

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA
O BICUDO DA CANA-DE AÇÚCAR *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978, E
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DESSES AGENTES COM INSETICIDAS
QUÍMICOS**

FERNANDO MARTINS TAVARES

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Fevereiro – 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA
O BICUDO DA CANA-DE AÇÚCAR *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978, E
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DESSES AGENTES COM INSETICIDAS
QUÍMICOS**

FERNANDO MARTINS TAVARES

Biólogo

Orientador: Dr. Antonio Batista Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP - Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia (Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Fevereiro - 2006

FICHA CATALOGráfICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

T231a Tavares, Fernando Martins, 1979-
Avaliação de nematóides entomopatogênicos contra o bicudo da cana-de-açúcar *Sphaecophorus levis* Vaurie, 1978, e efeito da associação desses agentes com inseticidas químicos/ Fernando Martins Tavares. - Botucatu, [s.n.], 2006.
ii, 61 f. : il. color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006
Orientador: Antonio Batista Filho
Inclui bibliografia

1. Agentes no controle biológico de pragas. 2. Inseticidas sintéticos. 3. Cana-de-açúcar - Doenças e pragas - Controle. 4. Pragas agrícolas - Controle integrado. 5. Bicudo da cana-de-açúcar. I. Batista Filho, Antonio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "AVALIAÇÃO DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA O
BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR, *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978
E EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DESSES AGENTES COM INSETICIDAS
QUÍMICOS"

ALUNO: FERNANDO MARTINS TAVARES

ORIENTADOR: DR. ANTONIO BATISTA FILHO

Aprovado pela Comissão Examinadora



DR. ANTONIO BATISTA FILHO



PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN



DR. LUIS CARRIGOS LEITE

Data da Realização: 02 de fevereiro de 2006.

Para minha filha **Eduarda** - todo amor e
carinho

AGRADECIMENTOS

A DEUS por todos os momentos da minha existência.

Ao Dr. Antonio Batista Filho pela orientação, apoio e oportunidade no curso de mestrado.

Ao Dr. Luis Garrigós Leite Pesquisador Científico do Instituto Bioológico, pela Co-Orientação.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", em especial ao Departamento de Pós Graduação em Proteção de Plantas, pela oportunidade concedida para a realização desse curso.

À Fundação de Apoio a Pesquisa Agrícola (Fundag) pela concessão da Bolsa de Estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo suporte financeiro desta pesquisa.

Ao Prof Dr. Paulo S. M. Botelho e a Usina União São João Açúcar e Álcool S. A. (Araras, SP) pelo apoio durante a realização do experimento de campo.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) pelo fornecimento dos insetos.

Ao Prof Dr. Carlos Frederico Wilcken pelo apoio durante o curso.

Aos estagiários do Laboratório de Controle Biológico do instituto Biológico Alexandre Silva, Alexandre Sano, Beto, Aline, Dani, Guru, Thaís, Mariana, Luciano, Ferdigoto, Emma, Luciana e Dr. Carmem pela amizade e convívio durante o período de realização deste trabalho.

Ao Mestrando Roberto Marchi Goulart pela amizade e indicação no estágio de Iniciação Científica.

À Dra. Inajá M. Wenzel pelo auxílio na confecção da dissertação.

À minha namorada Camila Silveira Gurian pela companhia e pelo apoio na formatação da dissertação, principalmente as Referências.

Aos meus irmãos pela amizade.

Aos meus pais todo meu respeito...

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	1
SUMMARY	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1. Distribuição geográfica do gênero <i>Sphenophorus</i> nos EUA	8
2.2. <i>Sphenophorus levis</i>	8
2.2.1. Biologia	9
2.2.2. Monitoramento e controle do inseto	10
2.2.2.1. Monitoramento	10
2.2.2.2. Controle	10
2.3. Nematóides Entomopatogênicos	11
2.3.1. Biologia	11
2.3.2. Sobrevivência e persistência	12
2.3.3. Pesquisas com nematóides entomopatogênicos no Brasil e testes de eficiência realizados pelo Instituto Biológico de São Paulo	13
2.3.4. Uso de nematóides no controle de curculionídeos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Multiplicação dos nematóides entomopatogênicos	18
3.2. Obtenção de larvas e adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	19
3.3. Avaliação de <i>H. indica</i> e <i>Steinernema</i> sp. contra larvas de <i>S. levis</i> em laboratório e casa de vegetação	20
3.3.1. Experimento em laboratório	20
3.3.2. Experimento em casa de vegetação	21

3.4. Avaliação de <i>H. indica</i> e <i>Steinernema</i> sp. em combinações com inseticidas químicos, contra larvas e adultos de <i>S. levis</i> , em laboratório.....	23
3.4.1. Experimento de compatibilidade.....	23
3.4.2. Experimento com larvas.....	24
3.4.3. Experimentos com adultos.....	25
3.5. Eficiência de <i>H. indica</i> e <i>Steinernema</i> sp. no controle de <i>S. levis</i> em área de soqueira de cana-de-açúcar e o efeito desses agentes com thiamethoxam.....	28
3.6. Análise Estatística.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Avaliação de <i>H. indica</i> e <i>Steinernema</i> sp. contra larvas de <i>S. levis</i> em laboratório e casa de vegetação.....	30
4.1.1. Experimento em laboratório.....	30
4.1.2. Experimento em casa de vegetação.....	32
4.2. Avaliação de <i>H. indica</i> e <i>Steinernema</i> sp. em combinações com inseticidas químicos, contra larvas e adultos de <i>S. levis</i> , em laboratório.....	37
4.2.1. Experimento de compatibilidade.....	37
4.2.2. Experimento com larvas.....	38
4.2.3. Experimentos com adultos.....	39
4.3. Eficiência de <i>H. indica</i> e <i>Steinernema</i> sp. no controle de <i>S. levis</i> em área de soqueira de cana-de-açúcar e o efeito desses agentes com thiamethoxam.....	47
5. CONCLUSÕES.....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

Buscando-se novas alternativas para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, foi testado em laboratório, em estufa e no campo, a ação dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* Poinar, 1992 e *Steinernema* sp., e o efeito da associação desses agentes com subdosagens dos inseticidas químicos fipronil (Regent 800WG), thiamethoxam (Actara 250WG) e imidacloprid (Confidor 700WG), no controle de larvas e adultos do inseto. Inicialmente foram avaliadas diferentes dosagens dos nematóides contra larvas do inseto. O nematóide *Steinernema* sp. apresentou-se mais eficiente no controle de larvas, podendo ser utilizada na menor dosagem avaliada (2,4 JI/cm²), já que ocasionou 69% de mortalidade corrigida do inseto em estufa, não diferindo significamente das maiores dosagens. Esse nematóide apresentou-se mais eficiente também contra adultos do inseto, em teste de laboratório, proporcionando níveis de mortalidade do inseto igual ou superior a 70% nas dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm², quando avaliado em associação com o inseticida thiamethoxam na subdosagem de 250 g p.c./ha. No teste de campo foi possível verificar nas parcelas tratadas com *Steinernema* sp., na dosagem de 1,0x10⁸ JI/ha, associado ao thiamethoxam na dose de 500 g p.c./ha, ganho superior a 28 toneladas de cana crua quando

comparada a testemunha. Quanto ao efeito de fipronil e thiamethoxam sobre a viabilidade dos nematóides em laboratório, esses produtos químicos apresentaram-se compatíveis a esses agentes, não afetando a viabilidade dos juvenis infectivos. O nematóide *Steinernema* sp. é uma alternativa viável para o controle de *S. levis*, podendo ser usado isoladamente ou associado com subdosagem de thiamethoxam.

Palavras-chave: controle microbiano, controle biológico, bicudo da cana de açúcar, inseticida químico, nematóide entomopatogênico.

EVALUATION OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AGAINST THE SUGARCANE BILLBUG, *Sphenophorus levis* VAURIE, 1978, AND THE EFFECT OF THE NEMATODES COMBINED WITH CHEMICAL INSECTICIDES. 2006, 61p. Tese (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: FERNANDO MARTINS TAVARES

Adviser: ANTONIO BATISTA FILHO

SUMMARY

With the purpose to find new alternatives to control the sugarcane billbug *Sphenophorus levis*, this study aimed to evaluate in laboratory, green house and field conditions, the effect of the nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* sp., in combinations with sub-dosages of the chemical insecticides fipronil (Regent 800WG), thiametoxam (Actara 250WG) and imidacloprid (Confidor700WG), against larva and adults of this pest. Firstly, several dosages of the nematodes were evaluated against larvae. The nematode *Steinernema* sp. was the most efficient against larva, with its dosage of 2,4 IJ/cm² showing to be the best one for the insect control since it provide 69% larva mortality, not significantly differing from the other dosages. This nematode was also the most efficient against adults in laboratory test, providing insect mortality levels equal or higher than 70% when evaluated at the dosages of 2,4; 12 and 60 IJ/ha, in combination with thiametoxam at the sub-dosage 250 g c.p./ha. The insecticides fipronil and thiamethoxam did not affected the viability of the infect juveniles. For the field test, the combination of *Steinernema* sp. (108 IJ/ha) plus thiamethoxam (500 g c.p./ha) provided an increasing to the sugarcane production higher than 28 ton/ha. The nematode *Steinernema* sp. seems to be a viable alternative for the

controlling of *S. levis*, providing expressive increasing to the sugarcane production when used alone or in combination with thiamethoxam.

