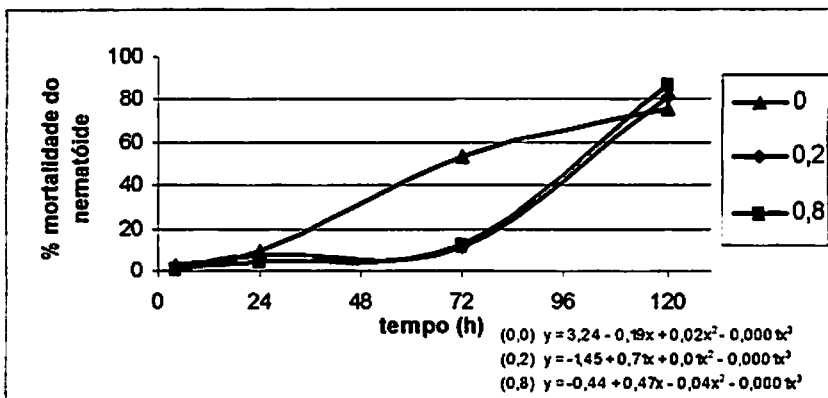


FIGURA 2. Mortalidade de *Steinernema carpocapsae* na interação tempo x concentração, exposto a Glifosato 480 Agripec CS.

A infectividade de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* não diferiu no período de 4 horas de exposição ao produto (Tabela 11), mostrando diferenças nos períodos de 24 e 72 horas na concentração de 0,8, e em 120 horas na concentração de 0,2. As testemunhas dos NEPs foram diferentes nos períodos de 72 e 120 horas.

A infectividade de *H. bacteriophora* na interação tempo e concentração do produto (Figura 3) foi significativa ( $F = 11,25; 2,16; 7,29$  e  $P = 0,0015; 0,1478; 0,0095$ ) na testemunha e na concentração de 0,8. Em *S. carpocapsae*, houve diferença significativa ( $F = 1,39; 0,01; 5,01$  e  $P = 0,2425; 0,9209; 0,0298$ ) somente na concentração de 0,8 (Figura 4).

TABELA 11. Mortalidade de lagartas de *G. mellonella* inoculadas com nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS.

Tempo (horas) <sup>1</sup>	Concentração	Espécie de nematóide <sup>2</sup>	
		<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
4	0	78,25 ± 11,23 A <sup>3</sup>	94,00 ± 10,33 A
	0,2	90,75 ± 10,33 A	100,00 ± 0,00 A
	0,8	94,00 ± 5,98 A	100,00 ± 0,00 A
24	0	90,75 ± 11,81 A	69,00 ± 9,38 A
	0,2	87,75 ± 6,25 A	69,00 ± 9,38 A
	0,8	56,25 ± 20,65 B	100,00 ± 0,00 A
72	0	78,25 ± 10,64 A	31,50 ± 27,18 B
	0,2	84,50 ± 12,34 A	62,75 ± 35,90 A
	0,8	66,00 ± 29,69 A	31,25 ± 20,65 B
120	0	90,75 ± 10,33 A	53,50 ± 16,61 B
	0,2	94,00 ± 5,98 A	47,00 ± 22,97 B
	0,8	56,50 ± 15,63 A	59,50 ± 21,40 A

<sup>1</sup> Período de exposição dos juvenis infectivos ao produto

<sup>2</sup> Valores expressos em porcentagem de lagartas mortas.

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott ( $P > 0,05$ ).

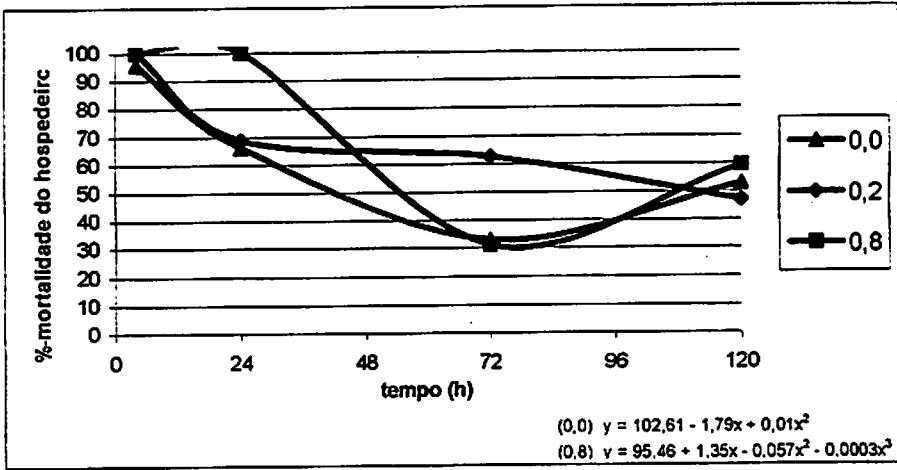


FIGURA 3. Infectividade de *Heterorhabditis bacteriophora* na interação tempo x concentração, contra lagartas de *G. mellonella*

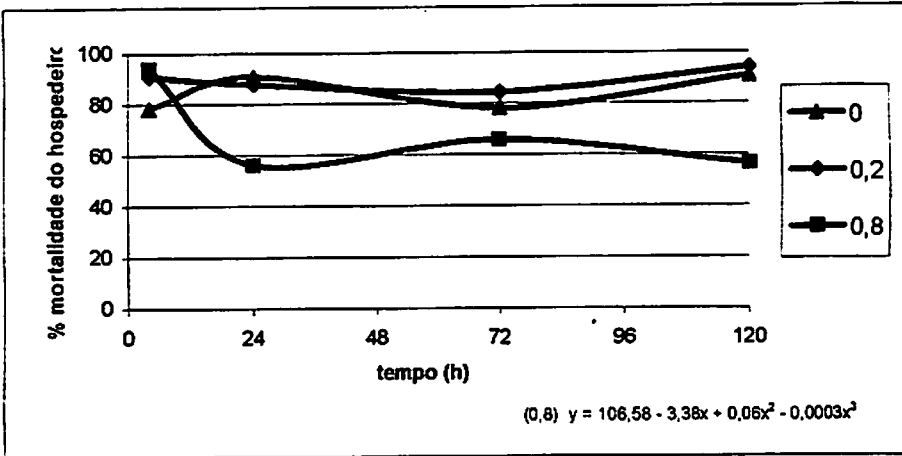


FIGURA 4. Infectividade de *Steinernema carpocapsae* na interação tempo x concentração, contra lagartas de *G. mellonella*

Os resultados indicam diminuição da viabilidade de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* quando expostos a diferentes concentrações de glifosato em todos os períodos de exposição, sem que houvesse diminuição da infectividade dos juvenis nos diferentes tratamentos. Os resultados desse estudo concordam com Krishnaya & Grewal (2002), que verificaram a diminuição da viabilidade de *S. feltiae* quando exposto à *Azadiractha indica* e fungicidas seletivos utilizando a mesma metodologia. A infectividade foi pouco afetada por *Azadiractha indica*, sendo considerados como tóxicos os fungicidas cinamaldeído e ácido peróxido acético + dióxido de hidrogênio causando mortalidade de 100 % dos JIs. Posteriormente, De Nardo & Grewal (2003), utilizando a mesma metodologia, verificaram a compatibilidade de *S. feltiae* com 17 produtos fitossanitários utilizados em casa de vegetação, observando viabilidade de mais de 80% dos JIs expostos por 72 horas aos produtos, sendo possível mistura de tanque de todos os produtos testados, exceto o inseticida terrazole.

## **6.2 Metodologia de Rovesti et al. (1988)**

De acordo com as características atribuídas aos JIs pela escala de notas proposta pelos autores, os JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* mostraram-se, de forma geral, medianamente afetados pelo produto comparando-se com a testemunha, conforme mostra a Tabela 12.

TABELA 12. Mortalidade de nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS.

