



**PAULO HENRIQUE DE SIQUEIRA SABINO**

**ASSOCIAÇÃO DE *Heterorhabditis amazonensis* (NEMATODA:  
RHABDITIDA) E INSETICIDAS SISTÊMICOS NO CONTROLE  
DE *Tuta absoluta* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)  
EM LABORATÓRIO E CULTIVO PROTEGIDO**

**LAVRAS - MG  
2018**

**PAULO HENRIQUE DE SIQUEIRA SABINO**

ASSOCIAÇÃO DE *Heterorhabditis amazonensis* (NEMATODA: RHABDITIDA) E  
INSETICIDAS SISTÊMICOS NO CONTROLE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK)  
(LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) EM LABORATÓRIO E CULTIVO PROTEGIDO

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

Prof. Dr. Alcides Moino Junior  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados  
pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Sabino, Paulo Henrique de Siqueira.

Associação de *Heterorhabditis amazonensis* (Nematoda:  
Rhabditida) e inseticidas sistêmicos no controle de *Tuta absoluta*  
(Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em laboratório e cultivo  
protegido / Paulo Henrique de Siqueira Sabino. 2018.

55 p.

Orientador: Alcides Moino Junior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Heterorhabditidae. 2. Traça-do-tomateiro. 3.  
Compatibilidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**PAULO HENRIQUE DE SIQUEIRA SABINO**

ASSOCIAÇÃO DE *Heterorhabditis amazonensis* (NEMATODA: RHABDITIDA) E  
INSETICIDAS SISTÊMICOS NO CONTROLE DE *Tuta absoluta* (MEYRICK)  
(LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) EM LABORATÓRIO E CULTIVO PROTEGIDO

ASSOCIATION OF *Heterorhabditis amazonensis* (NEMATODA: RHABDITIDA) AND  
SYSTEMIC INSECTICIDES IN THE CONTROL OF *Tuta absoluta* (MEYRICK)  
(LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) IN LABORATORY AND PROTECTED CULTIVATION

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

APROVADO em 26 de fevereiro de 2018

Dr. Ricardo Souza Cavalcanti	IFMG, Campus Bambuí.
Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza	UFLA
Dr. Ronald Zanetti	UFLA
Dr. Stephan Malfitano Carvalho	UFLA

Dr. Alcides Moino Junior  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2018**

*A Deus, princípio de toda sabedoria,  
que está comigo em todos os momentos  
dando-me forças para seguir firme na jornada da vida,*

OFEREÇO

*Aos meus pais, Roberto e Berenice  
e a minha noiva Ticyane*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Entomologia pela oportunidade para a realização do Doutorado.

Ao professor Alcides Moino Junior pela orientação e apoio colocando-se sempre à disposição.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

A todo corpo docente do Departamento de Entomologia da UFLA, em especial aos professores Brígida Souza, Ronald Zanetti e Luis Claudio Paterno Silveira.

Às secretárias Isabel e Lisiane, pela atenção nos atendimentos na secretaria.

Aos colegas de laboratório, Pedro e Fernanda.

À professora Vanessa Andaló da Universidade Federal de Uberlândia pela colaboração no desenvolvimento dos artigos e ao Prof. Ricardo Cavalcanti pelos ensinamentos e colaboração durante minha carreira acadêmica.

Aos funcionários Irene e Julinho pela amizade, conversas e apoio.

À UNIFENAS, pela disponibilidade da área para a condução do ensaio.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**SINCERAMENTE AGRADEÇO!**

## RESUMO GERAL

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) são organismos que vivem no solo, sendo propícios para o controle de pragas subterrâneas ou que passam no mínimo uma fase de seu ciclo nesse ambiente, no entanto esses nematoides também possuem potencial de serem utilizados no controle de pragas que danificam a parte aérea das plantas quando as condições são adequadas. Além disso, na agricultura convencional a utilização de produtos químicos é inevitável, sendo assim importante conhecer as possibilidades de realizar aplicações conjuntas entre inseticidas e os NEP. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar dois diferentes intervalos de aplicação de *Heterorhabditis amazonensis* JPM4 combinado com inseticidas aplicados via solo no controle de larvas de *T. absoluta*, analisar a compatibilidade do nematoide com inseticidas aplicados via solo na cultura do tomateiro e a aplicação combinada dos inseticidas e o NEP no controle de pupas da *T. absoluta* no solo em laboratório e ambiente protegido. Para o ensaio do intervalo de aplicação as aplicações foram feitas semanalmente e quinzenalmente até a destruição total das plantas com infestações semanais de *T. absoluta*. No ensaio de compatibilidade foi avaliada a viabilidade e infectividade do NEP após o contato com os inseticidas e para a aplicação combinada no controle de pupas de *T. absoluta* foi avaliado o efeito sinérgico, aditivo e antagonista da aplicação. A aplicação semanal e quinzenal de *H. amazonensis* combinado com os inseticidas e com água é eficaz no controle de larvas de *T. absoluta*. A aplicação combinada de inseticidas e nematoide proporciona melhor desenvolvimento das plantas. Os produtos testados são compatíveis ao NEP. A aplicação combinada do nematoide com os inseticidas apresenta efeito aditivo em condições de laboratório e são eficazes no controle de pupas em cultivo protegido.

**Palavras-Chave:** Heterorhabditidae. Traça-do-tomateiro. Compatibilidade.

## ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPN) are organisms that live in the soil, are favorable for the control of underground pests or that spend at least a phase of their cycle in this environment, however these nematodes also have potential to be used to control pests that damage the aerial part of the when conditions are appropriate. In addition, in conventional agriculture, the use of chemicals is unavoidable, so it is important to know the possibilities of joint applications between insecticides and EPN. Thus, the present work had the objective of evaluating two different application intervals of *Heterorhabditis amazonensis* JPM4 combined with insecticides applied via soil in the control of *T. absoluta* larvae, to analyze the nematode compatibility with insecticides applied via soil in the tomato crop and the combined application of insecticides and EPN in *T. absoluta* pupae control in soil in laboratory and protected environment. For the application interval assay the applications were made weekly and fortnightly until the total destruction of the plants with weekly *T. absoluta* infestations. In the compatibility test, the viability and infectivity of EPN after contact with the insecticides were evaluated, and the synergic, additive and antagonistic effect of the application was evaluated for the combined application in *T. absoluta* pupae control. The weekly and biweekly application of *H. amazonensis* combined with insecticides and water is effective in the control of *T. absoluta* larvae. The combined application of insecticides and nematodes provides better plant development. The products tested are compatible with the EPN. The combined application of nematode with insecticides has an additive effect under laboratory conditions and is effective in controlling pupae in protected culture.

**Keywords:** Heterorhabditidae. Leaf miner. Compatibility.



## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	11
2.1. O tomateiro e sua importância econômica .....	11
2.2 <i>Tuta absoluta</i> .....	12
2.3 Métodos de controle de <i>Tuta absoluta</i> .....	12
2.4 Aplicação combinada de nematoides entomopatogênicos e inseticidas.....	13
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	15
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	19
<b>ARTIGO 1. COMPATIBILIDADE DE <i>Heterorhabditis amazonensis</i> JPM4 E INSETICIDAS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO TOMATEIRO</b> .....	19
<b>ARTIGO 2. INSETICIDAS COMO POTENCIALIZADORES DE <i>Heterorhabditis amazonensis</i> JPM 4 NO CONTROLE DE <i>Tuta absoluta</i> (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) NA CULTURA DO TOMATEIRO</b> .....	28
<b>ARTIGO 3. APLICAÇÃO COMBINADA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E INSETICIDAS NO CONTROLE DE PUPAS DE <i>TUTA ABSOLUTA</i> (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) NO TOMATEIRO</b> .....	42

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

O tomateiro é a segunda hortaliça mais cultivada no Brasil perdendo apenas para a batata, sendo fonte de renda e emprego no campo. Devido às grandes áreas de cultivo a ocorrência de insetos-praga é inevitável, dentre estes podemos destacar a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) que pode levar à perda total da produção. Para reduzir os problemas causados por *T. absoluta*, diferentes táticas de controle são adotadas pelos produtores, podendo-se destacar a utilização de produtos químicos que possuem ação rápida na mortalidade dos insetos, além de fácil acesso ao produtor. Quando os produtos químicos são utilizados de maneira inadequada, alguns sérios problemas podem ocorrer como contaminação ambiental, resíduos em alimentos e seleção de insetos resistentes devido à utilização frequente e de doses acima das recomendadas pelo fabricante. No entanto, o controle químico, quando utilizado de maneira correta, é um método de controle de grande aplicabilidade na proteção de cultivos.

Outros métodos de controle também podem ser adotados no manejo de pragas, podendo-se destacar o controle biológico, composto por diferentes agentes de controle biológico como os nematoides entomopatogênicos (NEP) que apresentam potencial de controle para diferentes insetos praga. Diversas são as estratégias para utilização dos NEP no controle de pragas, sendo a estratégia mais prática e econômica aquela que se baseia na conservação dos NEP no agroecossistema. Uma dessas formas é a utilização de inseticidas compatíveis com os NEP, que não interfiram na sua capacidade de infectar o hospedeiro, sendo ainda impossível a exclusão dos inseticidas nas áreas produtoras.

Trabalhos de compatibilidade de nematoides com inseticidas são realizados frequentemente por vários autores, mostrando que esses organismos são tolerantes aos principais inseticidas utilizados atualmente. Além de estudos de compatibilidade de nematoides com os inseticidas, alguns trabalhos são realizados com aplicação combinada de NEP e inseticidas no controle de pragas, sendo que tal aplicação pode tanto aumentar a taxa e controle das pragas. A possibilidade da interação entre NEP e inseticidas deve receber especial atenção nas culturas onde o uso de defensivos é ainda indispensável, como na cultura do tomateiro.

Os objetivos neste estudo foram

- Avaliar a compatibilidade de NEP e inseticidas utilizados via solo na cultura do tomateiro

- Avaliar a associação de NEP em diferentes intervalos de aplicação e inseticidas sistêmicos via solo no controle de larvas de *T. absoluta* em casa de vegetação.
- Avaliar a combinação de NEP e inseticidas no controle de pupas de *T. absoluta* em laboratório e cultivo protegido.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. O tomateiro e sua importância econômica

O tomateiro é originário da América do Sul, mais especificamente entre o Equador e o norte do Chile, encontrando-se muitas espécies desde o litoral do Pacífico até uma altitude de 2.000 m nos Andes, sendo, portanto uma planta de clima tropical de altitude que se adapta a quase todos os tipos de climas, porém não tolerando temperaturas extremas (GOTO, 1995). A espécie cultivada *Solanum lycopersicum* originou-se da espécie andina e silvestre *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* (TAYLOR, 1986).

O tomateiro pertence à família botânica Solanaceae e ao gênero *Solanum*, sendo este gênero constituído por nove espécies (TAYLOR, 1986). A espécie cultivada é uma planta herbácea, com folhas pecioladas, compostas e com número ímpar de folíolos, com caule flexível com abundância em brotações laterais (FILGUEIRA, 2000).

O tomateiro é uma das culturas hortícolas mais importantes em termos de produção e valor económico, uma vez que ocupa o segundo lugar em volume de produção mundial, sendo superada apenas pela batata. O setor do tomate e seus produtos transformados inserem-se assim num mercado mundial muito competitivo dominado pela China com um volume anual de cerca de 33 milhões de toneladas, o que representa 26% da produção mundial, seguido dos Estados Unidos da América (E.U.A) que ocupam a 2ª posição no ranking mundial.

No Brasil, o tomateiro foi introduzido por imigrantes europeus no fim do século XIX (CANÇADO JÚNIOR et al., 2003). Desde então, o seu cultivo consolidou-se, tornando-se a hortaliça de fruto mais importante do Brasil, a ponto de ocupar o primeiro lugar em valor e volume de produção (SCHMIDT, 2000). Com uma produção anual de cerca de 3,04 milhões de toneladas, numa área em torno de 63.000 ha, o Brasil é o oitavo maior produtor mundial e o décimo primeiro em termos de produtividade. Considerando-se o panorama nacional, São Paulo é o maior produtor, com uma área de 11.259 ha e produção de 753.283 toneladas, em seguida, Minas Geras com 10.495 ha de área e uma produção de 732.703 toneladas, segundo dados do AGRIANUAL (2017).

Devido a essa alta produção, alguns problemas fitossanitários são bastantes conhecidos por exigirem grande número de aplicações de defensivos durante todo o ciclo do cultivo e assim onerando o custo do produtor, tanto no Brasil quanto no mundo.

As pragas que ocorrem na cultura podem comprometer toda a produção se não forem controladas de maneira adequada. Em geral, os produtores têm muitas dificuldades de tomar decisão de controle, desse modo realizam pulverizações frequentes, que podem levar a vários e sérios problemas.

Uma forma de reduzir os numero de aplicações seria o emprego do Manejo Integrado de Pragas (MIP) que consiste no uso racional e integrado de diferentes táticas de controle com parâmetros técnicos, econômicos, sócias e ecológicos buscando manter a praga abaixo do nível de dano econômico (FERNANDES et al., 2003). O conhecimento das épocas de pico de infestações dos insetos pragas, sua distribuição e injuria na planta constituem ferramentas importantes, orientando as atividades do produtor sobre a ocorrência da praga durante o ciclo da cultura, permitindo o planejamento da produção com maior confiabilidade e segurança (MALTA et al., 2005).

## **2.2 *Tuta absoluta***

Um dos principais problemas da cultura é a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), a qual, em altas infestações, pode destruir até 90% da área foliar. Foi relatada pela primeira vez no Brasil na década de 1980, nos estados do Paraná, Minas Gerais, entre outros (MORAIS; NORMANHA FILHO, 1982; TORRES et al., 2001). Atualmente, encontra-se distribuída por todas as regiões produtoras do país.

Este microlepidóptero tem distribuição neotropical e hábito minador de folhas, frutos, flores e caules. Apresenta grande potencial destrutivo, podendo atacar os órgãos da planta em qualquer estágio de desenvolvimento (SOUZA; REIS, 2003). A injúria ocorre quando a larva se alimenta do mesófilo foliar, afetando a capacidade fotossintética com consequente perda da produção, além das injúrias diretas nos frutos, causando graves prejuízos (COLOMO; BERTA, 1995).