Key words: microbial control, biological control, sugarcane billbug, chemical insecticide, entomopathogenic nematode.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as pragas que danificam a cultura da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, o curculionídeo *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, vem assumindo grande importância, principalmente por estar se disseminando em áreas onde sua incidência ainda não havia sido registrada nesse Estado (ALMEIDA, 2005). Esse aumento na área infestada deve-se principalmente ao descuido no transporte de mudas de uma região a outra, o que tem proporcionado perdas que variam de 50 a 60% dos perfilhos (PRECETTI & ARIGONI, 1990).

Como as larvas do inseto, responsáveis pelo maior dano, se abrigam dentro do rizoma da cana, o uso de inseticidas químicos não proporciona um controle satisfatório da praga. No momento, apenas a destruição mecânica das soqueiras e restos culturais tem proporcionado resultados satisfatórios, porém até o primeiro corte da cana. Após esse período, como o rizoma da cana permanece para a próxima safra, não havendo destruição das soqueiras, a incidência da praga aumenta, sem que haja mecanismos que possam frear o aumento da população do inseto na área (PRECETTI & ARIGONI, 1990).

Uma das alternativas para o controle populacional da praga são os nematóides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, os quais

vêm se mostrando bastante efetivos no controle de diversas espécies de curculionídeos que ocorrem nos EUA (SHAPIRO-ILAN, et al., 2002).

O primeiro estudo realizado no Brasil, avaliando nematóides contra adultos de *S. levis*, mostrou o potencial desses agentes para uso como uma alternativa no controle desse inseto (GOULART, et al., 2004).

Este trabalho teve os seguintes objetivos:

- 1) Avaliar os nematóides *Steinernema* sp. e *H. indica* Poinar, 1992, contra larvas, em laboratório e estufa.
- 2) Avaliar o efeito desses nematóides em combinações com os inseticidas fipronil, thiamethoxam e imidacloprid na mortalidade de larvas e adultos de *S. levis* e o efeito da exposição dos nematóides a esses inseticidas químicos, em laboratório.
- 3) Avaliar a eficiência desses nematóides no controle de *S. levis*, no campo, e o efeito da associação dos nematóides com inseticida thiamethoxam.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cultura da cana-de-açúcar é uma das principais atividades que impulsionam a economia brasileira. Dentre os estados produtores, São Paulo destaca-se com uma produção estimada em 230.310.237 toneladas de cana, na safra 2004/2005, correspondendo a mais de 60% do total produzido no país (UNICA, 2005).

Para manter esta elevada produtividade muito tem sido investido no estabelecimento e condução da cultura destacando-se diversos aspectos como o Manejo Integrado de Pragas, principalmente pelo uso de novas alternativas de controle (GALLO et al., 2002). Mais recentemente, com a conscientização do uso de produtos sem agrotóxicos, diversos centros de pesquisa vêm estudando agentes biológicos para o controle de pragas, com destaque para os fungos entomopatogênicos e parasitóides. Nematóides entomopatogênicos têm sido estudados para o controle de diversas pragas de solo, entre eles o bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis*, uma das principais pragas que atingem a cana-de-açúcar no estado de São Paulo (GOULART et al., 2004).

2.1 Distribuição geográfica do gênero *Sphenophorus* nos EUA

O gênero *Sphenophorus* compõe um complexo de espécies que danificam diversas culturas de importância econômica, mais precisamente as gramíneas. Só nos EUA ocorrem mais de 64 espécies desse gênero, sendo que 20 já foram registradas na Flórida (WOODRUFF, 1966).

No Arkansas, *Sphenophorus maidis* foi descrito causando danos severos em plantas jovens de milho, sendo que as plantas sobreviventes ao ataque da praga foram danificadas posteriormente por escarabeídeos (HAYES, 1920). Essa mesma espécie foi relatada atacando milho em Oklahoma e em Missouri. Na Pensilvânia, *Sphenophorus aequalis* é a principal espécie, dentre um complexo de pragas do gênero *Sphenophorus* que atacam a cultura do milho (GESELL, 1983).

Em Maryland (USA), *Sphenophorus parvulus* e *Sphenophorus venatus vestitus* são relatados como as principais pragas de gramados, sendo que a segunda espécie foi encontrada em diversas outras localidades dos Estados Unidos, incluindo a Flórida (WOODRUFF, 1966). Em Oregon, foi relatada a ocorrência de *S. venatus vestitus* juntamente com as espécies *Sphenophorus cicatristriatus* e *Sphenophorus sayi*. Já *S. parvulus* é a principal praga de gramado “bluegrass”, sendo que a espécie *Sphenophorus minimus* também pode ser encontrada no estado de Oregon causando algum dano na planta.

No estado da Flórida, as espécies *Sphenophorus coesifrons* e *S. venatus vestitus* foram listados como insetos fitófagos que ocorrem na cultura da cana-de-açúcar (HALL, 1988)

2.2. *Sphenophorus levis*

O bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) é uma das principais pragas da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (GALLO et al., 2002). Já em 1990, *S. levis* foi mencionado ocorrendo na região de Piracicaba, sendo considerada praga primária por causar a morte de 50 a 60% dos perfilhos ainda na fase de cana-planta, com cinco a sete meses de crescimento (PRECETTI & ARIGONI, 1990). Nos últimos anos esse inseto foi encontrado também em outros 41 municípios, sendo 11

municípios mais distantes da região de Piracicaba. Este fato se deve principalmente ao descuido no transporte de mudas infestadas, de uma região a outra, já que o inseto possui baixa taxa de dispersão, sendo da ordem de 6,60 à 11,10 metros por mês (DEGASPARI et al., 1987)

Na cana-de-açúcar ocorrem dois picos populacionais da praga na forma adulta: o primeiro no período de fevereiro a março e o segundo nos meses de outubro e novembro. Para larvas, ocorrem também dois picos populacionais, sendo um nos meses de maio e julho, e o outro no mês de novembro (TERÁN & PRECETTI, 1983). Portanto, nos períodos de maio a novembro, especialmente nos três primeiros meses, ocorrem os maiores danos nas plantas de cana-de-açúcar, já que a fase larval é a que causa maiores prejuízos na cultura (ALMEIDA, 2005).

O dano na planta é verificado no rizoma abaixo do nível do solo, local onde a larva se alimenta e abriga, abrindo galerias circulares e longitudinais na base da brotação. Esse ataque resulta no amarelamento da folha e morte do perfilho, conseqüentemente ocasionando em falha nas rebrotas das soqueiras. Também pode ser observado aumento na proliferação de plantas invasoras, que ocupam os espaços deixados pela falha no perfilho (PRECETTI & ARIGONI, 1990). Tudo isso resulta na redução da tonelagem de cana produzida por hectare (PRECETTI & TERÁN, 1983).

2.2.1. Biologia

Em laboratório a fêmea adulta de *S. levis* realiza a postura na parte interna do colmo utilizando o rostro para abrir um orifício, ovipositando ao longo da sua existência em torno de 60 a 70 ovos (PRECETTI & TERÁN, 1983).

O período de incubação aproximado é de 7 a 12 dias. Após a eclosão da larva, o inseto se apóia nas paredes das galerias abertas para se locomover. O período larval é de aproximadamente 35,5 dias. Pouco antes de a larva alcançar à fase de pupa, ela abre uma galeria, onde o inseto se instala, cessando sua alimentação e movimentação (DEGASPARI et al., 1987).

O período pupal é de 5 a 7 dias, emergindo o adulto de coloração castanho, que em laboratório pode permanecer vivo até 205 dias. No campo o adulto se abriga

abaixo do nível do solo e raramente são encontrados voando (PRECETTI & ARIGONI, 1990). O período médio de ovo a adulto é de 57,2 dias, sendo a razão sexual de 1:1 (BOTELHO et al., 1983).

O surgimento da praga no campo está intimamente relacionado com a variação da temperatura, verificando-se que os picos populacionais de adultos ocorrem nos períodos mais quentes do ano.

2.2.2. Monitoramento e controle do inseto

2.2.2.1. Monitoramento

O monitoramento do inseto na fase adulta é realizado por meio de armadilhas formadas com iscas atrativas confeccionadas com toletes de cana de 1 metro, rachados ao meio e imersos em inseticida químico por 24 horas. Após este período, os toletes são colocados nas bases das touceiras e revestidos com palha da cana na razão de 100 toletes para cada hectare. Passados 20 dias, a avaliação da incidência de adulto é feita com base na quantidade de insetos mortos (ALMEIDA, 2005). Esta armadilha também foi utilizada para o controle de adultos no campo, visando-se desviar a ovoposição das fêmeas recém emergidas, para as armadilhas atrativas (TERÁN et al., 1986).

2.2.2.2. Controle

O método de controle mais utilizado no manejo de *S. levis* é a destruição mecânica das soqueiras no período de plantio (momento da reforma do canavial), procurando-se expor ao máximo as larvas aos seus predadores e ao secamento dos rizomas, recomendando-se também eliminar o mato infestante que pode servir de alimento para larvas (PRECETTI & ARIGONI, 1990).

Esta prática apresenta resultado satisfatório somente no 1º corte, pois muitas larvas do inseto conseguem sobreviver alimentando-se da matéria orgânica deixada no campo, após a destruição das soqueiras, não afetando também as formas adultas do inseto. Com relação ao controle químico, o inseticida fipronil (Regent 800WG) é o produto

atualmente recomendado tentando reduzir a incidência da praga no campo. Assim como na destruição das soqueiras, esta técnica é utilizada no plantio procurando-se evitar o ataque da praga na cana planta (ALMEIDA, 2005).