Tempo (horas) <sup>1</sup>	Concentração	Espécie de nematóide <sup>2</sup>	
		<i>S. carpocapsae</i>	<i>H. bacteriophora</i>
24	0	0	0
	0,001	-	+
	0,01	++	+
	0,1	+	+
	0,4	++	+
72	0	0	0
	0,001	++	+
	0,01	++	++
	0,1	++	++
	0,4	++	++

<sup>1</sup> Período de exposição dos juvenis infectivos ao produto

<sup>2</sup> Valores expressos segundo escala de notas proposta por Rovesti et al. (1988)

Na interação espécie *versus* concentração, não houve diferença das espécies de NEPs nas concentrações em placa de petri. Já em areia, houve diferença na testemunha e nas concentrações de 0,001 e 0,1 (Tabela 13). Em contraposição, na interação concentração do produto *versus* método de inoculação, houve diferença na concentração de 0,01 e 0,4 para *S. carpocapsae* e somente na concentração 0,001 para *H. bacteriophora* (Tabela 14). Comparando-se com as outras metodologias, a infectividade nesta foi a menor para ambas as espécies de nematóides em todos tratamentos (concentrações x método inoculação).

TABELA 13. Mortalidade de lagartas de *G. mellonella* inoculadas com nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS, em dois métodos de inoculação.

Método	Concentração	Espécie de nematóide <sup>1</sup>	
		<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
areia	0	4,00 ± 2,45 B <sup>2</sup>	14,00 ± 2,45 A**
	0,001	0,00 ± 0,00 A	16,00 ± 2,45 A
	0,01	8,00 ± 3,74 B	14,00 ± 4,00 A
	0,1	4,00 ± 4,00 B	10 ± 0,00 A
	0,4	16,00 ± 2,45 A	10 ± 0,00 A
placa	0	9,00 ± 1,38 A	10,00 ± 1,51 A
	0,001	9,75 ± 1,96 A	6,75 ± 1,04 A
	0,01	10,00 ± 1,25 A	9,00 ± 1,20 A
	0,1	10,00 ± 1,20 A	9,00 ± 1,96 A
	0,4	7,00 ± 2,11 A	10,00 ± 1,91 <sup>A</sup>

<sup>1</sup> valores expressos em porcentagem de lagartas mortas

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott (P > 0,05)

TABELA 14. Mortalidade de lagartas de *G. mellonella* inoculadas com nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS.

Espécie de NEP	Concentração	Método <sup>1</sup>	
		Areia	Placa
<i>Steinernema carpocapsae</i>	0	4,00 ± 2,45 A <sup>2</sup>	9,00 ± 1,38 A
	0,001	0,00 ± 0,00 B	9,75 ± 1,96 A
	0,01	8,00 ± 3,74 A	10,00 ± 1,25 A
	0,1	4,00 ± 4,00 A	10,00 ± 1,20 A
	0,4	16,00 ± 2,45 A	7,00 ± 2,11 B
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	0	14,00 ± 2,45 A	10,00 ± 1,51 A
	0,001	16,00 ± 2,45 A	6,75 ± 1,04 B
	0,01	14,00 ± 4,00 A	9,00 ± 1,20 A
	0,1	10 ± 0,00 A	9,00 ± 1,96 A
	0,4	10 ± 0,00 A	10,00 ± 1,91 <sup>A</sup>

<sup>1</sup> valores expressos em porcentagem de lagartas mortas

<sup>2</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott (P > 0,05)

Os resultados mostram a baixa toxicidade de glifosato sobre a viabilidade dos JIs de *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*. No entanto, a redução da infectividade foi significativa em alguns períodos de avaliação, fato difícil de ser explicado, tendo em vista a alta mortalidade de lagartas observadas nas outras metodologias testadas.

Rovesti et al. (1988), utilizando a mesma metodologia, testaram 25 herbicidas com *H. bacteriophora*, verificando baixo efeito deletério desses produtos na viabilidade e infectividade dos JIs em todas as concentrações testadas, inclusive glifosato. Os mesmos produtos foram testados com *S. carpocapsae* apresentando resultados semelhantes (Rovesti & Deseö, 1990).

Estes resultados concordam com o trabalho de Rovesti & Deseö (1991) que avaliaram a compatibilidade de glifosato e mais quatro herbicidas em JIs de *H. heliothidis*, tendo apresentado efeito positivo na viabilidade e infectividade dos JIs quando expostos nas três concentrações dos produtos (1.000, 5.000 e 2.500 ppm da formulação comercial).

### 6.3 Metodologia de Hara & Kaya (1983)

Como pode ser visto pelos dados da Tabela 15, não houve diferença significativa entre a viabilidade dos JIs de ambos os nematóides entomopatogênicos testados em nenhum dos tratamentos, exceto no período de 72 horas na testemunha e na concentração de 0,01. Em todos os tratamentos houve aumento da mortalidade em todas as concentrações do produto e testemunha após o período de 24 horas de exposição.



TABELA 15. Mortalidade de nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS.

Tempo (horas) <sup>1</sup>	Concentração	Espécie de nematóide <sup>2</sup>	
		<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
24	0	21,00 ± 4,73 A <sup>3</sup>	6,00 ± 1,92 A
	0,001	9,23 ± 2,30 A	21,00 ± 5,20 A
	0,01	25,00 ± 3,38 A	27,00 ± 5,32 A
	0,1	25,00 ± 8,44 A	33,00 ± 8,45 A
	0,4	19 ± 5,16 A	31,00 ± 5,74 A
72	0	33,00 ± 4,91 B	8,80 ± 3,49 A
	0,001	38,31 ± 16,29 A	27 ± 4,53 A
	0,01	20,80 ± 2,75 B	52,00 ± 6,66 A
	0,1	47,00 ± 15,90 A	54,00 ± 18,20 A
	0,4	32,00 ± 11,86 A	47,00 ± 11,22 A
120	0	15,00 ± 2,57 A	30,39 ± 4,04 A
	0,001	25,00 ± 5,99 A	33,18 ± 5,04 A
	0,01	32,00 ± 11,41 A	37,00 ± 6,10 A
	0,1	60,00 ± 7,39 A	52,00 ± 9,11 A
	0,4	51,00 ± 8,29 A	65,15 ± 8,24 A
168	0	21,00 ± 1,86 A	29,45 ± 1,32 A
	0,001	41,00 ± 8,64 A	31,26 ± 3,03 A
	0,01	38,00 ± 9,63 A	48,26 ± 8,12 A
	0,1	59,01 ± 11,67 A	67,07 ± 3,07 A
	0,4	53,00 ± 10,94 A	38,07 ± 8,02 A

<sup>1</sup> Período de exposição dos juvenis infectivos ao produto

<sup>2</sup> Valores expressos em porcentagem de juvenis infectivos mortos

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott (P > 0,05)

A interação tempo de exposição e concentração do produto não foi significativa para viabilidade de *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* (F = 1,17; 0,03; 3,11; 1,14; 6,46 e P = 0,28; 0,85; 0,8; 0,28; 0,01 para *H. bacteriophora*; F = 2,05; 3,47; 0,24; 0,01; 0,42 e P = 0,15; 0,06; 0,62; 0,88; 0,15 para *S. carpocapsae*), exceto na maior concentração (0,4) (Figuras 6 e 7).

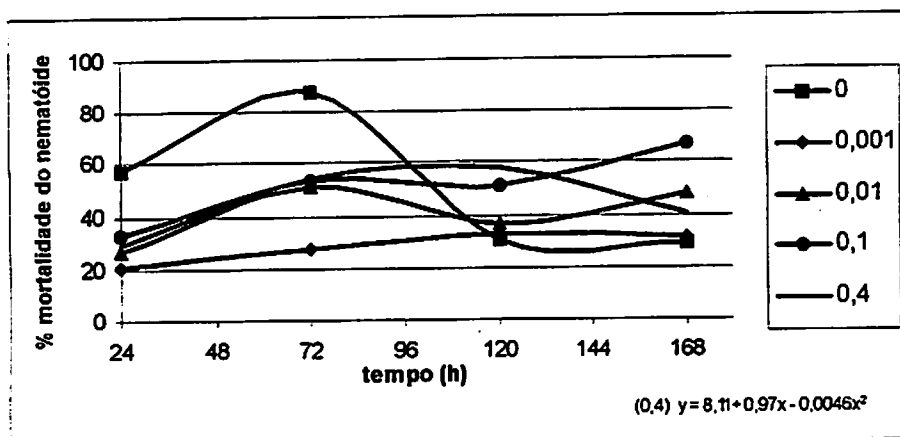


FIGURA 6. Mortalidade de *Heterorhabditis bacteriophora* na interação tempo x concentração, exposto a Glifosato 480 Agripec CS.