As fêmeas de *T. absoluta* normalmente depositam seus ovos nas folhas. Os quatro estádios larvais vivem em túneis no interior da folha onde se alimentam e se desenvolvem. As pupas são principalmente encontradas no chão, mas também podem ser encontradas nas plantas de tomate. A longevidade das fêmeas está entre 10 e 22 dias e sua fecundidade de 60 a 120 ovos. A espécie precisa de 29-38 dias para completar seu ciclo, dependendo da temperatura (URBANEJA et al., 2007).

## **2.3 Métodos de controle de *Tuta absoluta***

Atualmente, um dos métodos mais utilizados para o controle de *T. absoluta* consiste no controle químico, devido à ação rápida e fácil disponibilidade ao produtor. Vários inseticidas já foram registrados para o controle de *T. absoluta* pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tais

como abamectina, indoxacarbe, cartape e clorfenapir (AGROFIT, 2011). No entanto, a utilização irracional do controle químico pode levar a diversos e sérios problemas tais como resíduos de produtos nos alimentos, eliminação das populações de inimigos naturais, contaminação humana e ambiental e conferindo resistência a populações de pragas (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001).

Uma ferramenta importante para redução dos problemas citados é o controle biológico, composto por diversos agentes de controle como os nematoides entomopatogênicos (NEP) que pertencem à ordem Rhabditida e possuem associação com bactérias mutualísticas, que quando introduzidas na hemocele do inseto pelos juvenis infectantes (JI) levam o hospedeiro à morte entre 24 e 48 horas (FERRAZ, 1998). Estes nematoides são aplicados em áreas que recebem diferentes insumos agrícolas como produtos químicos e corretivos de solo, sendo que alguns produtos podem reduzir a sobrevivência e infectividade dos NEP (GREWAL et al., 2001), sendo necessários estudos de compatibilidade antes de sua utilização em campo.

#### **2.4 Aplicação combinada de nematoides entomopatogênicos e inseticidas**

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) estimula a diminuição da utilização de produtos fitossanitários e fornece várias opções para se controlar as pragas harmoniosamente, fazendo com que essas permaneçam em baixos níveis populacionais e assim não causem danos econômicos às culturas (PAPACEK; SMITH, 1994).

Na ausência de um produto à base de NEP altamente eficaz e disponível comercialmente, o sinergismo entre os nematoides e inseticidas pode ser uma alternativa viável para o controle de insetos praga. O controle de *T. absoluta* no seu estágio de pupa por nematoides apresenta baixa eficácia (BATALLA-CARRERA; MORTON, 2010). Diversos estudos comprovam que as interações entre NEP e inseticidas podem aumentar a efetividade de controle das pragas (KOPPENHOFER E FUZY 2008; KOPPENHOFER et al. 2002; NEGRISOLI et al. 2010).

A ação de inseticidas sobre organismos pode levar a distúrbios da atividade de muitos sistemas, incluindo o neuroendócrino e imunológico. Além disso, substâncias tóxicas induzem à excessiva intensidade de reações de proteção do inseto, podendo levar ao esgotamento mais rápido do organismo e, conseqüentemente, a maior suscetibilidade a agentes patogênicos (DUBOVSKIY et al., 2013a). Os inseticidas podem também afetar o sistema nervoso do inseto, impedindo a produção de hormônios que participam na resposta de imunidade contra agentes infecciosos (DUBOVSKIY et al., 2013b). A aplicação combinada entre inseticida e *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Leptinotarsa decemlineata*

(Coleoptera: Chrysomelidae) levou a uma queda da taxa de encapsulação e houve efeito sinérgico sobre a mortalidade desse inseto (DUBOVSKIY et al., 2010).

A aplicação combinada de inseticidas e nematoides no controle de insetos-pragas tem sido realizada. Koppenhofer e Fuzy (2008) observaram que a aplicação combinada de clorantniliprole uma semana antes e em seguida *Heterorhabditis bacteriophora* levou ao aumento no controle de *Anomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) ocorrendo efeito sinérgico na aplicação combinada. De acordo com Koppenhofer et al. (2002) a aplicação combinada de NEP e imidaclopride além de aumentar a mortalidade de Scarabaeidae também aumentou a velocidade de mortalidade em relação aos nematoides isolados tanto em laboratório quanto em casa de vegetação, sendo um aspecto positivo da aplicação conjunta. Neste sentido, Negrisoli, Garcia e Barbosa (2010) avaliaram a aplicação conjunta de *Heterorhabditis indica*, *Steinernema carpocapsae* e *Steinernema glaseri* com inseticidas no controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e obtiveram efeito aditivo e sinérgico da aplicação em laboratório e campo. Shapiro-Ilan, Cottrell e Wood (2011) conseguiram efeito sinérgico de *S. carpocapsae* quando aplicado com carbaryl e cipermetrina na mortalidade de larvas de *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) em *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch.

Além de apresentar melhores resultados de mortalidade com a interação entre inseticidas e NEP, essa aplicação combinada reduz o problema de resistência de insetos-praga pelo fato do nematoide conseguir controlar os indivíduos menos suscetíveis aos inseticidas (KOPPENHOFER E KAYA, 1998). No Brasil já foi relatado o primeiro caso de resistência em populações de *T. absoluta* por Siqueira et al. (2000) a abamectina, cartap, metamidofos e cipermetrina. Posteriormente, Silva et al. (2011) relataram alto nível de resistência de populações do insetos a inseticidas reguladores de crescimento em alguns estados brasileiros, como por exemplo com os ingredientes ativos indoxacarbe, *B. thuringiensis*, bifentrina e cipermetrina a essa praga (> 100 vezes). Mais recentemente, resistência a espinosinas já foi relatada (CAMPOS et al., 2014; REYES et al., 2012).

Desta maneira realizar a aplicações combinadas entre nematoides e inseticidas buscando quebrar a resistência dos insetos pragas torna-se uma estratégia importante, principalmente na agricultura convencional onde a aplicação de agrotóxicos é indispensável devido a ocorrência de várias pragas.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

A aplicação combinada de *H. amazonensis* e inseticidas via solo é eficaz no controle da *T. absoluta*, sendo fundamental conhecer os efeitos dessa aplicação principalmente em áreas de cultivo convencional, onde é indispensável a utilização de inseticidas para o controle de outras pragas que ocorrem na cultura. Além disso, em áreas onde ocorrem infestações constantes da praga é importante definir intervalos de aplicações na cultura visando manter as características morfológicas das plantas adequadas para alcançar maiores produtividades, sendo que no presente trabalho a aplicação semanal e quinzenal do NEP consegue manter as características morfológicas da planta. A aplicação dos inseticidas pode ser combinada com o nematoide para o controle da fase de pupa da *T. absoluta* que ocorre no solo, reduzindo a população da praga, uma vez que os produtos utilizados são compatíveis com o nematoide *H. amazonensis*.



## REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL, Anuário da agricultura Brasileira, São Paulo: FNP. 2017. Disponível em: <http://www.agriannual.com.br/>
- AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária, e 253** Abastecimento. Disponível em 254 , acessado em 255 24/01/2014, 2011.
- BATALLA-CARRERA, L.; MORTON, A.; GARCÍA-DEL-PINO, F. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. **BioControl**. v. 55, p. 523–530, 2010.
- CAMPOS, M. R. et al. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **PLoS ONE**. v. 9, p. e103235, 2014.
- CANÇADO-JÚNIOR, F. L. et al. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate para mesa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, n. 219, p. 7-18, 2003.
- COLOMO, M. V.; BERTA, D. C. Fluctuacion de la poblacion de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em plantaciones de tomate en el Departamento de Lules, Tucuman. **Acta Zoologica Lilloana**. v. 43, p. 165-177, 1995.
- DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, 2001.
- DUBOVSKIY, I. M.; KRYUKOV, V. Y. U.; BENKOVSKAYA, G. V.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; SURINA, E. V.; GLUPOV, V. V. Activity of Detoxificative Enzymes System and Encapsulation Rate in Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* Larvae under Organophosphorus Insecticide Treatment and Entomopathogenic Fungus *Metharizium anisopliae* Infection, **Euroasian Entomology Journal**. v. 9, p. 577–582, 2010.
- DUBOVSKIY, I. M.; WHITTEN, M. M. A.; YAROSLAVTSEVA, O. N.; GREIG, C., KRYUKOV, V. Y.; GRIZANOVA, E.V.; MUKHERJEE, K.; VILCINSKAS, A.; GLUPOV, V.V.; BUTT, T.M. Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? **PLoS ONE**. v. 8, p. e60248, 2013.
- FERNANDES, O. P; CARDOSO, A. M; MARTINELLI, S. **Manejo integrado de pragas do tomate: Manual de reconhecimento das pragas e táticas de controle**. Jaboticabal: UNESP, 2003. 38 p.
- FERRAZ, L. C. C. B. 1998. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. Cap. 8, p. 541-569.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura**. Viçosa MG: Ed. UFV. 402 p, 2000.
- GOTO, R. **Manejo nutricional no cultivo de hortaliças em casa de vegetações. In: Encontro de hortaliças**. Encontro de plasticultura da região sul, Maringá. Palestras e trabalhos apresentados, Maringá: Universidade Estadual de Maringá, p. 11-18, 1995.
- GREWAL, P. S.; DE NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M. M. Entomopathogenic nematodes: Potential for exploration and use in South America. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.

- KOPPENHÖFER, A.K., KAYA, H.K. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub control in turfgrass. **Journal Economic Entomology**. v. 91, p. 618–623, 1998.
- KOPPENHÖFER, A. M.; COWLES, R. C.; COWLES, E. A.; FUZY, E. M.; BAUMGARTNER, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **BioControl**. v. 24, p. 90-97, 2002.
- KOPPENHÖFER, A. M.; FUZY, E. M. Effect of the anthranilic diamide insecticide, chlorantraniliprole, on *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). **BioControl**. v. 45, p. 93–102, 2008.
- MALTA, A. W. O. et al. **Calibração dos níveis de ação para o controle populacional da broca – pequena (*Neoleucinodes elegantalis*), na meso região metropolitana de Belo Horizonte** In: Congresso Brasileiro de Olericultura. 2005.
- MORAIS, G. J.; NORMANHA FILHO, J. A. Surto de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) em tomateiro no trópico semi-árido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 7, p. 503-504, 1982.
- NEGRISOLI JR, A. S.; GARCIA, M. S.; BARBOSA NEGRISOLI, C. R. C. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. **Crop Protection**, v. 29, p. 545–549, 2010.
- NISHIMATSU, T.; JACKSON. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal Economic Entomology**. v. 9, p. 410 - 418. 1998.
- PAPACEK, D.; SMITH, D. Manejo integrado de pragas nos citrus: linhas gerais de um programa comercial de MIP em Queensland, Austrália. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITRUS, Bebedouro. **Anais... Bebedouro**, p. 153-75, 1994.
- PYE, A.E.; BURMAN, M. *Neoapectana carpocapsae*: infection and reproduction in large pine weevil larvae, *Hylobius abietis*. **Exp Parasitol**. v. 46, p. 1–11, 1978.
- REYES, M.; ROCHA, K.; ALARC, L.; SIEGWART, M.; SAUPHANOR, B. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 102, p. 45 – 50, 2012.
- ROBERTSON, J. L.; PRESILIER, H. K. **Pesticide Bioassays with Arthropods**. Boca Raton, Florida, 1992.
- SCHMIDT, D. et al. Potencial produtivo de tomate cultivado com alta densidade, em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 273-274, 2000.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; COTTRELL, T. E.; WOOD, B. W. Effects of Combining Microbial and Chemical Insecticides on Mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Journal Economic Entomology**. v. 104, n. 1, p. 14-20, 2011.

- SILVA, G. A.; PICANÇO, M. C.; BACCI, L., CRESPO, A. L. B.; ROSADO, J. F.; GUEDES, R. N. C. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. **Pest Management Science**. v. 67, p. 913–920, 2011.
- SIQUEIRA, H. A. A.; GUEDES, R. N. C.; PICANÇO, M. C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**. v. 2, p. 147–153, 2000.
- SOUZA, J. C.; REIS, P. R. Principais pragas do tomate para mesa: Bioecologia, dano e controle. **Informe agropecuário**. n. 24, p. 79-92, 2003.
- TAYLOR, I. B. **Biosystematics of the tomato**. In: ATHERTON, J. G., RUDICH, J. The tomato crop: a scientific basis for improvement, London, Chapman and Hall, p. 1-34, 1986.
- TORRES, J. B.; FARIA, C.A.; EVANGELISTA, W.S.; PRATISSOLI, D. Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. **Integrate Journal Pest Management**. v. 4, p. 173-178, 2001.
- URBANEJA, A. et al. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. **Phytoma Espana**, v. 194, p.16–23, 2007.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS****ARTIGO 1. COMPATIBILIDADE DE *Heterorhabditis amazonensis* JPM4 E INSETICIDAS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO TOMATEIRO**

Sabino, P.H.S\* ; Moino Jr, A.

Departamento de agricultura, Fundação de Ensino Tecnológico de Alfenas. C.P 23, 37130-000 Alfenas,  
MG.

Autor para correspondência\* : phsabino09@gmail.com.

**Artigo de acordo com as normas Norma NBR 6022 (ABNT 2003)**

**RESUMO:** Os nematoides entomopatogênicos (NEP) são agentes que podem ser utilizados para o controle biológico de pragas associadas a inseticidas em uma mistura de tanques. Estudos de compatibilidade precisam ser conduzidos para analisar quais produtos são compatíveis com nematoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade de inseticidas utilizados na cultura do tomateiro via esguicho com o nematoide *Heterorhabditis amazonensis* JPM4, que apresenta potencial para o controle da *Tuta absoluta*. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 5 repetições. Os produtos testados foram Actara<sup>®</sup>, Warrant<sup>®</sup> e Premio<sup>®</sup>. Para o teste de compatibilidade foi avaliado o efeito dos produtos na viabilidade e infectividade do nematoide em larvas de *Galleria mellonella*. Os produtos testados não apresentam efeito na viabilidade e infectividade do NEP *Heterorhabditis amazonensis* JPM4.

**Palavras-chaves:** Controle biológico, seletividade, *Tuta absoluta*

**ABSTRACT:** The entomopathogenic nematodes (EPN) are agents that can be used for the biological control of insecticide associated pests in a tank mix. Compatibility studies need to be conducted to analyze which products are compatible with nematodes. The objective of this work was to evaluate the compatibility of insecticides used in the tomato crop via Drench with the nematode *Heterorhabditis amazonensis* JPM4, which presents potential for the control of *Tuta absoluta*. The design was completely randomized with 4 treatments and 5 replicates. The products tested were Actara<sup>®</sup>, Warrant<sup>®</sup> and Premio<sup>®</sup>. For the compatibility test, the effect of the products on nematode viability and infectivity in *Galleria mellonella* larvae was evaluated. The products tested have no effect on the viability and infectivity of NEP *Heterorhabditis amazonensis* JPM4.

