

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO O CONTROLE DE *Elasmopalpus lignosellus* NA CULTURA DO MILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIA EDUARDA BERLATTO MAGNABOSCO

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2018

MARIA EDUARDA BERLATTO MAGNABOSCO

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO O CONTROLE DE *Elasmopalpus lignosellus* NA CULTURA DO MILHO

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental – Mestrado, área de concentração em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

Co-orientadora

Prof.^a Dr.^a Adriane de Andrade Silva

UBERLÂNDIA
MINAS GERAIS – BRASIL

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M196n Magnabosco, Maria Eduarda Berlatto, 1991-
2018 Nematoides entomopatogênicos visando o controle de
Elasmopalpus lignosellus na cultura do milho [recurso eletrônico] /
Maria Eduarda Berlatto Magnabosco. - 2018.

Orientadora: Vanessa Andaló Mendes de Carvalho.
Coorientadora: Adriane de Andrade Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1193>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Qualidade ambiental. 2. Elasmopalpus lignosellus – Controle biológico. 3. Agentes no controle biológico de pragas. 4. Heterorhabditis. 5. Steinernematidae. I. Carvalho, Vanessa Andaló Mendes de (Orient.). II. Silva, Adriane de Andrade, 1972- (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Qualidade Ambiental. IV. Título.

CDU: 574

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

MARIA EDUARDA BERLATTO MAGNABOSCO

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS VISANDO O CONTROLE DE *Elasmopalpus lignosellus* NA CULTURA DO MILHO

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental – Mestrado, área de concentração em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental, para obtenção do título de “Mestre”.

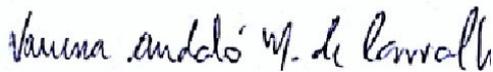
APROVADA em 24/08/ 2018.

Prof. Dr. Flávio Lemes Fernandes - UFV

Prof. Dr. Fernando Juari Celoto - UFU

Profª. Dr^a. Adriane Andrade Silva - UFU

(Co-orientadora)



Profª. Dr^a. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho - UFU

(Orientadora)

UBERLÂNDIA – MG

AGOSTO – 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me fortalecer me fazendo seguir adiante em meio das adversidades.

A minha professora orientadora Prof.^a Dr.^a Vanessa Andalo Mendes de Carvalho, por todos os ensinamentos, compromisso e atenção, mesmo estando distante.

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Adriane, por disponibilizar seu tempo para orientações.

Aos meus pais Marcos e Marli, que me apoiarem em todas minhas decisões se fazendo presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo Lucas, pela paciência, apoio e compreensão.

Ao meu irmão Guilherme e a minha cunhada Eduarda, que me acolherem em Uberlândia, me orientaram e me deram oportunidades em um novo ambiente.

A equipe da Herbae, especialmente ao Murilo, por compartilhar experiências e conhecimento sobre a criação do inseto.

Ao Arthur, Pedro e a Syngenta, pela disponibilização de produtos.

Aos colegas de sala, especialmente ao Gabriel, Juliana, e Neila pela amizade e apoio em muitas etapas do projeto.

Aos professores, em especial ao Prof. Dr. Marcus Vinicius, pela preocupação e disposição em sempre ajudar, aconselhar e buscar soluções para eventuais problemas, mesmo não estando diretamente envolvido com a pesquisa.

Aos companheiros de laboratório, especialmente Anakely pelas experiências trocadas.

A UFU, ao ICIAG e ao PPGMQ pelos recursos cedidos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1 - NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Elasmopalpus lignosellus</i> NA CULTURA DO MILHO	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. CULTURA DO MILHO	1
2. LAGARTA-ELASMO (<i>Elasmopalpus lignosellus</i>).....	2
2.1. Ocorrência	2
2.2. Aspectos morfológicos e bioecológicos	2
2.3. Danos de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> à cultura do milho	5
2.4. Monitoramento.....	5
2.5. Manejo da praga.....	6
3. NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	8
3.1. Taxonomia e morfologia de nematoides entomopatogênicos	8
3.2 Infecção e ciclo de vida.....	9
3.3. Biologia	12
3.4. Obtenção e produção de nematoides entomopatogênicos	12
3.5. Nematoides entomopatogênicos no controle biológico	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2 - VIRULÊNCIA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A <i>Elasmopalpus lignosellus</i> EM LABORATÓRIO	24
RESUMO.....	25
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Criação de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> em laboratório	28
2.2. Multiplicação dos nematoides entomopatogênicos.....	29

2.3. Seleção de nematoides entomopatogênicos a lagartas e pupas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	30
2.4. Adequação da concentração de nematoides entomopatogênicos a lagartas e pupas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	32
3. RESULTADOS.....	32
3.1. Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos a lagartas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	32
3.2. Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos a pupas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	35
3.3. Concentração de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01 a lagartas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	37
3.4. Concentração de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> GL a pupas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	39
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 3 - SUSCETIBILIDADE DE <i>Elasmopalpus lignosellus</i> A NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NA CULTURA DO MILHO EM CONDIÇÕES DE CASA-DE-VEGETAÇÃO.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1. Adequação da concentração de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01 a lagartas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	52
2.2. Adequação da concentração de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> GL a pupas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	53
3. RESULTADOS.....	53
3.1. Seleção da concentração de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01 a lagartas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> em casa de vegetação.....	53
3.2. Seleção da concentração de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> GL a pupas de <i>Elasmopalpus lignosellus</i> em casa de vegetação.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO 4 - COMPATIBILIDADE DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COM PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS UTILIZADOS NA CULTURA DO MILHO.....	60
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62

1. INTRODUÇÃO	63
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
3. RESULTADOS.....	67
REFERÊNCIAS	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
ANEXOS	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1- Adultos de *Elasmopalpus lignosellus*. (A) Macho. (B) Fêmea..... 3
- FIGURA 2- Postura de *Elasmopalpus lignosellus*. (A) Ovos recém-postados (seta). (B) Ovos próximos à eclosão..... 3
- FIGURA 3 - Lagartas de primeiro ínstar (A) e de último ínstar (B).....4
- FIGURA 4 - Câmaras pupais construídas a partir de teia e vermiculita.....4
- FIGURA 5 - Pupas recém-formadas (A), com 3 dias (B) e com 5 dias (C)..... 4

CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 - Criação de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* em potes plásticos com dieta artificial e vermiculita.....28
- FIGURA 2 – Gaiola para postura de ovos contendo pupas e dieta dos adultos de *Elasmopalpus lignosellus*.29
- FIGURA 3 – Lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* dispostas em placas de Petri com dieta artificial.31
- FIGURA 4 – Mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após 72 horas de exposição.37
- FIGURA 5 - Mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após 96 horas de exposição.38
- FIGURA 6 - Variação da mortalidade média de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* GL após 48 h.....40
- FIGURA 7 - Variação da mortalidade média de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* GL após 72 h.....41

CAPÍTULO 3

- FIGURA 1 – Gaiola metálica com tela antiafídeo.52

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* após 48 horas da aplicação de isolados de entomopatogênicos.....33

TABELA 2 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* após 72 horas da aplicação de isolados de nematoides entomopatogênicos..34

TABELA 3 - Porcentagem de mortalidade de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* após 48 horas da aplicação de isolados de NEPs.36

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Mortalidade média de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* inoculadas a diferentes concentrações de *H. amazonensis* MC01 em casa de vegetação54

TABELA 2 -Mortalidade média de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* inoculadas a diferentes concentrações de *Heterorhabditis amazonensis* GL em casa de vegetação.....56

CAPÍTULO 4

TABELA 1 - Produtos fitossanitários usados no estudo de compatibilidade com nematoides entomopatogênicos (AGROFIT, 2018).65

TABELA 2 - Compatibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 com produtos fitossanitários utilizados na cultura do milho67

TABELA 3 - Compatibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* GL com produtos fitossanitários utilizados na cultura do milho68

RESUMO

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Nematoides entomopatogênicos visando o controle de *Elasmopalpus lignosellus* na cultura do milho.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

A lagarta-elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) é uma das pragas responsáveis pela diminuição do potencial produtivo do milho, por formar galeria no colmo, causando o perfilhamento ou morte da planta. Apesar de ser considerada uma praga de difícil manejo, atualmente faz-se uso do controle químico, via tratamento de sementes e aplicações de inseticidas. Contudo, o uso desse método tem apresentado baixa eficiência, além de gerar problemas pelo uso incorreto como, resistência de insetos, surtos populacionais, ascensão de pragas secundárias, aumento dos custos de produção e aumento da contaminação humana e ambiental. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar métodos alternativos de controle de *E. lignosellus* utilizando nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp., em laboratório e casa de vegetação. Inicialmente, foi avaliada a virulência dos isolados, *Heterorhabditis amazonensis* MC01, *H. amazonensis* JPM3, *H. amazonensis* GL, *Steinernema carpocapsae* All, *Heterorhabditis* sp. Nepet 11 sobre pupas e lagartas de *E. lignosellus* em laboratório. As médias foram comparadas pelos testes de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Posteriormente, foram testadas as concentrações de 50, 100, 150 e 200 JI inseto⁻¹ de *H. amazonensis* GL para pupas e de *H. amazonensis* MC01 para lagartas em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de regressão. Em casa de vegetação as concentrações dos isolados foram novamente testadas em vasos contendo milho. Para lagartas foram testadas as concentrações de 190, 210, 230 e 250 JI lagarta⁻¹ de *H. amazonensis* MC01 seguindo o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Para pupas foram testadas as concentrações 3380, 3500, 3620, 3740 JI vaso⁻¹ de *H. amazonensis* GL seguindo o mesmo delineamento com quatro repetições. Por fim foi testada a compatibilidade de produtos fitossanitários usados no tratamento de sementes de milho com os nematoides *H. amazonensis* MC01 e *H. amazonensis* GL. O teste de seleção de isolados para lagartas demonstrou que após 72 horas os nematoides *H. amazonensis* MC01 e *S. carpocapse* All foram igualmente virulentos diferindo dos demais reduzindo a população de lagartas em mais de 90%. Já o isolado *H. amazonensis* GL se destacou dos demais causando uma mortalidade de 94% de pupas após 48 h. A concentração de *H. amazonensis* MC01 que causou maior mortalidade de lagartas em laboratório foi de aproximadamente 190 JI lagarta⁻¹, e a concentração de *H. amazonensis* GL foi de 157 JI pupa⁻¹. Em casa de vegetação as concentrações de *H. amazonensis* MC01 testadas não diferiram entre si. No ensaio com pupas a concentração que causou a maior mortalidade foi de 3500 JI vaso⁻¹. O teste de compatibilidade mostrou que os nematoides foram compatíveis com os produtos NeemMax[®], Fortenza 600 FS[®] e Cruiser 350 FS[®].

Palavras-chave: controle biológico, *Heterorhabditis*, manejo integrado de pragas, proteção de plantas, *Steinernema*.

ABSTRACT

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Entomopathogenic nematodes aiming the control of *Elasmopalpus lignosellus* in maize.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

The cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), is one of the pests responsible for the decrease of the productive potential of the corn, because it forms gallery on the stem, causing the tillering or death of the plant. Despite being considered a difficult-to-manage pest, it is currently used chemical control, via seed treatment and insecticide applications. However, the use of this method has presented low efficiency, besides generating problems due to incorrect use, insect resistance, population outbreaks, rise of secondary pests, increased production costs and increased human and environmental contamination. Initially, the virulence of the isolates, *Heterorhabditis amazonensis* MC01, *H. amazonensis* JPM3, *H. amazonensis* GL, *Steinernema carpocapsae* All and *Heterorhabditis* sp. Nepet 11 was tested on *E. lignosellus* pupae and caterpillars in the laboratory. The averages were compared by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$). Subsequently, the concentrations of 50, 100, 150 and 200 JI insect⁻¹ of *H. amazonensis* GL for pupae and of *H. amazonensis* MC01 for caterpillars were tested in a completely randomized design with five replicates. Data were submitted to regression analysis. In greenhouse the concentrations of the isolates were again tested in vase containing corn. For caterpillars the concentrations of 190, 210, 230 and 250 JI larve⁻¹ of *H. amazonensis* MC01 were tested following the completely randomized design with five replicates. For the pupae the concentrations 3380, 3500, 3620, 3740 JI vase⁻¹ of *H. amazonensis* GL were tested following the same design with four replicates. Finally, the compatibility of phytosanitary products used in the treatment of corn seeds with *H. amazonensis* MC01 and *H. amazonensis* GL nematodes was tested. The isolate selection test for caterpillars showed that after 72 hours the nematodes *H. amazonensis* MC01 and *S. carpocapse* All were equally virulent differing from the others, reducing the caterpillar population by more than 90%. The isolate *H. amazonensis* GL stood out from the others, causing a mortality of 94% of pupae after 48 h. The concentration of *H. amazonensis* MC01 that caused the highest mortality of caterpillars in the laboratory was approximately 190 JI larve⁻¹, and the concentration of *H. amazonensis* GL was 157 JI pupa⁻¹. In greenhouse the concentrations of *H. amazonensis* MC01 tested did not differ among themselves. In the pupae assay the concentration that caused the highest mortality was 3500 JI vase⁻¹. The compatibility test showed that the nematodes were compatible with NeemMax®, Fortenza 600 FS® and Cruiser 350 FS® products.

Keywords: biological control, crop protection, *Heterorhabditis*, integrated pest management, *Steinernema*.

CAPÍTULO 1

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE *Elasmopalpus lignosellus* NA CULTURA DO MILHO

INTRODUÇÃO GERAL

1. CULTURA DO MILHO

O milho, *Zea mays* L. (Poaceae), é o cereal mais produzido no mundo, tendo grande importância no agronegócio brasileiro, já que o país é o terceiro maior produtor mundial, ficando atrás somente da China e dos EUA (DEPEC, 2017). É uma gramínea originária do México e da América Central a partir da domesticação do teosinto (*Zea* spp.) (BUCKLER; STEVENS, 2005).

Além de ser utilizado em forma de grãos, o milho também é fundamental no sistema de rotação de culturas, e desempenha um papel econômico importante, já que é uma *commodity* em ascensão no mercado internacional (BONO et al., 2008). A elevada produção brasileira em área é dada pela aptidão agrícola e multiplicidade de aplicações do milho, seja na alimentação humana ou animal, assumindo também um relevante papel sócioeconômico (OLIVEIRA JR. et al., 2006).

A demanda pelo cereal vem crescendo na última década, principalmente devido ao crescimento econômico dos países asiáticos, e pela utilização na produção de etanol em países como o Brasil e os EUA. Da mesma maneira, o consumo interno também tem aumentado em decorrência do seu uso em formulação de ração animal e do crescimento do setor de carnes, mais especificamente, de aves e suínos (PAVÃO; FERREIRA FILHO, 2011).

Embora o milho ocupe grande extensão de área cultivada do Brasil, seu rendimento é um dos mais baixos do mundo, pois apesar de ser uma cultura com muitos investimentos tecnológicos, existem vários fatores que podem contribuir para a baixa produtividade relativa (CONAB, 2018).

Um desses fatores pode estar relacionado ao número de pragas de difícil controle que acometem a cultura, sendo a lagarta-elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) uma delas, já que fica abrigada próximo ou dentro do colmo, ou ainda em abrigos de teia que constroem sob o solo, e por isso se torna um alvo de difícil alcance (ZORZETTI et al., 2017).

Além do difícil controle, o monitoramento também pode ser uma tarefa árdua e onerosa, por isso geralmente a presença da praga é evidenciada pelos danos causados, principalmente o “coração morto”, que leva a morte da planta no estágio inicial de desenvolvimento e conseqüentemente à redução do rendimento da cultura (MARTINS, 2009),

sendo assim é fundamental investir em pesquisas que contribuam para o controle da praga a fim de reduzir as perdas causadas por ela.

2. LAGARTA-ELASMO (*Elasmopalpus lignosellus*)

2.1. Ocorrência

Elasmopalpus lignosellus vulgarmente conhecida como broca do colo ou simplesmente lagarta-elasmo, é uma praga subterrânea que ocorre desde o Sul dos Estados Unidos até a América do Sul (VIANA, 2004).

Busoli et al. (1977) classificaram-na como um inseto polífono, já que pode se alimentar de mais de 60 espécies de plantas (STONE, 1968). Por isso, é uma praga que pode reduzir a produtividade de muitas plantas cultivadas comercialmente com significativo prejuízo econômico (TIPPINS, 1982).

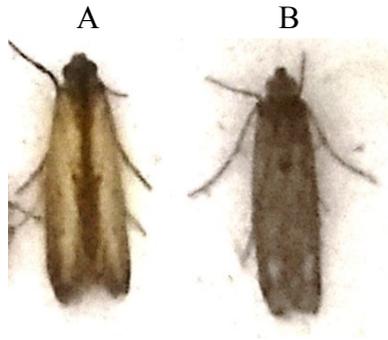
No Brasil, as culturas do milho, soja e algodoeiro são os principais alvos do inseto, porém também pode causar sérios prejuízos às lavouras de arroz, sorgo, amendoim, cana-de-açúcar e feijoeiro (FERREIRA; BARRIGOSI, 2003; VIANA, 2004; SULEIMAN, 2010; GILL et al., 2010; SANDHU et al., 2011).

Os dados sobre perdas causadas por pragas de solo são poucos, mas estima-se que *E. lignosellus* na cultura do milho pode causar perdas que variam de 20% até a destruição total da lavoura, em condição de alta infestação (VIANA, 2004). Além disso, pode ser considerada uma praga chave da fase inicial, já que o ataque se concentra nos 30 dias após a germinação (GALLO et al., 2002), sendo assim, as plantas mais jovens são mais suscetíveis ao ataque (FERREIRA; MARTINS, 1984).

2.2. Aspectos morfológicos e bioecológicos

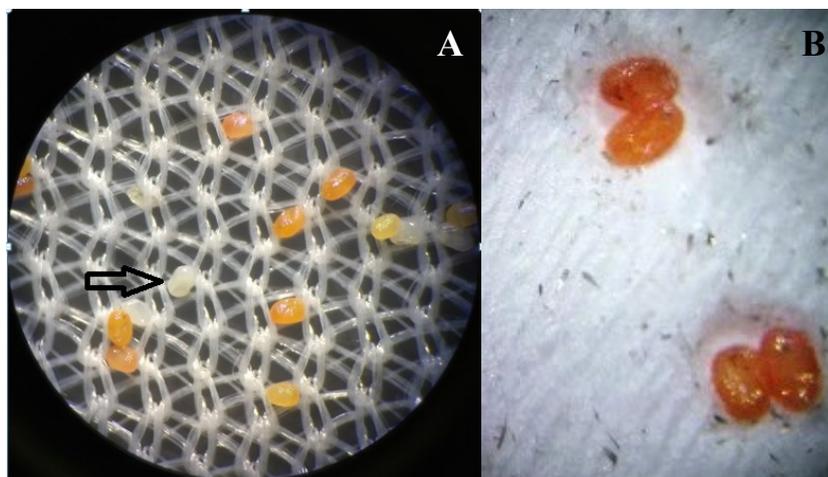
Os adultos de *E. lignosellus* são mariposas com 16 a 24 mm de envergadura (BARROS, 2009) que apresentam dimorfismo sexual pronunciado, sendo que os machos apresentam palpos labiais mais longos e eretos, além da coloração amarelo claro no centro das asas anteriores (Figura 1A). Já as fêmeas possuem as asas anteriores escuras (Figura 1B) (VIANA, 2004).

FIGURA 1 - Adultos de *Elasmopalpus lignosellus*. (A) Macho. (B) Fêmea.



As fêmeas ovipositam isoladamente no solo, concentrando-se nos 30 centímetros ao redor da planta. Os ovos inicialmente são esverdeados (Figura 2A) se tornando rosa ou vermelho próximo da eclosão (Figura 2B) (GILL et al., 2017). Os adultos são mais ativos durante a noite, sendo que as condições ideais para o acasalamento são temperatura acima de 27°C, baixa umidade relativa (menor que 50%), pouco vento e completa escuridão (GILL et al., 2017).

FIGURA 2 - Postura de *Elasmopalpus lignosellus*. (A) Ovos recém-postados (seta). (B) Ovos próximos à eclosão.



As lagartas eclodem em média no terceiro dia após a oviposição, passando por seis instares (VIANA; MENDES, 2011). Possuem três pares de pernas torácicas e cinco pares abdominais (FERREIRA; BARRIGOSI, 2006). No primeiro instar é de coloração amarelo-palha com listras vermelhas (Figura 3A) e à medida que se desenvolvem tornam-se esverdeadas com anéis vermelhos (Figura 3B) (VIANA, 2004). A lagarta de último instar

apresenta listras longitudinais e cápsula cefálica que variam de marrom escuro ao preto (BESSIN, 2004).