No controle biológico foi estudada a utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, em associação com isca atrativa formada por tolete de cana, visando o controle da população de adultos (BADILLA & ALVES, 1989).

A sanidade de áreas de mudas também deve ser considerada, procurando-se evitar a introdução da praga em locais onde ainda não há registro do inseto, ou reinfestação no campo. Mudas infestadas são as principais propagadoras do inseto, por isso é muito importante verificar sempre o local de origem das mudas, observando-se a presença ou não da praga (PRECETTI & ARIGONI, 1990).

2.3. Nematóides Entomopatogênicos

Os estudos com nematóides entomopatogênicos têm avançado bastante nos últimos anos, especialmente no tocante aos métodos de produção e descoberta de novas espécies/isolados. Atualmente, estão disponíveis no mercado pelo menos 5 espécies de nematóides para o controle biológico de pragas, quais sejam: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis megidis*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema feltiae* e *Steinernema riobrave* (ALVES, 1998). Na América Latina, as pesquisas sobre nematóides têm se restringido a descrição de algumas espécies novas, ao relato de ocorrências de espécies já conhecidas e a alguns resultados de experimentos no controle de pragas.

2.3.1. Biologia

Steinernema e *Heterorhabditis* são gêneros de nematóides entomopatogênicos encontrados freqüentemente no solo ou infectando insetos, em diversas regiões do mundo (HOMINICK, 2002). No solo, esses nematóides são encontrados na fase de juvenis infectivos de terceiro estágio, forma responsável pela busca e infecção do hospedeiro. Nessa fase o nematóide não se alimenta, podendo resistir por um bom tempo as ações do intemperismo (GLAZER, 2002).

Esses agentes de controle carregam bactérias altamente patogênicas a insetos, em seu trato digestório, numa associação mutualística em que o nematóide, ao penetrar em um hospedeiro pelas aberturas naturais, tais como o ânus, boca e espiráculos ou pelo tegumento, e invadir seu hemocele, liberam a bactéria que causa septicemia no inseto entre 24 e 48 horas (FERRAZ, 1998). O nematóide se alimenta da bactéria e tecidos do hospedeiro, se reproduzindo entre 2 a 3 gerações. Com a exaustão dos nutrientes, o nematóide emerge do cadáver como juvenil infectivo para a procura de novos hospedeiros.

O ciclo de vida para a maioria dos esteinernematídeos e heterorabditídeos, da infecção à emergência dos juvenis infectivos, varia de 7 a 10 e 12 a 15 dias, respectivamente, em temperatura ambiente (EHLER, 2001).

2.3.2. Sobrevivência e persistência

Nematóides entomopatogênicos são extremamente dependentes da quantidade de lipídios armazenada no seu organismo e da umidade e temperatura para sobreviverem no solo (PATEL & WRIGHT, 1997; GLAZER, 2002). Essa capacidade de sobrevivência em diferentes temperaturas têm sido avaliada em diversos estudos, procurando selecionar isolados que permitam estar adaptados às adversidades de cada região.

Cada espécie e até mesmo isolados da mesma espécie reagem diferentemente as variações de temperatura e umidade. Desse modo, a avaliação de nematóides se faz necessária, com o objetivo de descobrir novos agentes que sejam mais eficientes para uso nos programas de controle biológico de pragas. Estudos de formulação e técnicas de aplicação tentam amenizar os efeitos do clima. Essas formulações permitem maior persistência dos nematóides no ambiente, garantindo melhores resultados no controle de pragas. Também o cuidado na aplicação pode ser um fator essencial para garantir o sucesso desses agentes a níveis de controle de uma determinada praga (GEORGIS, 1990).

Cabe ressaltar, que muitos fatores podem interferir na reciclagem e manutenção desses agentes no campo. McCoy et al. (2000) demonstraram que formigas podem interferir nesta reciclagem, capturando insetos infectados pelos nematóides e interrompendo a reprodução dos nematóides nos cadáveres. Por outro lado, a possibilidade dos nematóides infectarem mais de um estágio de desenvolvimento de uma mesma espécie pode

provocar um aumento na quantidade de inóculo no campo, acarretando muitas vezes num controle maior do que o esperado (LOYA & HOWER JR., 2003).

2.3.3. Pesquisas com nematóides entomopatogênicos no Brasil e testes de eficiência realizados pelo Instituto Biológico de São Paulo

No Brasil, algumas espécies de nematóides têm sido encontradas atacando insetos, ou sendo isoladas a partir de amostras de solos:

- *Heterorhabditis hambletoni* foi originalmente encontrado atacando a broca do algodoeiro (*Eutinobothrus brasiliensis*) e descrito por Pereira em 1937 como pertencente ao gênero *Rhabditis* (POINAR, 1979).
- *Steinernema scapterisci* foi primeiramente encontrado no Brasil e Uruguai atacando a paquinha (FOWLER & GARCIA, 1988), e, em seguida na Argentina parasitando o mesmo hospedeiro (STOCK, 1992). Hoje este nematóide é amplamente usado nos USA, em campos de golfe e pastagens.

Atualmente, grupos de pesquisas têm se empenhado em encontrar novas espécies de nematóides. O Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico vem realizando levantamento de nematóides, a partir de amostras de solo, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo, sendo já encontrados mais de 20 isolados de nematóides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (GOULART et al., 2003). Segundo os autores, alguns desses isolados já foram fornecidos para mais de 5 instituições visando estudos de controle de pragas. Paiva et al. (2003) relataram também a incidência do gênero *Heterorhabditis* nas zonas de cultivo de citros, em 7 municípios do Estado de São Paulo.

Em outro estudo sobre ocorrência de nematóides entomopatogênicos, Acevedo (2005) comparou técnicas para isolamento de nematóide entomopatogênicos, a partir de amostras de solo coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, concluindo que o uso de insetos armadilha, no caso *Galleria mellonella*, proporcionou maior eficiência.

Diversos testes de controle com nematóides entomopatogênicos também têm sido realizados contra algumas pragas de importância econômica. Contra

Naupactus sp., curculionídeo-da-raiz do citros, Leite et al. (2002) avaliaram a patogenicidade de *S. carpocapsae*, *Steinernema arenarium* e *Heterorhabditis* sp. aplicados sobre o solo, em laboratório. Foi obtido 75% de mortalidade de larvas com o nematóide *Heterorhabditis* sp., 8 dias após a aplicação.

Já Tavares et al. (2003) avaliaram isolados de nematóides entomopatogênicos contra larvas de *Bradysia* sp., verificando que o isolado *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n5) proporcionou alto índice de mortalidade de larvas do inseto (70%) 3 dias após a aplicação do nematóide. Bussóla et al.(2005) comparou o nematóide *H. indica* com *S. feltiae*, no controle de *Bradysia* sp. em casa de vegetação, obtendo mais de 75% de controle do inseto na dosagem de 100 JI/cm². O nematóide *S. feltiae* não proporcionou nível satisfatório de controle do inseto.

Em ensaios de campo,. Machado¹ comparou o mesmo isolado de *Heterorhabditis* sp., com inseticida químico e um isolado do fungo *Metarhizium anisopliae*, contra besouros escarabeídeos da cultura de cana-de-açúcar, obtendo melhor resultado com o nematóide, chegando a um controle de 60% na dosagem de 5x10⁸ JI/ha (juvenis infectivos por hectare).

Leite et al. (2005) avaliaram o nematóide *H. indica* no controle da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*, em condições de campo, obtendo taxa de mortalidade variável de 60 a 70%, de ninfas do inseto. Tais resultados sugerem um futuro promissor para o uso de nematóides entomopatogênicos no Brasil.

2.3.4. Uso de nematóides no controle de curculionídeos

Nematóides entomopatogênicos já foram testados amplamente no controle de curculionídeos que atacam cultivos de importância econômica, havendo já disponível no mercado diversos produtos a base desses agentes, para o controle de curculionídeos. No controle de *Diaprepes abbreviatus*, o nematóide *S. riobraves* vem proporcionando os melhores resultados de controle de larvas. McCoy et al. (2000) obtiveram bons resultados com esse nematóide no controle de *D. abbreviatus*, porém altas doses foram

¹ MACHADO, L. A. (Instituto Biológico – Campinas). Comunicação Pessoal, 2005.

requeridas para se atingir um bom nível de controle. Utilizando-se do mesmo nematóide, Shapiro-Ilan & McCoy (2000) avaliaram JIs produzidos “in vitro” e “in vivo”, no controle de larvas de *D. abbreviatus*, em condições de campo, conseguindo bons resultados com uso desse agente, independentemente do modo a produção do entomopatógeno.

S. riobraves também proporcionou elevados níveis de mortalidade de larvas do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, em teste de laboratório. As larvas de primeiros ínstaes foram mais susceptíveis ao nematóide que os demais estádios de desenvolvimento do inseto, sendo que a CL_{50} foi de 3,9 JIs por larva de 1º instar. O único entrave para o uso desse nematóide no controle desse inseto é o fato de que a praga se desenvolve nas partes florais que só podem ser atingidas pelos JIs quando essas estruturas atingem o solo (abscisão) (CABANILLAS, 2003).

Outro nematóide efetivo no controle de curculionídeos é *S. carpocapsae*. Contra larvas e adultos do gorgulho da pecan *Curculio caryae*, esse nematóide entomopatogênico proporcionou taxa de mortalidade expressiva, em testes realizados em laboratório, sendo que adultos foram mais susceptíveis ao ataque do nematóide (SHAPIRO-ILAN et al. 2003). O mesmo nematóide demonstrou efeito aditivo no controle desse inseto, quando associado aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (SHAPIRO-ILAN et al., 2004).