**Keywords:** Biological control, selectivity, *Tuta absoluta*

## INTRODUÇÃO

O tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) é considerado uma das principais culturas agrícolas em todo o mundo, atualmente distribuída em todas as regiões brasileiras, especialmente no Centro-Oeste e no Sudeste (CAMARGO; MAZZEI, 1997). Entre os principais insetos praga da cultura, destaca-se a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Esse inseto é considerado uma praga chave da cultura, causando injúrias nas folhas e frutos, podendo causar perda total na produção (HAJI et al., 2002). O controle químico é a forma mais comum de reduzir as populações dessa praga, mas muitas vezes pode levar a problemas sérios, como a eliminação da população de inimigos naturais, contaminação humana e ambiental e resistência nas populações (DIEZ RODRIGUES; OMOTO, 2001).

O controle biológico é uma ferramenta importante na redução dos problemas mencionados. Uma estratégia de controle biológico é o uso de nematoides entomopatogênicos (NEP), especialmente espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, devido à associação mutualista com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente, que causam a morte rápida do inseto. O parasitismo começa quando os juvenis infectantes (JI) entram através de aberturas naturais (aparelho bucal, ânus e espiráculos) ou diretamente no tegumento do inseto (especialmente *Heterorhabdits*), liberando a bactéria na hemocele e causando a morte do hospedeiro (BOEMARE, 2002).

Os nematoides são aplicados em culturas que recebem insumos agrícolas variáveis, como corretivos de solo e produtos químicos, sendo que alguns produtos podem reduzir a sobrevivência e infectividade dos nematoides (WILLIAMS; WALTERS, 2000). No Manejo Integrado de Pragas (MIP), são utilizados inseticidas seletivos em conjunto com agentes de controle biológico e podem influenciar a atividade desses organismos (CUTHBERTSON et al., 2007). Tornou-se, assim, muito importante aprender mais sobre quais inseticidas que ajudam os nematoides no controle associado e, conseqüentemente, reduzem o estabelecimento de populações com genes que conferem resistência a um agente de controle (HOY, 1995). Assim, é vital avaliar criticamente a compatibilidade de inseticidas e nematoides entomopatogênicos para possibilitar a aplicação combinada no solo, com o objetivo de introduzir esses organismos no MIP.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade entre inseticidas sistêmicos utilizados via esguicho na cultura do tomateiro com o nematoide *Heterorhabditis amazonensis*.

## Material e Métodos

O nematoide utilizado no bioensaio foi *Heterorhabditis amazonensis* JPM4 (isolado em Lavras, MG, Brasil, identificado na Universidade da Flórida) (ANDALO; NGUYEN; MOINO, 2006), que foi mantido em suspensão aquosa (500 IJs / mL) a  $16 \pm 1$  ° C.

A produção de *Galleria mellonella* (L) (Lepidoptera: Pyralidae) foi realizada de acordo com a metodologia adaptada por Dutky, Thompson e Cantwe (1964), utilizando uma dieta artificial modificada por Parra (1998). O nematoide entomopatogênico foi multiplicado em larvas de instar final de *G. mellonella*, de acordo com Kaya e Stock (1997).

Os nematoides foram obtidos das larvas de *G. mellonella* e mantidos em suspensão aquosa a  $16 \pm 1$  ° C, armazenados até uma semana antes de serem utilizados no experimento. A concentração de JI na suspensão final foi quantificada com o uso de placas de poliestireno contendo 96 poços, como utilizado

em testes sorológicos, aplicando 0,1 mL de suspensão JI por poço. No final, obteve-se a quantidade de JI por alíquota de 1 mL e calculado o valor médio.

### Ensaio de compatibilidade entre nematoide entomopatogênico e inseticidas

Para determinar a compatibilidade do nematoide entomopatogênico com os inseticidas utilizados nas culturas de tomateiro, utilizou-se a metodologia modificada por Negrisoni, Barbosa and Moino (2008), avaliando a viabilidade e infectividade dos JI após a exposição aos produtos. O bioensaio foi realizado com três inseticidas normalmente utilizados na cultura do tomateiro (Tabela 1).

Tabela 1. Produtos utilizados para a condução dos ensaios

Ingrediente ativo	Produto comercial	Grupo químico	C.T	P.C. ha <sup>-1</sup>
Tiametoxam	Actara <sup>®</sup>	neonicotinoide	III	800 g
Imidacloprid	Warrant <sup>®</sup>	neonicotinoide	III	200 g
Clorantraniliprole	Premio <sup>®</sup>	diamida antranilílica	III	200 ml

C.T = Classificação toxicológica

P.C = Produto comercial

Para o ensaio de viabilidade um litro de cada produto formulado foi preparado, no dobro da dose recomendada para aplicação em um hectare. A partir desta solução, foi colhida uma alíquota de 1 ml e colocada em cada tubo de ensaio de fundo chato em cada tratamento, sendo cada tratamento composto de cinco tubos (cada tubo como uma repetição), aos quais foram adicionados e agitados 1 mL de suspensão contendo 2.500 JI, o tratamento controle foi formado por apenas água. O bioensaio ocorreu em uma câmara climatizada a  $27 \pm 1$  ° C, UR de  $70 \pm 10\%$ . A viabilidade dos nematoides foi avaliada 48 horas após a exposição aos produtos. Para isso, uma alíquota de 0,1 mL (aproximadamente 125 JI) foi removida da suspensão e os JI foram observados sob microscópio estereoscópico para verificar o efeito causado pelos produtos testados. Aqueles que não responderam à estimulação com estile foram considerados mortos. Logo após avaliar a viabilidade, o teste de infectividade foi realizado; para este 3 mL de água destilada foram adicionados aos tubos de vidro, que foram então deixados para decantar durante 30 minutos numa câmara climatizada a  $27 \pm 1$  ° C, UR de  $70 \pm 10\%$ . O sobrenadante foi retirado e a lavagem foi repetida três vezes. Após a última lavagem, removeu-se 0,2 mL (aproximadamente 250 JI) do fundo de cada tubo pipetando-se em cinco placas de Petri por tratamento (9 cm de diâmetro), cada uma contendo uma folha de papel de filtro, previamente umedecida com 1,8 mL de água destilada.

No ensaio de infectividade cada placa de Petri recebeu 10 larvas de último instar de *G. mellonella* e foi mantida em uma câmara climatizada sob as mesmas condições que o teste anterior, durante três dias. Após este período, as larvas mortas foram transferidas para placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo

papel de filtro. Após este período, foram observados sob microscópio estereoscópico e submetidos à dissecação para verificar a presença de nematoides. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e os valores de mortalidade de nematoides e larvas foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As diferenças na viabilidade e infectividade das espécies NEP foram analisadas utilizando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), com o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Os efeitos dos tratamentos sobre a infectividade do NEP em *G. mellonella* foram classificados de acordo com Peters e Poullot (2004), com base no guia IOBC e na fórmula:

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

Sendo Red = porcentagem de redução na infectividade no tratamento.

A mortalidade corrigida foi igual a zero para todos os tratamentos e, portanto, não foi considerada no cálculo de E%.

A porcentagem de redução na infectividade do NEP foi calculada pela fórmula:

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

$I_t$  = mortalidade de *G. mellonella* em cada tratamento

$I_c$  = mortalidade de *G. mellonella* no tratamento de controle

Com base no valor de E%, os produtos foram classificados como: 1 - não tóxico (<30%), 2 - ligeiramente tóxico (30 - 79%), 3 - moderadamente tóxico (80 - 99%) e 4 - tóxico (> 99%).

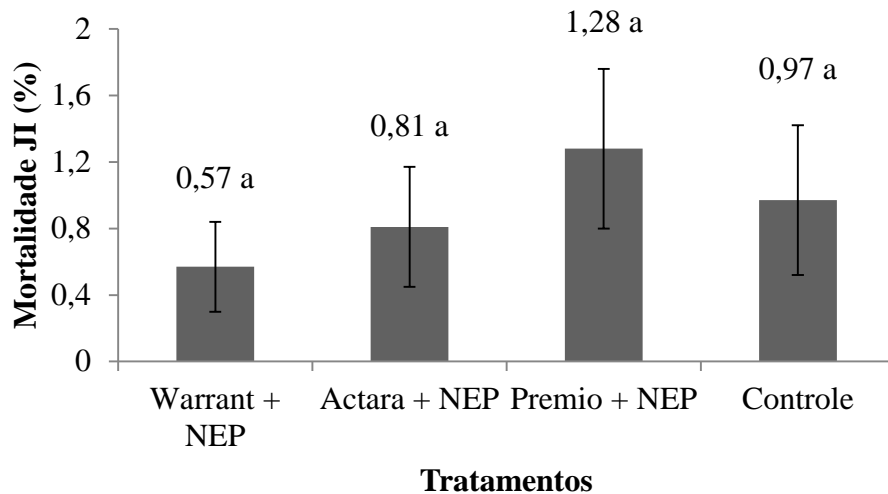
Para os tratamentos que apresentaram uma porcentagem de larvas mortas que foi maior do que no tratamento controle, E% foi considerado igual a zero e o produto foi considerado não tóxico.

## **Resultados e discussão**

### **Viabilidade de *Heterorhabditis amazonensis***

Em relação à viabilidade dos JI expostos aos diferentes inseticidas, todos promoveram baixa mortalidade de *H. amazonensis* ( $F = 0,54$ ,  $gl = 3$ ,  $P = 0,66$ ), sendo que a mortalidade dos tratamentos com Actara<sup>®</sup>, Warrant<sup>®</sup> e Premio<sup>®</sup> não diferindo do tratamento controle (Figura 1).





**Fig. 1.** Mortalidade (média  $\pm$  EP) de *Heterorhabditis amazonensis* após a exposição aos inseticidas registrados para a cultura do tomateiro.

#### **Infectividade de *Heterorhabditis amazonensis***

Houve diferença entre os tratamentos ( $F = 3,15$ ,  $gl = 3$ ,  $P = 0,05$ ) na mortalidade de larvas de *G. mellonella* resultantes da exposição do nematoide aos inseticidas. Os JI de *H. amazonensis* expostos a Warrant<sup>®</sup> causaram um incremento de 10% na mortalidade quando comparado com os JI expostos a Actara<sup>®</sup> ( $F = 3,02$ ,  $gl = 16$ ,  $P = 0,04$ ). Entretanto, nenhum dos tratamentos diferiu do controle (Tabela 2).

No presente trabalho, o NEP *H. amazonensis* JPM4 não foi afetado em relação à sua viabilidade quando exposto aos inseticidas Actara<sup>®</sup>, Warrant<sup>®</sup> e Premio<sup>®</sup>. Diversos trabalhos de compatibilidade mostram que os inseticidas com o princípio ativo a base de tiametoxam, imidacloprido e clorantraniliprole não apresentam efeito negativo na viabilidade e infectividade dos NEP, podendo esses ser utilizados de forma combinada no controle de pragas (KOPPENHÖFER et al., 2002; KOPPENHÖFER; FUZY, 2008). Estudo realizado por SABINO et al. (2014) mostra que inseticidas sistêmicos que são utilizados na pulverização na cultura do tomateiro não apresentam efeito negativo sobre nematoides.

Neste estudo, o NEP apresentou viabilidade e infectividade semelhantes ao tratamento de controle quando expostos ao produto Premio<sup>®</sup>. KOPPENHÖFER et al., (2002) avaliaram o efeito de Merit<sup>®</sup> e Meridian<sup>®</sup> combinados com *H. bacteriophora* e *Steinernema glaseri*, obtendo efeitos sinérgicos dos nematoides com cada um dos produtos nos mesmos hospedeiros. O inseticida Actara<sup>®</sup> também manteve alta viabilidade em *Steinernema arenarium* (83%), *S. carpocapsae* (83,3%), *S. glaseri* (85,1%) e *H.*

*bacteriophora* (83,4%) em um trabalho realizado por Andaló, Moino and Santa-Cecília (2004) Estes autores também encontraram alta infectividade (mais de 80%) destes nematoides quando expostos a Actara®.

**Tabela 1.** Mortalidade (média  $\pm$  EP) de *Galleria mellonella* por *Heterorhabditis amazonensis* após a exposição aos inseticidas.

<i>Heterorhabditis amazonenses</i>			
	% de mortalidade	E%	C
Actara	90,00 $\pm$ 0,31 b	6,25	1
Premio	94,00 $\pm$ 0,24 ab	2,08	1
Warrant	100,00 $\pm$ 0,0 a	4,16	1
Controle	96,00 $\pm$ 0,24 ab	0,00	-

<sup>a</sup>Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella*.

<sup>b</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

<sup>c</sup>Efeito dos tratamentos:  $E \% = 100 - (100 - \% \text{ Mortalidade corrigida}) \times (100 - \text{Red})$ . % de mortalidade dos tratamentos foi corrigida e posteriormente considerados no calculo do E.

<sup>d</sup>IOBC Classificação toxicológica dos inseticidas: 1— Não tóxico (< 30%), 2—Levemente prejudicial (30 – 79%).

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram o potencial da utilização combinada dos inseticidas e NEP no controle de *T. absoluta*. Os produtos avaliados são recomendados para a aplicação via solo tornando-os uma alternativa viável com a mistura dos nematoides que apresentam capacidade de controlar insetos presentes no solo. Todos os produtos testados apresentam baixa classificação toxicológica (Classe III) sendo considerados como não tóxicos ao nematoide, correlacionando com o baixo efeito dos produtos na viabilidade e infectividade do nematoide, sendo os produtos considerados compatíveis com o NEP.