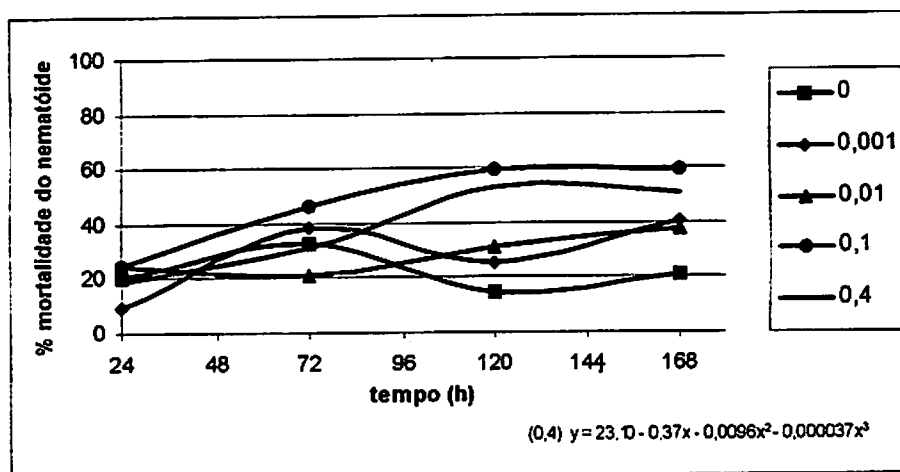


FIGURA 7. Mortalidade de *Steinernema carpocapsae* na interação tempo x concentração, exposto a Glifosato 480 Agripec CS.

Houve redução significativa da infectividade de *H. bacteriophora* em relação a *S. carpocapsae*, nos períodos de 24 e 72 horas, em todas as concentrações do produto. No período de 120 horas a diferença da infectividade

dos NEPs ocorreu na testemunha e na concentração 0,001 e 0,4. Já em 168 horas de exposição, a infectividade dos NEPs diferiu nas concentrações de 0,01 e 0,4 (Tabela 16).

TABELA 16. Mortalidade de lagartas de *G. mellonella* inoculadas com nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS.

Tempo (horas) <sup>1</sup>	Concentração	Espécie de nematóide <sup>2</sup>	
		<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
24	0	67,50 ± 12,50 A <sup>3</sup>	5,0 ± 5,00 B
	0,001	57,5 ± 16,01 A	22,50 ± 6,29 B
	0,01	75,0 ± 6,45 A	25,00 ± 18,93 B
	0,1	72,5 ± 10,31 A	30,00 ± 12,91 B
	0,4	70,0 ± 9,13 A	25,00 ± 9,57 B
72	0	75,00 ± 11,90 A	22,50 ± 8,54 B
	0,001	100 ± 0,00 A	45,00 ± 19,36 B
	0,01	75,00 ± 15,00 A	42,50 ± 14,93 B
	0,1	97,50 ± 2,50 A	55,00 ± 14,43 B
	0,4	85,00 ± 15,00 A	80,00 ± 7,07 A
120	0	80,00 ± 9,13 A	22,5 ± 9,46 B
	0,001	85,0 ± 5,00 A	30,0 ± 4,08 B
	0,01	57,5 ± 17,02 A	57,5 ± 11,09 A
	0,1	85,0 ± 8,66 A	60,0 ± 4,08 A
	0,4	62,5 ± 17,50 A	20,00 ± 7,07 B
168	0	62,50 ± 17,77 A	55,00 ± 10,41 A
	0,001	47,50 ± 12,50 A	50,00 ± 12,91 A
	0,01	77,50 ± 2,50 A	17,50 ± 4,79 B
	0,1	50,00 ± 12,91 A	25,00 ± 10,41 A
	0,4	95,00 ± 5,00 A	35,0 ± 8,66 B

<sup>1</sup> Período de exposição dos juvenis infectivos ao produto

<sup>2</sup> Valores expressos em porcentagem lagartas mortas.

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott ( $P > 0,05$ ).

A interação entre tempo de exposição e concentração do produto foi significativa em *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* nas concentrações de 0,1 e 0,4, apresentando a concentração de 0,001 para *S. carpocapsae* também significativa (F = 0,98; 2,07; 1,09; 0,15; 14,27 e P = 0,32; 0,15; 0,01; 0,009; 0,003 para *H. bacteriophora*; F = 0,15; 12,65; 1,19; 7,11; 3,38 e P = 0,69; 0,00; 0,27; 0,00; 0,06 para *S. carpocapsae*) (Figuras 8 e 9).

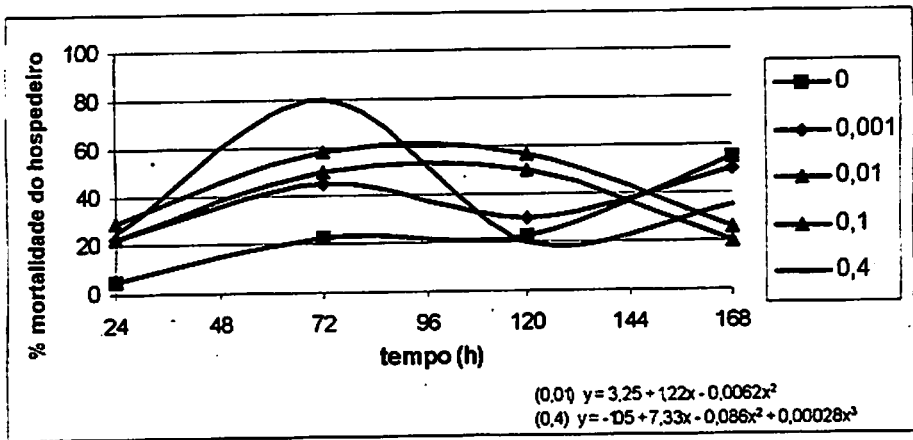


FIGURA 8. Infectividade de *Heterorhabditis bacteriophora*, na interação tempo x concentração contra lagartas de *G. mellonella*.

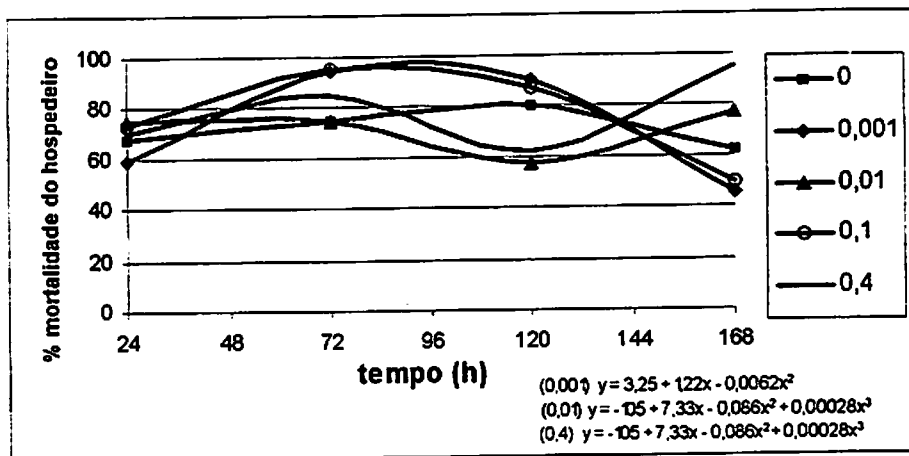


FIGURA 9. Infectividade de *Steinernema carpocapsae*, na interação tempo x concentração, contra lagartas de *G. mellonella*.

Hara & Kaya (1983), utilizando a mesma metodologia, observaram a diminuição da viabilidade de *S. carpocapsae* quando exposto a inseticidas e nematicidas com aumento da concentração e tempo de exposição aos produtos. Assim, as concentrações de 0,01 e 0,1 mg/mL dos produtos causaram alta viabilidade e infectividade do NEP em todos os períodos de exposição.