FIGURA 3 - Lagartas de primeiro ínstar (A) e de último ínstar (B).



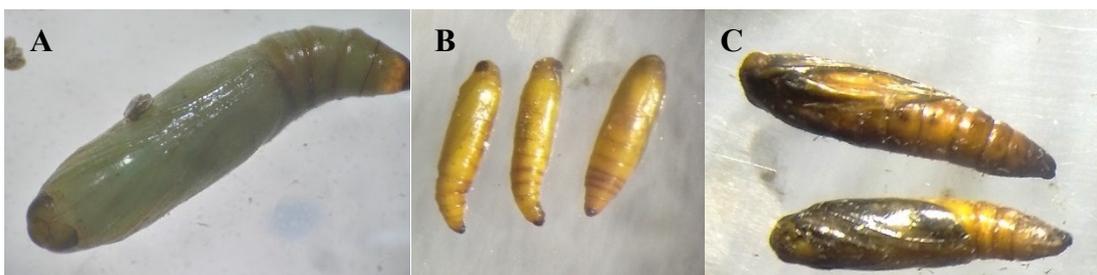
O período larval é influenciado pela temperatura e pode variar de 17 a 42 dias. A fase de pupa ocorre no solo e dura de 8 a 10 dias, ficando dentro de uma câmara construída de teia e partículas de solo (Figura 4) (VIANA; MENDES, 2011).

FIGURA 4 - Câmaras pupais construídas a partir de teia e vermiculita.



As pupas medem de 8 a 10 mm e inicialmente são esverdeadas (Figura 5) tomando uma coloração marrom à medida que ocorre esclerotização da cutícula (Figuras 5A a C) (NUESSLY; WEBB, 2001).

FIGURA 5 - Pupas recém-formadas (A), com 3 dias (B) e com 5 dias (C).



2.3. Danos de *Elasmopalpus lignosellus* à cultura do milho

A lagarta ataca a planta do milho com até 35 cm de altura (PINTO et al., 2004), ainda nos primeiros ínstares se alimenta de folhas novas em seguida penetra na região do colo fazendo galeria no interior do colmo (DUPREE, 1965; KISHINO, 1981), o que pode provocar o perfilhamento e/ou a morte da planta (PINTO et al., 2004).

O sintoma de ataque pode ser visualizado pelo murchamento e pela seca das folhas centrais, que se destacam com facilidade ao serem puxadas. O dano é causado na região da gema apical, quando essa se encontra abaixo do nível do solo ou pela destruição total ou parcial dos tecidos meristemáticos responsáveis pela condução de água e nutrientes. As perdas na lavoura estão relacionadas com a redução no estande, resultando no baixo rendimento de grãos (VIANA, 2009).

Em regiões tropicais e subtropicais é considerada uma das principais pragas do milho (CHITTENDEN, 1980), sendo os sintomas de ataque mais evidentes em períodos com temperaturas elevadas, baixa umidade e locais com solos arenosos e de fácil drenagem (ALL et al., 1982). No Brasil, observa-se que a ocorrência da praga é mais frequente em solos com maior teor de areia na região de Cerrado e em períodos secos (BARROS, 2009), provavelmente porque o inseto é capaz de reter mais água em sua cutícula que a maioria dos insetos podendo se adaptar às condições mais adversas (CHAPIN, 1999). De acordo com Mack e Backman (1984) a produção máxima de ovos ocorre entre 27,5 e 30,5°C, temperatura encontrada em diversas regiões brasileiras.

Em estudos realizados por Viana (1981) em casa de vegetação e laboratório, verificou-se que em condições de alta umidade do solo a oviposição das mariposas foi comprometida, assim como, a eclosão dos ovos. Em consequência disso, em condições de cultivo em sistema de plantio direto a infestação de elasmop apresenta-se menor quando comparada com métodos convencionais (JORDÃO et al., 1992).

2.4. Monitoramento

A dificuldade de monitoramento de pragas subterrâneas representa o maior entrave para seu manejo. Deve-se realizar a análise cuidadosa do solo ao redor das plantas a fim de se identificar a presença de casulos construídos a partir da teia, solo e excrementos. O uso de armadilhas tipo delta utilizando feromônios para o monitoramento de elasmop é uma das alternativas disponíveis nos EUA (NUESSLY; WEBB, 2001), no entanto, testes realizados no

Brasil utilizando esses semioquímicos produziram baixas respostas na atração dos machos na região de Sete Lagoas, Minas Gerais (PIRES et al., 1992). Sendo assim, apesar do grande potencial para o monitoramento de elasmos (VIANA, 2009), não existe recomendação e nem produto sintetizado que sejam eficientes para as populações nativas.

Com isso, a técnica mais utilizada para o monitoramento da praga é a avaliação do número de plantas atacadas pela lagarta. Essa técnica é considerada falha, pois não se consegue monitorar a praga antes da entrada na área, dificultando o emprego de medidas de controle a fim de se evitar as perdas econômicas na lavoura (VIANA, 2009).

2.5. Manejo da praga

Como *E. lignosellus* é uma praga chave de diversas culturas, muito já se estudou sobre sua biologia, comportamento, tabela de vida, dinâmica populacional, práticas de manejo, assim como, seleção de genes de resistência (VILLELA et al., 2002; XAVIER et al., 2011; SANDHU et al., 2013; ZORZETTI et al., 2017; LEMES et al.; 2017).

Apesar disso, as recomendações de manejo se baseiam na utilização de inseticidas, sendo o método químico por meio de tratamento de sementes o mais utilizado. Estima-se que para cada 1% de controle da lagarta-elasmos, há redução de 2,8% da perda do rendimento de grãos (ALI et al. 1979). Cruz et al. (1983) encontraram diferenças acima de 1.500 Kg ha⁻¹, entre parcelas de milho que receberam o tratamento de sementes no plantio e as que não receberam. Entretanto, em áreas onde tem ocorrido severa estiagem e consequente baixa umidade do solo, a eficácia desses inseticidas tem sido prejudicada, já que, à semelhança de alguns herbicidas, requerem umidade para proporcionar um controle efetivo da lagarta, e são justamente essas condições que são favoráveis ao aparecimento da elasmos (VIANA; MENDES, 2011).

Além disso, o controle químico, quando mal utilizado, pode selecionar populações resistentes do inseto, provocando efeitos deletérios ao ambiente, à saúde animal e elevação dos custos de produção (DALVI et al., 2011; ZORZETTI et al., 2017).

Outros métodos de controle, como o físico e as práticas culturais, já foram testados. O revolvimento do solo e a queima de restos culturais é uma prática antiga e ainda utilizada, que auxilia na redução das pragas de solo. No entanto, Viana (2009) observou que áreas que tiveram os restos culturais queimados o ataque da praga se apresentou mais severo. Uma hipótese é de que a fumaça é um atrativo olfativo para os adultos, além de ser um sinal da

presença de recursos alimentares atraindo as fêmeas e aumentando a oviposição (MAGRI, 1998).

Por outro lado, outras práticas culturais se mostram eficazes no manejo da praga, como a utilização de armadilhas luminosas e cobertura de solo com *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae), devido à liberação de aleloquímicos e manutenção de maior umidade no solo, mostrando que podem ser aliados a outros métodos de controle (GILL et al., 2010).

Práticas que contribuem para a manutenção ou aumento do teor da umidade no solo, como irrigação, quando viável, e o sistema de plantio direto também podem influenciar a incidência da praga, já que a oviposição diminui em solos com maior teor de umidade (VIANA; COSTA, 1993; SILVA et al., 1994; GALLO et al., 2002).

Pesquisas recentes mostraram interesse em desenvolver biopesticidas e plantas transgênicas resistentes a *E. lignosellus* devido ao potencial inseticida encontrado em proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (ZORZETTI et al., 2017; LEMES et al., 2017) além da utilização de agentes de controle biológico como *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (XAVIER et al., 2011).

O uso desses agentes de controle biológico está ganhando enfoque na pesquisa, pois podem ser seletivos, de baixa toxicidade além de serem eficientes contra várias espécies de pragas (SILVA et al., 2008; ANDALÓ, 2010; BELLINI, 2012).

Alguns parasitoides pertencentes às ordens Hymenoptera, como o parasitoide de ovos *T. pretiosum* (PARON; QUINTELA, 2002), e o entomopatógeno *B. thuringiensis* já foram citados como inimigos naturais de *E. lignosellus* (JOHNSON; SMITH JR., 1980; TIPPINS, 1982; MOAR et al., 1995). Apesar disso, o impacto sobre a lagarta-elasma é considerado baixo, já que esta se encontra abrigada no colmo da planta enquanto se alimenta, ou protegida pelo abrigo de teia e solo que constrói (VIANA, 2009).

No entanto, o controle com o fungo *Beauveria bassiana* (Bals. Criv.) Vuill. inoculado a substratos foliares de milho já foi constatado como eficaz para lagartas de primeiro e terceiro ínstar (MCDOWELL et al., 1990).

Dessa maneira, em função do potencial de ação de agentes de controle biológico nos diferentes estádios de desenvolvimento do inseto, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) devem ser testados no combate à lagarta-elasma, podendo constituir mais uma ferramenta para o manejo integrado de pragas.

3. NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

A tentativa de utilizar nematoides para controle de pragas agrícolas iniciou-se com sua descoberta no início do século 20 (POINAR, 1979), mas a tecnologia para a produção artificial dos juvenis infectantes (JIs) em laboratório ainda vem sendo desenvolvida (LEITE et al., 2016). Duas famílias de nematoides são consideradas com potencial entomopatogênico, sendo estas Steinernematidae e Heterorhabditidae (NGUYEN; HUNT, 2007). No Brasil, Lauro Travassos pode ser considerado o pioneiro na descrição do gênero *Steinernema* (HUNT, 2007). Já a primeira espécie brasileira do gênero *Heterorhabditis* foi descrita por Pereira (1937).

Ambos os gêneros podem ser considerados cosmopolitas, pois são encontrados em solos de diversos biomas mundiais (LAWRENCE et al., 2006). Assim, a utilização desses organismos como agentes de controle biológico apresenta um vasto potencial, necessitando de uma busca local de organismos adaptados às condições climáticas (SPIRIDONOV, 2017).

3.1. Taxonomia e morfologia de nematoides entomopatogênicos

Nematoides são metazoários pertencentes ao filo Nematoda, os quais apresentam corpo alongado e cilíndrico (WOOD, 1988). Esses animais apresentam aparentemente uma simplicidade morfológica, no entanto, escondem uma ampla variedade de estruturas especializadas presentes em sua anatomia, como por exemplo, os aparelhos bucais e as ornamentações da cutícula. Essa diversidade dentro do filo está intimamente relacionada às características biológicas e ecológicas (DE LEY, 2006).

Existem espécies tanto de vida livre quanto parasitas de plantas ou animais (LAMBSHEAD, 1993). Dentro dessa diversidade existem famílias de nematoides que utilizam artrópodes como hospedeiros, são os chamados nematoides entomopatogênicos (NEPs) (ALMENARA, 2012).

Os dois principais gêneros, *Heterorhabditis* e *Steinernema*, apresentam histórias evolutivas independentes, mesmo apresentando atualmente o mesmo nicho ecológico (ALMENARA, 2012). O gênero *Heterorhabditis* evoluiu a partir de um ancestral marinho, enquanto o gênero *Steinernema* de um ancestral terrestre (POINAR, 1993). A hipótese de que os dois gêneros não possuem um mesmo ancestral comum foi confirmada por Elsworth et al. (2011) com estudos filogenéticos baseados na sequência de genes das subunidades ribossômicas.

O método mais utilizado para a identificação dos NEPs é por meio de estudos de morfologia e morfometria utilizando microscopia ótica ou eletrônica de varredura. Pela morfometria é feita a medição das estruturas do nematoide, as quais poderão ser comparadas empregando chaves taxonômicas para identificação de gêneros e espécies (ADAMS; NGUYEN, 2002). Por outro lado também é possível a identificação de isolados de forma mais precisa utilizando testes moleculares, que complementam outros métodos (ALBERTS et al., 1994).

De forma geral os machos de *Heterorhabditis* se assemelham a bastonetes e são mais transparentes que as fêmeas, que apresentam corpo mais robusto. Já as fêmeas de *Steinernema* têm um corpo espesso, cheio de tubos gonadais. O corpo dos JIs é coberto com a cutícula lisa, e somente *Heterorhabditis* possuem um dente proeminente visível na extremidade anterior (SPIRIDONOV, 2017).

3.2 Infecção e ciclo de vida

O ciclo de vida dos NEPs inicia-se a partir da penetração dos JIs no inseto hospedeiro e podem apresentar uma ou várias gerações dentro do mesmo cadáver (KAYA; GAUGLER, 1993). Este ciclo inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto (machos e fêmeas), sendo a fase juvenil composta de quatro estádios (J1, J2, J3 ou JI e J4) (DOLINSKI, 2006a). O JI, único ínstar adaptado a sobreviver fora do hospedeiro, possui duas cutículas superpostas e seus orifícios naturais (boca e ânus) encontram-se fechados, de forma a evitar dessecação e conferir maior tempo de sobrevivência no solo (VOSS, 2009).

Quando no solo, o JI consegue encontrar o hospedeiro através de órgãos quimiotáteis, chamados anfideos, existentes na parte anterior do corpo, assim, penetrando pelas suas aberturas corporais naturais (boca, espiráculos e poros anal e genital), ou em alguns casos pela cutícula, por meio de um dente quitinoso localizado frontalmente em sua extremidade (KAYA; GAUGLER, 1993; DOLINSKI, 2006b).

Depois de alcançar a hemolinfa, os sinais dos insetos induzem os JIs a liberarem bactérias simbióticas que estão presentes na superfície epitelial do seu intestino anterior (BIRD; AKHURST, 1983; POINAR, 1966; WANG; BEDDING, 1996; CICHE; ENSIGN, 2003; CAGNOLO et al., 2004).

Esses sinais são induzidos pela ativação do sistema imunológico dos insetos sendo que os hematócitos podem fagocitar, formarem nódulos e encapsular os nematoides. No entanto os JI possuem a capacidade de suprimir a resposta de encapsulação, superlotando o sistema

imune do inseto por múltiplas infecções (DOWDS; PETERS, 2002; FORST; CLARKE, 2002).

A liberação das bactérias por meio do ânus dos JI ocorre quando a encapsulação, promovida pelo inseto, não é completamente formada. Dessa forma os JI liberam as bactérias na hemolinfa pelo ânus, durante um período de 30 minutos a 5 horas. Provavelmente essa liberação lenta e contínua de poucas bactérias seja relevante para neutralizar os mecanismos de defesa do inseto (DUNPHY; THURSTON, 1990; FORST; CLARKE, 2002).

As bactérias produzem uma ampla gama de toxinas e exoenzimas hidrolíticas, que matam o inseto hospedeiro por septicemia dentro de 24 a 48 horas, ficando o nematoide imerso no material do qual se alimenta, possibilitando seu crescimento e multiplicação (BUENO et al., 2011).

De forma geral, os nematoides do gênero *Steinernema* possuem associação com bactérias do gênero *Xenorhabdus*, enquanto *Heterorhabditis* com bactérias do gênero *Photorhabdus* (GAUGLER, 2002).

O sistema *Heterorhabditis-Photorhabdus* é bastante restritivo. Uma espécie de nematoide apresenta como simbiote sempre e somente uma única linhagem daquela espécie de bactéria. No caso do par *Steinernema-Xenorhabdus*, a especificidade é menor: diferentes espécies de nematoides podem apresentar a mesma espécie de bactéria simbiote (FORST; CLARKE, 2002).

A relação entre a bactéria e o nematoide é simbiótica porque a bactéria faz a bioconversão do tecido do hospedeiro como fonte de alimento para o nematoide, além de a própria biomassa bacteriana lhe servir de alimento. Além disso, essas bactérias produzem compostos com amplo espectro de atividade biológica: antibióticos, antifúngicos, bacteriocinas, proteases, lipases e lipopolissacarídeos. A presença destes compostos impede a colonização do cadáver do inseto por outras espécies bacterianas existentes no ambiente (BODE, 2009). Por outro lado, o nematoide fornece abrigo à bactéria, uma vez que ela não é encontrada sozinha na natureza (WOODRING; KAYA, 1988).

Os JIs são classificados em três categorias: emboscadores, cruzadores e intermediários (LEWIS, 2002). As espécies emboscadoras se posicionam de forma a interceptar um inseto que se movimenta próximo. Para isso, os JIs apoiam-se sobre a cauda, levantam-se, saltam e circulam a procura do hospedeiro, o que os tornam adaptados para infectar hospedeiros que se movimentam sob a superfície do solo (KONDO; ISHIBASHI, 1986). Já as espécies cruzadoras movem-se ativamente à procura do hospedeiro, localizando-os pelos produtos de excreção, níveis de CO₂ e gradientes de temperatura (DOLINSKI, 2006b). Dessa forma, de

acordo com a estratégia adotada, aumenta-se a probabilidade de encontro e reconhecimento do hospedeiro susceptível (SCHROEDER; BEAVERS, 1987; CAMPBELL; KAYA, 2002). Os JIs de comportamento intermediário apresentam características de cruzadores e emboscadores, de acordo com a proximidade do hospedeiro (DOLINSKI, 2006b).

Em *Steinernema* spp. enquanto houver disponibilidade de alimento os JI se alimentam, crescem, fazem ecdises e dão origem aos adultos da primeira geração sendo produzidos em todas as gerações machos e fêmeas, o que é denominado como gonocorismo (GREWAL et al., 2005). Os adultos copulam e os ovos são retidos no interior do abdômen da fêmea até a eclosão dos J1, quando rompem a parede do corpo da fêmea e atingem também o inseto, aonde vão se alimentar. Alguns J1 vão mudar para o estágio J2 e, mais tarde, vão se transformar em JI (J3 infectantes), retendo a cutícula do estágio anterior. Outros J1 vão completar o ciclo de desenvolvimento, passando por J2, J3, J4 e adultos de segunda geração, que são menores que os de primeira geração. Estes adultos copulam e novos ovos e juvenis são liberados (KAYA; GAUGLER, 1993; KAYA; BEDDING; AKHURST, 1993).

Quando os recursos alimentares se esgotam, estes ciclos de reprodução cessam e os JIs migram para o ambiente, onde permanecem até encontrarem outro inseto e reiniciar o ciclo (ADAMS; NGUYEN, 2002).

O ciclo de vida de *Heterorhabditis* spp. é similar ao de *Steinernema* spp., porém os adultos da primeira geração são hermafroditas, possuindo a morfologia da fêmea (POINAR, 1990) e são auto férteis. Já a próxima geração produz machos e fêmeas por fertilização cruzada (ADAMS; NGUYEN, 2002). O aumento na densidade populacional de nematoides no cadáver somado às condições limitantes de nutrientes levam ao desenvolvimento das formas resistentes, os JIs. Estes emergem do cadáver e penetram no solo carregando a bactéria em seu intestino, prontos para infectar um novo hospedeiro (POINAR, 1990; STUART; GAUGLER; GEORGIS, 1996).

Em geral, insetos mortos por *Heterorhabditis* apresentam cor marrom escura avermelhada, enquanto insetos infestados com *Steinernema* se tornam marrons ou bronzeados (KAYA; GAUGLER, 1993), com excessão das lagartas infestadas por *Steinernema rarum*, que mostram uma cor vermelha clara (NGUYEN et al., 2006). O ciclo de vida dos NEPs pode variar de 12 a 15 dias a uma temperatura de 25 a 30°C, que é a temperatura ideal para o crescimento e a reprodução dos nematoides (BANU; CANNAYANE; MEENA, 2017).

3.3. Biologia

Os NEPs são capazes de resistir a condições ambientais adversas dentro de cadáveres de seus hospedeiros, já os JIs que vivem no solo são mais vulneráveis à variabilidade ambiental (BROWN; GAUGLER, 1997).

NEPs utilizam estratégias de dormência para sobreviverem em condições ambientais desfavoráveis, sendo a diapausa caracterizada por uma interrupção no metabolismo controlada por hormônios e a quiescência um metabolismo facultativo, que pode ser induzido por anidrobiose (falta de água), termobiose (alta temperatura), criobiose (baixa temperatura), anoxibiose (falta de oxigênio) e osmobiose (estresse osmótico) (BARRETT, 1991). Quando as condições ambientais são recuperadas os NEPs podem recuperar sua bioatividade (DENLINGER, 2002).

Os JIs possuem estratégias como a formação de cutícula dupla, obstrução das aberturas externas para evitar a entrada de produtos tóxicos, e utilização de reservas bioquímicas, principalmente glicogênio e lipídeos, para a sobrevivência durante a dormência (PATEL et al., 1997).