## REFERÊNCIAS

- ANDALÓ, V.; NGUYEN, K. B.; MOINO, A. Jr. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. **Nematology**, v. 8, n. 6, p. 853-67, 2006.
- ANDALÓ, V.; MOINO, A. Jr.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C. Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**. v. 28, n. 2, p. 149-58, 2004.
- BOEMARE, N. 2002. Biology, taxonomy and sistematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R, editor. **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI; p. 35-56.
- CAMARGO, W. P.; MAZZEI, A. R. Mercado mundial de tomate e o mercosul. **Informações Econômicas**. v. 27, n. 10, p. 25-38, 1997.
- CUTHBERTSON, A. G. S.; WALTERS, K. F. A.; NORTHING, P.; LUO, W. Efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) under laboratory and glasshouse conditions. **Bulletin of Entomological Research**. v. 97, n. 1, p. 9-14, 2007.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**. v.30, n.2, p. 311-6, 2001.
- DUTKY, S. R.; THOMPSON, L. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. **Journal of Insect Pathology**. v. 6, p. 417-22, 1964.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 35, n. 6, p. 1039-42, 2011.
- HAJI, F. N. D.; PREZOTTI, L.; CARNEIRO, J. S.; ALENCAR, J. A. 2002. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro indstrial. In: Parra JRP, Botelho PSM, Corrêa-Ferreira BS, Bento JMS, editors. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole; p. 477-94.
- HOY, M. A. Multitactic resistance management: an approach that is long overdue. **The Florida Entomologist**. v. 78, n. 3, p. 443-51, 1995.
- KAYA, H. K.; STOCK, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. In: Leacy LA, editor. Manual of tecniques in insect pathology. California: Elsevier; p. 281-324.
- KOPPENHÖFER, A. M.; COWLES, R. C.; COWLES, E. A.; FUZY, E. M.; Baumgartner, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **BioControl**. v. 24, p. 90-97, 2002.
- KOPPENHÖFER, A. M.; FUZY, E. M. Effect of the anthranilic diamide insecticide, chlorantraniliprole, on *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). **BioControl**. v. 45, p. 93-102, 2008.
- NEGRISOLI, A. S Jr.; BARBOSA, C. R. C.; MOINO, A, Jr. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**. v. 32, n. 2, p. 111-6, 2008.

PARRA, J. R. P. 1998. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: Alves SB, editor. **Controle microbiano de insetos**. 2nd ed. Piracicaba: FEALQ; p. 1015-38.

SABINO, P. H. S.; SALES, F. S.; GUEVARA, E. J.; MOINO JR, A.; FILGUEIRAS, C. C.; Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with insecticides used in the tomato crop. **Nematoda**. v. 1, n. 1, p. e03014, 2014

WILLIAMS, E. C.; WALTERS, K. F. A. Foliar application of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* against leafminers on vegetables. **Biocontrol Science and Technology**. v. 10, n. 1, p. 61-70, 2000.

**ARTIGO 2. INSETICIDAS COMO POTENCIALIZADORES DE *Heterorhabdits amazonensis* JPM 4 NO CONTROLE DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) NA CULTURA DO TOMATEIRO**

Sabino, P.H.S\* ; Moino Jr, A.

Departamento de agricultura, Fundação de Ensino Tecnológico de Alfenas. C.P 23, 37130-000 Alfenas,  
MG.

Autor para correspondência\* : phsabino09@gmail.com.

**Artigo de acordo com as normas da revista Bragantia**

**Resumo:** As áreas de cultivo de tomateiro na América do Sul são frequentemente atacadas por *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), considerada uma das principais pragas da cultura. O uso de produtos químicos vem sendo adotado para o seu controle, no entanto, nem sempre com eficácia, devido aos casos de resistência do inseto a inseticidas. Desta forma, o uso de diferentes métodos, como o controle biológico, utilizando nematoides entomopatogênicos (NEP) torna-se uma importante ferramenta para o manejo integrado desse inseto-praga. Este trabalho teve por objetivo avaliar dois intervalos de aplicação de NEP combinados com inseticidas sistêmicos aplicados via solo no controle de *T. absoluta* na cultura do tomateiro em casa de vegetação. Foi testado o NEP *Heterorhabditis amazonensis* JPM4 e os inseticidas Actara<sup>®</sup>, Premio<sup>®</sup> e Warrant<sup>®</sup>. A eficácia da aplicação combinada via solo dos inseticidas e o NEP sobre *T. absoluta* foi feita em intervalos de aplicação semanal e quinzenal. A utilização conjunta de NEP e inseticidas aumentou a eficácia de controle da praga. A aplicação semanal e quinzenal foi eficaz no controle de *T. absoluta*, sendo que não houve diferença entre os inseticidas quando aplicados juntamente o nematoide. A aplicação de Actara<sup>®</sup> e Premio<sup>®</sup> combinados com o nematoide é eficaz na manutenção das características morfológicas das plantas.

**Palavras-chave:** Controle combinado, intervalo de aplicação, traça-do-tomateiro.

**Abstract:** Areas under tomato cultivation in South America are often attacked by the leaf-miner *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), considered one of the main pests of that crop. The use of chemical products has been adopted for its control, but this has not always been effective due to cases of resistance to insecticides. Thus, the use of other methods, such as biological control, using entomopathogenic nematodes (EPNs), has become an important tool in the integrated management of this insect pest. This study aimed to evaluate two intervals for applying EPNs combined with systemic insecticides, on soil in the control of *T. absoluta* in tomato grown in a glasshouse. The EPN *Heterorhabditis amazonensis* JPM4 and the insecticides Actara<sup>®</sup>, Premio<sup>®</sup> and Warrant<sup>®</sup> were tested. The efficacy of the combined application of the insecticides and the EPNs on *T. absoluta* via soil was carried out at application intervals of one and two weeks. The joint use of the EPNs and insecticides increased the effectiveness of pest control. The weekly and fortnightly applications were effective in controlling *T. absoluta*, and there was no difference between the insecticides tested when applied together with the nematode. The application of Actara<sup>®</sup> and Premio<sup>®</sup> combined with the nematode is effective in the maintenance of the morphological characteristics of the plants.

Keywords: Combined control, application range, leaf-miner

## Introdução

A produção de tomate, *Solanum lycopersicum* L., é realizada em áreas extensas, o que favorece o ataque de insetos-praga, compromete a produção e aumenta o custo de condução da cultura. A traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), é considerada um dos principais insetos-praga da cultura do tomateiro podendo levar à perda total da produção (Haji et al. 2002). Encontra-se distribuída por todas as regiões brasileiras, especialmente no Centro-oeste e Sudeste do Brasil (Camargo e Mazzei 1997).

No controle de *T. absoluta* na cultura do tomateiro, o controle químico tem sido o método mais utilizado (Silva et al. 2016). No entanto, devido ao aumento de populações resistente, a diferentes inseticidas químicos, como abamectina, cartap, metamidofós, cipermetrina e espinosinas (Siqueira et al. 2000, Silva et al. 2011, Campos et al. 2014; Reyes et al. 2012), alternativas de controle tornam-se cruciais para o manejo da cultura. Nenhum caso de resistência de *T. absoluta* a inseticidas do grupo das diamidas foi relatado no campo, apesar de existirem relatos em condições de casa de vegetação na Europa (Roditakis et al. 2015). Além das diamidas, não há relatos de resistência de *T. absoluta* a neonicotinoides no Brasil. Desta forma, esses inseticidas podem ter um papel importante no controle da praga, principalmente se utilizados de forma correta, possibilitando o uso associado com outros métodos de controle e evitando-se o desenvolvimento de resistência.

Alguns inseticidas do grupo químico das diamidas e neonicotinoides podem ser aplicados via solo devido à sua ação sistêmica (Schwartz et al. 2000). Assim, apresentam potencial no controle preventivo em áreas com histórico de ocorrência de pragas, como *T. absoluta*, sendo esse método de aplicação realizado pelos produtores na cultura do tomateiro. Devido à sua aplicação localizada, sua utilização torna-se mais adequada em cultivo protegido, uma vez que o produto não ficará disperso no ambiente evitando o risco de contaminação do aplicador. No entanto, a utilização contínua de tais produtos pode acarretar a seleção de insetos resistentes, e uma das formas de evitar esse problema é a utilização combinada de diferentes metodologias de controle. Dentre estas, podemos destacar o controle biológico com nematoides entomopatogênicos (NEP). Os NEP são agentes de controle generalistas causando rápida mortalidade de insetos-praga. Devido à sua associação mutualística com as bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que são lançadas na hemocole dos insetos pelos juvenis infectantes (JI) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente, causando septicemia e morte do hospedeiro dentro de 24 a 48 h (Adams e Nguyen 2002).

Trabalhos utilizando NEP têm apresentado resultados promissores no controle de larvas de *T. absoluta* em laboratório e casa de vegetação (Batalla-Carrera et al. 2010; García-del-Pinto et al. 2013; Van Damme et al. 2016; Agudelo, 2014), no entanto devido a ocorrência de vários insetos praga na cultura do tomateiro, a utilização de inseticidas é ainda inevitável. Desta maneira torna-se importante conhecer o

efeito da aplicação combinada de NEP com inseticidas, possibilitando sua utilização em programas de manejo integrado de pragas (MIP).

Os trabalhos relacionados à aplicação de NEP no controle de *T. absoluta* vêm sendo realizados através de uma aplicação durante todo o ciclo da cultura (Batalla-Carrera et al. 2010; García-del-Pinto et al. 2013; Agudelo, 2014). No entanto, em condições onde ocorrem infestações constantes da praga torna-se importante entender a dinâmica de aplicação de inseticidas associados à NEP e os possíveis intervalos de aplicação, para proporcionar um bom estado fitossanitário da planta, evitando-se a ocorrência de perdas econômicas. Assim, avaliando-se a associação do uso do controle químico e biológico como ferramenta para potencializar o controle de *T. absoluta*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar intervalos de aplicação de NEP combinados com inseticidas sistêmicos aplicados via solo no controle de larvas de *T. absoluta* na cultura do tomateiro em condições de casa de vegetação.

### **Material e Métodos**

A espécie de nematoide utilizada para os bioensaios foi *Heterorhabditis amazonensis* JPM4 (isolado em amostra de solo através da técnica do inseto isca utilizando lagartas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) em Lavras, MG, Brasil), mantida em suspensão aquosa ( $500 \text{ JI ml}^{-1}$ ) a  $16 \pm 1^\circ \text{C}$ . A criação de *G. mellonella* foi conduzida de acordo com a metodologia adaptada por Dutky et al. (1964) utilizando-se dieta artificial modificada por Parra (1998). Os NEP foram multiplicados em larvas de último instar de *G. mellonella*, de acordo com Kaya e Stock (1997).

Os adultos de *T. absoluta* provenientes de plantas de tomateiro mantidas em casa de vegetação foram confinados em laboratório dentro de gaiolas de policloreto de vinila com dimensões 47x47x47 cm com folhas de tomateiro fixadas em uma espuma fenólica de 3x22x10 cm devidamente umedecida com água para oviposição. As folhas de tomateiro com os ovos foram colocadas em outra gaiola e acondicionadas em espuma fenólica, nas quais foram acondicionadas, a cada três dias, folhas de tomateiro para permitir a alimentação das larvas e seu desenvolvimento. A criação de *T. absoluta* foi mantida a  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 h para fornecer larvas necessárias para o experimento. A cultivar utilizada para manutenção da criação e realização do experimento foi a Santa Clara. Os inseticidas utilizados para o ensaio foi (Tabela 1).



Tabela 1. Produtos utilizados para a condução dos ensaios

Ingrediente ativo	Produto comercial	Grupo químico	C.T	P.C. ha <sup>-1</sup>
Tiametoxam	Actara <sup>®</sup>	neonicotinoide	III	800 g
Imidacloprid	Warrant <sup>®</sup>	neonicotinoide	III	200 g
Clorantraniliprole	Premio <sup>®</sup>	diamida antraninílica	III	200 ml

C.T = Classificação toxicológica

P.C = Produto comercial

### **Intervalo de aplicação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos no controle de larvas de *Tuta absoluta* em casa de vegetação.**

O experimento para avaliar o intervalo de aplicação de inseticidas e NEP para o controle de larvas de *T. absoluta* foi estabelecido em condições de casa de vegetação em delineamento em blocos casualizados, com nove tratamentos e quatro repetições, totalizando 36 parcelas, sendo cada parcela constituída de seis plantas (total de 216 plantas). As plantas utilizadas no ensaio apresentaram inicialmente 30 cm de altura sendo cultivadas em vasos com 8 litros de capacidade, sendo que o solo utilizado foi adubado de acordo com o recomendado para a cultura. Nas aplicações semanais uma planta foi avaliada e nas aplicações quinzenais duas plantas. As parcelas foram distribuídas de forma subdividida, sendo as plantas avaliadas semanalmente ou quinzenalmente conforme os tratamentos. Os tratamentos testados foram os produtos químicos Actara<sup>®</sup>, Warrant<sup>®</sup> e Premio<sup>®</sup>, todos aplicados uma única vez, sendo que as aplicações semanais e quinzenais foram realizadas com o nematoide *H. amazonensis* e o tratamento controle (apenas água).

Para a condução do ensaio os inseticidas primeiramente foram aplicados no solo 24 horas antes da primeira infestação da *T. absoluta*, totalizando seis infestações com larvas para as aplicações semanais e cinco infestações para aplicações quinzenais. As infestações semanais tiveram como intuito simular a ocorrência constante da praga na cultura. O nematoide foi aplicado 24 horas após cada infestação com larvas, tempo suficiente para a formação das minas. As aplicações de *H. amazonensis* foram realizadas com pulverizador manual, com capacidade de 1 L, sendo que cada planta recebeu um volume de calda de 40 ml com adição de adjuvante TA 35 a 0,05% do volume.

Os inseticidas foram aplicados na dose recomendada para a aplicação em 1 hectare e os juvenis infectantes a 2.500 JI/ml. As infestações das plantas foram feitas semanalmente, colocando 10 larvas por planta. O ensaio foi conduzido até a total destruição do tratamento controle. As avaliações quanto à infectividade do nematoide foram feitas 72 horas após cada aplicação, sendo que foram feitas seis avaliações para as aplicações semanais e três para as aplicações quinzenais, uma vez que na sexta aplicação todas as plantas já estavam destruídas possibilitando a avaliação somente da aplicação semanal.

Foi avaliado o número total de larvas por planta, sendo que mesmo devido à infestação padrão do número de larvas ocorreu variação na quantidade final de larvas avaliadas, devido à sua dispersão na planta. As larvas foram retiradas das minas com o auxílio de uma pinça e transferidas para placa de Petri para dissecação e confirmação da mortalidade pelos nematoides. No final do experimento também foram feitas avaliações da morfologia da planta (altura e número de folhas) das últimas parcelas, avaliando-se a capacidade de proteção das plantas ao ataque da praga após a aplicação dos NEP.

### **Análise dos dados**

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para a análise de normalidade. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey a 5% de probabilidade com desdobramento dos tratamentos dentro de cada intervalo de aplicação no programa SISVAR (Ferreira 2011).