Zimmerman & Crashaw (1990), utilizando a metodologia modificada de Hara & Kaya (1983), observaram a compatibilidade de *S. carpocapsae*, *S. bibionis* e *H. bacteriophora* (HP88) com nove pesticidas utilizados em gramados. Os fungicidas pentacloronitrobenzeno, benomil e clorotalonil e o herbicida dicamba não reduziram a viabilidade aos NEPs testados no período de 24 e 48 horas de exposição. Carbaril, bendiocarbe e diazinon foram muito tóxicos a *H. bacteriophora* (HP88) e menos tóxicos a *S. carpocapsae*. Calo-clor e o fungicida mercurial foram altamente tóxicos aos NEPs.

#### 6.4 Protocolo de Vainio (1992)

Os resultados evidenciam que houve diferença na viabilidade dos JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, nos períodos de 120 e 168 horas, na testemunha. Na interação tempo *versus* concentração, para *S. carpocapsae* houve diferença no período de 168 horas na concentração de 0,8. No entanto, para *H. bacteriophora*, as diferenças ocorreram nas testemunhas de 48 e 168 horas (Tabela 17). Nos resultados de infectividade não apresentaram diferença entre as espécies de NEPs e entre a interação tempo *versus* concentração (Tabela 18).

TABELA 17. Mortalidade de nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS.

Tempo (horas) <sup>1</sup>	Concentração	Espécie de nematóide <sup>2</sup>	
		<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
48	0	10,00 ± 1,61 a A <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00 b A
	0,8	3,80 ± 1,23 a A	1,40 ± 0,43 a A
120	0	1,00 ± 0,67 a A	0,40 ± 0,45 a B
	0,8	0,40 ± 0,45 a A	18,8 ± 5,69 a A
168	0	12,40 ± 1,28 a A	0,80 ± 0,45 b B
	0,8	4,6 ± 1,69 b A	22,80 ± 5,19 a A

<sup>1</sup> Período de exposição dos juvenis infectivos ao produto

<sup>2</sup> Valores expressos em porcentagem de juvenis infectivos mortos.

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott (P > 0,05).

TABELA 18 Mortalidade de lagartas de *G. mellonella* inoculadas com nematóides entomopatogênicos previamente expostos a diferentes concentrações de Glifosato 480 Agripec CS.

Tempo (horas) <sup>1</sup>	Concentração	Espécie de nematóide <sup>2</sup>	
		<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>
48	0	60,00 ± 9,92 a A <sup>3</sup>	90,00 ± 5,16 a A
	0,8	76,00 ± 2,58 a A	82,00 ± 17,89 a A
120	0	36,00 ± 19,83 a A	70,00 ± 20,12 a A
	0,8	74,00 ± 16,88 a A	27,00 ± 17,07 a A
168	0	74,00 ± 9,22 a A	100 ± 0,00 a A
	0,8	82,00 ± 17,27 a A	100 ± 0,00 a A

<sup>1</sup> Período de exposição dos juvenis infectivos ao produto

<sup>2</sup> Valores expressos em porcentagem de lagartas mortas

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott ( $P > 0,05$ )

O produto fitossanitário Glifosato 480 Agripec CS (i.a. glifosato) apresentou baixo ou nenhum efeito negativo sobre os JIs de *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora* em todas as metodologias testadas. Esses dados concordam com Carvalho (2003), que avaliou a compatibilidade de *S. carpocapsae* com o mesmo ingrediente ativo e formulação (outro produto comercial) utilizando o protocolo proposto por Vainio (1992). A viabilidade de *S. carpocapsae* foi de cerca de 13% em todos os períodos de exposição e a redução de infectividade em relação à testemunha foi de 25% (48 horas de exposição dos JIs ao produto) e de 33,33% (120 horas), sendo assim o produto considerado como compatível, conforme estabelecido pela metodologia. Forchler et al. (1990) avaliaram os efeitos desse produto em JIs de *S. feltiae*, resultando em valores de cerca de 20% a 25% de mortalidade de JIs quando expostos a diferentes concentrações do produto, apresentando uma baixa  $CL_{50}$  (0,97 nematóides/lagarta) em *G. mellonella*.

Em todas as metodologias adotadas não foi evidenciada diferença entre a viabilidade e infectividade dos JIs, comparando-se os tratamentos (concentração

do produto x tempo de exposição) e a testemunha. Esses resultados indicam a possível baixa interferência da concentração do produto, bem como do tempo de exposição a esse produto nos resultados.

## 7 Análise de custo das metodologias

### 7.1 Custo fixo (CF)

Os custos fixos de cada metodologia encontram-se nas Tabelas 19 a 22, discriminando, para cada recurso, os parâmetros necessários para o cálculo do custo total (CT) de cada metodologia.

TABELA 19. Custo fixo discriminado para a metodologia Krishnayya & Grewal (2002).

Recursos	Valor (R\$)	Vida útil (anos)	Valor residual <sup>1</sup>	Depreciação	Custo alternativo <sup>2</sup>	Custo fixo parcial
B.O.D	3.478,00	10,00	500,00	24,82	69,56	94,38
Refrigerador	644,00	10,00	200,00	3,70	12,88	16,58
Microscópio estereoscópico	1.125,00	10,00	200,00	7,71	22,50	30,21
Destilador	835,00	10,00	200,00	5,29	16,70	21,99
Estufa	1.978,00	10,00	200,00	14,82	39,56	54,38
Placa de 24 células	352,00	2,00	0,00	14,67	7,04	21,71
Armadiça White	15,00	2,00	0,00	0,63	0,30	0,93
Micropipetas	576,00	5,00	0,00	9,60	11,52	21,12
Pissetas	3,50	2,00	0,00	0,15	0,07	0,22
Pinça	2,00	2,00	0,00	0,08	0,04	0,12
Estilete	4,00	2,00	0,00	0,17	0,08	0,25
Erlenmeyer (500mL)	53,40	2,00	0,00	2,23	1,07	3,29
Contador manual	10,00	10,00	0,00	0,08	0,20	0,28
Mesa com fórmica	100,00	10,00	20,00	0,67	2,00	2,67
<b>Total</b>				<b>84,60</b>	<b>183,52</b>	<b>268,11</b>

<sup>1</sup> Valor residual – valor de mercado de tais equipamentos

<sup>2</sup> Custo alternativo – forma de estimação: valor do novo x a taxa mensal (2%)



TABELA 20. Custo fixo discriminado para a metodologia Rovesti et al. (1988).

Recursos	Valor (R\$)	Vida útil (anos)	Valor residual <sup>1</sup>	Depreciação	Custo alternativo <sup>2</sup>	Custo fixo parcial
B.O.D	3.478,00	10,00	500,00	24,82	69,56	94,38
Refrigerador	644,00	10,00	200,00	3,70	12,88	16,58
Microscópio estereoscópico	1.125,00	10,00	200,00	7,71	22,50	30,21
Destilador	835,00	10,00	200,00	5,29	16,70	21,99
Estufa	1.978,00	10,00	200,00	14,82	39,56	54,38
Placa de Petri (9 cm)	148,00	2,00	0,00	6,17	2,96	9,13
Armadilha White	15,00	2,00	0,00	0,63	0,30	0,93
Micropipetas	576,00	5,00	0,00	9,60	11,52	21,12
Pissetas	3,50	2,00	0,00	0,15	0,07	0,22
Pinça	2,00	2,00	0,00	0,08	0,04	0,12
Estiletas	2,00	2,00	0,00	0,08	0,04	0,12
Erlenmeyer (500mL)	53,40	2,00	0,00	2,23	1,07	3,29
Tubo de ensaio	40,00	2,00	0,00	1,67	0,80	2,47
Grade para tubo ensaio Ependorff	8,40	4,00	0,00	0,18	0,17	0,34
	2,68	2,00	0,00	0,11	0,05	0,17
Contador manual	10,00	10,00	0,00	0,08	0,20	0,28
Mesa com fórmica	100,00	10,00	20,00	0,67	2,00	2,67
Total				77,97	180,42	258,39

<sup>1</sup> Valor residual – valor de mercado de tais equipamentos

<sup>2</sup> Custo alternativo – forma de estimação: valor do novo x a taxa mensal (2%)

TABELA 21. Custo fixo discriminado para a metodologia de Hara & Kaya (1983).