De forma geral os NEPs apresentam-se adaptados aos respectivos climas em que são encontrados. Dados apontam para uma maior abundância de steinernematídeos em regiões temperadas e heterorhabditídeos em solos tropicais e subtropicais apesar de que ambos podem ser encontrados em outras regiões (POPIEL; HOMINICK, 1992; LAWRENCE et al., 2006). Mukuka et al. (2010), analisaram populações naturais de *H. bacteriophora* expostos à altas temperaturas, e indentificaram uma faixa de tolerância de 33,3°C a 40,1°C, destacando que temperaturas mais altas podem afetar o crescimento, a infectividade e a reprodução de nematoides.

3.4. Obtenção e produção de nematoides entomopatogênicos

Os NEPs podem ser isolados e multiplicados em larga escala para pulverizações convencionais nos cultivos comerciais, oferecendo uma opção segura e limpa no controle de pragas agrícolas (NARDO et al. 2001; GREWAL et al., 2001). Esses organismos já estão sendo comercializados, principalmente nos Estados Unidos e na Europa, em especial para o controle de pragas de solo que ocorrem em ambientes protegidos (GAUGLER et al., 2000).

A busca pelo nematoide, para posterior isolamento e multiplicação, é realizada utilizando larvas vivas de insetos como iscas, geralmente *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera:

Tenebrionidae), que são monitoradas quanto à infecção. Após 2 a 5 dias de exposição, cadáveres com coloração amarelada ou avermelhada são coletados e transferidos para uma placa de Petri com papel filtro umedecido. Dentro de 3 a 7 dias os JIs começam a migrar devendo-se coletá-los vivos para preparar um estoque para re-inoculações. Em geral, os isolados de NEPs tropicais devem ser armazenados entre 12 e 22°C (SPIRIDONOV, 2017).

3.5. Nematoides entomopatogênicos no controle biológico

A partir dos anos 2000 a pesquisa com NEPs começou a ganhar força abrindo diversos campos de investigação, incluindo estudos de virulência às diversas pragas e comportamento em diferentes habitats (DOLINSKI, 2006a).

O potencial do uso dos NEPs no controle biológico já foi identificado para diferentes ordens de insetos e em diferentes cultivos agrícolas, como na cana-de-açúcar (TAVARES et al., 2007), porém ocorre de forma mais eficiente em insetos que apresentam pelo menos uma fase do seu desenvolvimento no solo ou em galerias.

O controle de coleópteros se mostrou eficiente na cultura da cana-de-açúcar, quando Giometti et al. (2011) testaram isolados de NEPs para o controle de adultos de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae) e confirmaram mortalidade de mais de 70% para um isolado de *Heterorhabditis*.

Dentre vários mecanismos utilizados para explicar a mortalidade dos insetos, um é a ineficiência do seu sistema imunológico. Manachini, Schillaci e Arizza (2013), identificaram que larvas de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae), não conseguem encapsular o *Steinernema carpocapsae*.

O controle de hemípteros também já foi investigado. Leite et al. (2005) estudaram o controle de ninfas de cigarrinha da cana, *Mahanarva fimbriolata* (Fabricius) (Hemiptera: Cercopidae), e verificaram uma mortalidade de até 100% causada por NEPs, além disso constataram que não houve diferença quanto ao método de controle químico, reafirmando a eficiência do controle biológico.

O interesse em diminuir as aplicações de agroquímicos e, assim, os altos custos de produção em culturas como avelãs e amêndoas despertou o interesse em incluir os NEPs como agentes de controle biológico (BRUCK; WALTON, 2007). Considerando o café também uma cultura de alto investimento, Alves et al. (2009) procuraram estabelecer uma concentração de NEPs para o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro, *Dysmicoccus*

texensis (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae), e encontraram altas mortalidades em condições de laboratório quando aplicados 100 JIs inseto⁻¹.

Ma et al. (2013), também buscaram selecionar uma concentração ideal de JIs para o controle de *Bradysia odoriphaga* (Yang e Zhang) (Diptera: Sciaridae), uma praga severa de *Allium tuberosum*, e determinaram que 75 JI/cm² leva a uma redução populacional da praga de até 94%.

Foelkel, Monteiro e Voss (2016) também avaliaram, em condições laboratoriais, a virulência de oito isolados de nematoides contra um díptero, *Anastrepha fraterculus* (Schiner) (Diptera: Tephritidae) constatando um controle de 90% na população do inseto.

Por outro lado Woltz et al. (2015) testando o controle de *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae), verificaram que nenhum dos nematoides testados - *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae* e *S. carpocapsae* - foi capaz de reduzir significativamente a população da praga.

Apesar dos estudos não serem direcionados somente ao controle de lepidópteros, estes são o maior foco das pesquisas. Dessa forma, Bellini e Dolinski (2012) testaram a eficiência do controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) utilizando *Heterorhabditis baujardi* e *S. carpocapse* pulverizados em área foliar e observaram a redução significativa dos danos causados nas plantas que receberam os nematoides.

Feaster e Steinkraus (1996) e Andaló et al. (2010), avaliaram o controle de pupas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) e *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) e confirmaram os altos índices de mortalidade. Esses insetos, assim como *E. lignosellus*, empupam no solo e é nesse momento que pode ocorrer o controle utilizando NEPs.

Partindo-se da hipótese de que os NEPs podem ser virulentos e utilizados no manejo da elasmobrânquia, o presente trabalho buscou através de diversos testes, respostas que contribuíssem para esse cenário, considerando que as respostas biológicas individuais, tanto dos insetos quanto dos nematoides, assim como suas interações, que dependem do ambiente e precisam ser investigadas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. J.; NGUYEN, K. B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (Ed.) **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, Oxon, UK, 2002. p. 1-33.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. Garland: New York, 1994. 1294 p.
- ALL, J. N.; GALLAHER, R. N.; JELLUM, M. D. Influence of planting date, preplanting weed control, irrigation, and conservation tillage practices on efficacy of planting time insecticide applications for control of lesser cornstalk borer in field corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 2, p. 265-268, 1979. <https://doi.org/10.1093/jee/72.2.265>
- ALL, J. H.; GARDNER, W. A.; SUBER, E. F.; ROGERS, B. Lesser cornstalk borer as a pest of corn and sorghum. In: TIPPINS, H. H. (Ed.). **A Review of information on the lesser cornstalk borer *Elasmopalpus lignosellus***. Athens: University of Georgia, 1982. p.33-46. (Publicação especial, 17).
- ALMENARA D. P. et al. Nematoides entomopatogênicos. In: Instituto nacional de ciência e tecnologia em entomologia molecular. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Sudeste: Winter, 2012. p 1-39.
- ALVES, V. S. et al. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a cochonilha da raiz do cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, Lavras, v. 76, n. 1, p.67-73, 2009.
- ANDALÓ, V. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1860-1866, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000151>
- BANU, J. G.; CANNAYANE, I.; MEENA, K. S. Entomopathogenic nematodes: general biology and behaviour. In: ABD-ELGAWAD, M. M.; ASKARY, T. H.; COUPLAND, J. (Ed.). **Biocontrol Agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes**. CABI, 2017. Cap. 4. p. 63-87.
- BARRETT, J. Anhydrobiotic nematodes. **Agricultural Zoology Reviews**, v. 4, p. 161-176, 1991.
- BARROS, R. **Pragas do milho safrinha**. Tecnologia e produção: milho safrinha e culturas de inverno 2009. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br/arquivos/materias/%7B78B60976-853F-4D84-9F3A-F4B2E6D4EEA3%7D_07_pragas_do_milho_safrinha.pdf>. Acesso em: 30 dez. 2017.
- BELLINI, L. L.; DOLINSKI, C. Foliar application of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) for the control of *Diatraea saccharalis* in greenhouse. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 997-1004, 2012. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n3p997>
- BESSIN, R. **The common stalk borer in corn**. Entomology, 2004. Disponível em:<<https://entomology.ca.uky.edu/ef100>>. Acesso em: 18 fev. 2018.

BIRD, A. F.; AKHURST, R. J. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. **International Journal of Parasitology**, v. 13, n. 6, p. 599-606, 1983. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(83\)80032-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(83)80032-0)

BODE, H. B. Entomopathogenic bacteria as source of secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 13, p. 224-230, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.02.037>

BONO, J. A. M.; RODRIGUES, A. P. D. C.; MAUAD, M.; ALBUQUERQUE, J. C.; CHERMOUTH, K. S.; FREITAS, M. E. Application of fertilizers nitrogenated in the quality physiologic of maize seeds. **Agrarian**, v. 1, n. 2, p. 91-102, 2008.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica**, v. 43, n. 5, p.363–375, 1997. <https://doi.org/10.1163/005025997X00102>

BRUCK, D. J.; WALTON, V. M. Susceptibility of the filbertworm (*Cydia latiferreana*, Lepidoptera: Tortricidae) and filbert weevil (*Curculio occidentalis*, Coleoptera: Curculionidae) to entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, n. 1, p. 93-96, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.012>

BUCKLER, E. S.; STEVENS, N. M. Maize Origins, domestication, and selection. In: MOTLEY, T. J.; ZEREGA, N.; CROSS, H. (Ed). **Darwin's harvest: new approaches to the origins, evolution, and conservation of crops**. New York: Columbia University Press. 2005. p. 67-90.

BUENO, A. H. P.; LINS JUNIOR, J. C.; MOINO JUNIOR, A.; SILVEIRA, L. C. P. Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável. **Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras**, 2011.

BUSOLI, A. C.; LARA, F. M.; NUNES JUNIOR, D.; GUIDI, M. Preferências de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller 1848) (Lepidoptera: Phycitidae) por várias culturas. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v. 6, p. 73-79, 1977.

CAGNOLO, S. R.; DONARI, Y. M.; DI RIENZO, J. A. Existence of infective juveniles in the offspring of first and second generation adults of *Steinernema rarum* (OLI strain): evaluation of their virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 1, p. 33–39, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.008>

CAMPBELL, J. F.; KAYA, H. K. Variation in entomopathogenic nematode (Steinernematidae and Heterorhabditidae) infective stage jumping behavior. **Nematology**, v. 4, n. 4, p. 471–482, 2002. <https://doi.org/10.1163/156854102760290455>

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/...milho/.../15276_b4ee896301d68c25e69736267e7c5007>. Acesso em: 28 ago. 2018.

- CHAPIN, J. W. **Lesser cornstalk borer on peanut**. Entomology insect information series. 1999. Disponível em: <<http://entweb.clemson.edu/eiis/pdfs/ag21.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2018.
- CHITTENDEN, F. H. The smaller cornstalk borer (*Elasmopalpus lignosellus* Zell.). **USDA Division Entomology Bulletin**. 23. p. 17-22, 1980.
- CICHE, T. A.; ENSIGN, J. C. For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, n. 4, p. 1890–1897, 2003.
- CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J.; SANTOS, J. P. Efeito de diversos inseticidas no controle da lagarta-elasma em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 18 p. 1293-1301, 1983.
- DALVI, L. P. et al. Compatibility of biological agents to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Agrarian**, v. 4, n. 12, p. 79-83, 2011.
- DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. **Wormbook**, p. 1-8, 2006. <http://dx.doi.org/10.1895/wormbook.1.41.1>
- DENLINGER, D. L. Regulation of diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 93–122, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145137>
- DEPEC - DEPARTAMENTO DE PESQUISAS E ESTUDOS ECONÔMICOS. **Milho**. Junho de 2017. Disponível em: <http://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_milho.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- DOLINSKI, C. Uso de nematoides entomopatogênicos no controle de pragas agrícolas. In: VENZON, M., PAULA JÚNIOR, T.J., PALLINI, A. (Ed.) **Tecnologias alternativas para o controle de pragas de doenças**. 1. ed. Viçosa. 2006a. p. 261-289.
- DOLINSKI, C. Nematoides como agentes do controle biológico de insetos. In: OLIVEIRA FILHOS, E. C.; MONNERAT, R. G. **Fundamentos para regulação de semioquímicos inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: EMBRAPA, 2006b. Cap. 4, p. 73-101.
- DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 79-98.
- DUNPHY, G. B.; THURSTON, G. S. Insect immunity. In GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC Press, 1990, p. 301-326.
- DUPREE, M. Observations on the life history os the Lesses cornstalk borer. **Journal of Economic Entomology**, v. 58, n. 6, p. 1156-1157, 1965. <https://doi.org/10.1093/jee/58.6.1156>
- ELSWORTH, B.; WASMUTH, J.; BLAXTER, M. NEMBASE4: The nematode transcriptome resource. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 8, p. 881-894, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.009>.

FEASTER, M. A.; STEINKRAUS, D. C. Inundative biological control of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema riobraviss* (Rhabditida: Steinernematidae). **Biological Control**, v. 7, n. 1, p. 38-46, ago. 1996. <http://dx.doi.org/10.1006/bcon.1996.0061>

FERREIRA, E.; BARRIGOSSO, J. A. F. Field technique for infesting rice with *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) and evaluating insecticide treatments. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 367-371, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2003000200030>

FERREIRA, E.; BARRIGOSSO, J. A. F. **Insetos orizívoros da parte subterrânea**. 52 p. 2006. (Documento EMBRAPA, 190). Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAP/25058/1/doc_190.pdf> Acesso em: 29 jan. 2018.

FERREIRA, E.; MARTINS, J. F. da S. **Insetos prejudiciais ao arroz no Brasil e seu controle**. 67 p., 1984. (documento EMBRAPA, 11).

FOELKEL, E.; MONTEIRO, L. B.; VOSS, M. Virulence of nematodes against larvae of the south-American fruit fly in laboratory using soil from Porto Amazonas, Paraná, Brazil, as substrate. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 405-410, 2016.

FORST, S.; CLARKE, D. J. Nematode-bacterium symbiosis. In: Gaugler, R. (Ed.) **Entomopathogenic Nematology**. CABI, Wallingford, UK, 2002. p. 57-77.

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

GAUGLER, R. et al. Quality assessment of commercially produced entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 17, n. 1, p. 100-109, 2000. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0768>

GAUGLER, R. **Entomopathogenic Nematology**. New Jersey: CABI, 2002. 393 p.

GILL, H. K. et al. Mulch as a Potential Management Strategy for Lesser Cornstalk Borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Insecta: Lepidoptera). **Florida Entomologist**, v. 93, n. 2, p. 183-190, jun. 2010. <https://doi.org/10.1653/024.093.0206>

GILL, H. K., CAPINERA, J. L.; MCSORLEY, R. **Lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)**. EENY-155, Entomology & Nematology Department, University of Florida, Gainesville, FL. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/IN312>> Acesso em: 2017.

GIOMETTI, F. H. C. et al. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera). **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 81-86, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000100013>

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

GREWAL, P. S.; EHLERS, R. U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. **Nematodes as biocontrol agents**. CAB International, Wallingford, UK. 2005.
<http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v39i4.32707>

HUNT, D. J. Introduction. In: NYGUEN, K. B.; HUNT, D. J. (ed.). **Entomopathogenic nematodes: systematic, phylogeny and bacterial symbionts**. Leiden, Brill, 2007. p.126.

JOHNSON, S. J.; SMITH JR., W. Biology of *Orgilus elasmopalpi* (Hym.: Braconidae) with *Elasmopalpus lignosellus* (Lep.: Pyralidae) as host. **Entomological Society of America**, v. 73, n. 5, p. 572-575, 1980. <https://doi.org/10.1093/aesa/73.5.572>

JORDÃO, B. A. et al. Efeito de métodos de preparo do solo e plantio de milho nos danos causados pela lagarta elasma (*Elasmopalpus lignosellus* Zeller, 1848), (Lepidoptera: Pyralidae). **Revista Técnica Anual**. CNPMS/EMBRAPA, p. 65. 1992.

KAYA, H. K.; BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. An overview of insect-parasitic and entomopathogenic nematodes. In: BEDDING, R.A.; AKHURST, R.J; KAYA, H.K. (Ed.) **Nematodes and the biological control of insect pests**. East Melbourne: CSIRO Publications, 1993. p. 1-10.

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

KISHINO, K. **Estudo da biologia e controle de *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera, Phycitidae) em regiões de cerrado**. In: Relatório parcial do projeto da cooperação em pesquisa agrícola nos cerrados do Brasil. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF. Embrapa/CPAC Cerrados – Japan Internacional Cooperation Agency – JICA, p.45-81, 1981.

KONDO, E.; ISHIBASHI, N. Nictating behavior and infectivity of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., to the larvae of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), on the soil surface. **Applied Entomology and Zoology**. v. 21, n. 4, p. 553-560, 1986. <https://doi.org/10.1303/aez.21.553>

LAMBSHEAD, P. J. D. Recent developments in marine benthic biodiversity research. **Oceanis**, v. 19, n. 6, p. 5-24, jan. 1993.

LAWRENCE, J. L.; HOY, C. W.; GREWAL, P. S. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. **Biological Control**, v. 37, n. 3, p. 247-255, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.02.002>

LEITE, L. G. et al. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000500010>

LEITE, L. G. et al. Effect of inoculum age and physical parameters on in vitro culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 6, p. 686-695, 2016. <http://dx.doi.org/10.1017/s0022149x16000821>

LEMES, A. R. N. et al. Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **Peerj**, v. 5, p. 28-66, 2017. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.2866>

LEWIS, E. E. Behavioural ecology. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 205-223.

MA, J. et al. Efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) against the chive gnat, *Bradysia odoriphaga*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 3, p. 551-561, 19 abr. 2013.

MACK, T. P.; BACKMAN, C. B. Effects of temperature and adult age on the oviposition rate of *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller), the lesser cornstalk borer. **Environmental Entomology**, v. 13, n. 4, p. 966-969, 1984. <https://doi.org/10.1093/ee/13.4.966>

MAGRI, D. C. **Efeito da fumaça e de cinzas na biologia reprodutiva da *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae)**. 1998. 42p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MANACHINI, B.; SCHILLACI, D.; ARIZZA, V. Biological responses of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) to *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal Of Economic Entomology**, v. 4, n. 106, p. 1582-1589, 2013.

MARTINS, J. F. da S. et al. **Situação do manejo integrado de insetos-praga na cultura do arroz no Brasil**. Pelotas: (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 290, 2009.

MCDOWELL, J. M. et al. Biological activity of *Beauveria bassiana* *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on leaf substrates and soil. **Environmental Entomology**, v. 19, n. 1, p. 137-141, 1990. <http://dx.doi.org/10.1093/ee/19.1.137>

MOAR, W. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; MACK, T. P. Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from *Bacillus thuringiensis* against Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 88, n. 3, p. 606-609, 1995. <https://doi.org/10.1093/jee/88.3.606>

MUKUKA, J. et al. Heat tolerance among different strains of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. **Biocontrol** v. 55, n. 3, p. 423-434, 2010.

NARDO, E. A. B.; AGUILLERA, M.M.; GREWAL, P.S. **Pragas brasileiras de solo com potencial de serem controladas com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae)**. In: Reunião sul-brasileira de pragas de solo, 8.; 2001, Londrina. Anais. Londrina: Embrapa Soja, 2001.p.273-278. (Embrapa Soja. Documentos, 172).

NGUYEN, K. B. et. al. Caracterização taxonômica e biológica de *Steinernema rarum* encontrado no sudeste dos Estados Unidos. **Journal of Nematology**, v. 38, n. 1, p. 28-40, 2006.

- NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. Entomopathogenic nematodes; Systematics, Phylogeny and bacterial symbionts. **Nematology Monographs and Perspectives**. v. 5, 2007, 816p.
- NUESSLY, G. S.; WEBB, S. E. Insect Management for Sweet corn. 2001. University of Florida, Gainesville. Disponível em: < <http://edis.ifas.ufl.edu/>> Acesso em: 13 dez. 2017.
- OLIVEIRA JR, L. F. G. et al. Seleção de genótipos de milho mais promissores para o consumo in natura. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.1, p. 159-166, 2006.
- PARON, M. R.; QUINTELA, E.D. Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* sobre ovos de *Elasmopalpus lignosellus* em arroz. In: Congresso da cadeia produtiva de arroz, reunião nacional de pesquisa de arroz, 2002. **Anais**. p. 493-495. (Embrapa Arroz e feijão. Documentos, 134).
- PATEL, M. N., PERRY, R. N., WRIGHT, D. J. Desiccation survival and water contents of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology** v. 27, n. 1, p. 61-70, 1997.
- PAVÃO, A. R.; FERREIRA FILHO, J. B. de S. Impactos econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n.1, p. 81-108, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-20032011000100004>
- PEREIRA, C. *Rhabditis hambletoni* n.sp., nema aparentemente semiparasito da “bróca do algodoeiro” (*Gasterocercodes brasiliensis*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 8, p. 214-230, 1937.
- PINTO, A. S.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos do milho e sorgo**. Ribeirão Preto. Livraria PLD, 2004. 108 p.
- PIRES, C. S. S. et al. Avaliação no campo do feromônio sexual sintético de *Elasmopalpus lignosellus* (Lepdoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 21, n. 1, p. 59-68, 1992.
- POINAR JR, G. O. The presence of *Achromobacter nem atophilus* in the infective stage of a *Neoplectana* sp. (Steinernematidae: Nematoda). **Nematologica** v. 12, p. 105–108, 1966.
- POINAR JR, G.O. **Nematodes for biological control of insects**. Boca Raton: CRC, 1979.
- POINAR JR, G. O. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids. *Heterorhabditis* and *Steinernema*. **Fundamental & Applied Nematology**. v. 16, n. 4, p. 333-338, 1993.
- POINAR, G. O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Press Inc. Boca Raton, Florida, 1990. p. 23-60.
- POPIEL, I; HOMINICK, W. M. Nematodes as biological control agents: part II. **Advances in Parasitology**, v. 31, p. 381-431, 1992.