### **Resultados**

#### **Ensaio com *T. absoluta***

No ensaio comparando a aplicação semanal do NEP combinada com os inseticidas e o controle apenas com NEP não houve diferença na interação entre os tratamentos durante a condução do ensaio ( $F = 0,92$ ;  $p > 0,05$ ), no entanto, houve diferença do tratamento controle com aplicação de água, onde não houve mortalidade de larvas de *T. absoluta*, o mesmo ocorreu com a aplicação quinzenal. A menor porcentagem de mortalidade (43%) das larvas de *T. absoluta* ocorreu na terceira semana após a aplicação com o tratamento apenas com NEP, sendo a maior porcentagem de mortalidade alcançada na segunda aplicação do NEP em combinação com o inseticida Actara<sup>®</sup> (82%). A última aplicação de NEP ocorreu na quinta semana devido à destruição total do tratamento controle com água (Figura 1a).

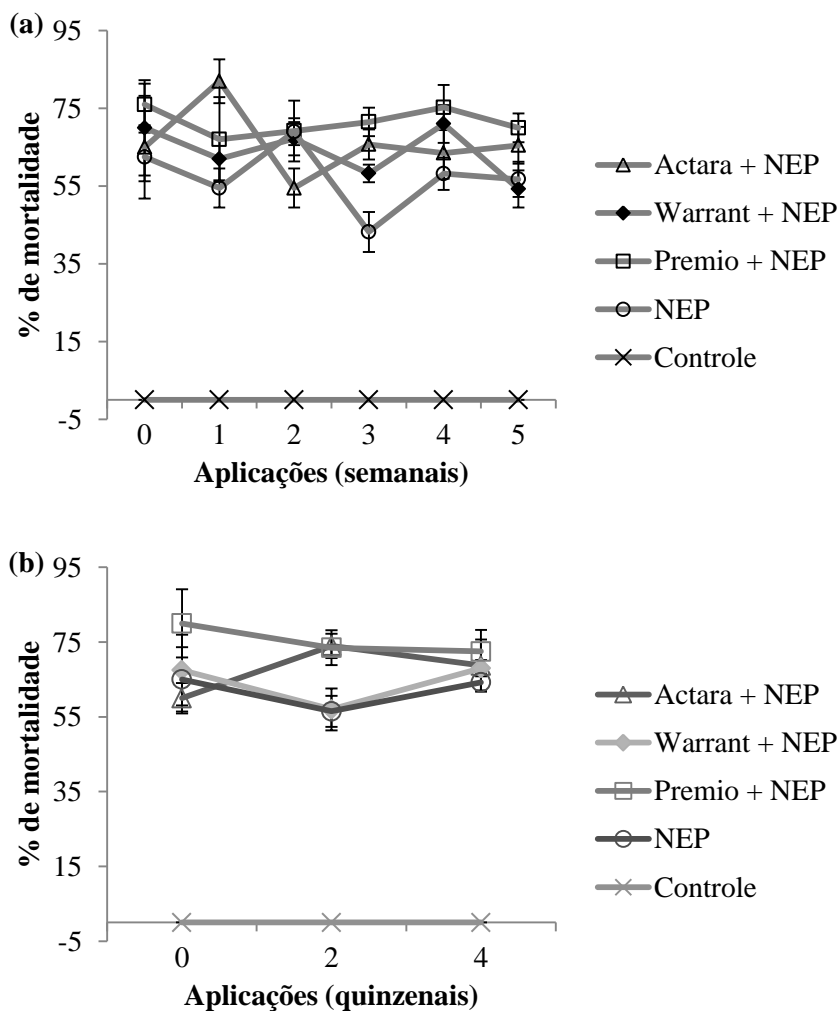
Não houve diferença na interação entre os tratamentos em relação à aplicação quinzenal dos NEP combinados com inseticidas ( $F = 1,04$ ;  $p > 0,05$ ), nas quais a mortalidade das larvas de *T. absoluta* permaneceu acima de 56%, sendo a maior mortalidade registrada na combinação de Premio<sup>®</sup> + NEP (80%). Houve diferença significativa entre o tratamento controle e os demais tratamentos (Figura 1b).

Nas avaliações referentes às características morfológicas das plantas nas aplicações semanais, houve efeito significativo dos tratamentos nas alturas das plantas avaliadas ( $F = 15,554$ ;  $p < 0,05$ ).

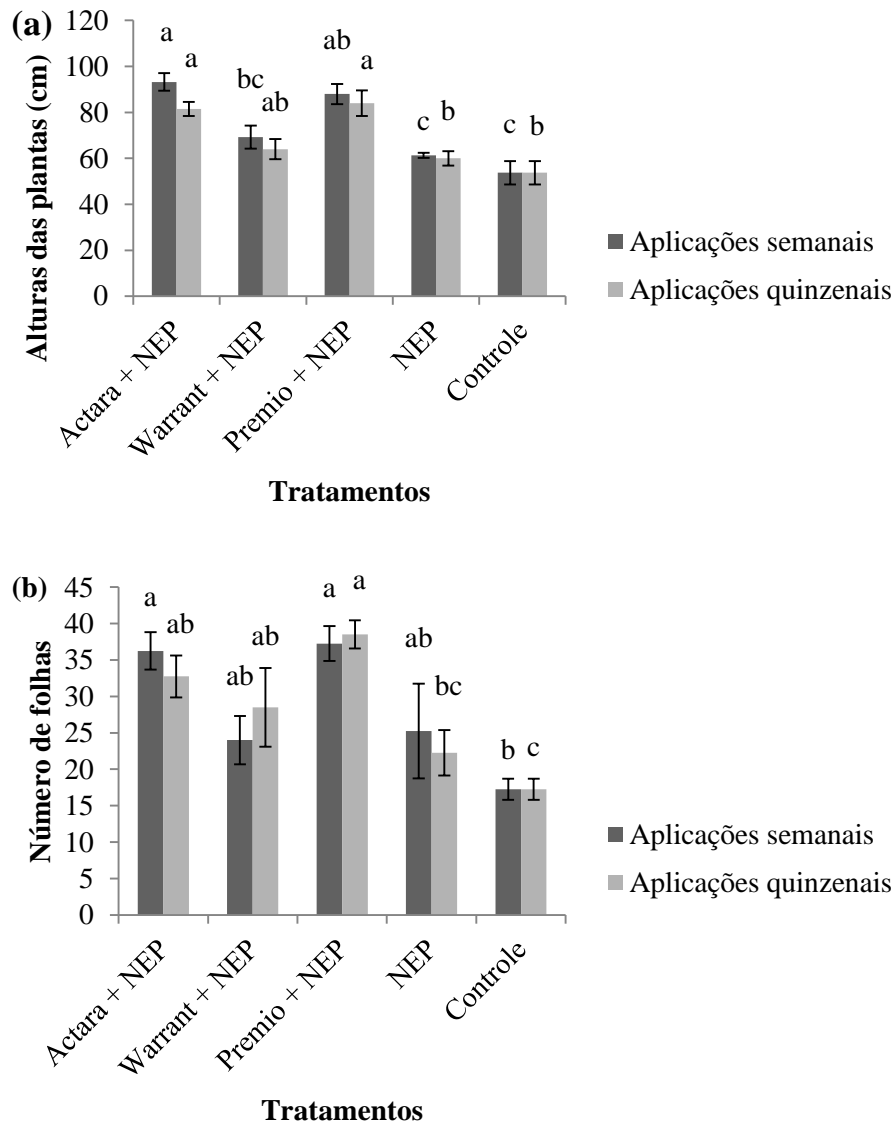
Na aplicação semanal do NEP combinada com inseticida Actara<sup>®</sup> à altura média das plantas foi de 93 cm, diferenciando do controle, que apresentou uma altura média de 53 cm e também dos tratamentos Warrant<sup>®</sup> + NEP e com aplicação apenas do nematoide (Figura 2a). Em relação à aplicação quinzenal também houve efeito dos tratamentos na altura das plantas ( $F = 7,965$ ;  $p < 0,05$ ), sendo a aplicação

combinada de NEP com o inseticida Actara® e Premio® foi superior ao tratamento controle (apenas água) e ao tratamento com aplicação apenas do NEP com água (Figura 2a).

Houve efeito da aplicação semanal ( $F = 4,353$ ;  $p < 0,05$ ) e quinzenal ( $F = 4,519$ ;  $p < 0,05$ ) de NEP nas avaliações do número de folhas das plantas. A aplicação combinada de Actara® + NEP semanalmente diferenciou do tratamento controle, no entanto, não diferenciou dos demais tratamentos. Na aplicação quinzenal a aplicação combinada entre Premio + NEP diferenciou do tratamento controle e da aplicação do nematoide com água, no entanto não diferenciou dos demais tratamentos. (Figura 2b).



**Figura 1.** Porcentagem de mortalidade (média  $\pm$  EP) de *Tuta absoluta* (Média  $\pm$  EP) após as aplicações semanais (a) e quinzenais (b) de *Heterorhabditis amazonensis* combinado com inseticidas e/ou com água em casa de vegetação ( $25 \pm 10^\circ \text{C}$ , UR de  $70 \pm 20\%$ ).



**Figura 2.** Altura (a) e número de folhas (b) das plantas (média  $\pm$  EP) de tomate após cinco semanas de aplicações semanais e quinzenais de *Heterorhabditis amazonensis* combinados com inseticidas e/ou água no controle de *T. absoluta* na cultura do tomate em casa de vegetação ( $25 \pm 10^\circ\text{C}$ , UR de  $70 \pm 20\%$ ).

## Discussão

Estudos anteriores têm mostrado o potencial de NEP para reduzir o impacto causado por larvas de *T. absoluta*, apresentando mais uma ferramenta a ser utilizada em programas de MIP, principalmente em casa de vegetação (Batalla-Carrera et al. 2010; García-del-Pinto et al. 2013; Van Damme et al. 2016). A migração das larvas de *T. absoluta* entre as folhas ao sair do túnel e fazer um novo em outra folha gera grandes orifícios que podem ser facilmente utilizados para a entrada dos nematoides, ao mesmo tempo as

galerias tornam-se um abrigo, evitando a dessecação e a luz ultravioleta, e finalmente possibilitando os nematoides de infectar as larvas (Batalla-Carrera et al. 2010).

Segundo Türköz and Kaşkavalci (2016) os NEP são efetivos no controle de larvas de *T. absoluta* dentro e fora das minas foliares. Van Damme et al. (2016) observou que *Steinernema carpocapsae* foi efetivo contra larvas de *T. absoluta* em condições de laboratório. Em outro estudo, Batalla-Carrera et al. (2010) alcançaram uma redução de 87 a 95% de infestação da *T. absoluta* após a aplicação de NEP a 1000 JI/ml. Gozel e Kasap (2015) demonstraram que a aplicação de NEP em concentração de 50 JI/cm<sup>2</sup> pode ser eficaz no controle do minador em condições de campo podendo ser utilizado em programa de manejo da praga. Apesar de todas as vantagens apresentadas, a aplicação foliar de NEP pode ser limitada devido a obstáculos ambientais como a radiação ultravioleta, altas temperaturas e baixa umidade, reduzindo a sobrevivência e a eficácia dos nematoides (Shapiro-Ilan et al. 2005). Assim, as aplicações devem ser realizadas à noite ou no início da manhã, quando condições ambientais desfavoráveis podem ser evitadas (Cabanillas e Raulston 1995).

Contudo, para o nosso conhecimento este é o primeiro relato demonstrando a eficácia da aplicação combinada de inseticidas via solo e NEP ao longo da condução da cultura com infestações semanais de *T. absoluta*. A aplicação de inseticidas sistêmicos via solo na cultura do tomateiro em mudas ou no pós-plantio é uma técnica comum adotada pelos produtores buscando o controle preventivo em áreas com histórico de ocorrência de insetos-praga. Além disso, na cultura do tomateiro podem ocorrer diferentes insetos-pragas, de tal modo que apenas a aplicação de NEP não seria suficiente para controlá-las, sendo necessária a utilização de outro método de controle, como o químico. Assim, a utilização combinada de inseticidas com os NEP principalmente em cultivo protegido, é uma prática que pode favorecer o controle da praga, uma vez que a aplicação dos inseticidas seria feita de forma localizada, reduzindo a presença do produto no ar e a contaminação dos aplicadores. A eficácia da aplicação de NEP combinada com os inseticidas apresenta uma alternativa viável no controle da *T. absoluta*, tornando-se mais uma ferramenta para programas de MIP. É conhecido que alguns inseticidas proporcionam melhora na atividade dos NEP (Ishibashi e Takii 1993).

Shapiro-Ilan, Cottrell e Wood (2011) conseguiram efeito sinérgico de *S. carpocapsae* quando aplicado com carbaryl e cipermetrina na mortalidade de larvas de *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) em *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch. De acordo com Koppenhofer et al. (2002) a aplicação combinada de NEP e imidacloprido além de aumentar a mortalidade de Scarabaeidae também aumenta a velocidade de mortalidade em relação aos nematoides isolados tanto em laboratório quanto em casa de vegetação, sendo um aspecto positivo da aplicação conjunta. Neste sentido, Negrisoli et al. (2010) avaliaram a aplicação conjunta de *Heterorhabditis indica*, *S. carpocapsae* e *Steinernema glaseri* com inseticidas no controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) obtendo

efeito aditivo e sinérgico da aplicação em laboratório e campo. Koppenhofer e Fuzy (2008) observaram que a aplicação combinada entre clorantraniliprole uma semana antes e em seguida *Heterorhabditis bacteriophora* houve um aumento no controle de *Anomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) ocorrendo efeito sinérgico da aplicação combinada.

Alguns trabalhos têm investigado a aplicação em momentos diferentes de NEP e inseticidas no controle de insetos-praga. De acordo com Head et al. (2000) a aplicação de inseticidas via foliar 24 horas antes da aplicação do nematoide *Steinernema feltiae* proporcionou um aumento na mortalidade de *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). O mesmo foi observado no trabalho desenvolvido por Cuthbertson et al. (2007) no qual a aplicação de inseticidas sistêmicos 24 horas após a aplicação de *S. carpocapsae* proporcionou um aumento na mortalidade de *Bemisia tabaci*, sendo que o inseticida imidacloprido sozinho e combinado com o NEP apresentou menor controle quanto à mortalidade da praga, resultados similares aos encontrados no presente trabalho.