Recursos	Valor (R\$)	Vida útil (anos)	Valor residual <sup>1</sup>	Depreciação	Custo alternativo <sup>2</sup>	Custo fixo parcial
B.O.D	3.478,00	10,00	500,00	24,82	69,56	94,38
Refrigerador	644,00	10,00	200,00	3,70	12,88	16,58
Microscópio estereoscópico	1.125,00	10,00	200,00	7,71	22,50	30,21
Destilador	835,00	10,00	200,00	5,29	16,70	21,99
Centrifuga	4.032,00	10,00	500,00	29,43	80,64	110,07
Estufa	1.978,00	10,00	200,00	14,82	39,56	54,38
Placa de petri (5 cm)	232,00	2,00	0,00	9,67	4,64	14,31
Placa de petri (9 cm)	296,00	2,00	0,00	12,33	5,92	18,25
Placa de petri plástica	2,50	2,00	0,00	0,10	0,05	0,15
Micropipetas	576,00	5,00	0,00	9,60	11,52	21,12
Pissetas	3,50	2,00	0,00	0,15	0,07	0,22
Pinça	2,00	2,00	0,00	0,08	0,04	0,12
Estiletas	4,00	2,00	0,00	0,17	0,08	0,25
Erlenmeyer (500mL)	53,40	2,00	0,00	2,23	1,07	3,29
Tubo de ensaio	40,00	2,00	0,00	1,67	0,80	2,47
Grade para tubo ensaio	8,40	4,00	0,00	0,18	0,17	0,34
Contador manual	10,00	10,00	0,00	0,08	0,20	0,28
Mesa com fôrmica	100,00	10,00	20,00	0,67	2,00	2,67
<b>Total</b>				<b>122,68</b>	<b>268,40</b>	<b>391,08</b>

<sup>1</sup> Valor residual – valor de mercado de tais equipamentos

<sup>2</sup> Custo alternativo – forma de estimação: valor do novo x a taxa mensal (2%)

**TABELA 22. Custo fixo discriminado para a metodologia protocolo de Vainio (1992).**

Recursos	Valor (R\$)	Vida útil (anos)	Valor residual <sup>1</sup>	Depreciação	Custo alternativo <sup>2</sup>	Custo fixo parcial
B.O.D	3.478,00	10,00	500,00	24,82	69,56	94,38
Refrigerador	644,00	10,00	200,00	3,70	12,88	16,58
Microscópio estereoscópico	1.125,00	10,00	200,00	7,71	22,50	30,21
Destilador	835,00	10,00	200,00	5,29	16,70	21,99
Estufa	1.978,00	10,00	200,00	14,82	39,56	54,38
Placa de petri (9 cm Ø)	222,00	2,00	0,00	9,25	4,44	13,69
Armadilha White	15,00	2,00	0,00	0,63	0,30	0,93
Micropipetas	576,00	5,00	0,00	9,60	11,52	21,12
Pissetas	3,50	2,00	0,00	0,15	0,07	0,22
Pinça	2,00	2,00	0,00	0,08	0,04	0,12
Estiletos	4,00	2,00	0,00	0,17	0,08	0,25
Erlenmeyer (500mL)	53,40	2,00	0,00	2,23	1,07	3,29
Tubo de ensaio	30,00	2,00	0,00	1,25	0,60	1,85
Grade para tubo ensaio	8,40	4,00	0,00	0,18	0,17	0,34
Contador manual	10,00	10,00	0,00	0,08	0,20	0,28
Mesa com fôrmica	100,00	10,00	20,00	0,67	2,00	2,67
<b>Total</b>				<b>80,60</b>	<b>181,69</b>	<b>262,29</b>

<sup>1</sup> Valor residual – valor de mercado de tais equipamentos

<sup>2</sup> Custo alternativo – forma de estimação: valor do novo x a taxa mensal (2%)

## 7.2 Custo variável (CV)

Os custos variáveis correspondentes a cada metodologia encontram-se nas Tabelas 23 a 26, discriminando, para cada um dos recursos, os parâmetros necessários para o cálculo dos custos totais (CT) de cada metodologia.

TABELA 23. Custo variável discriminado para a metodologia Krishnayya & Grewal (2002).

Recurso	Quantidade	Valor (R\$)
Mão-de-obra	28h.homem	245,00
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	768	23,04
Material limpeza		5,00
Árcia esterilizada	0	0,00
Produto fitossanitário	0	0,00
<b>Total</b>		<b>273,04</b>

TABELA 24. Custo variável discriminado para a metodologia Rovesti et al. (1988).

Recurso	Quantidade	Valor (R\$)
Mão-de-obra	18h.homem	157,5
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	480	14,4
Material limpeza	-	5,00
Árcia esterilizada	-	0,00
Produto fitossanitário	-	0,00
Copos plásticos com tampa	40	1,40
Papel filtro (9cm Ø)		1,37
<b>Total</b>		<b>179,67</b>

TABELA 25. Custo variável discriminado para a metodologia Hara & Kaya (1983)

Recurso	Quantidade	Valor (R\$)
Mão-de-obra	33h.homem	288,75
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	800	24,00
Material limpeza	-	5,00
Produto fitossanitário	-	0,00
Papel filtro (9cm de diâmetro)	80	1,37
<b>Total</b>		<b>319,12</b>

TABELA 26. Custo variável discriminado para a metodologia protocolo de Vainio (1992).

Recurso	Quantidade	Valor (R\$)
mão-de-obra	22 h.homem	192,5
Lagartas de <i>G. mellonella</i>	600	18,00
Material limpeza	-	5,00
Produto fitossanitário	-	0,00
Papel filtro (9cm Ø)		1,37
<b>Total</b>		<b>216,87</b>

### 7.3 Custos totais das metodologias

De acordo com a com os cálculos expostos na Tabela 27, a metodologia que apresentou menor custo de aplicação foi de Rovesti et al. (1988), seguida pelo protocolo de Vainio (1992).

TABELA 27. Cálculo do custo total de cada metodologia.

Parâmetros <sup>1</sup>	Krishnayya & Grewal	Rovesti et al.	Hara & Kaya	Protocolo Vainio
CopFT	84,60	77,97	122,68	80,60
CaltFT	183,52	180,42	268,39	181,69
CFT	268,11	258,39	391,07	262,29
CopVT	273,04	179,67	319,12	216,87
CaltVT	5,46	3,59	6,38	4,34
CVT	278,50	183,26	325,50	221,21
CopT	357,64	257,64	441,80	297,47
CT	546,61	441,65	716,57	483,50

- 1: CopFT (custo operacional fixo total) =  $\sum$  depreciações  
 CaltFT (custo alternativo fixo total) =  $\sum$  custos alternativos  
 CFT (custo fixo total) = CopFT + CaltFT  
 CopVT (custo operacional variável total) =  $\sum$  recursos  
 CaltVT (custo alternativo variável total) =  $\sum$  custo variável x taxa de juros  
 CVT (custo variável total) = CopVT + CaltVT  
 CopT (custo operacional total) = CopFT + CopVT  
 CT (custo total) = CFT + CVT

A metodologia mais viável economicamente foi a de Rovesti et al. (1988), apresentando menor custo total e menor tempo de realização do bioensaio (menor tempo h.homem). No entanto, essa metodologia não foi a melhor tecnicamente pela subjetividade da escala de notas adotada para a avaliação da viabilidade dos JIs e pelo fato do teste de infectividade em areia não apresentar resultados consistentes. Assim, o protocolo de Vainio (1992), pela simplicidade de sua realização e avaliação, foi selecionado como a melhor técnica. Além disso, esta metodologia foi a que apresentou o segundo mais baixo custo total. A baixa diferença da viabilidade de ambos os NEPs e a infectividade na interação tempo *versus* concentração do produto no protocolo de Vainio (1992) sugerem a adoção dessa metodologia modificada como padrão na realização de testes de compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos. Assim, o período de avaliação da viabilidade e infectividade passa a ser de 48 horas de exposição ao produto, utilizando lagartas de *G. mellonella* como padrão de avaliação de infectividade.