O nematóide *S. carpocapsae* foi avaliado também para o controle de *Cosmopolites sordidus*, praga da cultura da banana. Um sistema armadilha formado pelo nematóide aplicado com auxílio de uma seringa, em abertura feita no pseudocaule da planta, resultou num bom nível de controle, a custo extremamente baixo (TREVERROW & BEDDING, 1993). No Brasil, *C. sordidus* também é reportado como alvo potencial para uso de nematóides entomopatogênicos (GREWAL et al., 2001). Outro inseto que demonstrou ser susceptível aos nematóides, em laboratório, foi a praga da raiz dos citros *Naupactus* sp. (LEITE et al., 2002).

Nos Estados Unidos e Japão, os gorgulhos das gramíneas *Sphenophorus* spp. têm sido eficientemente controlados pelo uso dos nematóides *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*. Este último, na dose de $2,5 \times 10^9$ juvenis infectivos/ha, proporcionou níveis de controle variáveis de 70,4 a 91,2% para *S. purvulus* em estudos realizados nos Estados Unidos, e de 77,3 a 96,2% para *S. venatus* em testes no Japão. Já *H.*

bacteriophora, na mesma dose, foi um pouco menos eficiente para *S. purvulus*, proporcionando níveis de controle variáveis de 67,0 a 84,1%. Todos os estágios imaturos desses insetos são suscetíveis aos dois nematóides, o mesmo ocorrendo com os adultos de *S. venatus* em relação a *S. carpocapsae* (SHAPIRO-ILAN et al., 2002; SMITH, 1994)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos em laboratório e em casa de vegetação foram realizados nas dependências do Laboratório de Controle Biológico, do Instituto Biológico, sediado em Campinas, SP. O experimento de campo foi realizado em uma área da fazenda São Jerônimo, que pertence a Usina São João, localizada em Araras, SP.

Nos estudos foram utilizados os nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp., os quais encontram-se depositados na Coleção de Nematóides Entomopatogênicos, do Banco de Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu”, pertencente ao Instituto Biológico (GOULART et al., 2003), registrados como IBCB-n5 e IBCB-n6, respectivamente.

O nematóide *H. indica* foi isolado a partir de amostra de solo coletada em área de cultivo de citros, no município de Itapetininga, SP. Já o nematóide *Steinernema* sp. foi isolado a partir de amostra de solo coletada em área de mata nativa, no município de Porto Murtinho, MT.

3.1. Multiplicação dos nematóides entomopatogênicos

Os nematóides usados nos testes em laboratório, e casa de vegetação, foram multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* (3° ao 5° instar), mais conhecida como “traça dos favos”, as quais foram criadas em bandejas metálicas circulares, sendo mantidas em dieta artificial à base de soja e cera de abelha, em estufa (32°C), segundo metodologia citada por Cruz (1988) (Figura 1A). Para o teste de campo, os nematóides utilizados foram produzidos “in vitro”, segundo metodologia usada por Bedding (1984) (Figura 1B).

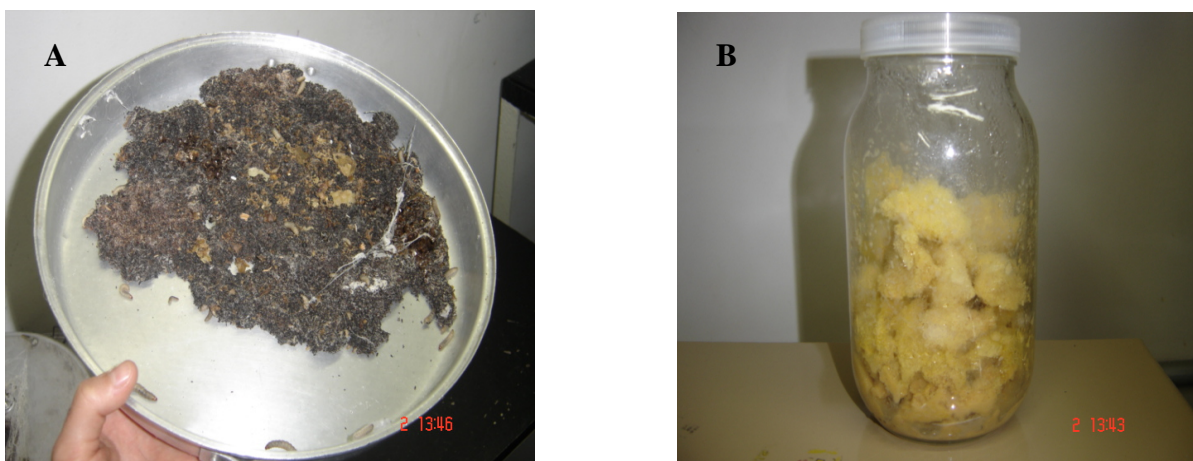


Figura 1. (A) Bandeja de criação de *G. mellonella* e (B) Recipiente de vidro contendo inóculo de nematóide produzido “in vitro”, segundo metodologia de Bedding (1984)

As espécies dos nematóides foram multiplicadas em placa de Petri (9 cm de diâmetro) com papel filtro no fundo, o qual recebeu 2 mL de suspensão contendo 10000 JI (JI = juvenis infectivos). Em cada placa foram adicionadas 10 larvas de *G. mellonella*. As mesmas foram lacradas com filme de PVC e acondicionadas a 25°C, no escuro.

Após 3 dias, as larvas mortas de *G. mellonella* foram retiradas das placas e colocadas em armadilha de “White”, formada por placa de Petri (13 cm de diâmetro por 2 cm de altura) contendo papel filtro apoiado em tampa plástica (4 cm de diâmetro por 1 cm de altura). No fundo da placa foi adicionada água (lâmina de 0,5 cm de espessura), tendo

em vista coletar os nematóides entomopatogênicos que abandonaram o cadáver do inseto (Figura 2A).

Após 7 dias, os nematóides suspensos na água foram filtrados em papel filtro, com auxílio de um funil de Buchner, “Kitasato” e bomba d’ vácuo (Figura 2B). O papel filtro foi então lavado e a suspensão dos nematóides obtida foi mantida sob oxigenação constante em baldes plástico (21 cm de diâmetro por 20 cm de altura) durante 24 horas.

Após esse período, os nematóides foram filtrados novamente (metodologia já descrita anteriormente) e armazenados em potes plásticos (21 cm de comprimento, 12 cm de largura e 6 cm de altura) à 15°C, no escuro, por um período de 2 a 10 dias (antes de serem usados)². Em cada teste os nematóides foram quantificados em câmara de Peters.

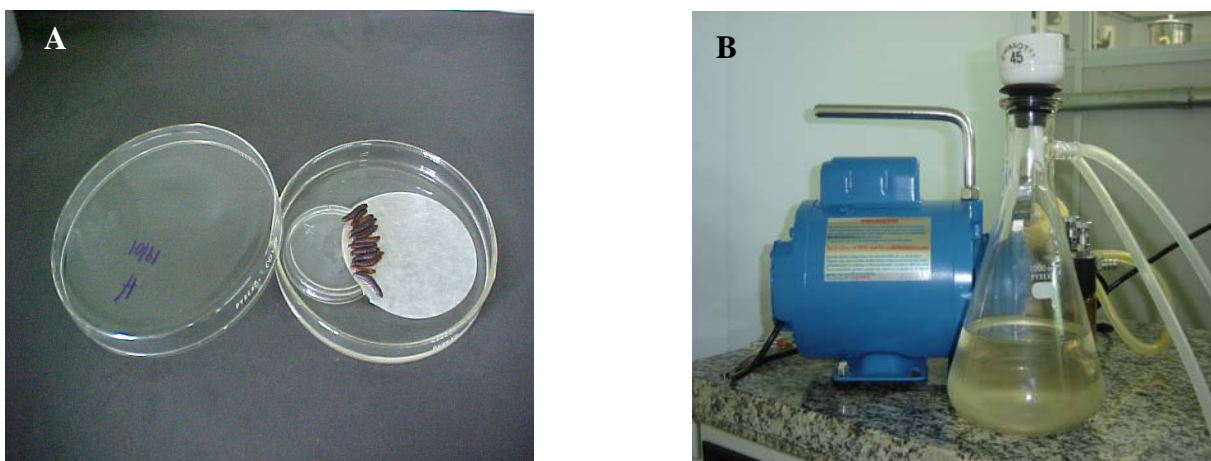


Figura 2. (A) Armadilha de White. (B) Funil de Buchner, “Kitasato” e bomba d’ vácuo utilizada na filtragem dos nematóides

3.2. Obtenção de larvas e adultos de *Sphenophorus levis*

Os insetos adultos usados no experimento foram obtidos a partir de coletas em cultura de cana-de-açúcar, na Fazenda Iracema, pertencente ao Centro de

² Os nematóides foram preparados seguindo sempre a mesma metodologia, em todos os testes realizados.

Tecnologia Canavieira (CTC), situada em Piracicaba, SP. Para a coleta foram utilizadas armadilhas atrativas formadas por toletes de cana crua de um metro cada, agrupadas em valas abertas (1 m x 1 m) entre as linhas da cultura (PRECETTI & TERÁN, 1983).