As avaliações feitas semanalmente e quinzenalmente tiveram como propósito confirmar a mortalidade das larvas de *T. absoluta* pelo nematoide ou inseticida. Pouco se conhece sobre intervalo de aplicações de NEP durante a condução da cultura, onde há infestação constante de uma determinada praga. Zappala et al. (2011) avaliaram a aplicação semanal e quinzenal de duas diferentes formulações de enxofre e um tratamento com *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Berliner) na infestação semanal de *T. absoluta* na cultura do tomateiro. A aplicação semanal e quinzenal de enxofre reduziu a infestação de *T. absoluta* em relação ao tratamento controle e ao tratamento contendo Bt.

A avaliação das plantas no final do ensaio mostrou a capacidade da aplicação combinada de NEP e inseticidas na proteção da cultura permitindo um crescimento adequado. Em trabalho realizado por Fayad et al. (2001) plantas de tomate da cultivar Santa Clara cultivadas em ambiente protegido apresentaram altura máxima de 86 cm após 75 dias do plantio com mudas transplantadas apresentando 1 par de folhas verdadeiras, sendo que no presente trabalho as plantas com aplicação semanal com combinação de Actara® + NEP apresentaram 93 cm de altura, no entanto apresentavam no início do ensaio 30 cm de altura, isso explica a diferença do tamanho no tempo. Segundo os mesmos autores o crescimento máximo do tomate ocorre até os 45 dias após o plantio das mudas. Esses resultados mostram a capacidade do nematoide combinado com os inseticidas de promover um possível ganho na produção devido à proteção da cultura. Outro fator relacionado ao maior crescimento das plantas pode ser pelo efeito fisiológico desses produtos, estimulando a produção de hormônios pelas plantas (Castro et al. 2008).

A possibilidade da interação de NEP e inseticidas deve receber especial atenção nas culturas onde o uso de defensivos ainda é indispensável, como na cultura do tomateiro. A aplicação em intervalos previamente definidos de produtos químicos é uma técnica utilizada pelos produtores, principalmente em áreas onde ocorrem infestações constantes de *T. absoluta*. Desta forma, aplicações sequenciadas de NEP

podem ser feitas com uma alternativa para diminuir a seleção de insetos resistentes, tornando a técnica viável. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que o uso preventivo de inseticidas sistêmicos aplicados via solo combinados com aplicações de *H. amazonensis* pode ser uma estratégia no controle da *T. absoluta*, visando diminuir o uso inadequado de inseticidas.

### **Agradecimentos**

Ao apoio financeiro da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

### **Referências**

- Adams, B. J., Nguyen, K. B. Taxonomy and systematics. (2002). In R Gaugler (Ed.), Entomopathogenic nematology (p. 1-33). Wallingford: CABI International.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A. and García-del-Pino, F. (2010). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *BioControl*, 55, 523–530. <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9284-z>
- Cabanillas, H. E. and Raulston, J. R. (1995). Impact of *Steinernema riobris* (Rhabditida: Steinernematidae) on the control of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Journal Economic Entomology*, 88, 58-64. <https://doi.org/10.1093/jee/88.1.58>
- Camargo, W. P. and Mazzei, A. R. (1997). Mercado mundial de tomate e o mercosul. *Informações Econômicas*, 27, 25-38.
- Campos, M. R., Rodrigues, A. R. S., Silva, W. M., Silva, T. B. M., Silva, V. R. F., Guedes, R. N. C. and Siqueira, H. A. A. (2014). Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *PLoS ONE*, 9, e103235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103235>
- Cuthbertson, A. G. S., Walters, K. F. A., Northing, P. and Luo, W. (2007). Efficacy of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, against sweetpotato whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) under laboratory and glasshouse conditions. *Entomology Research*, 97, 9-14. doi: 10.1017/S0007485307004701.

- Gözel, Ç. and Kasap, I. (2015). Efficacy of entomopathogenic nematodes against the Tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato field. *Türkiye Entomoloji Dergisi-Turkish Journal Entomology*, 39, 229-237. DOI: <http://dx.doi.org/10.16970/ted.84972>.
- Dutky, S. R., Thompson, L. V. and Cantwe, G. E. (1964). A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal Insect Pathology*, 6, 417-22.
- Fayad, J. A., Fontes, P. C. R., Cardoso, A. A., Finger, L. F. and Ferreira, F. A. (2001). Crescimento e produção do tomateiro cultivado sob condições de campo e de ambiente protegido. *Horticultura brasileira*, 19, 232-237. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362001000300016>
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência Agrotecnologia*, 35, 1039-42.
- Garcia-del-Pino, F., Alabern, X. and Morton, A. (2013). Efficacy of soil treatments of entomopathogenic nematodes against the larvae, pupae and adults of *Tuta absoluta* and their interaction with the insecticides used against this insect. *BioControl*, 58, 723–731. doi 10.1007/s10526-013-9525-z.
- Gaugler, R. and Campbell, J. F. (1991). Selection for enhanced host- finding of scarab larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode. *Environmental Entomology*, 20, 700–706. <https://doi.org/10.1093/ee/20.2.700>
- Haji, F. N. D., Prezotti, L., Carneiro, J. S. and Alencar, J. A. (2002). *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro indstrial. In J. R. P. Parra., P. S. M. Botelho., B. S. Corrêa-Ferreira., J. M. S. Bento (Ed.), *Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores* (p. 477-494). São Paulo: Manole.
- Head, J., Walters, K. F. A. and Langton, S. (2000). The compatibility of the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, and chemical insecticides for the control of the South American leafminer, *Liriomyza huidobrensis*. *BioControl*, 45, 345-53. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1009986217310>.
- Ishibashi, N. and Takii, S. (1993). Effects of Insecticides on Movement, Nictation, and Infectivity of *Steinernema carpocapsae*. *Journal Nematology*, 25, 204-213.
- Kaya, H. K. and Stock, S. P. (1997). Techniques in insect nematology. In L.A Leacy. *Manual of tecniques in insect pathology* (p. 281-324). California: Elsevier.
- Koppenhöfer, A. M., Cowles, R. C., Cowles, E. A. and Fuzy, E. M., Baumgartner, L. (2002). Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. *BioControl*, 24, 90-97. [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(02\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00008-7)



- Koppenhöfer, A. M. and Fuzy, E. M. (2007). Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *S. glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* and *H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology*, 35, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.05.007>
- Negrisoni, A. S., Garcia, M. S. and Barbosa-Negrisoni, C. R. C. (2010). Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Crop Protection*, 29, 545 - 549. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.12.012>
- Parra, J. R. P. (1998). Criação de insetos para estudos com patógenos. In S. B. Alves (Eds.), *Controle microbiano de insetos* (p. 1015-1038). Piracicaba: FEALQ.
- Reyes, M., Rocha, K., Alarc, L., Siegwart, M. and Sauphanor, B. (2012). Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, 45 – 50.
- Roditakis, E., Vasakis, E., Grispuou, M., Stavrakaki, M., Nauen, R., Gravouil, M. and Bassi, A. (2015). First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. *Journal of Pest Science*, 88, 9 - 16. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.10.008>
- Schwartz, B. J., Sparrow, F. K., Heard, N. E. and Thede, B. M. (2000). Simultaneous derivatization and trapping of volatile products from aqueous photolysis of thiamethoxam insecticide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4671 – 4675. DOI: 10.1021/jf990966y
- Shapiro-Ilan, D. I., Gouge, D. H., Piggott, S. J. and Fife, J. P. (2006). Application technology and environmental considerations for use of entomopathogenic nematodes in biological control. *Biology Control*, 38, 124-33. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.09.005>
- Shapiro-Ilan, D. I., Cottrell, T. E. and Wood, B. W. (2011). Effects of Combining Microbial and Chemical Insecticides on Mortality of the Pecan Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 104, 14-20. <https://doi.org/10.1603/EC10303>
- Silva, G. A., Picanço, M. C., Bacci, L., Crespo, A. L. B., Rosado, J. F. and Guedes, R. N. C. (2011). Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Management Science*, 67, 913 - 920. doi: 10.1002/ps.2131

- Silva, W. M., Berger, M., Bass, C., Williamson, M., Moura, D. M., Ribeiro, L. M. and Siqueira, H. A. (2016). Mutation (G275E) of the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 6$  subunit is associated with high levels of resistance to spinosyns in *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 131, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.02.006>
- Siqueira, H. A. A., Guedes, R. N. C. and Picanço, M. C. (2000). Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agricultural and Forest Entomology*, 2, 147–153. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100016>
- Türköz, S. and Kaşkavalcı, G. (2016). Determination of the efficacy of some entomopathogenic nematodes against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under laboratory conditions. *Türk. Entomology Dergisi*, 40, 175-183. doi: 10.16970/ted.92606
- Van Damme, V. M., Beck, B. K., Berckmoes, E., Moerkens, R., Wittemans, L., Vis, R., Nuyttens, D., Casteels, H. F., Maes, M., Tirry, L. and Clercq, P. (2016). Efficacy of entomopathogenic nematodes against larvae of *Tuta absoluta* in the laboratory. *Pest Management Science*, 72, 1702–1709. doi: 10.1002/ps.4195
- Zappala, L., Siscaro, G., Biondi, A., Molla, O., González-Cabrera, J. and Urbaneja, A. (2011). Efficacy of sulphur on *Tuta absoluta* and its side effects on the predator *Nesidiocoris tenuis*. *Journal of Applied Entomology*, 136, 401–409. doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01662.x

**ARTIGO 3.** APLICAÇÃO COMBINADA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E INSETICIDAS NO CONTROLE DE PUPAS DE *TUTA ABSOLUTA* (MEYRICK) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) NO TOMATEIRO

Sabino, P.H.S\* ; Moino Jr, A.

Departamento de agricultura, Fundação de Ensino Tecnológico de Alfenas. C.P 23, 37130-000 Alfenas,  
MG.

Autor para correspondência\* : phsabino09@gmail.com.

**Artigo de acordo com as normas da Crop Protection**

## Resumo

*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) é uma das principais pragas da cultura do tomateiro. Os nematoides entomopatogênicos (NEP) possuem potencial no controle dessa praga e podem ser utilizados juntamente com inseticidas compatíveis. Com isso, objetivou-se avaliar a suscetibilidade de pupas de *T. absoluta* a NEP combinados com diferentes doses de inseticidas compatíveis abaixo da recomendada em condições de laboratório e casa de vegetação. A espécie de NEP utilizada foi *Heterorhabditis amazonensis* JPM4. Os inseticidas utilizados foram Actara<sup>®</sup>, Premio<sup>®</sup> e Warrant<sup>®</sup>. A eficácia da aplicação combinada entre diferentes doses dos inseticidas e o NEP sobre *T. absoluta* foi realizada em laboratório e casa de vegetação. Em laboratório houve efeito aditivo da aplicação combinada de inseticidas e *H. amazonensis* à medida que aumentou a dose dos produtos. No ensaio em casa de vegetação a aplicação combinada de NEP e inseticidas manteve a mortalidade acima de 48%, sendo que a aplicação combinada entre NEP e Warrant 75% apresentou 60% de mortalidade.

**Palavras-chaves:** Controle associado, Controle biológico, seletividade.

## Abstract

*Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) is one of the main pests of the tomato crop. The entomopathogenic nematodes (EPN) have potential in the control of this pest and can be used together with compatible insecticides. The objective of this study was to evaluate the susceptibility of pupae from *T. absoluta* to EPN combined with different doses of compatible chemical insecticides in laboratory and greenhouse conditions. The species of EPN used was *Heterorhabditis amazonensis* JPM4. The insecticides used were Actara<sup>®</sup>, Premio<sup>®</sup> and Warrant<sup>®</sup>. The effectiveness of the combined application between different doses of insecticides and the EPN on *T. absoluta* was performed in laboratory and greenhouse. In the laboratory there was an additive effect of the combined application of insecticides and *H. amazonensis* as the dose of the products increased. In the greenhouse experiment, the combined application of NEP and insecticides maintained mortality above 48%, and the combined application between NEP and Warrant 75% presented a 60% mortality.

**Keywords:** Associated control, biological control, selectivity

## 1. Introdução

Dentre as pragas da cultura do tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), conhecida como traça-do-tomateiro, destaca-se por causar prejuízos econômicos, sendo considerada praga chave. É originário da América do Sul (Barrientos et al., 1998; EPPO 2010), e atualmente encontra-se distribuído em vários países no mundo. Na Europa, *T. absoluta* foi primeiramente descrita na Espanha no final de 2006 (Urbaneja et al., 2007), e desde então, se espalhou em toda a bacia do Mediterrâneo, chegando à Alemanha, Suíça e Reino Unido.

A traça-do-tomateiro ocorre durante todo o ciclo da cultura, podendo atacar tanto folhas, flores, caules e frutos (Apablaza, 1992). As fêmeas de *T. absoluta* normalmente depositam seus ovos nas folhas. Os quatro estádios larvais vivem em túneis no interior da folha onde se alimentam e se desenvolvem, causando injúrias e por consequência queda na produtividade. No último estágio as larvas descem para o solo por um fio de seda para tornarem-se pupas. Estas, por sua vez, completam seu desenvolvimento principalmente no solo e depois de 6 a 8 dias, emergem os adultos. A longevidade das fêmeas é entre 10 e 22 dias e sua fecundidade de 60 a 120 ovos. A espécie precisa de 29 a 38 dias para completar seu ciclo, dependendo da temperatura (Urbaneja et al., 2007).

Devido aos prejuízos que *T. absoluta* pode provocar na cultura, particularmente quando a infestação é alta, a aplicação de inseticidas é utilizada com frequência no controle da praga, mas o risco de desenvolvimento de resistência tem sido demonstrado por vários estudos (Siqueira et al., 2000; Silva et al., 2011). No Brasil o primeiro caso de resistência em populações de *T. absoluta* foi relatado por Siqueira et al. (2000) a abamectina, cartap, metamidofos e cipermetrina. Posteriormente, Silva et al. (2011) relataram alto nível de resistência de populações do inseto a inseticidas em alguns estados brasileiros, como por exemplo com os ingredientes ativos indoxacarbe, *B. thuringiensis*, bifentrina e cipermetrina a essa praga (> 100 vezes). Mais recentemente, resistência a espinosinas tem sido relatada (Campos et al., 2014; Reyes et al., 2012).

Para reduzir tal problema deve ser preconizado o manejo integrado de pragas (MIP), podendo-se utilizar métodos como o controle biológico com nematoides entomopatogênicos (NEP). Os NEP penetram no hospedeiro geralmente através de aberturas naturais como aparelho bucal, ânus e espiráculos ou diretamente através da cutícula (apenas *Heterorhabditis* spp) (Poinar, 1990). Os nematoides liberam a bactéria que produz toxinas dentro do hospedeiro levando à sua morte dentro de 24 a 48 horas (Kaya, 1985). Diferentes abordagens têm sido realizadas utilizando NEP no controle de *T. absoluta*, sendo que vários isolados de nematoides apresentam potencial para o controle de lagartas dessa praga, porém nos ensaios realizados com pupas ocorre uma baixa virulência dos NEP (Batalla-Carrera et al., 2010; García-del-Pinto et al., 2013; Agudelo, 2014).