- SANDHU, H. S. et al. Effects of *Elasmopalpus lignosellus* damage on sugarcane yield. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 2, p. 474-483, 2011.
- SANDHU, H. S. et al. Temperature-dependent reproductive and life table parameters of *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) on sugarcane. **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 380-390, 2013. <http://dx.doi.org/10.1653/024.096.0258>
- SCHROEDER, W. J.; BEAVERS, W. M. Laboratory bioassays and field trials of entomogenous nematodes for control of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in citrus. **Environmental Entomology**, v. 16, n. 4, p. 987-989, 1987. <https://doi.org/10.1093/ee/16.4.987>
- SILVA A. B.; BESERRA, E. B.; DANTAS, J. P. Utilização de *Metarhizium anisopliae* e extratos vegetais para o controle de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepdoptera: Noctuidae) em milho. **Engenharia Ambiental**, v. 5, p. 77-85, 2008.
- SILVA, M. T. B. et al. Influência de sistemas de manejo de solos e de culturas sobre insetos subterrâneos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 1994.
- SPIRIDONOV, S. E. Entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae: morphology and taxonomy. In: ASKARY, T. H. (Ed.). **Biocontrol agents: entomopathogenic and slug parasitic nematodes**. Boston: CABI, 2017. Cap. 3. p. 45-62.
- STONE, K. J. Reproductive biology of the lesser cornstalk borer. I Rearing technique. **Journal of Economic Entomology**, v. 61, n. 6, p. 1712-1714, 1968. <https://doi.org/10.1093/jee/61.6.1712>
- STUART, R. J.; GAUGLER, R.; GEORGIS, R. Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 74, n. 1, p. 164-170, 1996.
- SULEIMAN, K. **Pragas iniciais da soja**: Os cuidados devem começar antes da semeadura. Informações Tecnológicas, 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_3/PragasSoja/index.htm>. Acesso em: 10 dez. 2017.
- TAVARES, F. M. et al. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2007.
- TIPPINS, H. H. **A review of information on the Lesser Cornstalk Borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller)**. Athens: University of Georgia (Special Publication, 17) 1982, 64 p.
- VIANA, P. A. **Effect of soil moisture, substrate color and smoke on the population dynamics and behavior of the lesser comstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus*, Zeller 1848 (Lepidoptera: Pyralidae)**. 120 f. Tese (Doutorado) - Purdue University, West Lafayette, 1981.

VIANA, P. A. Lagarta-elasma. In: SALVADORI, J. R., ÁVILA, C. J., SILVA, M. T. B. **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo. 2004. p. 379-408.

VIANA, P. A. **Manejo de elasma na cultura do milho**. Circular Técnica EMBRAPA. Sete Lagoas, MG. 2009.

VIANA, P. A.; COSTA, E. F. da. **Manejo da lagarta elasma, *Elasmopalpus lignosellus* na cultura do milho, através da umidade do solo**. 1993. v. 5, 59 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/474693/manejo-da-lagarta-elasma-elasmopalpus-lignosellus-na-cultura-do-milho-atraves-da-umidade-do-solo>>. Acesso em: 10 out. 2017.

VIANA, P. A.; MENDES, S.M. Lagarta-elasma **Principais pragas subterrâneas do milho no Brasil**. p. 9, 2011.

VILELLA, F. M. F. et al. Resistance of Bt transgenic maize to lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Florida Entomologist**, v. 85, p. 652-653, 2002.

VOOS, M. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. 2009. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do119.pdf. Acesso em: 20 mai. 2018.

WANG, J. X., BEDDING, R. A. Population development of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* in the larvae of *Galleria mellonella*. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, p. 363–367, 1996.

WOLTZ, J. M.; DONAHUE, K. M.; BRUCK, D. J.; LEE, J. C. Efficacy of commercially available predators, nematodes and fungal entomopathogens for augmentative control of *Drosophila suzukii*. **Journal Of Applied Entomology**, v. 139, n. 10, p. 759-770, 2015. <https://doi.org/10.1111/jen.12200>

WOOD, W. B. (Ed.). **The nematode *Caenorhabditis elegans***. 17. ed. Cold Spring Harbor, 1988. 678 p.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques. Arkansas: **Agricultural Experiment Station Cooperative Bulletin**, 1988. 30 p.

XAVIER, L. M. S. et al. *Trichogramma pretiosum* attraction due to the *Elasmopalpus lignosellus* damage in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 578-585, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000600002>

ZORZETTI, J. et al. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains active against *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae). **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 39, n. 4, p. 417-425, 2017.

CAPÍTULO 2

VIRULÊNCIA DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A *Elasmopalpus lignosellus* EM LABORATÓRIO

RESUMO

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Virulência de nematoides entomopatogênicos a *Elasmopalpus lignosellus* em laboratório.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

O objetivo desse estudo foi avaliar a virulência de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre pupas e lagartas de *Elasmopalpus lignosellus*, assim como, ajustar a concentração ótima de aplicação do nematoide mais virulento em condições de laboratório. Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia. Foi avaliada a virulência de cinco isolados, *Heterorhabditis amazonensis* MC01, *H. amazonensis* JPM3, *H. amazonensis* GL, *Steinernema carpocapsae* All, *Heterorhabditis* sp. Nepet 11 sobre pupas e lagartas de *E. lignosellus*. Os isolados foram aplicados na concentração de 100 JI inseto⁻¹ em suspensão aquosa em placas de petri contendo 10 lagartas ou 10 pupas cada. O tratamento controle recebeu somente água destilada. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas por três dias. Os dados foram analisados e as médias foram comparadas pelos testes de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Posteriormente foram testadas quatro concentrações, 50, 100, 150 e 200 JI inseto⁻¹ de *H. amazonensis* GL para pupas e de *H. amazonensis* MC01 para lagartas de *E. lignosellus*. O tratamento controle recebeu aplicação somente de água destilada. Foi aplicado sobre o papel filtro 1 mL de suspensão aquosa nas respectivas concentrações com cinco repetições. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D. a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% UR e 24 h de escuro em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. A contagem de pupas mortas foi realizada após 24, 48 e 72 h da mesma forma para lagartas acrescentando-se uma análise após 96 h. Os dados que seguiram distribuição normal foram submetidos à análise de regressão e os que não seguiram foram ajustados a um Modelo Linear Generalizado com distribuição binomial. O teste de virulência mostrou que após 72 horas da aplicação dos isolados os nematoides *H. amazonensis* MC01 e *S. carpocapse* All foram igualmente virulentos diferindo dos demais reduzindo a população de lagartas em mais de 90%. Para pupas o isolado *H. amazonensis* GL se destacou dos demais causando uma mortalidade de 94% após 48 h. A concentração de *H. amazonensis* MC01 que causou a maior mortalidade (78,7%) de lagartas após 96 h de exposição foi de aproximadamente 182 JIs lagarta⁻¹. Já a mortalidade de pupas alcançou 100% após 72 h da aplicação de *H. amazonensis* GL numa concentração de 151 JI pupa⁻¹.

Palavras-chave: controle biológico, *Heterorhabditis*, manejo integrado de pragas, proteção de plantas, *Steinernema*.

ABSTRACT

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Virulence of entomopathogenic nematodes to *Elasmopalpus lignosellus* in laboratory.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

The objective of this study was to evaluate the virulence of entomopathogenic nematode isolates on pupae and caterpillars of *Elasmopalpus lignosellus*, as well as to adjust the optimum concentration of application of the most virulent nematode under laboratory conditions. The tests were conducted in the laboratory of Entomology of the Federal University of Uberlândia. The virulence of five isolates, *Heterorhabditis amazonensis* MC01, *H. amazonensis* JPM3, *H. amazonensis* GL, *Steinernema carpocapsae* All, *Heterorhabditis* sp. Nepet 11 on *E. lignosellus* pupae and caterpillars was evaluated. The isolates were applied at the concentration of 100 IJ insect⁻¹ in aqueous suspension in petri dishes containing 10 caterpillars or 10 pupae each. The control treatment received only distilled water. Evaluations were performed every 24 hours for three days. Data were analyzed and means were compared by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$). Subsequently, four concentrations, 50, 100, 150 and 200 IJ insect⁻¹ of *H. amazonensis* GL for pupae and of *H. amazonensis* MC01 for *E. lignosellus* caterpillars were tested. The control treatment received application only of distilled water. 1 mL of aqueous suspension was applied to the filter paper at respective concentrations with five replicates. The experiments were kept in a climatic chamber type B.O.D. at 25 ± 2 ° C, 70% RH and 24 h of dark in a completely randomized design with five replicates. The dead pupae count was performed after 24, 48 and 72 h in the same way for caterpillars, with an analysis after 96 h. Data that followed normal distribution were submitted to regression analysis and those that did not follow were fitted to a Generalized Linear Model with binomial distribution. The virulence test showed that after 72 hours of application the nematodes *H. amazonensis* MC01 and *S. carpocapse* All were equally virulent differing from the others, reducing the caterpillar population by more than 90%. For pupae the isolate *H. amazonensis* GL stood out from the others causing a mortality of 94% after 48 h. The concentration of *H. amazonensis* MC01 that caused the highest mortality (78.7%) of caterpillars after 96 h of exposure was approximately 182 IJ caterpillar⁻¹. The pupae mortality reached 100% after 72 h of the application of *H. amazonensis* GL at a concentration of 151 IJ pupae⁻¹.

Keywords: biological control, crop protection, *Heterorhabditis*, integrated pest management, *Steinernema*.

1. INTRODUÇÃO

A lagarta-elasma, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) é uma praga polífaga, que se alimenta de várias espécies de plantas com altos valores econômicos (VIANA, 2004). No milho as lagartas penetram no caule e danificam plantas recém-emergidas reduzindo o número de mudas por área de plantio (GALLO et al., 2002).

Por se localizarem no interior das plântulas ou em casulos construídos de teia e partículas de solo e permanecerem próximas ao caule seu manejo é dificultado. O desenvolvimento de novas estratégias de manejo utilizando inimigos naturais para a lagarta-elasma iniciou-se na década de 1980 (JHAM et al., 2005, 2007). Apesar disso, o método ainda mais utilizado no seu controle é o químico que em função do uso incorreto pode trazer sérios problemas derivados da falta de especificidade do produto e de seu acúmulo no ambiente, levando a problemas de poluição e ao desenvolvimento de populações resistentes (NERI et al., 2005).

Diversos organismos entomopatogênicos podem ser utilizados no controle de pragas, como fungos, vírus e bactérias (VALADARES-INGLIS et al., 1998). Dentre os organismos estudados para o controle populacional de *E. lignosellus*, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) apresentam grande potencial, por serem encontrados e sobreviverem no solo com capacidade de manter sua viabilidade e conseqüentemente permanecerem ativos promovendo um controle prolongado de larvas em diferentes ínstares (GREWAL et al., 2001).

Antes dos testes de campo, a virulência das populações de nematoides contra os insetos-alvo devem ser avaliadas, uma vez que existem evidências de que as populações de nematoides apresentam virulência distinta entre diferentes hospedeiros. A concentração ideal de NEPs que causa a mortalidade por pragas também varia (KAYA; HARA, 1981; FUXA et al., 1988).

Portanto, objetivou-se selecionar NEPs em condições de laboratório com base na mortalidade causada a pupas e lagartas de *E. lignosellus*, assim como, ajustar a concentração ótima de aplicação do nematoide mais virulento nessas mesmas condições.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Criação de *Elasmopalpus lignosellus* em laboratório

Para início da criação de *E. lignosellus*, uma massa de ovos foi obtida na empresa Herbae Consultoria e Projetos Agrícolas Ltda., localizada em Jaboticabal/SP. Os insetos foram criados no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia de acordo com a metodologia Andrade (2013).

Os papéis filtro contendo os ovos foram armazenados em placa plásticas tipo Gerbox[®] (15 cm de largura x 2 cm de altura) tampadas e armazenadas em B.O.D. a 27°C, 12 horas de fotoperíodo e 15% de umidade. Diariamente, à medida que os ovos eclodiram, as lagartas de primeiro ínstar foram transferidas para potes plásticos de 100 mL contendo dieta artificial. Sobre as lagartas foi adicionada uma camada de aproximadamente 2 cm de vermiculita autoclavada (120°C, 1 atm, 20 min), a fim de tornar o ambiente de criação semelhante às condições que o inseto se encontra na natureza para construção de abrigos larvais. Os potes foram fechados com tampas previamente furadas (aproximadamente 15 furos) com um alfinete para ventilação do ambiente interno (Figura 1) e mantidos nas mesmas condições dos ovos.

FIGURA 1 - Criação de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* em potes plásticos com dieta artificial e vermiculita.

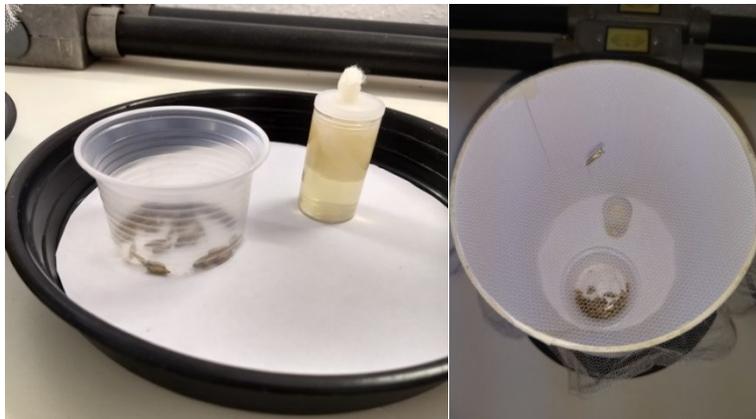


Após aproximadamente 25 dias as pupas foram retiradas das câmaras pupais e transferidas para gaiolas cilíndricas de PVC (15 cm x 20 cm) previamente forradas nas

laterais e no fundo com papel filtro, para facilitar a postura e coleta dos ovos, e tampadas na parte superior com tule.

Após a emergência, os adultos foram sexados tomando como base a coloração das asas, sendo mantidos 15 casais por gaiola. Para a alimentação dos adultos foi fornecida uma solução aquosa de mel a 10%, acondicionada em potes plásticos de 10 mL com tampa perfurada contendo um algodão em contato com a solução, dessa forma à medida que os adultos se alimentavam por capilaridade o algodão permanecia umedecido. A solução foi substituída a cada dois dias ou conforme a necessidade (Figura 2).

FIGURA 2 – Gaiola para postura de ovos contendo pupas e dieta dos adultos de *Elasmopalpus lignosellus*.



Diariamente, ou a cada dois dias, conforme a quantidade e coloração dos ovos, as folhas de papel filtro foram recolhidas e substituídas por novas. Estas foram recortadas de acordo com a disposição dos ovos e armazenadas novamente em placas plásticas tipo Gerbox[®] tampadas, reiniciando o ciclo.

A dieta utilizada na criação seguiu a dieta Chalfant (1975), modificada (Anexo I), sendo que não foram adicionadas a tetraciclina e a mistura de Vanderzant's e acrescentou-se ácido benzoico e óleo de milho. Estas eram preparadas um dia antes de serem utilizadas, e posteriormente mantidas em geladeira (8 a 10°C), para ser utilizada durante o período de criação de lagartas de uma geração.

2.2. Multiplicação dos nematoides entomopatogênicos

Os NEPs utilizados nos experimentos foram obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo. Para obtenção de juvenis infetantes (JI) recém-emergidos foi realizada a

multiplicação a partir dos nematoides armazenados em câmara climatizada B.O.D. a $16 \pm 2^\circ\text{C}$, em larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), criadas de acordo com metodologia de Potrich et al. (2007). As larvas mortas com sintomas de infecção foram colocadas em câmara seca (placa de Petri com papel filtro), durante cinco dias, as quais foram retiradas após esse período e colocadas em armadilhas de White (1927) para coletar os JI, de acordo com a metodologia de Molina e López (2001). Foram utilizados nos experimentos os JIs de até 3 dias após o início da emergência e que permaneceram armazenados em B.O.D. a $16 \pm 2^\circ\text{C}$ até a instalação do experimento no máximo por até 5 dias.

2.3. Seleção de nematoides entomopatogênicos a lagartas e pupas de *Elasmopalpus lignosellus*

Cinco isolados de nematoides, quatro do gênero *Heterorhabditis* e um *Steinernema*, foram testados sobre lagartas e pupas de *E. lignosellus* em condições de laboratório, avaliando-se a virulência desses organismos sobre a praga.

Cada ensaio contou com seis tratamentos, sendo cinco isolados e o controle. A viabilidade inicial dos JIs das suspensões de cada isolado foi aferida antes da aplicação. Os isolados testados tanto para pupas quanto para lagartas foram *Heterorhabditis amazonensis* MC01, *H. amazonensis* JPM3, *H. amazonensis* GL, *Steinernema carpocapsae* All e *Heterorhabditis* sp. Nepet 11.

Para o primeiro ensaio foram utilizadas dez lagartas de 2º e 3º instar de *E. lignosellus*, e para o segundo dez pupas de 3 a 5 dias, todos dispostos em placas de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) forradas com duas folhas de papel filtro contendo um bloco de aproximadamente 8 cm³ de dieta artificial nas placas com lagartas (Figura 3).

FIGURA 3 – Lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* dispostas em placas de Petri com dieta artificial.



Para cada isolado foi aplicado 1 mL por placa de suspensão do nematoide na concentração de 100 JI pupa⁻¹ emergidos de até 3 dias, armazenados por até 5 dias. Para o preparo das suspensões foi contabilizado com auxílio de microscópio estereoscópio a quantidade de JI existentes em cada μl das suspensões preexistentes dispostas em placas tipo Elisa. Foram realizadas cinco repetições totalizando 30 placas para cada ensaio, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. As placas foram fechadas com Parafilm[®] e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% UR e 24 h de escuro. As avaliações de mortalidade foram feitas após 24, 48 e 72 h. As pupas e lagartas mortas foram mantidas em B.O.D. a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ em câmara seca por quatro dias para posterior dissecação, sendo então, observadas em microscópio estereoscópio para confirmação da mortalidade pelo nematoide.

Os dados que seguiram distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com comparação entre as médias obtidas para cada nematoide pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os dados que não seguiram distribuição normal foram ajustados aos modelo Linear Generalizado com distribuição binomial, utilizando teste de Tukey generalizado para comparação das médias ($p \leq 0,01$) selecionando o nematoide considerado mais virulento, em função da mortalidade causada nas larvas, para continuidade dos testes.

Os pressupostos, normalidade, aditividade, homocedasticidade e independência dos resíduos, foram testados antes de aplicar a análise de variância feita no software Sisvar (FERREIRA, 2011).

2.4. Adequação da concentração de nematoides entomopatogênicos a lagartas e pupas de *Elasmopalpus lignosellus*

Foram testadas quatro concentrações de *H. amazonensis* GL para pupas, e de *H. amazonensis* MC01 para lagartas de *E. lignosellus*.

Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições do ensaio anterior, sendo que utilizou-se lagartas de 3º e 4º instar.

Os experimentos contaram com cinco tratamentos cada, sendo quatro concentrações, 50, 100, 150 e 200 JI pupa⁻¹ de *H. amazonensis* GL e 50, 100, 150 e 200 JI lagarta⁻¹ de *H. amazonensis* MC01 e o tratamento controle que recebeu aplicação somente de água destilada. Foi aplicado sobre o papel filtro 1 mL de suspensão aquosa nas respectivas concentrações com cinco repetições, totalizando 25 placas cada experimento. Foram utilizados JIs emergidos de até 3 dias, armazenados por até 5 dias. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada tipo B.O.D. a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% UR e 24 h de escuro.