Os insetos foram retirados diariamente até se obter quantidade suficiente para a realização dos experimentos. Os mesmos antes de serem utilizados foram mantidos em recipientes plásticos (13 cm de largura, 13 cm de comprimento e 20 cm de altura) com a tampa furada e vedada com pano de “filó”, sendo alimentados com pedaços de colmo de cana-de-açúcar. As larvas foram obtidas de criação em laboratório, mantidas em dieta artificial (DEGASPARI et al., 1987), sendo fornecidas pelo CTC.

3.3. Avaliação de *H. indica* e *Steinernema* sp. contra larvas de *S. levis* em laboratório e casa de vegetação³

3.3.1. Experimento em laboratório

Foram utilizadas larvas de *S. levis* de diferentes estádios de desenvolvimento (do 2º ao último instar), sendo considerados 7 tratamentos, quais sejam:

- I. Testemunha (Água destilada);
- II. *Steinernema* sp. (2,4 JI/cm²);
- III. *Steinernema* sp. (12 JI/cm²);
- IV. *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- V. *H. indica* (2,4 JI/cm²);
- VI. *H. indica* (12 JI/cm²);
- VII. *H. indica* (60 JI/cm²).

Os tratamentos foram constituídos por 5 repetições, sendo cada uma formada por 5 larvas agrupadas em um recipiente plástico (9 cm de diâmetro por 5 cm de altura), o qual recebeu um pedaço de colmo de cana-de-açúcar (3,5 cm de comprimento), perfurado em 5 regiões com auxílio de um vazador (0,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de

³ As dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm² equivalem a 1,0x10⁸, 4,0x10⁸ e 2,0x10⁹ JI/ha (Juvenis infectivos por hectare).

profundidade). Cada larva foi introduzida em uma perfuração do colmo, o qual serviu de alimentação para os insetos.

Os pedaços de colmo foram colocados nos potes e posteriormente cobertos com 287 mL de solo arenoso com umidade aproximada de 10% (P/P=peso por peso).

A suspensão de nematóides foi aplicada com auxílio de pipeta plástica na superfície do solo, usando-se um volume de 0,76 mL por pote. As dosagens dos nematóides foram calculadas com base nas áreas dos potes, considerando-se uma calda de 400 L por hectare. Os potes foram fechados com tampas furadas, para permitir aeração, e acondicionados em câmara com temperatura, umidade relativa e luminosidade controlada ($T^{\circ}=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}=70 \pm 10\%$ e fotofase de 12horas).

A avaliação foi feita 9 dias após a aplicação, contando-se o número de insetos mortos. As larvas mortas pelos nematóides foram utilizadas na verificação da quantidade de nematóides (juvenis infectivos) produzidos por inseto. Os insetos mortos foram colocados em solução de hipoclorito à 2%, durante um período de 10 minutos e, em seguida, foram colocados em água destilada. Os mesmos foram individualmente colocados em armadilha de White.

Após o término do período de emergência de juvenis infectivos (aproximadamente 10 e 15 dias, para os nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp., respectivamente) os nematóides foram quantificados em câmara de Peters, para avaliação da quantidade de JIs produzidos por larva.

3.3.2. Experimento em casa de vegetação

No ensaio realizado em estufa (Figura 3A) foram considerados os mesmos tratamentos do 1º experimento realizado em laboratório, sendo cada tratamento formado por 8 repetições, representados por 5 larvas cada uma (do 2º ao último instar), agrupadas em “balde” plástico (21 cm de diâmetro por 20 cm de altura), o qual recebeu dois rizomas de cana-de-açúcar previamente perfurados com auxílio de um vazador (0,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de profundidade), para permitir a alimentação do inseto (Figura 3B). Em cada perfuração foi introduzida uma larva, totalizando 5 larvas por balde.

As partes do rizoma foram mantidas enterradas, adicionando-se, em cada balde, 4710 mL de solo arenoso com umidade aproximada de 10% (P/P).

Os nematóides suspensos em água foram aplicados com auxílio de pipeta plástica na superfície do solo, usando-se um volume de 3,77 mL por balde. As dosagens dos nematóides foram calculadas com base na área do balde considerando-se uma calda de 400 L por hectare. Os baldes foram umedecidos a cada 2 dias, para evitar o ressecamento do solo.

A avaliação foi feita após 12 dias à aplicação dos tratamentos, contando-se o número de insetos mortos.



Figura 3. (A) Baldes contendo rizomas de cana-de-açúcar infestados com larvas de *S. levis*.
(B) Larva sendo introduzida em orifício feito no rizoma da cana.

3.4. Avaliação de *H. indica* e *Steinernema* sp. em combinações com inseticidas químicos, contra larvas e adultos de *S. levis*, em laboratório

3.4.1. Experimento de compatibilidade

Nesse experimento foram considerados 6 tratamentos:

- I. *H. indica* (Água destilada);
- II. *H. indica* + Fipronil (250 g p.c./ha);
- III. *H. indica* + Thiamethoxam (1000 g p.c./ ha);
- IV. *Steinernema* sp. (Água destilada);
- V. *Steinernema* sp. + Fipronil (250 g p.c./ ha);
- VI. *Steinernema* sp. + Thiamethoxam (1000 g p.c./ ha)⁴.

Os tratamentos foram representados por 5 repetições, sendo cada uma composta por 20 ml da calda dos produtos e 500 JI dos nematóides, colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) (Figura 4A). Os nematóides foram colocados nas placas com auxílio de um papel filtro, utilizando-se funil de Buchner, “Kitasato” e bomba de vácuo. As placas foram acondicionadas em BOD ajustada a 24° C, no escuro.

A avaliação foi realizada após 12 horas da mistura dos nematóides com os produtos, considerando-se a mortalidade dos juvenis infectivos (Figura 4B). Os nematóides foram contabilizados com auxílio de lupa estereoscópica.

⁴ Volume de aplicação equivalente à 400 L/ha.

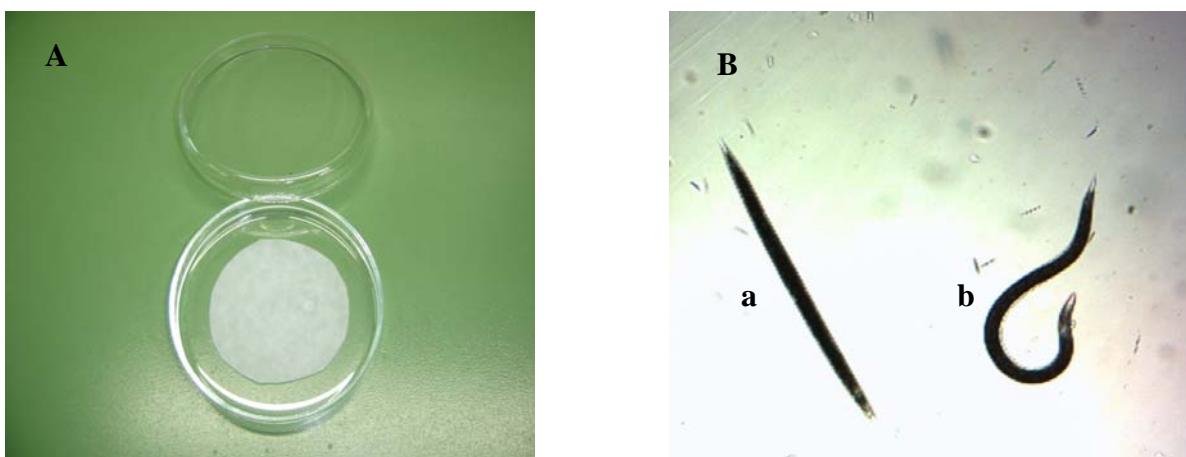


Figura 4. (A) Placa de Petri contendo suspensão de nematóide + inseticida e papel filtro usado para transferir os nematóides usados no experimento. (B) Juvenis infectivos de nematóide entomopatogênico observado em microscopia óptica (40x); (a) Morto e (b) Vivo.

3.4.2. Experimento com larvas

Nesse experimento foram considerados 6 tratamentos:

- I. Testemunha (Água destilada);
- II. *H. indica* (12 JI/cm²);
- III. *Steinernema* sp. (12 JI/cm²);
- IV. Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- V. Thiamethoxam (250 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (12 JI/cm²);
- VI. Thiamethoxam (250 g p.c./ha) + *H. indica* (12 JI/cm²).

Os tratamentos foram representados por 5 repetições, sendo cada uma formada por 4 larvas agrupadas em um recipiente plástico (9 cm de diâmetro por 5 cm de altura), o qual recebeu um pedaço de colmo de cana-de-açúcar (3,5 cm de comprimento), perfurado em 5 regiões com auxílio de um vazador (0,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de profundidade). Cada larva foi introduzida em uma perfuração do colmo, o qual serviu de alimentação para os insetos.

Os pedaços de colmo foram colocados nos potes e posteriormente enterrados com 287 mL de solo arenoso com umidade aproximada de 10% (P/P=peso por peso).

A suspensão de nematóides foi aplicada com auxílio de pipeta plástica na superfície do solo, usando-se um volume de 0,76 mL por pote. As dosagens dos nematóides foram calculadas com base nas áreas dos potes, considerando-se uma calda de 400 L por hectare. Os potes foram fechados com tampas furadas, para permitir aeração, e acondicionados em câmara com temperatura, umidade relativa e luminosidade controlada ($T^{\circ}=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}=70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

A avaliação foi feita 9 dias após a aplicação, contando-se o número de insetos mortos.