Uma das formas de aumentar o controle de pupas seria com a aplicação combinada entre NEP e inseticidas (Dubovskiy et al., 2010; Li et al., 2007), utilizando os inseticidas em doses abaixo da recomendada (Koppenhöfer et al., 2000; Koppenhöfer e Kaya, 1998), além de aumentar a mortalidade dos insetos-pragas reduz o custo para o produtor. Estudar métodos que aumentem a eficácia dos NEP no controle dessa praga torna-se importante uma vez que eles apresentam como habitat natural o solo, podendo reduzir a população dessa praga na fase de pupa. Com isso, objetivou-se investigar a suscetibilidade de pupas de *T. absoluta* a NEP combinado com diferentes inseticidas compatíveis em doses abaixo da recomendada em condições de laboratório e casa de vegetação.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Criação dos insetos utilizados no ensaio

O nematoide utilizado para os bioensaios foi *Heterorhabditis amazonensis* JPM 4 (isolado em amostra de solo em Lavras, MG, Brasil), o qual foi mantido em suspensão aquosa (500 JI/ml) a  $16^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A produção de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) foi executada de acordo com a metodologia adaptada por Dutky et al. (1964) utilizando-se dieta artificial modificada por Parra (1998). Os NEP foram multiplicados em larvas de último instar de *G. mellonella*, de acordo com Kaya e Stock (1997).

Os adultos de *T. absoluta* provenientes de plantas de tomateiro mantidas em casa de vegetação foram confinados em laboratório dentro de gaiolas de policloreto de vinila com dimensões 47x47x47 cm com folhas de tomateiro fixadas em uma espuma fenólica de 3x22x10 cm devidamente umedecida com água para oviposição. As folhas de tomateiro com os ovos foram colocadas em outra gaiola adicionada com espuma fenólica, nas quais foram acondicionadas, a cada três dias, folhas de tomateiro para permitir a alimentação das larvas e seu desenvolvimento. A criação de *T. absoluta* foi mantida a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase 12 h para fornecer pupas necessárias para o experimento. A cultivar utilizada para manutenção da criação foi a Santa Clara. Três inseticidas foram utilizados para a condução dos ensaios (Tabela 1).

Tabela 1. Produtos utilizados para a condução dos ensaios

Ingrediente ativo	Produto comercial	Grupo químico	C.T	P.C. ha <sup>-1</sup>
Tiametoxam	Actara <sup>®</sup>	neonicotinoide	III	800 g
Imidacloprid	Warrant <sup>®</sup>	neonicotinoide	III	200 g
Clorantraniliprole	Premio <sup>®</sup>	diamida antraninílica	III	200 ml

C.T = Classificação toxicológica

P.C = Produto comercial

## 2.2. Aplicação de nematoides entomopatogênicos e inseticidas no controle de pupas de *Tuta absoluta* em condições de laboratório.

Para avaliar a aplicação conjunta de nematoides e inseticidas no controle de pupas de *T. absoluta* foram utilizadas placas de Petri de vidro de 5,5 cm de diâmetro contendo 5 g de substrato composto de solo de textura média e esterco curtido de bovino na proporção 1:1. Em cada placa de Petri foram adicionadas quatro pupas de *T. absoluta* e em seguida foi aplicado 1 ml de NEP a 42,12 JI/cm<sup>2</sup> (1000 JI/placa) juntamente com 1 ml de cada inseticida e 1 ml de água destilada, para aumentar a umidade do substrato. As placas de foram vedadas com filme PVC e colocadas em câmara climatizada a 27 ± 1° C.

Os inseticidas foram aplicados em três diferentes porcentagens da dose do produto, sendo a dose recomendada do produto, formando os seguintes tratamentos: 1 – Inseticidas a 25% da dose recomendada; 2 – Inseticidas a 50% da dose recomendada; 3 – Inseticidas a 75% da dose recomendada; 4 – Nematoides entomopatogênicos; 5 – Combinação de cada inseticida a 25% da dose recomendada e nematoides entomopatogênicos; 6 - Combinação de cada inseticida a 50% da dose recomendada e nematoides entomopatogênicos; 7 - Combinação de cada inseticida a 75% da dose recomendada e nematoides entomopatogênicos; 8 – Controle (apenas água). Os tratamentos foram repetidos 10 vezes, sendo cada placa uma repetição. Após as aplicações as placas foram mantidas em câmara climatizada a 27 ± 1° C.

Para as avaliações dos tratamentos com a presença dos nematoides as pupas foram dissecadas e observadas em microscópio estereoscópico para confirmação da mortalidade pelos NEP. A mortalidade das pupas foi avaliada 96 horas após os tratamentos. Para os tratamentos sem a presença dos NEP foi avaliada a presença de adulto na placa. As avaliações desses tratamentos foram feitas 11 dias após adicionar as pupas nos substratos. Antes de cada avaliação as pupas foram lavadas em água destilada para retirar os nematoides aderidos a seu corpo, aumentando a confiabilidade da presença do nematoide dentro do hospedeiro.

*Análise estatística:* Os valores de mortalidade foram submetidos à análise de variância e a diferença entre as medias dos tratamentos foram analisadas usando-se o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), no programa SISVAR (FERREIRA, 2011). A fim de avaliar a efeito da interação entre inseticidas e nematoides foi utilizado o teste binomial; a porcentagem de mortalidade observada e esperada foi comparada pelo método de Robertson e Preslier (1992), modificado por Nishimatsu e Jackson (1998). O percentual de mortalidade esperada foi obtida através da fórmula:  $Pe = Po + (1 - Po) (P1) + (1 - Po) (1 - P1) (P2)$ , onde  $Pe$  representa a mortalidade esperada da combinação entre NEP e inseticidas;  $Po$  representa a mortalidade no tratamento controle (mortalidade natural do inseto);  $P1$  representa a mortalidade após o tratamento apenas com inseticida, e  $P2$  representa a mortalidade após o tratamento apenas com

nematoides. O valor para o qui-quadrado ( $X^2$ ) foi calculado através da fórmula:  $X^2 = (Lo - Le)/Le + (Do - De)/De$  onde Lo é o número de insetos vivos observado, Le é o número de insetos vivos esperado, Do é o número de insetos mortos observados e De é o número de insetos mortos esperado. Foi utilizado um valor de  $X^2 = 3,84$  para considerar o grau de liberdade (n-1) e  $p = 0,05$ . Para a interação aditiva o  $X^2$  foi representado por  $X^2 < 3,84$ , antagonismo por  $X^2 > 3,84$  e  $Po < Pe$  e sinergismo por  $X^2 > 3,84$  e  $Po > Pe$ .

### 2.3. Aplicação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos em vasos de tomate em casa de vegetação para o controle de pupas de *Tuta absoluta*.

Para o ensaio foram utilizados os inseticidas que apresentaram efeito aditivo com os NEP. Dez vasos com substrato convencional formado por terra de barranco e esterco curtido de bovino compuseram cada tratamento. Cada vaso recebeu quatro pupas de *T. absoluta* de dois a quatro dias e em seguida foi feita a aplicação combinada dos JI a 1000 JI/ml e dos inseticidas na melhor dose do ensaio anterior, sendo que cada vaso recebeu 20 ml de suspensão de NEP e 20 de solução de inseticidas. Os inseticidas também foram aplicados separadamente de acordo com as doses em que houve efeito aditivo. Para os inseticidas que apresentaram efeito aditivo em mais de uma dose, foi escolhida a que apresentou maior porcentagem de mortalidade. Os controles foram apenas aplicação de nematoides e apenas aplicação de água. O solo foi levado à capacidade de campo para manter a umidade antes de aplicar os tratamentos, sendo novamente umedecido após 96 horas. Esse ensaio foi realizado duas vezes a fim aumentar a confiabilidade dos resultados.

Os vasos foram cobertos por um pano voil, para avaliar a emergência dos adultos. A avaliação dos tratamentos foi feita 96 horas após a aplicação dos NEP, sendo que as pupas as quais não emergiram os adultos foram dissecadas para a confirmação da mortalidade pelo nematoide. Para os tratamentos sem a presença dos NEP foi avaliada a presença de adulto nos vasos. As avaliações desses tratamentos foram feitas 11 dias após adicionar as pupas nos substratos. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados. Os dados foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) para comparação entre médias, no programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

## 3. Resultados

### 3.1. Aplicação de *Heterorhabditis amazonensis* e inseticidas no controle de pupas de *Tuta absoluta* em condições de laboratório



A mortalidade de pupas de *T. absoluta* foi diferentes entre as doses utilizadas dos inseticidas ( $F = 2.81$ ,  $gl = 9$ ,  $P = 0.005$ ). A aplicação combinada de *H. amazonensis* com os inseticidas Actara<sup>®</sup> 75%, Warrant<sup>®</sup> 50%, Warrant<sup>®</sup> 75% e Premio<sup>®</sup> a 75% apresentam interação aditiva na mortalidade das pupas (Tabelas 2 e 3).

Houve um aumento na mortalidade de pupas de *T. absoluta* quando submetidas aos tratamentos com interação entre nematoides e inseticidas em relação aos tratamentos apenas com inseticidas e *H. amazonensis*, sendo que à medida que as doses aumentaram a mortalidade de pupa também aumentou. Em particular, a mortalidade de pupas foi maior na interação de *H. amazonensis* com Warrant<sup>®</sup> 75% e Premio<sup>®</sup> 75%. No entanto, para alguns tratamentos, tais como Actara<sup>®</sup> 25% e 50%, Warrant<sup>®</sup> 25%, Premio<sup>®</sup> 25% e 50% observou-se que ocorreu um antagonismo quando feita a aplicação conjunta (Tabela 2).

**Tabela 2**

Interação de inseticidas em diferentes doses e *Heterorhabditis amazonensis* JPM 4 na mortalidade (média  $\pm$  EP) de pupas de *Tuta absoluta* em laboratório ( $27 \pm 1^\circ$  C, UR de  $70 \pm 10$  %).

Tratamento	Po <sup>2</sup>	Pe <sup>3</sup>	Qui-quadrado <sup>4</sup>	Interação <sup>5</sup>
Actara 25%	40,0 $\pm$ 10,6 ab <sup>6</sup>	55,6	4,38	Antagonismo
Actara 50%	45,0 $\pm$ 11,05 ab	60,4	3,95	Antagonismo
Actara 75%	45,0 $\pm$ 13,33 ab	59,3	2,99	Aditivo
Warrant 25%	25,0 $\pm$ 14,33 b	58,2	3,94	Antagonismo
Warrant 50%	43,0 $\pm$ 13,84 ab	68,5	2,66	Aditivo
Warrant 75%	87,5 $\pm$ 6,71 a	91,0	0,13	Aditivo
Premio 25%	30,0 $\pm$ 11,66 b	49,6	7,75	Antagonismo
Premio 50%	37,5 $\pm$ 15,47 ab	55,0	5,57	Antagonismo
Premio 75%	85,0 $\pm$ 6,66 a	88,6	0,15	Aditivo
Controle <sup>1</sup>	32,5 $\pm$ 13,46 b	45,0	-	-

<sup>1</sup>Nematoide entomopatogênicos sem inseticida

<sup>2</sup>Po: Porcentagem de mortalidade observada

<sup>3</sup>Pe: Porcentagem de mortalidade estimada

<sup>4</sup> $X^2$  (qui-quadrado) =  $(Lo - Le)^2 / Le + (Po - Pe)^2 / De$

<sup>5</sup>Interação entre os seguintes fatores: antagonista ( $X^2 > 3.84$  e  $Po < Pe$ ), aditivo ( $X^2 < 3.84$ ), sinérgico ( $X^2 > 3.84$  e  $Po > Pe$ ), sendo 3,84 correspondentes a 1 grau de liberdade  $P \leq 0,05$ .

<sup>6</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 3**

Efeito de inseticidas em diferentes doses na mortalidade (média  $\pm$  EP) de pupas de *Tuta absoluta* após a exposição aos inseticidas em laboratório ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR de  $70 \pm 10\%$ ).

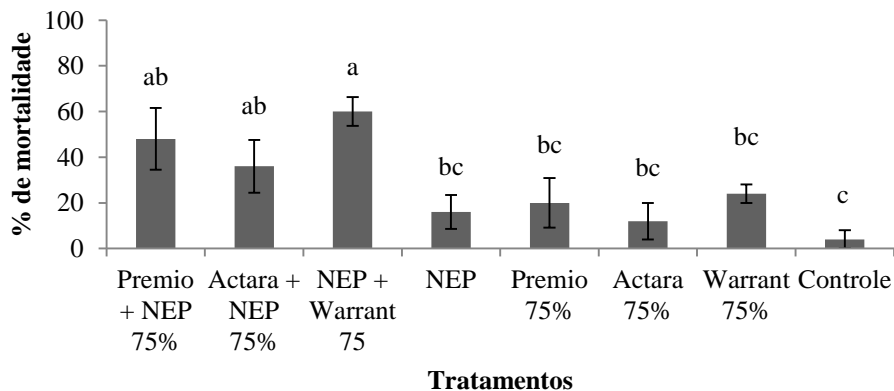
Tratamento	% de mortalidade
Actara 25%	$7,5 \pm 3,81$ a <sup>2</sup>
Actara 50%	$10 \pm 5,5$ a
Actara 75%	$7,5 \pm 5,33$ a
Warrant 25%	$5 \pm 3,33$ a
Warrant 50%	$12,5 \pm 8,5$ a
Warrant 75%	$10 \pm 5,52$ a
Premio 25%	$10 \pm 5,52$ a
Premio 50%	$10 \pm 6,66$ a
Premio 75%	$5 \pm 3,33$ a
Controle	$0 \pm 0,0$ b

<sup>1</sup>Água sem inseticida

<sup>2</sup>Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. Aplicação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos em vasos de tomate em casa de vegetação para o controle de pupas de *Tuta absoluta*

A mortalidade de pupas de *T. absoluta* em casa de vegetação diferiu entre os tratamentos ( $F = 5.014$ ;  $gl = 7$ ;  $p < 0.05$ ). A aplicação de NEP com os inseticidas proporcionou aumento na mortalidade do inseto, principalmente para a combinação entre NEP e Warrant<sup>®</sup> 75% que apresentou a maior porcentagem de mortalidade diferenciando da aplicação quando ambos foram aplicados separados (Fig. 1). A aplicação separada de NEP e inseticidas manteve a porcentagem de mortalidade abaixo de 25%, no entanto quando houve a aplicação combinada de NEP e inseticidas a porcentagem de mortalidade foi acima de 48%, sendo que a aplicação combinada entre NEP + Warrant 75% alcançou 60% de mortalidade.