A contagem de pupas mortas foi realizada após 24, 48 e 72 h da mesma forma para lagartas acrescentando-se uma análise após 96 h. Para confirmação da mortalidade pelo nematoide, as placas foram mantidas em B.O.D. a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em câmara seca por 4 dias, sendo os insetos posteriormente dissecados, observando-se com auxílio de microscópio estereoscópio a presença de nematoides.

Os dados que seguiram distribuição normal foram submetidos à análise de regressão para selecionar a melhor concentração de aplicação do nematoide em relação à mortalidade causada às pupas e lagartas de *E. lignosellus*. Os dados que não seguiram distribuição normal foram ajustados a um Modelo Linear Generalizado com distribuição binomial.

3. RESULTADOS

3.1. Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos a lagartas de *Elasmopalpus lignosellus*

Após 24 horas não houve mortalidade de lagartas por isso esperou-se mais 24 h e analisou-se os dados de 48 h. Houve diferença significativa entre a mortalidade de lagartas observada no controle e pelos tratamentos ($F_c = 57,88$, $GL\text{-tratamento} = 5$, $GL\text{-resíduo} = 24$ e $P\text{-valor} = 0,00$).

O comportamento dos dados foi avaliado e os pressupostos estatísticos foram atendidos, sendo assim, utilizou-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Todos os nematoides testados causaram mortalidade das larvas de *E. lignosellus*, diferindo do controle na qual foi observada baixa mortalidade por eventos naturais. Além disso, não foi observada diferença de virulência entre os isolados, sendo que após 48 h todos causaram mortalidade superior a 60% (Tabela 1).

TABELA 1 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* após 48 horas da aplicação de isolados de nematoides entomopatogênicos.

Tratamento	Mortalidade (%) ¹
<i>Heterorhabditis</i> sp. Nepet 11	76,0 ± 5,09 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	72,0 ± 3,74 a
<i>Steinernema carpocapsae</i> All	72,0 ± 3,74 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> GL	68,0 ± 3,74 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> JPM3	60,0 ± 3,16 a
Controle	2,0 ± 2,00 b

CV (%) = 14,17

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Média ± Erro Padrão (M).

Nas mesmas condições de laboratório Giometti et al. (2011) selecionaram 4 nematoides mais virulentos para adultos de *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae), no entanto, a mortalidade máxima observada foi de 30%, mostrando a necessidade de se testar a virulência de cada isolado para hospedeiros específicos.

Os dados coletados após 72 h não seguiram distribuição normal, sendo assim, aplicou-se teste de Tukey generalizado a 5% de probabilidade.

Os isolados que apresentaram maior virulência causando uma mortalidade superior a 90% foram *S. carpocapse* All e *H. amazonensis* MC01 não diferindo entre si (Tabela 2).

TABELA 2 - Porcentagem de mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* após 72 horas da aplicação de isolados de nematoides entomopatogênicos.

Tratamento	Mortalidade (%) ¹
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	92,0 ± 3,83 a
<i>Steinernema carpocapsae</i> All	90,0 ± 4,24 a
<i>Heterorhabditis</i> sp. Nepet 11	80,0 ± 5,65 b
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> GL	72,0 ± 6,35 b
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> JPM3	68,0 ± 6,59 b
Controle	2,0 ± 1,98 c

CV (%) = 13,96

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey generalizado a 5% de probabilidade. Média ± Erro Padrão (M).

Apesar disso, apenas *H. amazonensis* MC01 foi escolhido para a continuidade dos testes em função de ser um nematoide nativo e isolado da região de Monte Carmelo, MG, sendo adaptado às condições de Cerrado e podendo, portanto, apresentar bom comportamento de sobrevivência e busca pelo inseto no solo. Já *S. carpocapse* All além de não ser um isolado nativo é um nematoide que não apresenta um bom deslocamento horizontal no solo o que poderia influenciar negativamente na busca pelo inseto no campo.

Quando aplicados sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), *H. amazonensis* apresentou maior eficiência no controle quando comparado ao *S. arenarium*, já que esse possui uma maior capacidade de busca pelos insetos (ANDALÓ et al., 2012).

Além disso alguns testes indicam uma menor virulência dos steinernematídeos provavelmente devido, entre outros fatores, ao maior tamanho desses nematoides comparados aos heterorhabditídeos, o que pode dificultar a penetração nas aberturas naturais dos insetos. Os heterorhabditídeos, além de serem menores, possuem pequenos apêndices na região cefálica que os permitem penetrar no inseto também rompendo o seu tegumento, pelas regiões membranosas que oferecem pouca resistência (GEDEN et al., 1985).

Scheepmaker et al. (1998) justificaram os resultados insatisfatórios na mortalidade de larvas de *Magaselia halterata* (Wood) (Diptera: Phoridae) inoculadas com *Steinernema feltiae* pelo fato do nematoide ser maior que os esperiláculos e outras aberturas naturais do inseto.

Além disso, outros trabalhos demonstram maior virulência de heterorhabdítidos em testes com larvas de *Bradysia mabiusi* (Lane) (Diptera: Sciaridae) (TAVARES et al., 2012), larvas de *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) (BEDDING; MILLER, 1981; DORSCHNER et al., 1989), larvas e pupas de *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera.: Curculionidae) (BÉLAIR et al., 2005), adultos de *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera.: Curculionidae) (ROSALES; SUÁREZ, 1998), larvas de *Popillia japonica* (Newman) (Coleoptera: Scarabaeidae) (WRIGHT et al., 1988), adultos de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) (ALVES et al., 2009), ninfas de *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) (LEITE et al., 2005), pupas de *Frankiniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) (CHYZIK et al., 1996) e larvas de *S. frugiperda* (SALVADORI et al., 2012)

3.2. Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos a pupas de *Elasmopalpus lignosellus*

Assim como no ensaio anterior, na avaliação realizada após 24 h não foi observada mortalidade de pupas, por isso, a análise foi feita com os dados coletados após 48 h. A mortalidade causada pelos isolados diferiu estatisticamente da causada pelo tratamento controle ($F_c = 85,67$, $GL\text{-tratamento} = 5$, $GL\text{-resíduo} = 24$ e $P\text{-valor} = 0,00$).

Os dados atenderam aos pressupostos estatísticos para a aplicação do teste paramétrico, dessa forma as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Nas condições testadas, o isolado que apresentou maior virulência (94%) foi *H. amazonensis* GL (Tabela 3).

TABELA 3 - Porcentagem de mortalidade de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* após 48 horas da aplicação de isolados de NEPs.

Tratamento	¹ Mortalidade (%)
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> GL	94,0 ± 2,45 a
<i>Heterorhabditis</i> sp. Nepet 11	76,0 ± 5,09 b
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> JPM3	74,0 ± 2,45 b
<i>Steienrnema carpocapsae</i> All	68,0 ± 3,74 c
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	62,0 ± 3,74 c
Controle	2,0 ± 2,00 d
CV (%) = 12,19	

¹Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Média ± Erro Padrão (M).

A análise dos dados obtidos após 72 h apontaram o mesmo resultado, sendo que o *H. amazonensis* GL continuou sendo o mais virulento, causando a maior mortalidade diferindo estatisticamente dos demais.

Por outro lado Machado et al. (2015) verificaram que mesmo o *H. amazonensis* GL, estando entre os nematoides mais virulentos dentre os testado para pupas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a mortalidade causada após 72 h foi de 25%.

Stuart et al. (1997) também identificaram uma mortalidade de até 90% da população de *Dysmicoccus vachinii* (Miller) (Hemiptera: Pseudococcidae) usando espécies pertencentes ao gênero *Heterorhabditis*.

Salvadori et al. (2012) identificaram uma mortalidade de 55% a 77% de larvas de *S. frugiperda* quando expostas por cinco dias a uma concentração de 100 JI larva⁻¹ de *Heterorhabditis*.

A diferença encontrada entre a virulência de NEPs a pupas e lagartas de *E. lignosellus* reforça a necessidade de testes de seleção de isolados, pois as características e adaptações que cada isolado possui em relação ao ambiente e ao hospedeiro podem variar (GAUGLER et al., 1997).

3.3. Concentração de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 a lagartas de *Elasmopalpus lignosellus*

A mortalidade de lagartas após 24h e 48 h apresentou-se baixa e, além disso, não seguiram distribuição normal, dessa forma os dados após 72 horas foram avaliados.

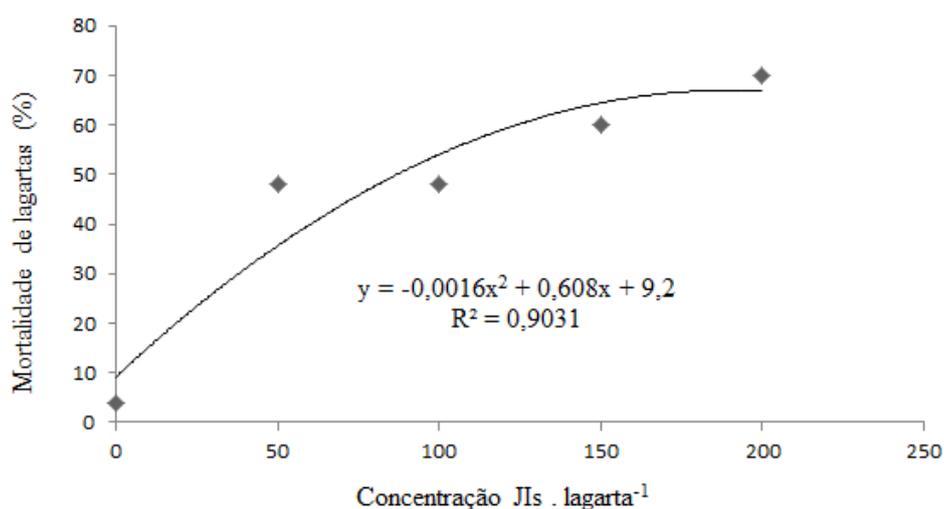
A análise de variância mostrou que houve diferença entre a mortalidade causada pelo tratamento controle e pelas demais concentrações testadas ($F_c = 58,89$, $GL\text{-tratamento} = 4$, $GL\text{-resíduo} = 20$ e $P\text{-valor} = 0,00$).

A mortalidade de larvas de *E. lignosellus* causada por *H. amazonensis* MC01 após 72 h foi de 48% para as doses de 50 e 100 JI lagarta⁻¹, 60% na concentração de 150 JI lagarta⁻¹ e de 70%, na concentração de 200 JI (Figura 4).

A relação entre a mortalidade das lagartas e as diferentes concentrações dos isolados foi ajustada pelo modelo quadrático de regressão com coeficiente de determinação (R^2) de 90,31% (Figura 4).

Partindo-se da derivada da equação da parábola a máxima mortalidade, que corresponde a 66%, foi observada na concentração de 190 JI lagarta⁻¹ (Figura 4).

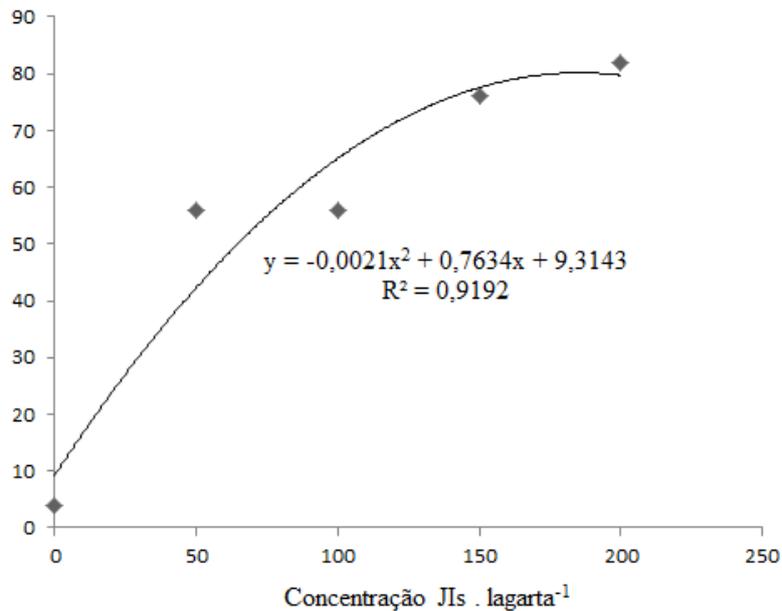
FIGURA 4 – Mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após 72 horas de exposição.



O experimento foi mantido e coletou-se mais um resultado de mortalidade acumulada após 96 h. Os dados seguiram distribuição normal e, portanto, aplicou-se teste de regressão. O modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático com coeficiente de determinação

(R^2) de 91,92% (Figura 5). A equação indica que a concentração que causou a maior mortalidade é de aproximadamente 182 JIs lagarta⁻¹, estando este valor dentro do intervalo testado, correspondendo a 78,7% de mortalidade.

FIGURA 5 - Mortalidade de lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após 96 horas de exposição.



Embora não haja estudos publicados sobre o efeito de NEPs em *E. lignosellus*, outras espécies do gênero foram estudadas. A mortalidade de larvas de *H. armigera* inoculadas com 100 e 500 JIs de *H. bacteriophora* variou entre 12% e 30% após 72 h da aplicação, respectivamente (KARY et al., 2012).

Após 96 h da aplicação de 100 e 500 JIs de *H. bacteriophora*, Kary et al. (2012) encontraram uma mortalidade de larvas de *H. armigera* de 26% e 50% respectivamente em condições de laboratório, indicando a variabilidade existente entre os processos de infecção de diferentes isolados a diferentes dosagens e a hospedeiros específicos.

Andaló et al. (2010) encontraram uma mortalidade de *S. frugiperda* nas mesmas condições entre 40% e 85% causada por nematoides do gênero Heterorhabditidae numa concentração de 100 JI larva⁻¹.

Santos et al. (2011) identificaram um aumento da mortalidade de larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) até a concentração de 200 JIs de

Heterorhabditis sp. RSC01, a partir de 250 JI larva⁻¹ a mortalidade começou a decrescer, o que pode ser explicado por uma possível competição entre os nematoides nessas condições interferindo nas taxas de infecção (SELVAN et al., 1993).

Rohde et al. (2012) também selecionaram uma concentração ótima próxima a esses valores onde verificaram uma maior mortalidade (69,88%) de larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na concentração de 293 JI inseto⁻¹ de *Heterorhabditis* sp. RSC01.

Giometti et al. (2011) selecionaram uma dose alta de 1200 JI inseto⁻¹ de *Heterorhabditis* sp. para se obter uma mortalidade da metade da população de adultos de *S. levis*. Por outro lado, Loya e Hower Jr. (2003) observaram que 100 JI inseto⁻¹ de *H. bacteriophora* foi suficiente para reduzir a população de *Sitona hispidulus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) em até 48%.

Assim, pode-se inferir que nem sempre o aumento da concentração de nematoides causa maior mortalidade dos hospedeiros, uma vez que pode haver uma tendência do nematoide ser mais atraído para insetos previamente infectados pelo mesmo organismo. O pouco conhecimento da interação entre JIs e o hospedeiro dificulta a interpretação da dinâmica de infecção causada pelos nematóides entomopatogênicos (LEWIS et al., 2002).

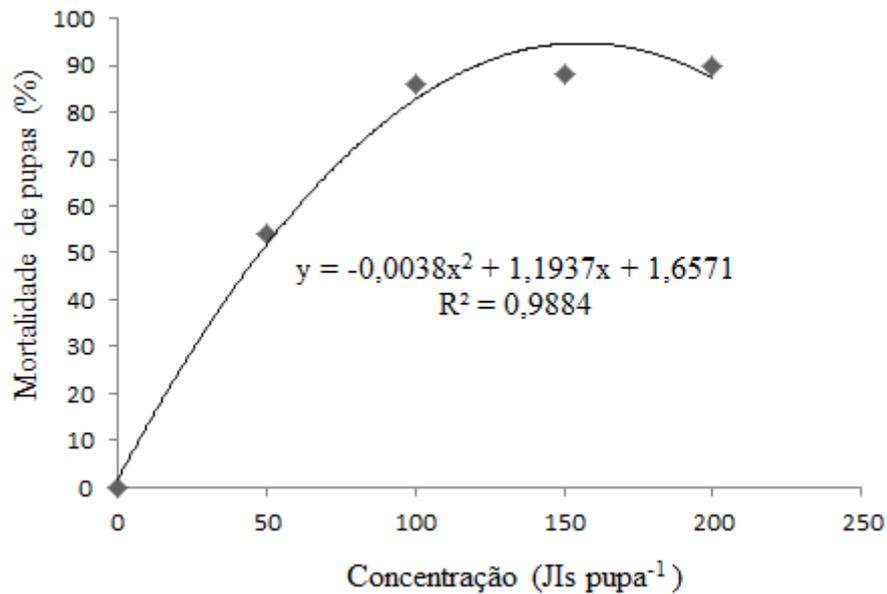
3.4. Concentração de *Heterorhabditis amazonensis* GL a pupas de *Elasmopalpus lignosellus*

Após 24 hras não houve mortalidade de pupas, dessa forma os dados após 48 horas foram avaliados. A análise de variância mostra que houve diferença entre a mortalidade causada pelo tratamento controle e pelas demais concentrações testadas ($F_c = 112,33$, $GL\text{-tratamento} = 4$, $GL\text{-resíduo} = 20$ e $P\text{-valor} = 0,00$).

Os pressupostos estatísticos foram atendidos e observou-se uma relação positiva entre as diferentes concentrações do isolado *H. amazonensis* GL a mortalidade de pupas de *E. lignosellus*, sendo essa relação ajustada pelo modelo quadrático de regressão com coeficiente de determinação (R^2) de 98,84% (Figura 6).

Partindo-se da derivada da equação da parábola, a concentração que causou a maior mortalidade nessas condições foi de 157 JIs pupa⁻¹, estando esse valor dentro do intervalo testado e que corresponde a 95,4% de mortalidade.

FIGURA 6 - Variação da mortalidade média de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* GL após 48 horas.

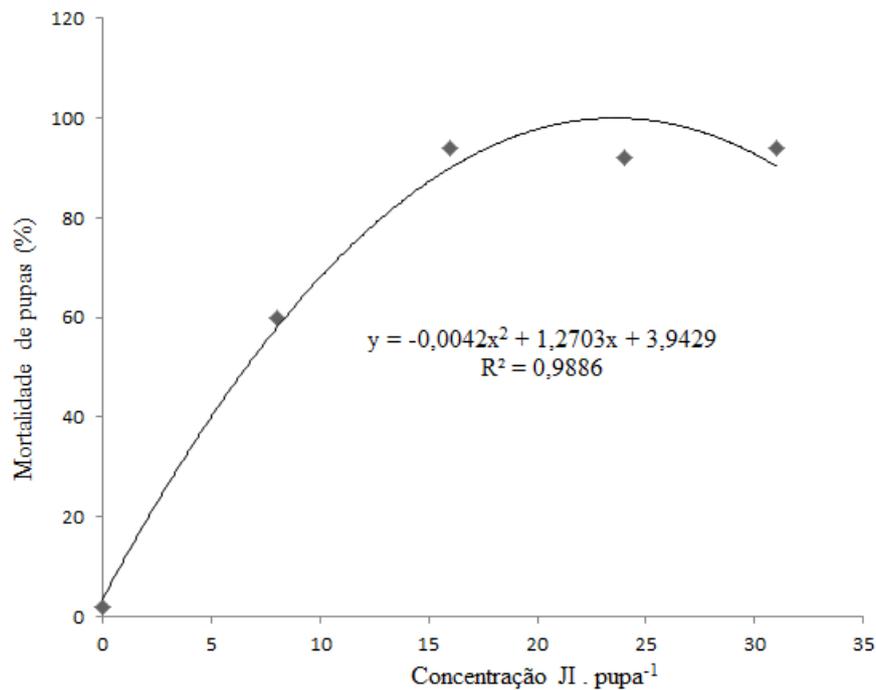


Santos et al. (2011) encontraram uma concentração ótima de *Heterorhabditis* sp. RSC01 de 268 JI pupa⁻¹ que causou mortalidade a pupas de *D. speciosa* superior a 80%.

Os dados coletados após 72 h não seguiram distribuição normal, por isso foram ajustados a um Modelo Linear Generalizado com distribuição binomial e função ligação logit. O efeito das concentrações foi avaliado pela análise de *deviance* (p -valor < 0,01).

A relação entre a mortalidade de pupas de *E. lignosellus* e concentrações de *H. amazonensis* GL também foi ajustada a um modelo quadrático com coeficiente de determinação (R^2) de 98,86% (Figura 7).

FIGURA 7 - Variação da mortalidade média de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* em função da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* GL após 72 horas.



A equação mostra que a concentração que causou a maior mortalidade (99,99%) foi de 151 JI pupa⁻¹ estando esse valor dentro do intervalo testado.