3.4.3. Experimentos com adultos

1º Experimento. Para o teste foram considerados 9 tratamentos:

- I. Testemunha (Água destilada);
- II. *H. indica* (60 JI/cm²);
- III. *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- IV. Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- V. Fipronil (125 g p.c./ha);
- VI. Thiamethoxam (250 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- VII. Thiamethoxam (250 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²);
- VIII. Fipronil (125 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- IX. Fipronil (125 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²).

Os inseticidas Actara 250WG e Regent 800WG foram avaliados na dosagem equivalente a ¼ da recomendação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para as pragas *M. fimbriolata* e *Migdolus fryanus*, respectivamente (MAPA, 2005).

Cada tratamento foi representado por 5 repetições e cada repetição foi formada com 5 adultos do inseto, agrupados em um recipiente plástico (9 cm de diâmetro por 4 cm de altura), contendo um pedaço de colmo de cana-de-açúcar (3,5 cm de comprimento). Os potes foram preenchidos com 287 mL de solo arenoso com umidade de 10% (P/P), sendo posteriormente colocado os insetos. Os tratamentos foram dispostos em Erlenmeyers de 250 mL, numa solução de 100 mL em cada, os quais foram colocados em agitador orbital ajustado para 200 rpm e mantidos sob agitação por 1 hora. Após esse período, um volume de 0,76 mL de cada tratamento foi aplicado com auxílio de pipeta plástica, na superfície do solo. As dosagens dos inseticidas e nematóides foram calculadas com base nas áreas dos potes, considerando-se uma calda de 400 L por hectare. Os potes foram fechados com tampa furada, para permitir aeração, e acondicionados em câmara com temperatura, umidade relativa e luminosidade controlada ($T^{\circ}=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}=70 \pm 10\%$ e fotofase 12 horas).

A avaliação foi realizada com 9 dias da aplicação dos tratamentos, contando-se o número de insetos mortos.

2º Experimento. Este ensaio contou com os seguintes tratamentos:

- I. Testemunha (Água destilada);
- II. *H. indica* (60 JI/cm²);
- III. *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- IV. Imidacloprid (250 g p.c./ha);
- V. Fipronil (65,2 g p.c./ha);
- VI. Imidacloprid (250 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- VII. Imidacloprid (250 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²);
- VIII. Fipronil (65,2 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- IX. Fipronil (65,2 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²).

O inseticida Confidor 700 GrDa foi avaliado na dosagem equivalente a $\frac{1}{4}$ da recomendação do MAPA e o inseticida Regent foi avaliado na dosagem de $\frac{1}{4}$ da recomendação do C.T.C (250 g p.c./ha) (MAPA, 2005; ALMEIDA, 2005).

A metodologia foi a mesma utilizada no primeiro experimento com adultos, porém foram utilizados 6 insetos por repetição.

3º Experimento. Nesse teste foram avaliados o efeito dos nematóides em diferentes dosagens, com subdosagens dos inseticidas thiamethoxam e fipronil, os quais proporcionaram melhores resultados nos dois primeiros testes.

O ensaio foi composto por 21 tratamentos, sendo:

- I. Testemunha (Água destilada);
- II. *H. indica* (2,4 JI/cm²);
- III. *H. indica* (12 JI/cm²);
- IV. *H. indica* (60 JI/cm²);
- V. *Steinernema* sp. (2,4 JI/cm²);
- VI. *Steinernema* sp. (12 JI/cm²);
- VII. *Steinernema* sp. (60 JI/cm²);
- VIII. Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- IX. Fipronil (65,2 g p.c./ha);
- X. *H. indica* (2,4 JI/cm²) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- XI. *H. indica* (12 JI/cm²) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- XII. *H. indica* (60 JI/cm²) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- XIII. *Steinernema* sp. (2,4 JI/cm²) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- XIV. *Steinernema* sp. (12 JI/cm²) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- XV. *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- XVI. *H. indica* (2,4 JI/cm²) + Fipronil (65,2 g p.c./ha);
- XVII. *H. indica* (12 JI/cm²) + Fipronil (65,2 g p.c./ha);
- XVIII. *H. indica* (60 JI/cm²) + Fipronil (65,2 g p.c./ha);
- XIX. *Steinernema* sp. (2,4 JI/cm²) + Fipronil (65,2 g p.c./ha);
- XX. *Steinernema* sp. (12 JI/cm²) + Fipronil (65,2 g p.c./ha);
- XXI. *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) + Fipronil (65,2 g p.c./ha);

A metodologia foi a mesma utilizada no primeiro experimento com adultos. Para verificar a quantidade de nematóides (JIs) produzidos por adulto foram utilizados insetos infectados pelos 2 nematóides durante a realização do ensaio. Os insetos mortos foram

colocados em solução de hipoclorito à 2%, durante um período de 10 minutos e, em seguida, foram lavados em água destilada. Os mesmos foram individualmente colocados em armadilha de “White” (para coleta dos nematóides que emergiram do cadáver).

Após o término do período de emergência de juvenis infectivos (aproximadamente 10 e 15 dias, para os nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp., respectivamente) os nematóides foram quantificados em câmara de Peters.

3.5. Eficiência de *H. indica* e *Steinernema* sp. no controle de *S. levis* em área de soqueira de cana-de-açúcar e o efeito desses agentes com thiamethoxam

O ensaio foi instalado em 05/02/2004 em área da fazenda São Gerônimo, pertencente a Usina São João, no município de Araras, SP, cultivada com a variedade SP 87-0344, no 3º corte e canavial com aproximadamente 5 meses de idade. O delineamento foi em blocos casualizados, com 5 repetições e com os seguintes tratamentos:

- I. Testemunha (Água destilada);
- II. *Steinernema* sp. ($1,0 \times 10^8$ JI/ha);
- III. *H. indica* ($1,0 \times 10^8$ JI/ha);
- IV. Thiamethoxam 250WG (500 g p.c./ha);
- V. Thiamethoxam 250WG (1000 g p.c./ha);
- VI. Thiamethoxam 250WG (1500 g p.c./ha);
- VII. *Steinernema* sp. ($1,0 \times 10^8$ JI/ha) + Thiamethoxam (500 g p.c./ha);
- VIII. *Steinernema* sp. ($1,0 \times 10^8$ JI/ha) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha);
- IX. *H. indica* ($1,0 \times 10^8$ JI/ha) + Thiamethoxam (500 g p.c./ha);
- X. *H. indica* ($1,0 \times 10^8$ JI/ha) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha).

As parcelas (repetições) foram constituídas de 5 linhas de 15 m com bordadura de duas ruas entre linhas e 2 m entre parcelas. A aplicação dos tratamentos foi realizada em ambos os lados das 5 linhas de cana da parcela, com auxílio de pulverizador costal manual regulado para um volume de aplicação de cerca de 400 L/ha, com o jato dirigido à base das plantas (50%) e para o solo (50%). Os produtos foram aplicados no período vespertino; à partir das 15:00 horas.

A avaliação dos tratamentos foi feita na colheita (22/11/2004). A cana foi colhida sem fogo e pesada com auxílio de um dinamômetro acoplado a trator (cada parcela foi pesada separadamente). As falhas existentes nas linhas, superiores a 0,5 m, foram medidas para correção dos dados de produção, que foram transformados em toneladas por hectare.

Para avaliação dos danos nos rizomas e da presença de formas biológicas da praga (larva, pupa e adulto) foi aberta nas três linhas centrais de cada parcela, uma trincheira de 0,5 m de largura, 0,5 m de comprimento por 0,3 m de profundidade, arrancando-se as touceiras de cana presentes nas trincheiras (para a determinação do dano foi calculado a porcentagem de cana com sintomas de ataque da praga).

3.6. Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), e para o cálculo da eficiência de nematóides contra larvas de *S. levis* foi utilizada a fórmula de correção de Abbott (Alves, 1998).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação de *H. indica* e *Steinernema* sp. contra larvas de *S. levis* em laboratório e casa de vegetação

4.1.1. Experimento em laboratório.

No ensaio em laboratório, o nematóide *H. indica* proporcionou níveis de mortalidade corrigida do inseto de 26, 63 e 95% nas dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm², respectivamente, havendo diferença significativa entre a maior e menor dosagem quanto a mortalidade real (F=11.573; P<0,001) (Figura 5). Já para o nematóide *Steinernema* sp. houve uma pequena resposta na mortalidade do inseto em função do aumento das dosagens, com níveis de mortalidade corrigida de 32, 47 e 42%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre esses tratamentos quanto a mortalidade real (F=11.573; P=0.079) (Tabela 1).

Os dados demonstraram que larvas de *S. levis* são susceptíveis a ação de *H. indica* e *Steinernema* sp., reforçando uma tendência de alta susceptibilidade à nematóides entomopatogênicos que tem sido verificada para larvas de insetos do gênero

Sphenophorus e de vários outros da família Curculionidae, em testes de laboratório (SHAPIRO-ILAN et al., 2003; CABANILLAS, 2003; DUNCAN et al., 2003; SMITH, 1994). O nematóide *S. carpocapsae* na dosagem de 40 JI/cm², proporcionou 60% de mortalidade de larvas do curculionídeo praga da pecan, *Curculio caryae*, 14 após a aplicação. (SHAPIRO-ILAN et al., 2003). Shapiro et al. (2000) avaliaram *S. riobraves* na dosagem de 52 JI/cm² contra larvas de *D. abbreviatus*, obtendo 90% de mortalidade do inseto 13 dias após a aplicação. Já Stuart et al. (2004) testaram dez isolados do mesmo nematóide contra larvas de *D. abbreviatus*, obtendo numa dosagem de 20 JI/cm², uma mortalidade do inseto de 79,3%, 10 dias após a aplicação.