## **8 CONCLUSÕES**

**As metodologias de avaliação da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos apresentam resultados semelhantes.**

**Os custos totais das metodologias de avaliação da compatibilidade de nematóides com produtos fitossanitários são diferentes entre si.**

**A metodologia selecionada é protocolo de Vainio (1992).**

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, V.A.M. Avaliação de fungos e nematóides entomopatogênicos e sua compatibilidade com produtos fitossanitários visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). 2003. 82p. Tese (Mestrado em Entomologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

DE NARDO, E.A.B.; GREWAL, P.S. Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) with pesticides and plant growth regulators used in glasshouse plant production. *Biocontrol Science and Technology*, v.13, n.4, p.441-448, 2003.

FORSCHLER, B.T.; ALL, J.N.; GARDNER, W.A. *Steinernema feltiae* activity and infectivity in response to herbicide exposure in aqueous and soil environments. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.55, p.375-379, 1990.

GREWAL, P.S. Formulation and application technology In: GAUGLER, I.(Ed.). *Entomopathogenic Nematology*. CAB International, 2002. p.266-284.

GREWAL, P.S.; CONVERSE, V., GEORGIS, R. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (Nematoda:Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.73, p.40-44, 1999.

⊗ HARA, A.H.; KAYA, H.K. Toxicity of selected organophosphate and carbamate pesticides to infective juveniles of the entomopatogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). *Environmental Entomology*, v.12, p.496-501, 1983.

KAYA, H.K. Soil ecology . In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: CRC, 1990. p.93-111.

KAYA, H.K; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego: Academic, 1997. p.281.



KRISHNAYYA, 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**. v.12, p.259-266, 2002.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.1015-1038.

REIS, A.J. Economia aplicada à administração. In: \_\_\_\_\_. **Comportamento de preços**. Lavras. 2004. p.39-64 Apostila.

ROVESTI, L.; DESEÖ, K.V. Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**, v.36, p.237-245, 1990.

ROVESTI, L.; DESEÖ, K.V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis heliothidis*. **Nematologica**, v.37, p.113-122, 1991.

ROVESTI, L. et al. Compatibility of Pesticides with the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). **Nematologica** v.4, p.462-476, 1988.

VAINIO, A. Guideline for laboratory testing of the side-effects of pesticides on entomophagous nematodes *Steinernema* spp. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.15, p.145-147, 1992.

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

ZIMMERMAN, R.J.; CRANSHAW, W.S. Compatibility of three entomogenous nematodes (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v.83, n.1, p.97-100, Feb. 1990.

## CAPÍTULO 3

### 1 RESUMO

NEGRISOLI JUNIOR, Aldomario Santo. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos utilizando a metodologia modificada de Vainio (1992) In: \_\_\_\_\_. Avaliação de técnicas para estudos de compatibilidade de produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae). Lavras: UFLA, 2005. 66-79p. (Dissertação – Mestrado em Entomologia) -Universidade Federal de Lavras, Lavras\*

O uso de produtos fitossanitários químicos e agentes de controle biológico no manejo integrado de pragas tem sido alvo de muito trabalhos. Nematóides entomopatogênicos podem ser utilizados como uma estratégia de controle de pragas com possibilidade de aplicação conjunta com outros entomopatogênicos ou produtos fitossanitários na chamada mistura de tanque. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade de alguns produtos fitossanitários com duas espécies de nematóides entomopatogênicos. Foram utilizados 18 produtos, dentre inseticidas, nematicidas, acaricidas e herbicidas. Os NEPs *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* foram expostos à maior concentração recomendada pelo fabricante de cada produto por um período de 48 horas em tubos de ensaio e mantidos em BOD a  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ , com cinco repetições por tratamento. Passado esse tempo, os JIs foram separados dos produtos, determinado-se a viabilidade dos JIs sob microscópio estereoscópico. A infectividade foi avaliada em dez lagartas de *G. mellonella*, em placas de petri com papel filtro, onde foram adicionados cerca de 100 JIs. Após cinco dias, as lagartas foram transferidas para câmara seca. Passados três dias, contabilizou-se o número de lagartas com sintoma de infecção por NEPs. Os produtos thiophanate metil, tiametoxan e imidaclopride diminuíram a viabilidade e a infectividade de *S. carpocapsae*. Tiametoxan, aldicarbe e carbofuran diminuíram a viabilidade de *H. bacteriophora*.

---

\* Orientador: Alcides Moino Junior

## CHAPTER 3

### 2 ABSTRACT

NEGRISOLI JUNIOR, Aldomario Santo. Compatibility evaluation of agrochemicals with entomopathogenic nematodes utilizing the Vainio's modified methodology (1992) In: \_\_\_\_\_. **Techniques evaluation for compatibility studies of agrochemicals with entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae)**. 2005. p.66-79p. Dissertation (Master in Entomology)- Federal University of Lavras, Lavras.\*

The use of chemicals agrochemicals and biological control agents in integrated pest management has been the goal of several studies. Entomopathogenic nematodes can be utilized as a strategy to control pest with possibility of application together with other entomopathogens and agrochemicals in the called tank mixture. Thus, the objective of this work was to evaluate the compatibility of some agrochemicals with two species of entomopathogenic nematodes. Eighteen products were utilized among insecticides, nematicides, acaricides and herbicides. The NEPs, *H. bacteriophora* and *S. carpocapsae* were exposed to the highest concentration recommended by the manufacturer of each product for the period of 48 hours in test tubes and kept in B.O.D. at  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ . After that time, the IJs were separated from the products, and their viability determined under a stereoscope microscope. The infection was evaluated in ten caterpillars of *G. mellonella*, in petri dish with filter paper, where about 100 IJs were added. After five days the caterpillars were transferred to the drying chamber. Three days later, the number of caterpillar with infection symptom by EPNs was counted. The products: thiophanate metil, tiametoxan and imidaclopride decreased the viability and the infectivity of *S. carpocapsae*. Tiametoxan, aldicarbe and carbofuran reduced the viability of *H. bacteriophora*.

---

\* Adviser: Alcides Moino Junior

### 3 INTRODUÇÃO

O uso de produtos fitossanitários químicos, tais como fungicidas, inseticidas, nematicidas e acaricidas, entre outros, representa um dos principais métodos de controle de doenças e pragas agrícolas. A fácil aplicação e resultados imediatos tornaram esses produtos como os mais difundidos em diversas culturas, somando-se a isto o baixo conhecimento dos produtores, o que aumenta sua difusão no sistema agrícola atual. Entretanto, essa prática representa grandes problemas quando utilizada de forma indiscriminada, já que pode causar efeitos deletérios ao ambiente, animais e ao homem, bem como aos inimigos naturais das pragas agrícolas.

O grande sucesso alcançado pelos inseticidas sintéticos a partir da década de 1940, no controle de pragas agrícolas, relegou as pesquisas sobre inimigos naturais a um plano secundário. A alta eficiência dos tratamentos e a aparente incompatibilidade entre os métodos químicos e biológicos dividiram os entomologistas em dois campos opostos: os defensores do método químico e os adeptos do controle biológico. Somente a partir da década de 1950, com as primeiras consequências negativas do uso indiscriminado e abusivo dos inseticidas, a importância dos agentes de controle biológico voltou a ser reconhecida, culminando no estabelecimento, na década de 1970, dos programas de manejo integrado de pragas, com o conceito de maximizar os efeitos de inseticidas sobre pragas, com o mínimo impacto nos inimigos naturais (Foerster, 2002).

Um dos principais aspectos que deve ser abordado é o estudo da compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados em diferentes culturas, de forma a possibilitar o uso associado dos NEPs com determinados produtos que possam apresentar características de

sinergismo, ou mesmo visando a conservação desses agentes de controle biológico em ambientes onde já ocorram, que é uma estratégia de baixo custo e ambientalmente segura (Alves et al., 1998).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade de produtos fitossanitários de diferentes classes com *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, utilizando a metodologia modificada de Vainio (1992).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos para avaliar a compatibilidade de diferentes produtos fitossanitários com nematóides entomopatogênicos. Para isso, utilizou-se a metodologia modificada de Vainio (1992), que se mostrou ser mais adequada e de baixo custo na avaliação da compatibilidade para ser aplicada a outros produtos fitossanitários de diferentes classes (herbicidas, inseticidas, etc.). Conforme discutido anteriormente, não houve diferença entre o tempo de exposição dos produtos com as diferentes espécies de NEPs na metodologia de Vainio (1992). Assim, a metodologia foi simplificada para apenas um período de avaliação da viabilidade e infectividade dos JIs (48 horas de exposição aos produtos).