Minas (2008) obteve uma concentração de 205 JIs pupa⁻¹ de *H. baujardi* LPP7 que proporcionou uma mortalidade de 92,5 % de pupas de *C. capitata*.

A especificidade e a eficiência de cada isolado sobre um determinado hospedeiro estão diretamente ligadas à sua eficiência de busca, capacidade de penetração, potogenicidade e reprodução driblando as resistências naturais do sistema imunológico do inseto. Portanto, diante das diversas variabilidades, deve-se testar cada isolado em hospedeiros, condições e dosagens específicas (LEWIS et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- ALVES, V. S. et al. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 67-73, 2009.
- ANDALÓ, V. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p.1860-1866, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000151>
- ANDALÓ, V. et al. Movement of *Heterorhabditis amazonensis* and *Steinernema arenarium* in search of corn fall armyworm larvae in artificial conditions. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 3, p.226-230, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162012000300008>
- ANDRADE, R. da S. **Criação de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) em dieta artificial em diferentes temperaturas e seleção de linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para seu controle em arroz.** 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Entomologia, ESALQ, Piracicaba, 2013.
- BEDDING, R. A.; MILLER, L. A. Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control black vine weevil, *Otiorynchus sulcatus*, in potted plants. **Annals of Applied Biology**, v.99, p.211- 216, 1981. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb04788.x>
- BÉLAIR, G.; WRIGHT, D. J.; CURTO, G. Vegetable and tuber crop applications. In: GREWAL, P. S.; EHLERS, R.U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Eds.), **Nematodes as biocontrol agents**. Cambridge, CABI Publishing, 2005. p. 255-264.
- CHALFANT, R. B. A simplified technique for rearing the lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Phycitidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 10, p. 33-37, 1975.
- CHYZIK, R.; GLAZER, I.; KLEIN, M. Virulence and efficacy of different entomopathogenic nematode species against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*). **Phytoparasitica**, v. 24, n. 2, p. 103-110, 1996.
- DORSCHNER, K. W.; AGUDELO-SILVA, F.; BAIRD, C. R. Use of heterorhabditid and steinernematid nematodes to control black vine weevils in hop. **Florida Entomologist**, v. 72, n. 3, p. 544-556, 1989. <https://doi.org/10.2307/3495198>
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FUXA, J. R. et al. Efeito da idade do hospedeiro e da cepa nematóide na suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a *Steinernema feltiae*. **Journal of Nematology**, v. 20, n. 1, p. 91-95, 1988.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: Fealq. 2002.

GAUGLER, R.; LEWIS, E.; STUART, R. J. Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. **Oecologia**, v. 109, n. 4, p. 483- 489, 1997.
<https://doi.org/10.1007/s004420050108>

GEDEN, C. J.; AXTELL, R. C.; BROOKS, W. M. Susceptibility of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae*, *S. glaseri* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). **Journal of Entomological Science**, v. 20, n. 3, p. 331-339, 1985.

GIOMETTI, F. H. C. et al. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera). **Bragantia**, v. 70, n. 1, p.81-86, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000100013>

GREWAL, P. S. et al. Nematóides entomopatogênicos: potencial para exploração e uso na América do Sul. **Entomologia Neotropical**, v. 30, n. 2, p. 191-205, 2001.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200001>

JHAM, G. N.; SILVA, A. A. da; LIMA, E. R.; VIANA, P. Identificação (GC e GC-MS) de acetatos insaturados em *Elasmopalpus lignosellus* e sua atividade biológica (GC-EAD e EAG). **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 281-285, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1002/jssc.200401814>

JHAM, G. N.; SILVA, A. A. da; LIMA, E.R.; VIANA, P. A. Identificação de acetatos em glândulas de feromonas de *Elasmopalpus lignosellus* usando um banco de dados espectral de massa recém-criado e índices de retenção de Kóvats. **Química Nova**, v. 30, p. 916-919, 2007.

KARY, N.E., et al. A laboratory study of susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) to three species of entomopathogenic nematodes. **Munis Entomology and Zoology**, v. 7, n. 1, p. 372-379, 2012.

KAYA, H. K.; HARA, A. H. Susceptibilidade de várias espécies de pupas lepidópteras ao nematódeo entomógeno *Neoplectana carpocapsae* . **Journal of Nematology**, v. 13, n. 3, p. 291-294, 1981.

LEITE, L. G. et al. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the Sugarcane Root Spittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 785-790, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2005000500010>

LEWIS, E. E.; BARBAROSA, B.; GAUGLER, R. Mating and sexual communication of *Steinernemacarpocapsae* (Nemata: Steinernematidae). **Journal of Nematology**, v. 34, n. 4, p. 328-331, 2002.

LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 38, n. 1, p. 66-79, 2006.

LOYA, L. J.; HOWER JR, A. A. Infectivity and reproductive potencial of the Oswego strain of *Heterorhabditis bacteriophora* associated with life stages of the clover root curculio, *Sitona hispidulus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.83, n. 1, p. 63-72, 2003.

MACHADO, F. A. O. et al. **Seleção de nematoides entomopatogênicos visando o controle de pupas de *Helicoverpa armigera***. 2015. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125884/1/Selecao-nematoides.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

MINAS, R. S. de. **Potencial dos nematóides entomopatogênicos como agentes de controle biológico da mosca-domediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae)**. 2008. 93 f. Tese (Doutorado) - Curso de Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

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

NERI, D. K. P. et al. Interação silício com inseticida regulador de crescimento da lagarta-do-cartucho *Spodoptera* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1167-1174, 2005.

POTRICH, T. D.; LORINI, I.; VOSS, M.; STEFFENS, M. C. S.; PAVANI, D. P. Metodologia de criação de *Tenebrio molitor* em laboratório para obtenção de larvas. **Documentos online**, 82, Embrapa – Trigo, Passo Fundo, RS, Brazil, 2007.

ROHDE, C. et al. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal Of Agricultural Sciences**, v. 7, p. 797-802, 2012. <http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v7isa2217>

ROSALES, L. C.; SUÁREZ, Z. Nematodos entomopatogênicos como posibles agentes de control del gorgojo negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). **Boletín Entomología Venezolana**, v. 13 p. 123- 140, 1998.

SALVADORI, J. D. et al. Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect. **Biological Control**, v. 63, n. 3, p. 253-263, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.08.002>

SANTOS, V. et al. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diabrotica speciosa* germar (coleoptera: chrysomelidae). **Ciência e agrotecnologia**, v .35, n. 6, p.1149-1156, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600015>

SCHEEPMAKER, J. W. A.; GEELS, F. P.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D.; SMITS, P. H. Susceptibility of larvae of the mushroom fly *Megaselia halterata* to the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in bioassays. **Biocontrol**, v. 43, n. 2, p. 201-214, 1998.

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

<http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1993.1113>. <https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1113>

STUART, R. J.; POLAVARAPU, S.; LEWIS, E. E.; GAUGLER, R. Differential susceptibility of *Dysmicoccus vacinni* (Homoptera: Pseudococcidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabdita: Heterorhabditidae and Steinernematidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 925-932, 1997.

TAVARES, F. M. et al. Avaliação de isolados de nematóides entomopatogênicos sobre a mosca-dos-fungos, *Bradysia mabiusi* (Diptera: Sciaridae), praga em estufas. **BioAssay**, v. 7, n. 9, p. 1-6, 2012.

VALADARES-INGLIS, M. C. C. et al. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p.201-230.

VIANA, P. A. Lagarta-elasma. In: SALVADORI, C. J.; ÁVILA, M. T. B.; SILVA. (Ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo; Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta, RS: Fundacep Fecotrigo 2004. p. 379-408.

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

WRIGHT, R. J.; VILLANI, M. G.; AGUDELO-SILVA, F. Steinernematid and heterorhabditid nematodes for control of larval European chafers and Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) in potted yew. **Journal of Economic Entomology**, v. 81, n. 1, p. 152-157, 1988. <https://doi.org/10.1093/jee/81.1.152>

CAPÍTULO 3

SUSCETIBILIDADE DE *Elasmopalpus lignosellus* A NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS NA CULTURA DO MILHO EM CONDIÇÕES DE CASA- DE-VEGETAÇÃO

RESUMO

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Suscetibilidade de *Elasmopalpus lignosellus* a nematoides entomopatogênicos na cultura do milho em condições de casa-de-vegetação.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

Quatro concentrações de *H. amazonensis* MC01 e de *H. amazonensis* GL foram testadas em lagartas e pupas de *Elasmopalpus lignosellus* respectivamente em condições de casa-de-vegetação. Para lagartas foram testadas as concentrações de 190, 210, 230 e 250 JI lagarta⁻¹ de *H. amazonensis* MC01. O milho foi semeado em vasos de 2 litros contendo aproximadamente 1,5 kg de solo peneirado. Após as plantas atingirem altura de 20 cm seis lagartas foram enterradas no solo e logo em seguida as suspensões aquosas contendo os tratamentos foram direcionados aos vasos, mantendo-se vasos sem a aplicação das suspensões como tratamento controle. Os vasos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. A avaliação foi realizada após 5 dias da aplicação dos nematoides e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p -valor < 0,05). Para pupas foram testadas as concentrações 3380, 3500, 3620, 3740 JI vaso⁻¹ de *H. amazonensis* GL seguindo o mesmo modelo experimental do ensaio com lagartas, com quatro repetições. A avaliação de mortalidade foi realizada após 5 dias e o efeito das concentrações foi avaliado pela análise de deviance (p -valor < 0,01), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (p -valor < 0,01). As concentrações de *H. amazonensis* MC01 testadas para lagartas não diferiram entre si, sendo que a mortalidade das larvas variou de 70 e 90%. A concentração de 3500 JI vaso⁻¹ de *H. amazonensis* GL causou a maior redução na população de pupas (50%).

Palavras-chave: controle biológico, *Heterorhabditis*, manejo integrado de pragas, proteção de plantas, *Steinernema*.

ABSTRACT

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Susceptibility of *Elasmopalpus lignosellus* to entomopathogenic nematodes in maize in greenhouse conditions.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

Four concentrations of *H. amazonensis* MC01 and *H. amazonensis* GL were tested on caterpillars and pupae of *Elasmopalpus lignosellus*, respectively, under greenhouse conditions. For caterpillars the concentrations of 190, 210, 230 and 250 IJ caterpillar⁻¹ of *H. amazonensis* MC01 were tested. The corn was sown in pots with 2 liters containing approximately 1.5 kg of sieved soil. After the plants reached height of 20 cm, six caterpillars were buried in the soil and soon afterwards the aqueous suspensions containing the treatments were directed to the vessels, maintaining pots without the application of suspensions as a control treatment. The pots were arranged in a completely randomized design with five replicates. The evaluation was performed after 5 days of nematoid application and the means were compared by the Tukey test (p -value <0.05). For the pupae, the concentrations 3380, 3500, 3620, 3740 JI vase⁻¹ of *H. amazonensis* GL were tested following the same experimental model of the caterpillar experiment with four replicates. The mortality evaluation was performed after 5 days and the effect of the concentrations was evaluated by the deviance analysis (p -value <0.01), and the means were compared by Tukey's test (p -value <0.01). The concentrations of *H. amazonensis* MC01 tested for caterpillars did not differ among them, and the mortality of the larvae ranged from 70 to 90%. The concentration of 3500 IJ pupae⁻¹ of *H. amazonensis* GL caused the greatest reduction in the pupae population (50%).

Keywords: biological control, crop protection, *Heterorhabditis*, integrated pest management, *Steinernema*.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é hoje um dos mais importantes produtos agrícolas integrantes da economia mundial, além de apresentar um alto impacto social, já que três quartos da produção total vêm de pequenos agricultores (ORTIZ et al., 2017).

Os insetos da ordem lepidóptera estão presentes em quase todas as lavouras de plantas cultivadas, sendo *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como lagarta-elasma, uma praga que causa danos severos no Brasil, especialmente no milho (VIANA, 2004), danificando as plantas na fase inicial de crescimento, causando redução do estande que pode resultar na diminuição do rendimento (ZANDONADI et al., 2005).

Trabalhos recentes têm se dedicado a incrementar novas alternativas de controle com foco no manejo integrado. Além dos métodos convencionais de controle, mecânico e químico, já foi identificado o controle de *E. lignosellus* quando aplicado extrato de neen (*Azadirachtina indica*) (ORTIZ et al., 2017).

Ortiz et al. (2017) também testaram a eficiência de inseticidas biológicos no controle da lagarta-elasma e identificaram que o controle provocado por *Bacillus thuringiensis* (Berliner) e *Tricoderma harzianum* se mostraram de forma lenta, iniciando-se após quatro dias da aplicação.

Outra forma de controle estudada é a utilização de plantas transgênicas Bt (*B. thuringiensis*). Esse método já foi aprovado como estratégia alternativa de manejo de pragas no sul dos Estados Unidos. Neste cenário Reisig et al. (2015) identificaram um maior ataque de *E. lignosellus* em plantas de milho refúgio, mostrando, portanto, que pode ser uma estratégia eficaz na redução populacional da praga.

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são agentes de controle de artrópodes e são naturalmente encontrados no solo de várias regiões. Como mais de 90% das espécies de insetos têm estádios do ciclo de vida no solo, o emprego de NEPs apresenta potencial no controle biológico de insetos que apresentam hábito críptico (KLEIN, 1990).

O controle de lepidópteros utilizando NEPs já foi testado na cultura do milho para *Helicoverpa zea* (Boddie) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (CABANILLAS; RAULSTON, 1996; FEASTER; STEINKRAUS, 1996; RICHTER; FUXA, 1990; ANDALÓ et al., 2010) e para *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae) (LEVINE; OLOUMI-SADEGHI, 1992), observando-se alta eficácia no controle.

Para alcançar sucesso no manejo de pragas utilizando NEPs como agente de controle biológico, o conhecimento do comportamento destes é de fundamental importância. Estudos realizados em laboratório verificaram que os principais fatores limitantes à permanência das populações de NEPs nos ambientes agrícolas são as taxas de irradiação por luz U.V., dessecação, disponibilidade de água no solo (WILSON; GAUGLER, 2004) e à predação por ácaros e collembola (EPSKY et al., 1988; GILLMORE; POTTER, 1993).

Por isso vários isolados avaliados como eficientes no controle de insetos em condições de laboratório, quando levados às condições de campo, podem não apresentar os mesmos resultados. Fatores do ambiente, do hospedeiro (comportamento sésil ou móvel, hábitos de vida, suscetibilidade), e do isolado, como capacidade de busca, especificidade ou não ao hospedeiro e resistência às condições ambientais desfavoráveis (DOWDS; PETERS, 2002) devem ser levados em consideração, na implementação de um programa de controle, tornando indispensável a realização de ensaios em campo.

Desta forma, considerando a variabilidade dos campos de cultivo e os fatores que influenciam a permanência de NEPs em áreas agrícolas, a aplicação inundativa, com altas concentrações de juvenis infectantes (JIs) (GEORGIS et al., 2006), tem sido preconizada com intuito de causar a rápida mortalidade da praga. Por isso testes que se aproximam mais das condições reais do campo como os de semi-campo devem ser realizados com a vantagem de se ter o entendimento da influência de alguns fatores isolados.

Nenhum estudo direcionado ao controle de *E. lignosellus* por NEPs foi realizado, apesar de apresentar um alto potencial de controle. Desta forma, objetivou-se realizar o ajuste de concentração de JIs sobre pupas e lagartas em semi-campo partindo de concentrações ótimas obtidas em laboratório, considerando as maiores variações existentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação na Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Umuarama, coordenadas geográficas 18°53'40''S e 48°15'35''W.

Os NEPs utilizados nos experimentos foram obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia, *Campus* Monte Carmelo. Foram utilizadas as espécies *Heterorhabditis amazonensis* MC01e *Heterorhabditis amazonensis* GL.

Para obtenção de JIs recém-emergidos foi realizada a multiplicação destes em larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) criadas de acordo com metodologia de Potrich et al. (2007) e armazenados em câmara climatizada B.O.D. a $16 \pm 2^\circ\text{C}$. As larvas mortas com sintomas de infecção foram lavadas com água e colocadas em câmara seca (placa de Petri com papel filtro), durante 5 dias, após os quais foram retiradas e colocadas em armadilhas de White (1927) para coletar os JIs, de acordo com a metodologia de Molina e López (2001). As larvas infectadas foram mantidas em B.O.D. a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e foram utilizados nos experimentos os JIs de até 3 dias após o início da emergência e armazenados a $16 \pm 2^\circ\text{C}$ por até no máximo 5 dias.

As lagartas de *E. lignosellus* foram criadas no laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia *Campus* Umuarama de acordo com Andrade (2013). As gaiolas de postura receberam 15 casais alimentados com solução aquosa de mel a 10% e forradas com papel filtro. À medida que os ovos tornavam-se avermelhados os papéis foram retirados e armazenados em placa plásticas tipo Gerbox[®] tampadas. Diariamente, à medida que os ovos eclodiram, as lagartas de primeiro ínstar foram transferidas para potes plásticos de 100 mL contendo dieta artificial de Chalfant (1975) modificada (Anexo I). Sobre as lagartas foi adicionada uma camada de aproximadamente 2 cm de vermiculita autoclavada (120°C , 1 atm, 20 min), a fim de tornar o ambiente de criação semelhante às condições que o inseto encontra na natureza para construção de abrigos larvais. Após 20 dias as lagartas foram retiradas para utilização nos ensaios e as pupas após 35 dias.

As sementes de milho cultivar BM 3061 não tratadas foram semeadas em vasos plásticos de 2 litros contendo aproximadamente 1,5 Kg de solo peneirado. O solo foi extraído da fazenda do Glória e se classifica como Latossolo Vermelho-Escuro Distrófico (LEd) (EMBRAPA 2006). Em cada vaso foram semeadas 4 sementes e após a emergência foi realizado o desbaste deixando apenas uma planta por vaso.

Para os cálculos de adubação foi retirada uma amostra do solo para análise química, os cálculos foram feitos de acordo com a 5ª aproximação (RIBEIRO et al., 1999). Como fertilizante químico utilizou-se aproximadamente 1,8 g de NPK fórmula 4-14-8 por vaso. Durante o desenvolvimento inicial das plantas, até alcançarem 20 cm, os vasos foram irrigados diariamente mantendo a umidade do solo próxima à capacidade de campo. Após a montagem dos experimentos os vasos não receberam irrigação sendo que as plantas não apresentaram sintomas de estresse hídrico.

2.1. Adequação da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 a lagartas de *Elasmopalpus lignosellus*

Quatro concentrações de *H. amazonensis* MC01 foram testadas sendo 190, 210, 230 e 250 JI lagarta⁻¹. Foram mantidos vasos sem a aplicação do nematoide como tratamento controle. Cada tratamento foi realizado com 5 repetições, totalizando 25 vasos distribuídos em delineamento inteiramente casualizado.

A semeadura do milho foi realizada no dia 22 de novembro de 2017. Quinze dias após a emergência da plântula, quando a planta atingiu cerca de 20 cm de altura, foram liberadas 6 lagartas de quarto ínstar por planta e, em seguida, as suspensões contendo os nematoides foram ajustadas a um volume de 20 mL e aplicadas aleatoriamente no solo, sendo que o tratamento controle recebeu apenas água destilada.

A fim de se evitar a saída das lagartas os vasos foram protegidos por uma estrutura de metal coberta com tela antiáfideo de polietileno (Figura 1).

FIGURA 1 - Gaiola metálica com tela antiáfideo.



A avaliação foi realizada após cinco dias verificando a porcentagem de mortalidade das lagartas causada pelo nematoide. Para confirmação da mortalidade pelo nematoide, as lagartas mortas foram mantidas em câmara seca por 4 dias, em B.O.D. a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e posteriormente dissecadas, observando-se a com auxílio de microscópio estereoscópio a presença de nematoides para confirmar a mortalidade. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

2.2. Adequação da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* GL a pupas de *Elasmopalpus lignosellus*

Quatro concentrações de *H. amazonensis* G1 foram testadas sendo 3.380, 3.500, 3.620 e 3.740 JIs vaso⁻¹. As concentrações testadas foram extrapoladas para a área do vaso partindo-se da concentração ótima encontrada em laboratório nas placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

Foram mantidos vasos sem a aplicação do nematoide como tratamento controle. Cada tratamento foi realizado com 4 repetições, totalizando 20 vasos distribuídos em delineamento inteiramente casualizado.

A semeadura do milho foi realizada no dia 17 de abril de 2018, sendo que após quinze dias da emergência, quando a planta atingiu cerca de 20 cm de altura, no dia 03 de Maio de 2018, foram liberadas 6 pupas de 2 dias. Neste momento as soluções contendo os nematoides foram direcionadas ao solo, sendo que o tratamento controle recebeu apenas água destilada.