Tabela 1. Mortalidade média de larvas de *S. levis* pelos nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp., em laboratório (T°=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas)

Tratamentos	% Mortalidade Total *
Testemunha	24 a
<i>H. indica</i> (2,4 JI/cm ²)	44 a b
<i>H. indica</i> (12 JI/cm ²)	72 b c
<i>H. indica</i> (60 JI/cm ²)	96 c
<i>Steinernema</i> sp. (2,4 JI/cm ²)	48 a b
<i>Steinernema</i> sp. (12 JI/cm ²)	60 b
<i>Steinernema</i> sp. (60 JI/cm ²)	56 b

(*) Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

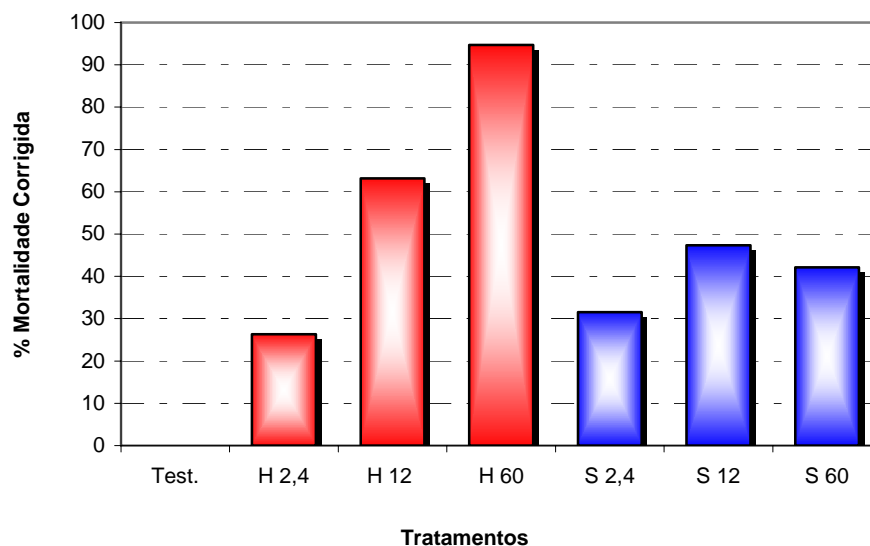


Figura 5. Mortalidade corrigida de larvas de *S. levis* tratadas com os nematóides *H. indica* (H) e *Steinernema* sp. (S), nas dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm², em laboratório (T°=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Dados corrigidos pela fórmula de Abbott.

4.1.2. Experimento em casa de vegetação

No teste em casa de vegetação, *H. indica* proporcionou níveis de mortalidade corrigida do inseto de 42, 65, e 85% nas dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm², respectivamente, havendo diferença significativa entre a maior e menor dosagem quanto a mortalidade real (F=13.673; P<0.001) (Figura 6) (Tabela 2). Para *Steinernema* sp., da mesma forma como ocorreu no teste em laboratório, houve uma pequena resposta na mortalidade do inseto em função do aumento da dosagem, com níveis de mortalidade corrigida de 69, 73 e 73%, respectivamente, não ocorrendo diferença significativa entre esses tratamentos quanto a mortalidade real (F=13.673; P=0.587).

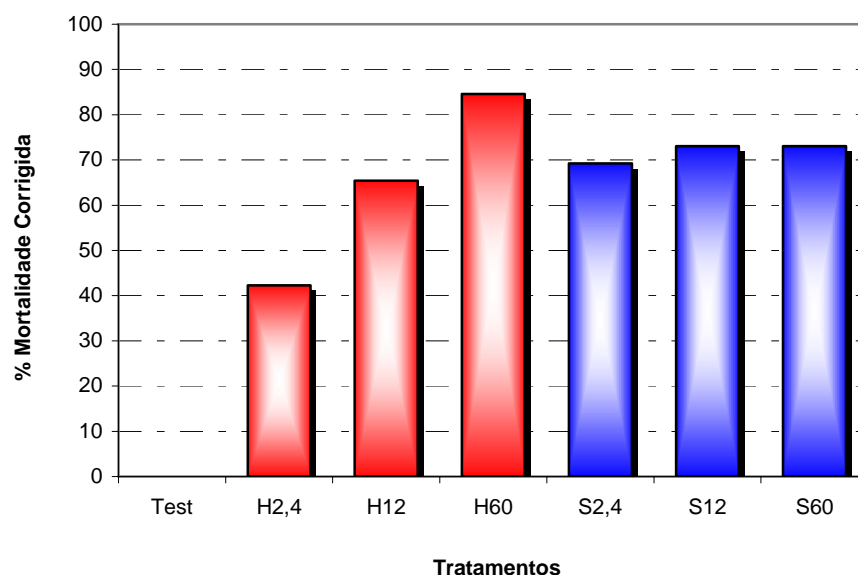


Figura 6. Mortalidade corrigida de larvas de *S. levis* tratadas com os nematóides *H. indica* (H) e *Steinernema* sp. (S), nas dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm², em casa de vegetação. Dados corrigidos pela fórmula de Abbott.

Tabela 2. Mortalidade média de larvas de *S. levis* pelos nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp., em casa de vegetação. (T°= entre 22 e 28°C) Laboratório de Controle Biológico, do Instituto Biológico, sediado em Campinas, SP. Maio, 2005.

Tratamentos	% Mortalidade Total *
Testemunha	35 a
<i>H. indica</i> (2,4 JI/cm ²)	62,5 b
<i>H. indica</i> (12 JI/cm ²)	77,5 b c
<i>H. indica</i> (60 JI/cm ²)	90 c
<i>Steinernema</i> sp. (2,4 JI/cm ²)	80 b c
<i>Steinernema</i> sp. (12 JI/cm ²)	82,5 b c
<i>Steinernema</i> sp. (60 JI/cm ²)	82,5 b c

(*) Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

Todas as larvas mortas do inseto encontravam-se dentro do rizoma da planta, alojadas nos canais construídos com o auxílio do vazador, em distâncias de até 4 cm a partir da abertura no rizoma (Figura 7A e B). Isso demonstra a capacidade que esses dois nematóides possuem para encontrar o hospedeiro, locomovendo-se inicialmente pelo solo até encontrar o orifício no rizoma, e posteriormente entrar no canal e se locomover até encontrar o hospedeiro. Essa habilidade de “invadir” ambientes crípticos também foi verificada em experimento com nematóides entomopatogênicos para o controle de larvas de *Opogona* sp., praga da tora de eucalipto usada na produção do fungo shiitake. Esse inseto se abriga abaixo da casca da tora, sendo de difícil controle nessas condições. Em experimento realizado em estufa o nematóide *S. feltiae* causou mortalidade média de 70%, quando aplicado juntamente com larvas de *G. mellonella* infectadas pelo nematóide, na dosagem de 4 larvas/tora (AMBRÓS et al., 2005).

Os nematóides proporcionaram níveis de mortalidade do inseto, no teste em casa de vegetação, bem superior comparados ao teste em laboratório, o que pode ser explicado por dois motivos:

1 - Os nematóides foram avaliados nas mesmas dosagens quanto ao número de JI/cm² para os dois testes. Entretanto, o número de nematóides aplicados dentro dos baldes, com área superficial do solo de 314 cm², foi 5 vezes superior comparado ao número de nematóides aplicados dentro dos potes com área superficial do solo de 63,5 cm². Consequentemente, o número de JI/inseto dentro dos baldes foi também 5 vezes superior, resultando em maiores níveis de mortalidade no teste em casa de vegetação.

2 - O nematóide *Steinernema* sp.(CB-n06) possui um ciclo de vida de vida bastante curto, com os JIs emergindo do hospedeiro já a partir dos 5 dias após a infecção. Considerando-se que o teste em casa de vegetação foi avaliado com 12 dias, sendo três dias a mais que o teste em laboratório, é provável que a concentração de JIs nos baldes tenha aumentado mais que nos potes, decorrente da reprodução no hospedeiro, resultando em maiores níveis de infecção. O aumento da população no ambiente resultante da reprodução no hospedeiro, também foi verificado por Loya & Hower Jr. (2003) em estudo de laboratório com *H. bacteriophora* para controle de larvas do curculionídeo *Sitona hispidulus*.

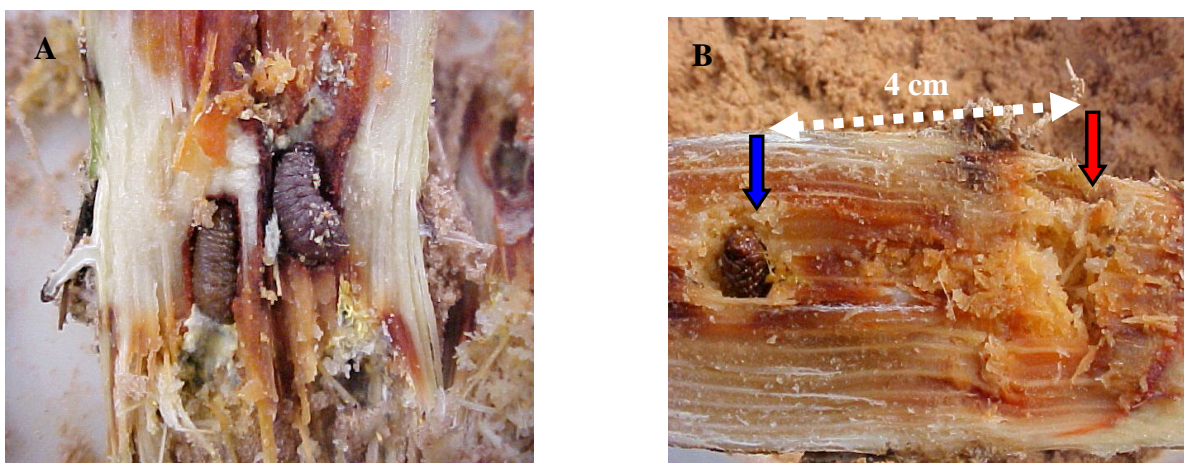


Figura 7. (A) Larvas de *S. levis* infectadas pelo nematóide *H. indica*, dentro do colmo da cana (corte longitudinal) e (B) Distância percorrida pelos nematóides dentro do rizoma de cana-de-açúcar. Seta azul = inseto infectado/ Seta vermelha = perfuração do rizoma.