Os nematóides utilizados foram os seguintes: *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis bacteriophora*. Juvenis infectivos destas espécies foram obtidos de lagartas de último instar de *G. mellonella*, segundo metodologia de Kaya & Stock (1997), conforme descrito anteriormente, sendo que as suspensões utilizadas apresentavam, no máximo, 30 dias de armazenamento, conforme suas exigências térmicas.

Os produtos foram utilizados com o dobro da maior concentração passível de ser aplicado em campo, de acordo com a cultura na qual pode-se aplicar a maior quantidade do produto comercial, conforme consta no compêndio de defensivos agrícolas (Andrei, 1996). Assim, para efeito de cálculo para a diluição do produto no laboratório, considerou-se que, em um hectare, são aplicados 300 litros de calda.

Os produtos fitossanitários utilizados e a maior concentração que pode ser aplicada em campo estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Produtos fitossanitários utilizados nos experimentos.

Nome		Formulação	Uso <sup>1</sup>	Grupo químico	Concentração (ha) <sup>2</sup>
Técnico	Comercial				
✓	Aldicarbe	Temik	WG	(I/N)	26 kg/ha
	Carbofuran	Furadan	WG	IN	Metilcarbamato de benzofuralina 40 kg/ha
✓	Tiametoxam	Actara	WG	I	Nicotinóide 2 kg/ha
	Imidaclopride	Premier	WG	I	Nicotinóide (nitroguanidinas) 1,3 kg/ha
	Imidaclopride	Confidor	WG	I	Nicotinóide (nitroguanidinas) 360g/ha
	Endosulfam	Thiodam	CE	I/A	Ester do ácido sulfuroso e um diol cíclico 11,5L/ha
✓	Clorpirifós	Pyrinex	CE	(I/A)	organofosforados 1 L/ha
	Deltrametrina	Decis 25	CE	I	piretróide 400 mL/ha
	Acetochlor	Fist	CE	H	Cloroacetanilida 4 L/ha
	Oxyfluorfen	Goal	CE	H	Éter difenilico 6 L/ha
⊗	Tiametoxam+ cyproconazole	Verdadero	WG	(I/F)	Neonicotinóide e triazol 1kg/ha
	Simazina+ Ametrina	Topezê	SC	H	Triazina 8 L/ha
	Dimetiluréia	Karmex 110	WG	H	Uréias substituídas 4 kg/ha
	Oxadiazom	Ronstar	SC	H	oxadiazoles 4 L/ha
	Pendimentalim	Herbadox 500	CE	H	dinitroanilinas 4L/ha
	Azaferidim	Ranger	GRDA	H	triazolona 4kg/ha
✓	Tiofanate metil	Cercobin 700	PM	(F)	Benzimidazoles 100g / L água
	Metalaxil+mancozeb	Ridomil mancozeb BR	PM	F	Alaninatos e diocarbamatos 4 kg/ ha

<sup>1</sup>A = Acaricida; I = Inseticida; F = Fungicida; N = Nematicida

<sup>2</sup>Maior concentração recomendada

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de compatibilidade foram divididos em dois ensaios. No primeiro, como pode ser visto na Tabela 2, em relação à viabilidade dos JIs expostos aos diferentes produtos fitossanitários, todos estes provocaram baixa mortalidade dos JIs, exceto para Simazina+ametrina (Topezê), que causou 84% de morte dos JIs de *H. bacteriophora*. A maior mortalidade registrada para *S. carpocapsae* foi com Tiofanate metil (Cercobin), apresentando 50% de mortalidade dos JIs. Os demais produtos provocaram mortalidade menor que 50% para as duas espécies de NEPs.

A infectividade foi menor em *H. bacteriophora* em comparação a *S. carpocapsae*. Os produtos que mais afetaram *H. bacteriophora* foram Tiofanate metil (Cercobin) e Deltrametrina (Decis), provocando 32% e 40% de mortalidade de lagartas de *G. mellonella*, respectivamente. Já no caso de *S. carpocapsae*, a menor mortalidade registrada foi verificada com o produto Tiofanate metil (Cercobin), apresentando 4% de morte das lagartas. A baixa mortalidade na testemunha de *S. carpocapsae* no primeiro ensaio foi provavelmente devido a erro experimental, dificultando a comparação com os tratamentos (produtos fitossanitários).



TABELA 2. Mortalidade e infectividade de *Heterorhabditis bacteriophora* e *Steinernema carpocapsae*, após exposição aos produtos fitossanitários.

Nome Técnico	Ensaio I			
	Viabilidade <sup>1</sup>		Infectividade <sup>2</sup>	
	<i>H. bacteriophora</i>	<i>S. carpocapsae</i>	<i>H. bacteriophora</i>	<i>S. carpocapsae</i>
Testemunha	0,00 ± 0,00 Be <sup>3</sup>	13,20 ± 3,25 Ac	52,00 ± 13,56 Ab	26,80 ± 8,76 Ab
Acetochlor	10,00 ± 3,32 Bc	41,80 ± 5,94 Aa	54,00 ± 18,87 Bb	100 ± 0,00 Aa
Oxadiazon	4,00 ± 0,63 Bd	25,60 ± 4,08 Ab	88,00 ± 4,90 Aa	100 ± 0,00 Aa
Pendimethalin	12,80 ± 3,71 Bc	31,00 ± 5,18 Ab	72,00 ± 10,20 Ba	100 ± 0,00 Aa
Dimetiluréia	14,20 ± 4,49 Ac	7,60 ± 2,62 Ac	92,00 ± 4,90 Aa	88,00 ± 8,00 Aa
Simazine+	84,00 ± 4,30 Aa	8,00 ± 1,45 Bc	72,00 ± 10,20 Ba	100 ± 0,00 Aa
Ametrine				
Thiophanate metil	32,00 ± 7,52 Bb	50,00 ± 7,75 Aa	32,00 ± 12,00 Ab	4,00 ± 4,00 Bc
Oxyfluorfen	13,80 ± 4,67 Ac	21,20 ± 4,33 Ab	88,00 ± 4,90 Aa	100 ± 0,00 Aa
Endosulfan	8,80 ± 1,32 Bc	33,80 ± 3,35 Ab	76,00 ± 4,00 Ba	96,00 ± 4,00 Aa
Imidaclopride (Confidor)	5,40 ± 2,06 Bd	19,80 ± 2,65 Ab	64,00 ± 7,48 Bb	88,00 ± 4,90 Aa
Deltrametrina	5,60 ± 1,33 Bd	28,40 ± 4,37 Ab	40,00 ± 6,32 Bb	100 ± 0,00 Aa

<sup>1</sup> Refere-se à porcentagem de JIs mortos

<sup>2</sup> Refere-se à porcentagem de lagartas mortas

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott (P > 0,05).

No segundo ensaio, como visto na Tabela 3, observou-se alta mortalidade de JIs, quando expostos aos produtos aldicarbe (Temik) e tiametoxam (Actara), para as duas espécies de NEPs. O produto carbofuram (Furadan) provocou alta mortalidade em *H. bacteriophora* (99%), o que não foi observado para *S. carpocapsae* (48%). Imidaclopride (Premier) causou alta mortalidade em *S. carpocapsae* (93%), o que não ocorreu com *H. bacteriophora* (49%).

A exemplo do primeiro ensaio, a infectividade de *H. bacteriophora* foi mais afetada em comparação a *S. carpocapsae*. Carbofuran (2%), aldicarbe (0%) e clorpirifós (7,6%) diminuíram severamente a infectividade de *H. bacteriophora*. Aldicarbe (6%) e clorpirifós (13%) provocaram baixa infectividade em *S. carpocapsae*.

TABELA 3. Mortalidade e infectividade de *Heterorhabditis bacteriophora* e *Steinernema carpocapsae* após exposição aos produtos fitossanitários.