A avaliação foi realizada no dia 08 de maio verificando a porcentagem de mortalidade das pupas causada pelo nematoide. Os dados foram ajustados a um Modelo Linear Generalizado com distribuição binomial e função ligação logit. O efeito das concentrações foi avaliado pela análise de *deviance* (p -valor < 0,01). Diferenças significativas detectadas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (p -valor < 0,01).

3. RESULTADOS

3.1. Seleção da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 a lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* em casa de vegetação

Por meio da análise de variância incluindo todos os tratamentos observou-se que houve diferença significativa entre a mortalidade das lagartas causada pelo controle e pelos demais tratamentos ($F_c = 14,41$, GL -tratamento = 4, GL -resíduo = 20 e P -valor = 0,00).

No entanto, de acordo com a análise de variância retirando-se o controle obtém-se que não houve diferença significativa entre as doses testadas ($F_c = 1,46$, GL -tratamento = 3, GL -resíduo = 16 e P -valor = 0,00).

A não constatação de diferenças de mortalidade de larvas de *E. lignosellus* evidencia que entre as quatro concentrações testadas a de 190 JIs lagarta⁻¹ foi suficiente para causar a mortalidade máxima (70-90%) em casa de vegetação, sendo desnecessária a utilização de concentrações mais elevadas nessas condições.

A provável explicação é que a suspensão concentrada mais baixa já oferecia o controle máximo que esses patógenos poderiam atingir, portanto, uma concentração aumentada não aumentava significativamente o controle.

Assim, *H. amazonensis* MC01 foi considerado virulento a larvas de *E. lignosellus* nas condições testadas e em todas as concentrações, sendo a mortalidade média de larvas superior a 70% (Tabela 1).

TABELA 1 – Mortalidade média de lagartas de *E. lignosellus* inoculadas a diferentes concentrações de *H. amazonensis* MC01 em casa de vegetação.

Concentração (JI lagarta ⁻¹)	¹ Mortalidade (%)
250	80,00 ± 7,30 a
230	90,00 ± 5,47 a
210	90,00 ± 5,47 a
190	70,00 ± 8,36 a
0	23,33 ± 7,72 b

CV (%) = 14,17

¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Média ± Erro Padrão (M).

Resultados semelhantes foram encontrados por Leite et al. (2007), onde *H. indica* (IBCB-n05), aplicado nas concentrações de 5,7 e 22,6 IJ cm⁻², não apresentou diferença estatística, atingindo eficiência de 75% e 85%, respectivamente, no controle de larvas de *Bradysia mabiusi* (Lane) (Diptera: Sciaridae) em casa de vegetação.

Santos et al. (2011), também não encontraram diferença significativa entre as doses testadas de *Heterorhabditis* sp. RSC01 em casa de vegetação em larvas de *D. speciosa* na cultura do milho.

Batista et al. (2014) também identificaram que a concentração de *H. amazonensis* RSC1 não influenciou a eficiência contra ninfas de *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae) em casa de vegetação, sendo que todas as concentrações testadas causaram uma mortalidade de 57,14%.

3.2. Seleção da concentração de *Heterorhabditis amazonensis* GL a pupas de *Elasmopalpus lignosellus* em casa de vegetação

Os dados obtidos não seguiram distribuição normal, assim, estes foram ajustados a um modelo logístico com distribuição binomial, já que cada pupa teve ou não a chance de morrer.

A mortalidade de pupas causada pelas concentrações e pelo controle diferiram entre si (p-valor $1,86 \times 10^{-5}$).

As concentrações testadas foram extrapoladas para área do vaso, uma vez que testando a mortalidade de pupas *E. lignosellus* com as concentrações ajustadas em laboratório esta foi insignificante. Isso deve-se ao fato de que nas condições de casa de vegetação os JIs encontraram maior dificuldade de buscar e penetrar no hospedeiro. Além disso os adultos podem emergir antes de as pupas morrerem, sendo necessário portanto a avaliação da tabela de vida do adulto, para identificar possíveis alterações.

Tavares et al. (2012), identificaram que *Heterorhabditis* além de lagartas, também podem infectar pupas de *B. mabiusi*. O que já tinha sido identificado por Harris et al. (1995) em experimento realizado contra *Bradysia coprophila* (Lintner), utilizando o nematoide *S. feltiae*. Isso significa que o controle biológico pode ser direcionado tanto a lagartas quanto a pupas.

No entanto Harris et al. (1995) destacaram que as pupas são naturalmente menos suscetíveis aos nematóides se comparadas com larvas, já que possuem estruturas de proteção mais desenvolvidas.

Sendo assim, apesar de os resultados mostrarem que a mortalidade máxima de pupas se apresentou menor que a de lagartas, o controle dessas com NEPs podem constituir uma alternativa de manejo, uma vez que foi detectada uma redução da metade da população de pupas usando a concentração de $3500 \text{ JI vaso}^{-1}$ (Tabela 2).

TABELA 2 – Mortalidade média de pupas de *Elasmopalpus lignosellus* inoculadas a diferentes concentrações de *Heterorhabditis amazonensis* GL em casa de vegetação.

Concentração (JI vaso ⁻¹)	Mortalidade (%)
3500	50,00 ± 10,20 a
3620	33,33 ± 9,62 ab
3380	12,50 ± 6,75 bc
3740	8,33 ± 5,64 bc
0	0,00 ± 0,00 c

*Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando a mortalidade de lagartas e pupas de *E. lignosellus* nas mesmas condições, observa-se que *H. amazonensis* MC01 pode causar até 90% de mortalidade de larvas em uma concentração menor quando comparada a concentração de *H. amazonensis* GL necessária para causar 50% da mortalidade de pupas.

Chambers et al. (2010) também identificaram que a mortalidade de pupas de *Cydia latiferreana* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae) foi menor que de lagartas quando expostas a *S. carpocapsae*.

Além disso, Andaló et al. (2010) identificaram que em laboratório, *Heterorhabditis* sp. RSC02 aplicado sobre larvas de *S. frugiperda* numa concentração de 200 JI lagarta⁻¹ causou 97,6% de mortalidade. Já em condições de casa de vegetação utilizando a mesma concentração do mesmo nematoide a mortalidade de larvas foi ligeiramente menor (87,5%).

Isso indica que a menor mortalidade observada em casa de vegetação para pupas não pode ser atribuída somente ao estágio em que o inseto se encontra, pois existem outras variáveis que devem ser levadas em consideração, como umidade e tipo de solo, condições ambientais e forma de aplicação.

Por isso, devido à complexidade de fatores nos sistemas agrícolas com uso constante de bioinseticidas, e onde as pragas são reguladas por outros patógenos, os estudos devem ser ajustados para confirmar o potencial deste método de controle (GARCIA et al., 2008).

O potencial de uso de NEPs para o controle de *E. lignosellus* foi confirmado pela presente pesquisa, no entanto testes de campo devem ser realizados a fim de se compreender a dinâmica e comportamento, tanto dos nematoides quanto dos insetos sobre as diversas variáveis existentes.

REFERÊNCIAS

- ANDALÓ, V. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p.1860-1866, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010005000151>
- ANDRADE, R. da S. **Criação de *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) em dieta artificial em diferentes temperaturas e seleção de linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para seu controle em arroz.** 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Entomologia, Esalq, Piracicaba, 2013.
- BATISTA, E. S. de P. et al. Virulence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) to spittlebug *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p.145-149, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657001152012>.
- CABANILLAS, H. E.; RAULSTON, J. R. Evaluation of *Steinernema riobravis*, *S. carpocapsae*, and irrigation timing for the control of corn earworm, *Helicoverpa zea*. **Journal of Nematology**, v. 28, n. 1, p. 75–82, 1996.
- CHALFANT, R. B. A simplified technique for rearing the lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Phycitidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 10, p. 33-37, 1975.
- CHAMBERS, U. et al. Control of overwintering filbertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Economic Entomology**. v. 103, n. 2, 416-422, 2010.
- DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms.. In: GAUGLER, R. **Entomopathogenic nematology**. Wallingford: CABI. 2002. p. 79-93.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, 2006. 306p.
- EPSKY, N. D.; WALTER, D. E.; CAPINERA, J. L. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 81, n. 3, 821-825, 1988. <https://doi.org/10.1093/jee/81.3.821>
- FEASTER, M. A.; STEINKRAUS, D. C. Inundative biological control of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema riobravis* (Rhabditida: Steinernematidae). **Biological Control**, v. 7, n. 1, p. 38–43, 1996.
- GARCIA, L. C. et al. Tecnologia de aplicação para os nematóides *Heterorhabditis* indica e *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Neotropical Entomology**, v.37, n.3, p.305-311, 2008.

- GEORGIS, R. et al. Sucessos e falhas no uso de nematóides parasitas no controle de pragas. **Controle biológico**. v. 38, p. 103–123, 2006.
- GILLMORE, S. K.; POTTER, D. A. Potential role of collembolan as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes. **Pedobiologica**, v. 37, n. 1, p. 30-38, 1993.
- HARRIS, M. A.; OETTING, R. D.; GARDNER, W. A. Use of entomopathogenic nematodes and a new monitoring technique for control of fungus gnats, *Brasysia coprophila* (Diptera: Sciaridae), in floriculture. **Biological Control**, v. 5, n. 3, p. 412-418, 1995. <https://doi.org/10.1006/bcon.1995.1049>
- KLEIN, M. G. Efficacy against soil inhabiting insect pests. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Eds). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990. p. 195–214.
- LEITE, L. G. et al. Virulence of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) against larva of the fungus gnat *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) and persistence of *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992 on organic substrates. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 4, p. 337-342, 2007.
- LEVINE, E.; OLOUMI-SADEGHI, H. Management of diabroticite rootworms in corn. **Annual Review of Entomology**, v. 36, p. 229–255, 1992.
- MOLINA J. P.; LÓPEZ N. J. C. Producción in vivo de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 27, p. 73-78, 2001.
- ORTIZ, T. L. et al. Avaliação de extractos vegetais y bioinsecticidas sobre poblaciones de *Spodoptera frugiperda* e *Elasmopalpus lignosellus* en maíz. **European Scientific Journal**, v. 13, n. 21, p. 238-250, 2017.
- POTRICH, T. D.; LORINI, I.; VOSS, M.; STEFFENS, M. C. S.; PAVANI, D. P. **Metodologia de criação de *Tenebrio molitor* em laboratório para obtenção de larvas**. Documentos online, 82, Embrapa – Trigo, Passo Fundo, RS, Brazil, 2007.
- REISIG, D. D. et al. Lepidoptera (Crambidae, Noctuidae, and Pyralidae) Injury to Corn Containing Single and Pyramided Bt Traits, and Blended or Block Refuge, in the Southern United States. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 1, pp.157-165, 2015. <https://doi.org/10.1093/jee/tou009>
- RIBEIRO, A. C; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ V. A, H. **Recomendação para uso de corretivos e fertilizantes em Mina Gerais – 5º aproximação**. Viçosa 1999. 359 p.
- RICHTER, A. R.; FUXA, J. R. Effect of *Steinernema feltiae* on *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Journal of Economic Entomology** v. 83, n. 4, p. 1286–1291, 1990. <https://doi.org/10.1093/jee/83.4.1286>
- SANTOS, V. et al. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diabrotica speciosa* gemmar

(coleoptera: chrysomelidae). **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1149-1156, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600015>

TAVARES, F. M. et al. Avaliação de isolados de nematóides entomopatogênicos sobre a mosca-dos-fungos, *Bradysia mabiusi* (Diptera: Sciaridae), praga em estufas. **BioAssay**, v. 7, n. 9, p. 1-6, 2012.

VIANA, P. A. Lagarta-elasma. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. da (ed.). **Pragas de solo no Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, 2004. p. 379–408,

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

WILSON, M.; GAUGLER, R. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. **Journal Of Applied Entomology**, v. 128, n. 4, p. 250-253, 2004.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00814.x>

ZANDONADI, R. S. et al. Identification of lesser cornstalk borer-attacked maize plants using infrared images. **Biosystems Engineering**, v. 91, n. 4, p. 433-439, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2005.05.002>

CAPÍTULO 4

COMPATIBILIDADE DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS COM PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS UTILIZADOS NA CULTURA DO MILHO

RESUMO

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do milho.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

A broca-do-colo, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), é uma das pragas responsáveis pela diminuição do potencial produtivo do milho, por formar galeria no colmo, causando o perfilhamento ou morte da planta. Além de ser uma praga polífaga, o que dificulta seu manejo através da rotação de cultivos, é um alvo de difícil alcance, já que se abriga em câmaras que constrói com teia e partículas de solo. Por isso, o método de controle mais utilizado é o controle químico, via tratamento de sementes. Contudo, o uso desse método tem apresentado baixa eficácia. Dessa forma, baseando-se no manejo integrado de pragas, outras formas de controle têm sido desenvolvidas, como o biológico. Considerando o potencial de controle de nematoides entomopatogênicos e sua possível utilização em programas de controle, se faz necessário um estudo para avaliar a compatibilidade entre esses dois métodos. Assim, teve-se como objetivo avaliar a compatibilidade dos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* GL e *H. amazonensis* MC01 com cinco produtos comerciais utilizados no tratamento de sementes Maxim[®], Cruiser 350 FS[®], Fortenza 600 FS[®], Avicta 500 FS[®], Amulet[®] e um produto à base de nim NeenMax[®] visando o controle de *E. lignosellus*. O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio contendo 1 mL de suspensão com 2.000 juvenis infectantes (JIs) e 1 mL do produto diluído de acordo com a recomendação do fabricante. Foram avaliados os parâmetros viabilidade, infectividade sobre larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) e produção de JIs após o contato com os produtos fitossanitários. Verificou-se que para ambos os nematoides os produtos Cruiser 350 FS[®], Fortenza 600 FS[®] e NeenMax[®] foram inócuos, pois não alteraram significativamente nenhum dos parâmetros avaliados e, por isso, podem ser considerados compatíveis. Amulet[®] se apresentou levemente nocivo, já Avicta 500 FS[®] e Maxim[®] foram considerados nocivos, pois apesar de não causarem mortalidade dos nematoides, reduziram significativamente a infectividade e produção desses.

Palavras-chave: broca-do-colmo, controle biológico, *Heterorhabditis*, manejo integrado de pragas, tratamento de sementes.

ABSTRACT

BERLATTO MAGNABOSCO, MARIA EDUARDA. **Compatibility of entomopathogenic nematodes with phytosanitary products used in maize.** 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Qualidade Ambiental) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

The lesser cornstalk borer, *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) is one of the pests responsible for the reduction of the productive potential of maize, since it forms gallery on the stem, causing the tillering or death of the plant. In addition of being a polyphagous pest, which becomes difficult using practices as rotating crops, it is a difficult target, since it refuge in chambers that build with web and soil particles. Therefore, the most used control method is the chemical control, through seed treatment. However, the use of this method has low efficacy, as well as to generate problems due to incorrect use, insect resistance, population outbreaks, rise in secondary pests, increased production costs and increased human and environmental contamination. Thus, based on integrated pest management different forms of control, such as biological control, have been developed. Considering the potential for control of entomopathogenic nematodes, and its possible use in control programs, a study is necessary to evaluate the compatibility between these two methods. Therefore, the objective of this study was to evaluate the compatibility of nematodes *Heterorhabditis amazonensis* AL and *H. amazonensis* MC01 with five commercial products used in the treatment of seeds Maxim[®], Cruiser 350 FS[®], Fortenza 600 FS[®], Avicta 500 FS[®], Amulet[®] and a product formulated with neem NeenMax[®] for the control of *E. lignosellus*. The trial was conducted in a completely randomized design with five repetitions per treatment. Each repetition consisted of a test tube containing 1 mL of suspension with 2.000 infective juveniles (IJs) and 1 mL of diluted product according to the manufacturer's recommendation. The parameters viability, infectivity on larvae of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) and production of IJs after the contact with phytosanitary products were evaluated. It was verified that for both nematodes the products Cruiser 350 FS[®], Fortenza 600 FS[®] and NeenMax[®] were innocuous, as they did not significantly alter any of the evaluated parameters and, therefore, can be considered compatible. Amulet[®] was slightly harmful, Avicta 500 FS[®] and Maxim[®] were considered harmful, although they did not cause mortality of the nematodes, they significantly reduced their infectivity and production.

Key words: biological control, *Heterorhabditis*, integrated pest management, lesser cornstalk borer, seed treatment.

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs), especialmente os pertencentes às famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae são parasitas de muitos grupos de insetos que ocorrem naturalmente no ambiente, fato que despertou grande interesse da comunidade científica para uma possível aplicação no controle biológico de pragas (ASKARY, 2010).

Além disso, algumas características desses agentes em potencial, como baixo custo de produção em insetos hospedeiros ou em meios artificiais, facilidade de armazenamento, e aplicação em campo, habilidade natural de busca pelo hospedeiro, compatibilidade com diversos pesticidas, e segurança ambiental fazem com que esses organismos ganhem ainda mais atenção nas pesquisas (GREWAL et al., 2001; AKHURST; SMITH, 2002; DOLINSKI, 2006).

Apesar dos agentes de controle biológico constituírem uma parte importante do manejo integrado de pragas, devem ser empregados conjuntamente a outros métodos de controle, visto que seu efeito em comparação com o método químico é mais lento e pode ter sua eficácia variada em diferentes condições ambientais (ASKARY, 2015).

Dessa forma, o estudo da aplicação conjunta desses métodos de controle deve ser realizado, uma vez que podem causar efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônico, afetando a infectividade e a sobrevivência dos nematoides (GREWAL et al., 1998), sendo que geralmente os Heterorhabditidae são mais afetados pelos inseticidas que os Steinernematidae (GREWAL, 2002).

A tolerância dos juvenis infectantes aos produtos fitossanitários varia de acordo com a espécie, tempo de exposição e princípio ativo (GREWAL et al., 2001; KOPPENHÖFER; GREWAL, 2005). Por isso os estudos de compatibilidade são fundamentais para a conservação dos NEPs no agroecossistema com objetivo de manter a capacidade infectante e reprodutiva desses nematoides (MONTEIRO et al., 2014).

Testes apontam que os juvenis infectantes (JIs) são compatíveis com a maioria dos pesticidas quando expostos por curtos períodos (2-24 h), o que facilita seu uso com esses produtos em misturas de tanques (KOPPENHÖFER; GREWAL, 2005). Além disso, alguns inseticidas usados em baixas doses atuam sinergicamente com NEPs aumentando a eficácia desses organismos em aplicações inundativas (NISHIMATSU; JACKSON, 1998).

Considerando o potencial de controle de NEPs sobre pupas e lagartas de *E. lignosellus*, teve-se por objetivo avaliar a compatibilidade de produtos fitossanitários

recomendados no tratamento de sementes de milho e um inseticida a base de nim aos nematoides *Heterorhabditis amazonensis* GL e *H. amazonensis* MC01.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A compatibilidade de cinco produtos fitossanitários recomendados para o tratamento de sementes de milho e um inseticida à base de nim foi testada com os isolados de *H. amazonensis* AL e *H. amazonensis* MC01. Os produtos utilizados nos testes de compatibilidade foram Maxim[®], Cruiser 350 FS[®], Fortenza 600 FS[®], Avicta 500 FS[®], Amulet[®] e NeenMax[®] e no controle utilizou-se água destilada, totalizando sete tratamentos.

Foram avaliados os parâmetros viabilidade, infectividade e produção de juvenis infectantes (JIs) após o contato com os produtos fitossanitários. Para isso, foi adicionada a tubos de vidro uma suspensão de 2.000 JIs em 1 mL de água destilada e 1 mL da diluição dos produtos, com 5 repetições por tratamento. Os nematoides mantidos em suspensão aquosa a $16 \pm 1^\circ\text{C}$ foram multiplicados em de larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae).

A diluição dos produtos testados (Tabela 1) foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Vainio (1992), com o dobro da maior concentração de ingrediente ativo recomendado pelo fabricante. Seguindo a recomendação utilizou-se 0,315 mL de Maxim[®], 0,6 mL de Cruiser 350 FS[®], 0,87 mL de Fortenza 600 FS[®], 0,15 mL de Avicta 500 FS[®], 0,5 mL de Amulet[®] e 0,25 mL de NeenMax[®] completando-se 1 mL com água destilada em cada tratamento, sendo repetido cinco vezes. Os tubos foram selados com Parafilm[®] e o bioensaio foi mantido em câmara incubadora do tipo B.O.D. a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 10\%$ e 24 h de escuro.

TABELA 1 - Produtos fitossanitários usados no estudo de compatibilidade com nematoides entomopatogênicos (AGROFIT, 2018).