**Fig. 1.** Porcentagem de mortalidade (média  $\pm$  EP) de pupas de *Tuta absoluta* exposta a combinações de inseticidas e nematoides entomopatogênicos em casa de vegetação.

#### 4. Discussão

Trabalhos de compatibilidade e aplicação de NEP na cultura do tomateiro para o controle da traça-do-tomateiro têm sido conduzido (Garcia-del-Pino et al., 2013; Sabino et al., 2014), embora ainda não tenha sido investigado o efeito sinérgico, aditivo ou antagonista da aplicação simultânea entre nematoides e inseticidas no controle de pupas de *T. absoluta*.

Insetos da ordem Lepidoptera na sua fase larval apresentam maior suscetibilidade aos NEP do que quando em fase de pupa, no entanto alguns insetos na fase de pupa podem apresentar suscetibilidade aos NEP como *G. mellonella*, *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) (Kaya e Hara, 1981). As larvas de *T. absoluta* apresentam suscetibilidade aos NEP, diferentemente das pupas que apresentam tolerância, sendo baixa a porcentagem de mortalidade pelos NEP, menor do que 20% (Batalla-Carrera et al., 2010; Garcia-del-Pino et al., 2013; Agudelo, 2014). A baixa suscetibilidade de pupas pode estar relacionada à capacidade de encapsulação do inseto nesse estágio (Richards e Davies, 1977). A encapsulação é uma resposta de imunidade comum entre insetos, e em NEP tem sido relatada em insetos (Pye e Burman, 1977; Girling et al., 2010). No entanto, NEP podem escapar da encapsulação com a aplicação simultânea de inseticidas (Dubovski et al., 2010; Li et al., 2007). Além disso, as pupas de Lepidoptera apresentam o aparelho bucal e ânus fechados, que são orifícios usados pelos JI, e maior esclerotização da cutícula (Hara e Kaya, 1981).

No presente trabalho também foi possível observar uma baixa mortalidade de pupas de *T. absoluta* quando exposta aos inseticidas testados, sendo as pupas de Lepidoptera do tipo oblecta dificultando a entrada dos inseticidas. O baixo efeito de inseticidas sobre pupas tem sido mostrado em trabalhos de seletividade onde pupas de *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) foram resistentes a maioria dos inseticidas (Fatima et al., 2013; Grafton-Cardwell e Hoy, 1985) Godoy et al. (2004) também confirmaram esses resultados onde os inseticidas thiacloprid, deltamethrin, lufenuron, tebufenozide, fenbutatin oxide, e abamectin não causaram efeito negativo na sobrevivência de pupas. Rocha (2008) examinou os efeitos de inseticidas tiametoxam, imidacloprid, endosulfan, e dimetoato e classificou estes como inofensivos para pupas de *C. externa*, sugerindo que a morfologia da pupa que é do tipo livre pode ter servido como barreira para penetração dos inseticidas.

A ação de inseticidas sobre organismos pode levar a distúrbios da atividade de muitos sistemas, incluindo o neuroendócrino e imunológico, além disso, substâncias tóxicas induzem a excessiva

intensidade de reações de proteção do inseto podendo levar ao esgotamento mais rápido do organismo e, conseqüentemente, a maior suscetibilidade a agentes patogênicos (Dubovskiy et al., 2013a). Os inseticidas podem também afetar o sistema nervoso do inseto, impedindo a produção de hormônios que participam na resposta de imunidade contra agentes infecciosos (Dubovskiy et al., 2013). A aplicação combinado de inseticida e *Metarhizium anisopliae* sobre larvas de *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) levou a uma queda da taxa de encapsulação e houve efeito sinérgico sobre a mortalidade desse inseto (Dubovskiy et al., 2010). Além disso, a utilização de doses de inseticidas abaixo da recomendada não só melhorariam a viabilidade econômica dessa abordagem de controle, mas também reduzir os potenciais efeitos prejudiciais dos produtos em insetos benéficos (Kaakeh et al., 1996; De Cock et al., 1996).

NEP da família Heterorhabditidae apresentam na região da boca um dente que pode perfurar a cutícula do inseto permitindo sua penetração (Adams e Nguyen, 2002; Koppenhofer et al., 2007). A penetração do nematoide pela cutícula provavelmente formou orifícios que permitiu a entrada dos inseticidas que levou à inibição do sistema imunológico do inseto. Esse trabalho mostrou que a aplicação combinada de nematoides e inseticida permite que os JI penetrem nas pupas impedindo a emergência dos adultos assim, a maior mortalidade obtida nesses tratamentos pode estar associada à inibição do sistema imunológico do inseto pelo inseticida à medida que se aumenta a dose do produto, sendo que a dose pode influenciar na combinação da aplicação entre inseticidas e NEP (Koppenhofer et al., 2002).

Trabalhos de aplicação combinada de NEP e inseticidas têm sido realizados, sendo que a aplicação conjunta pode melhorar a eficácia no controle de diferentes insetos praga. Koppenhofer e Fuzy (2008) observaram que a aplicação combinada entre clorantropilprole uma semana antes e em seguida *Heterorhabditis bacteriophora* houve um aumento no controle de *Anomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae) ocorrendo efeito sinérgico da aplicação combinada. De acordo com Koppenhofer et al. (2002) a aplicação combinada de NEP e imidaclopride além de aumentar a mortalidade de Scarabaeidae também aumenta a velocidade de mortalidade em relação aos nematoides isolados tanto em laboratório quanto em casa de vegetação, sendo um aspecto positivo da aplicação conjunta. Neste sentido, Negrisoli et al. (2010) avaliaram a aplicação conjunta de *Heterorhabditis indica*, *Steinernema carpocapsae* e *Steinernema glaseri* com inseticidas no controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e obtiveram efeito aditivo e sinérgico da aplicação em laboratório e campo.

O presente trabalho foi o primeiro em relatar a interação de NEP e inseticidas no controle de pupas de *T. absoluta*, sendo demonstrada a possibilidade da utilização de NEP combinados com inseticidas, podendo ser empregados em programa de manejo integrado de pragas (MIP). Além disso, as aplicações dos nematoides junto com os inseticidas podem reduzir o risco de selecionar insetos resistentes devido ao nematoide controlar os indivíduos menos suscetíveis aos inseticidas, mesmo quando esses são aplicados

em baixas doses (Koppenhofer e Kaya, 1998). O controle combinado utilizando dose dos inseticidas abaixo da recomendada com NEP representa a possibilidade do controle via irrigação, dependendo da tecnologia disponível ao produtor. O controle em casa de vegetação foi eficaz sobre pupas, no entanto são necessário mais estudos quanto aos fatores ambientais que possam melhorar a eficácia e persistência dos NEP.

### Agradecimentos

Ao apoio financeiro da CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

### Referências

- Adams, B.J., Nguyen. K.B., 2002. Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R. (Ed.), Entomopathogenic nematology. CABI International, pp. 1–33.
- Apablaza J (1992) La polilla del tomate y su manejo. Tattersal 79: 12–13
- Barrientos, Z.R., Apasblaza, H.J., Norero, S.A., Estay, P.P., 1998. Temperatura base y constante térmica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Cienc Invest Agraria. 25, 133–137.
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., García-del-Pino, F., 2010. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. BioControl. 55, 523–530.
- Campos, M.R., Rodrigues, A.R.S., Silva, W.M., Silva, T.B.M., Silva, V.R.F., Guedes, R.N.C., Siqueira, H.A.A., 2014. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. PLoS ONE. 9, e103235.
- De Cock, A., Clerq, P. De., Tirry, L., Degheele D., 1996. Toxicity of Diafenthiuron and imidacloprid to the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 25: 476-480.
- Dubovskiy, I.M., Kryukov, V.Yu., Benkovskaya, G.V., Yaroslavtseva, O.N., Surina, E.V., Glupov, V.V., 2010. Activity of detoxificative enzymes system and encapsulation rate in colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* larvae under organophosphorus insecticide treatment and entomopathogenic fungus *Metharizium anisopliae* Infection, Euroasian Entomol. J. 9, 577–582.
- Dubovskiy, I.M., Whitten, M.M.A., Yaroslavtseva, O.N., Greig, C., Kryukov, V.Y., Grizanov, E.V., Mukherjee, K., Vilcinskis, A., Glupov, V.V., Butt, T.M., 2013. CanInsects develop resistance to insect pathogenic fungi? PLoS ONE. 8, e60248.
- Dutky, S.R., Thompson, L.V., Cantwe, G.E., 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. J Insect Pathol. 6, 417-22.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)., 2010. Archives of the EPPO Reporting Service. [http://archives.eppo.org/EPPO/Reporting/Reporting\\_Archives.htm](http://archives.eppo.org/EPPO/Reporting/Reporting_Archives.htm). Accessed 10 April 2017.

Fatima, A.T., Carvalho, G.A., Costa, L.V., Fonseca, V.M., 2013. Selectivity of seven insecticides against pupae and adults of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae). Rev. Colomb. Entomol. 39, 34-39.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia. v.35, n.6, p. 1039-42, 2011.

Garcia-del-Pino, F., Alabern, X., Morton, A., 2013. Efficacy of soil treatments of entomopathogenic nematodes against the larvae, pupae and adults of *Tuta absoluta* and their interaction with the insecticides used against this insect. BioControl. 58, 723–731

Girling, R.D., Ennis, D., Dillon, A.B., Griffin, C.T., 2010. The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). J Invertebr Pathol. 104, 195–202.

Godoy, M.S., Carvalho, G.A., Moraes, J.C., Cosme, L.V., Goussain, M.M., Carvalho, C.F., Morais, A.A. 2004. Seletividade de seis inseticidas utilizados em citros a pupas e adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). Neotrop Entomol. 33, 359-364.

Grafton-Cardwell, E. E., Hoy, M. A., 1985. Short-term effects of permethrin and fenvalerate on oviposition by *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). J Econ Entomol. 78, 955-959.

Imms, A.D., Richards, O.W., Davies, R.G., 1977. Imms' general textbook of entomology. First ed. Structure, physiology and development. Springer Netherlands, London.

Kaakeh, N., Kaakeh ,W., Bennett, G. W. 1996. Topical toxicity of imidacloprid, ftpronil, and seven conventional insecticides to the adult convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). Entomol. Sci. 31: 315-322.

Kaya, K.H., 1985. Entomogenous nematodes for insect control in IPM systems. In: Hoy, M.A and Herzo, D.C. (Ed.), Biological control in agricultural IPM systems. Academic Press, Orlando and London. pp. 283 – 302.

Kaya, H.K., Stock, S.P., 1997. Techniques in insect nematology. In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, San Diego, California, pp. 281 - 324.

Kaya, H.K., Hara, A.H., 1981. Susceptibility of various species of lepidopterous pupae to the entomogenous nematode *Neoplectona carpocapsae*. J Nematol. 13, 291 – 294.

Koppenhöfer, A.K., Kaya, H.K., 1998. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: a novel approach to white grub control in turfgrass. J. Econ. Entomol. 91, 618–623.

Koppenhöfer, A.M., Grewal, P.S., Kaya, H.K., 2000. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: the mechanism. Entomol Exp Appl. 94, 283– 293.

- Koppenhöfer, A.M., Cowles, R. C., Cowles, E. A., Fuzy, E. M., Baumgartner, L., 2002. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. *Bio Control*. 24, 90-97.
- Koppenhöfer, A.M., Fuzy, E.M., 2007. Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei*, *Steinernema glaseri*, *Heterorhabditis zealandica* and *H. bacteriophora*. *Appl Soil Ecol*. 35,128–139.
- Koppenhöfer, A.M., Fuzy, E.M., 2008. Effect of the anthranilic diamide insecticide, chlorantraniliprole, on *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *Bio Control*. 45, 93–102.
- Li, X.Y., Cowles, R.S., Cowles, E.A., Gaugler, R., Cox-Foster, D.L., 2007. Relationship between the successful infection by entomopathogenic nematodes and the host immune response. *Int J Parasitol*. 37, 365–374.
- Negrisoni, A.S., Garcia, M.S., Barbosa-Negrisoni, C.R.C. 2010. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. *Crop Prot*. 29, 545 - 549.
- Nishimatsu, T.; Jackson .Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrys- omelidae). *Journal Economic Entomology*. 9,410 - 418. 1998.
- Parra, J. R. P. 1998. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: Alves SB, editor. Controle microbiano de insetos. 2nd ed. Piracicaba: FEALQ; p. 1015-38.
- Peters A, Poullot D. Side effects of surfactants and pesticides on entomopathogenic nematodes assessed using advanced IOBC guidelines. *IOBC/WPRS Bulletin*. 2004;27(6):67-72.
- Poinar, G.O., 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R and Kaya, K.K. (Ed.), *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Florida, USA. pp. 23-61.
- Pye, A.E., Burman, M., 1978. *Neoapectana carpocapsae*: infection and reproduction in large pine weevil larvae, *Hylobius abietis*. *Exp Parasitol*. 46, 1–11
- Reyes, M., Rocha, K., Alarc, L., Siegwart, M., Sauphanor, B., 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic. Biochem. Physiol*. 102, 45 – 50.
- Robertson, J. L.; Preslier, H. K. *Pesticide Bioassays with Arthropods*. Boca Raton, Florida, 1992.
- Rovesti, L., Deseo, K.V., 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). *Nematologica*. 36, 237–245.
- Sabino, P.H.S., Sales, F.S., Guevara, E.J., Moino Jr, A., Filgueiras, C.C., 2014. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with insecticides used in the tomato crop. *Nematoda*.1, e03014

Siqueira, H.A.A., Guedes, R.N.C., Picanço, M.C., 2000. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Agric For Entomol.* 2, 147–153.

Silva, G.A., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L.B., Rosado, J.F., Guedes, R.N.C., 2011. Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Manag Sci.* 67, 913–920.

Urbaneja, A., Vercher, R., Navarro, V., Porcuna, J.L., García María, F., 2007. La polilla del tomate, *Tuta absoluta*. *Phytoma.* 194, 16–23.