Nome técnico	Ensaio 2			
	Viabilidade <sup>1</sup>		Infectividade <sup>2</sup>	
	<i>H. bacteriophora</i>	<i>S. carpocapsae</i>	<i>H. bacteriophora</i>	<i>S. carpocapsae</i>
Testemunha	0,80 ± 0,37 Be <sup>3</sup>	16,00 ± 6,78 Ae	72,00 ± 5,83 Ba	100 ± 0,00 Aa
Metalaxil + mancozeb	37,80 ± 9,97 Ac	23,00 ± 7,00 Ad	50,00 ± 15,81 Ba	100 ± 0,00 Aa
Tiametoxan	88,00 ± 2,00 Bb	96,00 ± 2,45 Aa	10,00 ± 6,32 Bb	90,00 ± 5,48 Aa
Imidaclopride (Premier)	49,00 ± 8,72 Bc	93,00 ± 2,00 Aa	18,00 ± 5,83 Bb	98,00 ± 2,00 Aa
Tiametoxam + ciproconazole	29,00 ± 5,10 Bd	76,00 ± 2,45 Ab	48,00 ± 10,20 Ba	98,00 ± 2,00 Aa
Aldicarbe	100 ± 0,00 Aa	100 ± 0,00 Aa	0,00 ± 0,00 Ab	6,00 ± 2,45 Ab
Carbofuran	99,00 ± 0,63 Aa	48,00 ± 7,35 Bc	2,00 ± 2,00 Bb	88,00 ± 4,90 Aa
Azafenidim	20,00 ± 3,16 Bd	58,00 ± 3,74 Ac	62,00 ± 6,63 Ba	98,00 ± 2,00 Aa
Clorpirifós	2,80 ± 1,36 Ac	2,20 ± 0,73 Ae	7,60 ± 1,91 Ab	13,00 ± 4,36 Aa

<sup>1</sup> Refere-se a porcentagem de JIs mortos

<sup>2</sup> Refere-se a porcentagem de lagartas mortas

<sup>3</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste Scott-Knott (P > 0,05).

Carvalho (2003), avaliando a compatibilidade de produtos fitossanitários com *S. carpocapsae* utilizados na cultura do café, verificou que os herbicidas simazina + ametrina diminuíram a viabilidade do nematóide em 20,57%, enquanto acetoclor e oxifluorfem diminuíram em 100%; a redução de infectividade do nematóide em lagartas de *G. mellonella* foi de 25% (simazina + ametrina) e 100% para acetoclor e oxifluorfem. Já no presente trabalho, a viabilidade de *S. carpocapsae* apresentou valores menores para os produtos simazina + ametrina, acetoclor e oxifluorfem, com 8%, 41%, 8% e 21,2%, respectivamente; todos esses produtos apresentaram 100% de infectividade de *S. carpocapsae*, diferindo do referido do que foi relatado por aquele autor, em relação ao produto simazina + ametrina que apresentou infectividade de 25%.

Rovesti & Deseo (1990) e Rovesti et al. (1988) determinaram a compatibilidade de vários produtos fitossanitários com *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* e *S. feltiae*, verificando baixa viabilidade de *H. bacteriophora* e alta infectividade em lagartas de *G. mellonella* quando expostos aos fungicidas

mancozeb e metalaxil + folpet. Os inseticidas deltametrina e endosulfam não foram tóxicos aos JIs dos nematóides com elevada infectividade em todas as concentrações dos produtos, discordando de Head et al. (2000) com diminuição de infectividade de *S. feltiae* 0,56% com deltametrina. No entanto, os nematicidas aldicarbe e carbofuram foram igualmente prejudiciais, causando diminuição na viabilidade de todos os nematóides, não reduzindo a infectividade nas menores concentrações dos produtos. O herbicida oxifluorfen não causou nenhum efeito de redução da viabilidade e infectividade nos nematóides, considerado como compatível. Os resultados de viabilidade de *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* apresentados estão de acordo com o presente trabalho; discordando dos referidos autores, para a infectividade, aldicarbe diminuiu severamente a capacidade infectiva de ambos os nematóides e carbofuram reduziu somente em *H. bacteriophora*.

Os efeitos de aplicações combinadas de imidaclopride com *H. bacteriophora* e *S. glaseri* foram observadas em larvas de terceiro instar de *C. pasadenae*, *C. borealis*, *P. japonica* e *E. orientalis*, apresentando aumento da mortalidade no uso do inseticida mais nematóide, mostrando efeito sinérgico entre esta associação (Koppenhöfer & Kaya, 1998; Koppenhöfer et al., 2000). Posteriormente, Koppenhöfer et al. (2002) avaliaram o efeito de imidaclopride e tiametoxam combinado com *H. bacteriophora* e *S. glaseri* obtendo os mesmos efeitos sinérgicos de ambos nematóides com cada um dos produtos nos mesmos hospedeiros. Não foi observado efeito negativo dos mesmos produtos sobre a patogenicidade, infectividade e progênie de *S. glaseri*, *S. carpocapsae*, *S. feltiae*, *H. bacteriophora* e *H. megidis*. Além disso, a aplicação combinada pode aumentar a taxa de infecção nos hospedeiros testados e a persistência desses nematóides em campo (Koppenhöfer et al., 2003).

Concordando com os autores anteriores, a infectividade de *S. carpocapsae* foi alta com imidaclopride (Confidor e Premier) e a de *H. bacteriophora* foi alta

com Premier e baixa com Confidor; a viabilidade foi alta para ambos os nematóides com o produto Confidor, exceto com o produto Premier, com *S. carpocapsae* apresentando elevada mortalidade de JIs.

De maneira geral, houve maior redução de infectividade de *H. bacteriophora* em relação a *S. carpocapsae*. Alguns inseticidas e os nematicidas foram prejudiciais aos JIs de ambos os NEPs. Os herbicidas, exceto simazina + ametrina (Topezê), foram compatíveis com *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*.

## 6 CONCLUSÕES

Os produtos fitossanitários tiofanate metil (Cercobin) e aldicarbe (Temik) são incompatíveis com *S. carpocapsae*, provocando redução de viabilidade e infectividade do mesmo.

Os produtos fitossanitários tiametoxan (Actara), tiofanate metil (Cercobin), aldicarbe (Temik) e carbofuram (Furadan) são incompatíveis com *H. bacteriophora*, provocando redução de viabilidade e infectividade do mesmo.

Os produtos tiametoxan (Actara) e imidaclopride (Premier) reduzem a viabilidade de *S. carpocapsae*. O produto clorpirifós (Pyrinex) reduz a infectividade e simazina+ametrina reduz a viabilidade de *H. bacteriophora*.

Os demais produtos fitossanitários são compatíveis com *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap.8, p.217-238.
- ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. 5.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1996. p.506.
- CARVALHO, V.A.M. **Avaliação de fungos e nematóides entomopatogênicos e sua compatibilidade com produtos fitossanitários visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)**. 2003. 82p. Tese (Mestrado em Entomologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FOERSTER, L.A. Seletividade de inseticidas a predadores e parasitóides In: PARRA, J.R.P. et al. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p.95-103.
- HEAD, J.; WALTERS, K.F.A.; LANGTON, S. Compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* and chemical insecticides for the control of the south american leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. **Biocontrol**, Dordrecht, v.45, n.3, p.345-353, Sept. 2000.
- KAYA, H.K; STOCK, S.P. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L.A. **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic, 1997. p.281.
- a KOPPENHÖFER, A.M.; KAYA, H. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to White Grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, v.91, n.3, p.618-623, 1998.
- KOPPENHÖFER, A.M. et al. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. **Biological Control**, v.19, p.245-251, 2000.

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

KOPPENHÖFER, A.M. et al. Effect of neonicotinoid synergists on entomopathogenic nematode fitness. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.106, p.7-18, 2003.

ROVESTI, L.; DESEÖ, K.V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**, v.36, p.237-245, 1990.

ROVESTI, L. et al. Compatibility of Pesticides with the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). **Nematologica**, v.34, p.462-476, 1988.

VAINIO, A. Guideline for laboratory testing of the side-effects of pesticides on entomophagous nematodes *Steinernema* spp. **IOBC/WPRS Bulletin**, v.15, p.145-147, 1992.