Marca comercial	Ingrediente ativo	Descrição	Dose
Maxim [®]	Fludioxinil	Fungicida	150 mL pc*/100 kg sementes
Cruiser 350 FS [®]	Tiametoxam	Inseticida	120 mL/60.000 sementes
Fortenza 600 FS [®]	Ciantraniliprole	Inseticida	350 mL/100 Kg semente
Avicta 500 FS [®]	Abamectina	Nematicida e Inseticida	60-70 mL/60.000 sementes
Amulet [®]	Fipronil	Inseticida	50-200 mL ha ⁻¹
NeenMax [®]	Azadiractina	Inseticida	200 mL L ⁻¹ de água

*Produto Comercial.

A fim de possibilitar a visualização dos JIs em microscópio estereoscópio na avaliação de viabilidade, precedeu-se às avaliações a limpeza dos JIs, removendo os produtos fitossanitários. Para isso, as suspensões foram passadas em peneira de 500 mesh, obtendo-se os JIs sem os produtos, e posteriormente, reajustou-se ao volume inicial de 2 mL.

A avaliação de viabilidade foi realizada após 48 h retirando-se 0,1 mL da suspensão. Os JIs foram observados em microscópio estereoscópio, contando-se o número de juvenis vivos e mortos. Foram considerados mortos aqueles que não responderam a adição de 50 µl de NaOH 1 N (CHEN; DICKSON, 2000). Após esse período, a mortalidade das larvas causada pelos JIs foi verificada, confirmando a mortalidade através de sintomatologia e dissecação, caso necessário. A infectividade foi realizada retirando-se 1 mL de suspensão de cada repetição e adicionou-se a placa de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) com duas folhas de papel filtro e dez larvas de *T. molitor*. As placas foram mantidas nas mesmas condições anteriores por cinco dias. As larvas mortas foram contabilizadas e transferidas para armadilhas de White (1927).

Para determinação da produção, foram coletados e contabilizados os JIs produzidos durante cinco dias. Os dados de viabilidade dos JIs e mortalidade de insetos foram submetidos à análise de variância. Os valores de mortalidade dos nematoides foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925):

$$Mc\% = \frac{Mo\% - Mt\% \times 100}{100 - Mt\%}$$

Mc = Mortalidade corrigida; Mo = Mortalidade observada; e Mt = Mortalidade na testemunha.

A infectividade foi obtida pela porcentagem de mortalidade de larvas de *T. molitor*. A redução de infectividade no tratamento em comparação com o controle foi obtida pela fórmula:

$$Rinf\% = \left(1 - \frac{It\%}{Ic\%}\right) \times 100$$

Rinf% = Redução da infectividade; It% = Infectividade do tratamento; e Ic% = Infectividade do controle.

A produção foi obtida contabilizando o número de JIs obtidos das larvas de *T. molitor*. A redução da produção no tratamento em comparação com o controle foi obtida pela fórmula:

$$Rfec\% = \left(1 - \frac{Ft}{Fc}\right) \times 100$$

Em que, Rfec% = redução na produção; Ft = produção do tratamento; e Fc = Produção do controle.

Para obtenção do efeito do inseticida (E%), foi utilizada a fórmula modificada de Peters e Poullot (2004):

$$E\% = 100 - (100 - Mc\% - Rinf\% - Rfec\%)$$

As fórmulas empregadas seguem os padrões da IOBC (International Organisation for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants). Foi atribuído valor zero

(0) para o cálculo de E% quando os fatores Mc%, Rinf% e Rfec% apresentaram valor negativo.

Os valores do efeito do inseticida foram classificados conforme os padrões da IOBC para testes de laboratório como: inócuo (E% < 30), levemente nocivo (E% entre 30 a 79), moderadamente nocivo (E% entre 80 a 99) e nocivo (E% > 99) (BAKKER et al., 1992).

3. RESULTADOS

Em relação à viabilidade, a maioria dos produtos manteve mais de 95% dos JIs vivos, sendo que a maior mortalidade, pouco mais de 7% para ambos nematoides testados, foi causada pelo produto Maxim[®] (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2 - Compatibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* MC01 com produtos fitossanitários utilizados na cultura do milho.

Tratamento	Viabilidade (%)	Infectividade (%)	Mc%*	Rinf%	Rfec%*	E%*	Classe IOBC
Controle	99,60 ± 0,55 a	80,00 ± 7,07 b	0,00	0,00	0,00	0,00	Inócuo
NeenMax [®]	99,20 ± 1,10 a	88,00 ± 8,37 a	0,40	0,00	0,00	0,00	Inócuo
Fortenza 600FS [®]	99,00 ± 1,22 a	96,00 ± 5,48 a	0,60	0,00	0,00	0,00	Inócuo
Cruiser 350FS [®]	97,00 ± 2,00 b	70,00 ± 7,07 c	2,61	12,50	0,00	13,50	Inócuo
Avicta 500FS [®]	96,80 ± 0,84 b	24,00 ± 5,48 d	2,81	70,00	66,10	138,89	Nocivo
Amulet [®]	95,60 ± 3,29 b	66,00 ± 8,94 c	4,02	17,50	18,20	39,68	Levemente nocivo
Maxim [®]	92,00 ± 1,58 c	22,00 ± 8,37 d	7,63	72,50	65,40	145,56	Nocivo
CV (%)	1,79	11,56					

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Mc% = Mortalidade corrigida

Rinf% = Redução da infectividade

Rfec% = Redução na produção

E% = Efeito do inseticida

TABELA 3 - Compatibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* GL com produtos fitossanitários utilizados na cultura do milho.

Tratamento	Viabilidade (%)	Infectividade (%)	Mc%*	Rinf%	Rfec%*	E%*	Classe IOBC
Controle	99,80 ± 0,45 a	84,00 ± 5,48 a	0,00	0,00	0,00	0,00	Inócuo
NeenMax®	99,60 ± 0,55 a	82,00 ± 8,37 a	0,20	2,38	3,70	6,32	Inócuo
Fortenza 600FS®	98,60 ± 1,34 a	86,00 ± 5,48 a	1,20	0,00	6,90	5,70	Inócuo
Cruiser 350FS®	97,20 ± 0,84 b	76,00 ± 5,48 a	2,61	9,52	2,80	14,97	Inócuo
Avicta 500FS®	97,00 ± 1,58 b	20,00 ± 7,07 c	2,81	76,19	63,70	142,67	Nocivo
Amulet®	95,60 ± 3,29 b	66,00 ± 8,94 c	4,02	17,50	18,20	39,68	Levemente nocivo
Maxim®	92,60 ± 1,52 c	20,00 ± 7,07 c	7,21	76,19	62,30	145,74	Nocivo
CV (%)	1,13	10,88					

*Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Mc% = Mortalidade corrigida

Rinf% = Redução da infectividade

Rfec% = Redução na produção

E% = Efeito do inseticida

Quando expostos aos produtos Cruiser 350 FS® e Avicta 500 FS®, os JIs de *H. amazonensis* MC01 e *H. amazonensis* GL apresentaram índices semelhantes de mortalidade, 2,61% e 2,81%, respectivamente. Já quando expostos ao Amulet®, *H. amazonensis* MC01 apresentou-se ligeiramente mais sensível, já que teve sua viabilidade reduzida em 4,02% e *H. amazonensis* GL em 3,01% (Tabelas 2 e 3).

Para avaliar a infectividade dos JIs, foi contabilizado o número de larvas de *T. molitor* mortas, observando que em relação ao tratamento controle os produtos NeenMax® e Fortenza 600 FS® aumentaram a infectividade de *H. amazonensis* MC01 indicando, portanto, um efeito sinérgico (Tabela 2).

De forma semelhante, Abdel-Rasek e Gowen (2002), Mahmoud (2007) e Laznik e Trdan (2013) também constataram a compatibilidade de nematoides do gênero *Heterorhabditis* com extrato de plantas de nim, indicando que a combinação entre os dois métodos de controle podem ser sinérgicos para o controle de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) e *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). O efeito sinérgico na supressão de insetos também foi identificado com inseticidas químicos (KOPPENHOFER; KAYA 1998; NISHIMATSU; JACKSON, 1998).

Dentre vários mecanismos propostos para explicar o aumento da infectividade o mais comum indica que o inseticida pode afetar o sistema imunológico do inseto hospedeiro, o que o torna mais suscetível ao ataque dos nematoides (MAHMOUD, 2007).

Por outro lado, Rohde et al. (2013) constataram que a combinação dos nematoides *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *S. carpocapsae* All foram incompatíveis com extratos vegetais no controle da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), já que estes reduziram a viabilidade e infectividade dos nematoides em mais de 80%.

A redução da infectividade de *H. amazonensis* MC01 causada por Cruiser 350 FS[®] (12.5%) e Amulet[®] (17.5%) foi superior ao controle, e os dois produtos não diferiram entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade (Tabela 2). Apesar disso, Cruiser 350 FS[®] foi classificado como inócuo e Amulet[®] levemente prejudicial para ambos nematoides (Tabelas 2 e 3).

Alguns testes apontam que JIs são compatíveis com a maioria dos pesticidas quando expostos por curtos períodos (2-24 h), o que facilita seu uso com esses produtos em misturas de tanques (KOPPENHÖFER; GREWAL, 2005). Dessa forma, Tavares et al. (2009) identificaram que os nematoides *Heterorhabditis indica* IBCBn5 e *Steinernema brazilense* IBCBn6 foram compatíveis com baixas doses de um produto a base de tiametoxam, mesmo princípio ativo do Cruiser 350 FS[®]. A compatibilidade de produtos a base de tiametoxam, também já foi identificada para outros nematoides como *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema glaseri* e *Steinernema arenarium* (KOPPENHÖFER; KAYA, 1998; KOPPENHÖFER et al., 2003; ALUMAI; GREWAL 2004; ANDALÓ et al., 2004).

O comportamento de ambos nematoides foi semelhante quando expostos ao Maxim[®] e Avicta 500 FS[®], onde apresentaram baixa redução na viabilidade, porém alta redução na infectividade e produção. A redução da infectividade e da produção provocada pelo Maxim[®] foi respectivamente de 72,5% e 65,4% para MC01 e de 79,19% e 62,3% para GL. Já Avicta 500 FS[®] causou uma redução de 70% e 66,1% para MC01 e de 76,19% e 63,7% para GL na infectividade e produção, respectivamente. Ambos os produtos se apresentaram incompatíveis com os nematoides testados nestas condições (Tabelas 2 e 3).

Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que alguns produtos químicos podem reduzir a quantidade de lipídios, que são a maior fonte de energia dos nematoides e logo sua infectividade, como foi observado para *H. amazonensis* RSC5, *H. amazonensis* JPM4 e *S. carpocapsae* All quando avaliados em larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (ANDALÓ et al., 2009; SABINO et al., 2014).

Sabino et al. (2014) encontraram resultados semelhantes na redução da infectividade de *H. amazonensis* JPM 4 quando expuseram os JIs a um produto a base de abamectina, mesmo princípio ativo do Avicta 500 FS[®]. Além disso, associaram tal redução à diminuição da reserva lipídica que foi testada e comprovada.

Ainda sobre a infectividade, para *H. amazonensis* GL os produtos Cruiser 350 FS[®], Fortenza 600 FS[®] e NeenMax[®] não diferiram do controle pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, já o Amulet[®] causou uma ligeira redução de pouco mais de 20%, e Maxim[®] e Avicta 500 FS[®] apresentaram resultados semelhantes aos encontrado para *H. amazonensis* MC01, causando as maiores reduções (Tabela 3).

Para *H. amazonensis* MC01, Amulet[®] apesar de não ter reduzido a viabilidade dos nematoides causou redução da infectividade em 17,5% e a produção em 18,2% sendo considerado, portanto, ligeiramente prejudicial. Quando exposto ao mesmo produto *H. amazonensis* GL foi ligeiramente mais sensível, tendo sua infectividade reduzida em 28,57% e sua produção em 22,3%.

Para ambos nematoides os produtos Cruiser 350 FS[®], Fortenza 600 FS[®] e NeenMax[®] foram compatíveis já que o efeito do produto (E%) foi menor que 30 (Tabelas 2 e 3), o que evidencia o potencial de aplicação simultânea. Amulet[®] foi considerado ligeiramente prejudicial e Avicta 500 FS[®] e Maxim[®] prejudiciais, indicando a não utilização em conjunto de ambos os métodos.

Para comprovar tais resultados, futuros testes em campo deverão ser realizados a fim de comprovar os efeitos prejudiciais dos produtos aos nematoides, já que em laboratório as condições de exposição são máximas, enquanto que no campo outros fatores podem influenciar na resposta.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-266, 1925. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>
- ABDEL-RASEK, A. S.; GOWEN, S. The integrated effect to the nematode-bacteria complex and neem plant extracts against *Plutella xylostella* (L.) larvae (Lepidoptera: Yponomeutidae) on chinese cabbage. **Archive Phytopathology**, v. 35, n. 2, p. 181-188, 2002. <https://doi.org/10.1080/03235400215658>
- AKHURST, R.; SMITH, K. REGULATION AND SAFETY. In: GAUGLER R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. New York: CABI Publishing. 2002. p.311-332.
- ALUMAI, A.; GREWAL, P. S. Tankmix-compatibility of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*, with selected chemical pesticides used in turfgrass. **Biocontrol Science And Technology**, v. 14, n. 7, p. 725-730, 2004. <https://doi.org/10.1080/09583150410001724334>
- ANDALÓ, V.; MOINO JR., A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C. Compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. **Nematologia Brasileira** v. 28, p. 149-158, 2004.
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G. F.; MAXIMINIANO, C.; MOINO, A. Jr.; CAMPOS, V. P. Influence of herbicides on lipid reserves, mortality and infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Mediterranea**, v. 37, n. 1, p. 11–15, 2009.
- ASKARY, T. H. Limitations, research needs and future prospects in the biological control of phytonematodes. In: ASKARY, T. H.; MARTINELLI, P. R. P. (eds). **Biocontrol Agents of Phytonematodes**. CAB International, Wallingford, UK, 2015.p. 446–454.
- ASKARY, T. H. Nematodes as biocontrol agents. In: LICHTFOUSE, E. (ed.) **Sociology, Organic Farming, Climate Change and Soil Science**. Springer, The Netherlands, 2010. p. 347–378.
- BAKKER, F.; GROVE, A; BLÜMEL, S.; CALIS, J.; OOMEN, P. Side-effect tests for phytoseiids and their rearing methods. **IOBC/WPRS Bulletin**, Montfavet, v.15, n. 3, p.61-75, 1992.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 32, n. 1, p. 117-121, 2000.
- DOLINSKI, C. Nematóides como agentes do controle biológico de insetos. In: OLIVEIRA FILHO, E.C.; MONNERAT, R.G. **Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: EMBRAPA, 2006, p.1-10.
- GREWAL, P. S. **Formulation and application technology**. In: GAUGLER, R. (ed.) **Entomopathogenic Nematology**. CAB International, Wallingford, UK, p. 265–288, 2002.

GREWAL, P. S., WEBBER, T.; BATTERLEY, D. A. **Compatibility of *Steinernema feltiae* with chemicals used in mushroom production.** *Mushroom News* 46, 6–10, 1998.

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. M.; GREWAL, P. S. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. In: GREWAL, P. S.; EHLERS, R. U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Eds). **Nematodes as biological control agents.** CAB International, Wallingford, UK, 2005. p. 363–381.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Synergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: A novel approach to grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 618–633, 1998. <https://doi.org/10.1093/jee/91.3.618>

KOPPENHÖFER, A. M.; COWLES, R. S.; COWLES, E. A.; FUZY, E. M.; KAYA, H. K. Effect of neonicotinoid synergists on entomopathogenic nematode fitness. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 106, p. 7-18, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00008.x>

LAZNIK, Z.; TRDAN, S. The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under laboratory conditions. **Pest Management Science**. v. 70, n. 5, p. 784-789, 2013. <https://doi.org/10.1002/ps.3614>

MAHMOUD, F. Combining the botanical insecticides nsk extract, neemazal t 5%, neemix 4.5% and the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* cross n 33 to control the peach fruit fly, *Bactrocera zonata* (Saunders). **Plant Protection Science**, v. 43, n. 1, p. 19-25, 2007.

MONTEIRO, C. M. de O. et al. Compatibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolado RSC-5 com diferentes carrapaticidas utilizados no controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 3-8, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-16572014000100002>

NISHIMATSU, T.; JACKSON, J. J. Interaction of inseticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn root worm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 2, p. 410–418, 1998.

ROHDE, C. et al. Compatibilidade de nematóides entomopatogênicos e extratos vegetais aquosos visando o controle da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1033-1048, 2013. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n3p1033>

SABINO, P. H. S.; MOINO, A. Jr.; ANDALÓ, V. Effects of some insecticides on the neutral lipid percentage, survival and infectivity of *Steinernema carpocapsae* ALL and *Heterorhabditis amazonensis* JPM 4. **Nematoda**, v. 1, n. 1, 2014. <http://dx.doi.org/10.4322/nematoda.02014>

TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; GOULART, T. M. Efeito sinérgico de combinações entre nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e inseticidas químicos na mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculinidae). **BioAssay**, v. 4, n. 7, p. 1–10, 2009.

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

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v. 66, p. 302-303, 1927. <http://dx.doi.org/10.1126/science.66.1709.302-a>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos cinco isolados de nematoides entomopatogênicos, *Heterorhabditis amazonensis* MC01, *H. amazonensis* JPM3, *H. amazonensis* GL, *Steinernema carpocapsae* All, *Heterorhabditis* sp. Nepet 11, dois se destacaram como agentes de biocontrole de *E. lignosellus*, sendo o *H. amazonensis* MC01 considerado mais virulento a lagartas e *H. amazonensis* GL a pupas.

Observou-se em laboratório que a concentração de JIs foi diretamente proporcional a mortalidade de pupas e lagartas de *E. lignosellus* até certo ponto, a partir do qual a mortalidade começa a decrescer com o aumento da concentração, sendo indicativo de que as competições intra-específicas podem limitar a mortalidade com concentrações muito altas.

No geral, verificou-se que quanto maior tempo de exposição maior a mortalidade das lagartas, indicando uma vantagem do controle com NEPs, uma vez que o mesmo pode persistir no solo a espera de um hospedeiro.

Com relação à compatibilidade dos produtos fitossanitários, somente os produtos a base de Fludioxinil e Abamectina se mostraram incompatíveis causando uma redução na infectividade e produção dos JIs.

Esses resultados podem ser testados em campo a fim de se confirmar o controle diante a presença de outras variáveis.

ANEXOS

ANEXO I - Composição da dieta artificial padrão para *Elasmopalpus lignosellus* (CHALFANT, 1975) com modificações para o presente trabalho

Componente	Quantidade (mL ou g)
Água destilada	645 mL
Feijão	105 g
Levedo de cerveja	32 g
Germe de trigo moído	50 g
Ágar	15 g
Ácido ascórbico	3,25 g
Ácido sórbico	1 g
Ácido benzóico	0,2 g
Nipagin	2 g
Formaldeído (36 a 40%)	2 mL
Óleo de milho	2 mL
Solução inibidora de fungos*	3 mL

*Solução inibidora de fungos: 18 mL de ácido propiônico, 43 mL de ácido fosfórico e 540 mL de água destilada.

Modo de preparo:

- Pese o feijão e coloque para cozinhar numa panela de pressão com um litro de água destilada.
- Aguarde 30 minutos até que o feijão esteja cozido, enquanto isso pese o restante dos reagentes.
- Quando o feijão estiver cozido, separe o caldo dos grãos.
- Meça 400 mL do caldo do feijão e se caso seja necessário completar com água destilada.
- Aguarde que o feijão e o caldo resfriem até 40°C.
- Dissolva o ágar em 245 mL de água destilada fria.
- Adicione ao liquidificador o feijão, o caldo, o levedo, o germe, e a solução de ágar.
- Bata por um minuto até obter uma mistura homogênea.
- Adicione a mistura em uma panela e leve a fogo baixo mexendo sem parar a fim de se evitar grumos por aproximadamente 10 minutos até que se alcance fervura.

- Volte a mistura ao liquidificador e aguarde até que esteja a 60°C, ligue o liquidificador e adicione aos poucos o restante dos reagentes.
- Bata por um minuto.
- Ainda com a dieta quente adicione uma colher rasa de sopa (10 g) aos potes plásticos de 100 mL.
- Mantenha os potes abertos até que a dieta esfrie.
- Após resfriado tampe os potes e se necessário acondicione-os em geladeira.
- A validade da dieta é de aproximadamente 30 dias.

Tempo de preparo: 1:30 h

Rendimento: 70 potes de 100 mL.