Para o nematóide *Steinernema* sp., a pequena resposta na mortalidade do inseto em função do aumento das dosagens, observada nos teste de laboratório e casa de vegetação, tem sido comumente verificada em testes com nematóides para o controle de outras espécies de insetos. O nematóide *H. indica* avaliado em condições de campo para o controle de ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, proporcionou níveis de controle variáveis de 66 a 73% quando aplicado embaixo da palhada, ao lado das plantas, nas dosagens de $6,6 \times 10^7$ a $3,3 \times 10^9$ JIs/ha (LEITE et al., 2005). A razão para essa pequena resposta na mortalidade do inseto ainda não é bem conhecida, porém pode estar relacionada ao fato do nematóide ser mais atraído para insetos previamente infectados pela mesma espécie. 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).

Os nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp. se reproduziram dentro das larvas infectadas de *S. levis*, sendo que o número de juvenis infectivos emergidos por larva do inseto foi bastante superior para a primeira espécie do nematóide, com 48.602 indivíduos, comparada a segunda espécie (8.952) (Tabela 3). A menor produção de juvenis infectivos para o *Steinernema* sp. deve-se ao maior tamanho desse nematóide comparado ao *H. indica*, o que

resulta em limitações de espaço e alimento no hospedeiro, acarretando na geração de um menor número de descendentes (LEITE et al., 2003).

O nematóide *Steinernema* sp., embora promova um pequeno aumento na mortalidade de larvas em função do aumento das dosagens, acarreta uma mortalidade do inseto bastante elevada já na menor dosagem, pouco superior àquela obtida com a dosagem intermediária do *H. indica*, sem diferir significativamente da maior dosagem desse nematóide ($F=13.673$, $P=0,587$). Portanto, o nematóide *Steinernema* sp. apresenta-se como mais adequado para uso no controle do bicudo da cana-de-açúcar, comparado com o *H. indica*, podendo ser recomendado na menor dosagem ($2,4$ JI/cm²) para avaliação em testes de campo. O nematóide *Steinernema* sp. gera uma produção de juvenis infectivos/larva de *S. levis*, cinco vezes menor comparado ao *H. Indica*. Entretanto, os nematóides produzidos, embora em menores concentrações, podem resultar em uma mortalidade do inseto pouco mais elevada conforme verificado no teste em casa de vegetação.

Tabela 3. Número de juvenis infectivos dos nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp. produzidos por larva de *S. levis* ($T^{\circ}=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}=70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas)

Nematóide	Número de larvas	Média de juvenis infectivos produzidos por larva	Máx. *	Mín. *
<i>H. indica</i>	11	48602,0	72856	10547
<i>Steinernema</i> sp.	9	8952,4	12566	3254

(*) Valor máximo e mínimo.

4.2. Avaliação de *H. indica* e *Steinernema* sp. em combinações com inseticidas químicos, contra larvas e adultos de *S. levis*, em laboratório

4.2.1. Experimento de compatibilidade

No teste de compatibilidade de *H. indica* e *Steinernema* sp. com fipronil (Regent 800WG) e thiamethoxam (Actara 250WG) nas dosagens recomendadas para o controle de *S. levis* (250 g p.c./ha e 1000 g p.c./ha, respectivamente), os nematóides apresentaram viabilidade acima de 90%, após 12 horas de exposição aos inseticidas, demonstrando a compatibilidade desses agentes a esses inseticidas (Tabela 4). Os resultados desse estudo permitem discordar de Grewal (2005) que incluiu o inseticida fipronil em uma lista de defensivos químicos que não podem ser utilizados em misturas de tanque com nematóides entomopatogênicos, porém o autor não menciona a dosagem utilizada. Andaló et al. (2004) avaliaram a compatibilidade de thiamethoxam com nematóides entomopatogênicos e constataram que o produto além de não afetar a viabilidade, também não interferiu na infectividade dos nematóides, quando inoculados em larvas de *G. mellonella*. Koppenhöfer et al. (2003) avaliaram o efeito desse inseticida sobre *S. feltiae*, tendo o nematóide tolerado o produto, com alta viabilidade, mesmo quando exposto por um período de até 24 horas.

Tabela 4. Viabilidade (\pm Erro Padrão) dos juvenis infectivos de *Steinernema* sp. e *H.indica* após exposição aos inseticidas fipronil e thiamethoxam por 12 horas ($T^{\circ}=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, UR= $70 \pm 10\%$)

Tratamentos	% de Viabilidade *			
	<i>Steinernema</i> sp.		<i>H. indica</i>	
Testemunha	100	a	94,8 \pm 1,2	a
Fipronil	100	a	90,4 \pm 1,72	a
Thiamethoxam	99,2 \pm 0,48	a	94,4 \pm 0,75	a

(*) Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.2.2. Experimento com larvas

No ensaio com larvas de *S. levis* avaliando a compatibilidade de *H. indica* e *Steinernema* sp. com thiamethoxam, em subdosagem, os nematóides testados isoladamente ou em mistura com o inseticida proporcionaram níveis de mortalidade do inseto entre 75% a 87,5%, sem diferença significativa entre esses tratamentos ($F=15.225$, $P<0,001$), indicando não haver nenhuma contribuição das misturas para o incremento na mortalidade do inseto (Figura 8).

Um dos motivos para isso deve-se ao fato de que, nesse estudo, as larvas foram alojadas dentro dos canais construídos no rizoma da planta, onde apenas os nematóides podem alcançá-las, ficando protegidas da ação conjunta nematóide-inseticida.

Os fatores ou combinações de fatores relatados como possíveis causas dos efeitos de sinergismo obtidos com misturas de nematóides mais inseticidas, estão geralmente mais associados aos efeitos que os inseticidas causam no inseto, do que aqueles provocados no nematóide (CUI et al., 1993; ISHIBASHI & TAKII, 1993; WANG et al., 1994; GAUGLER et al., 1994; NISHIMATSU & JACKSON, 1998).

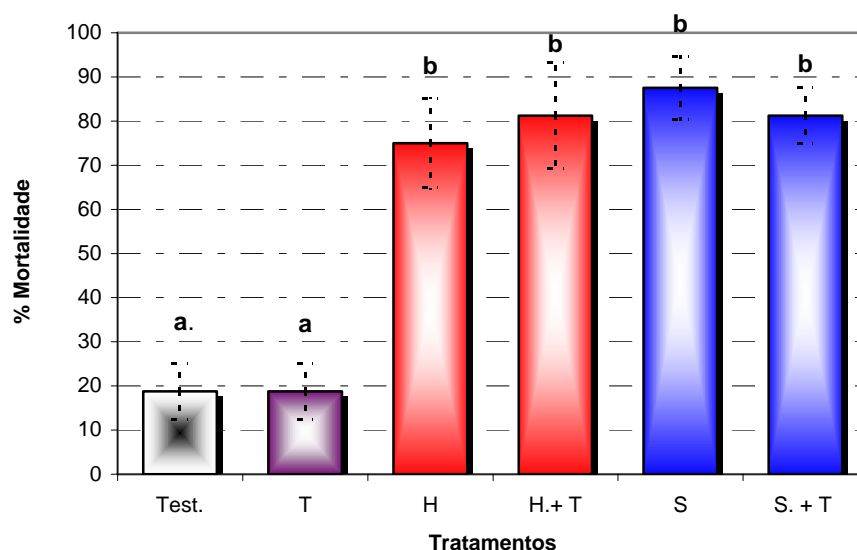


Figura 8. Mortalidade de larvas de *S. levis* tratadas com os nematóides *H. indica* (H) e *Steinernema* sp. (S) na dosagem de 12 JI/cm², em combinações com o inseticida thiamethoxam (T) (250 g p.c./ha), em laboratório (T°=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

4.2.3. Experimentos com adultos

No primeiro ensaio com adultos de *S. levis*, avaliando a associação do *H. indica* e *Steinernema* sp. com fipronil e thiamethoxam nas subdosagens de 125 g p.c./ha e 250 g p.c./ha, respectivamente, os nematóides e os inseticidas testados isoladamente proporcionaram níveis de mortalidade do inseto de apenas 16%, 44%, 40% e 12%, respectivamente, tendo apenas o *Steinernema* sp. e o fipronil diferidos significativamente da testemunha (F=117,00; P<0,001) (Figura 9). Já nas misturas dos nematóides com os produtos químicos, os níveis de mortalidade aumentaram expressivamente, variando de 84 a 100%, com todas essas misturas diferindo significativamente dos demais tratamentos, mas não entre si (F=117,00; P=0,099).

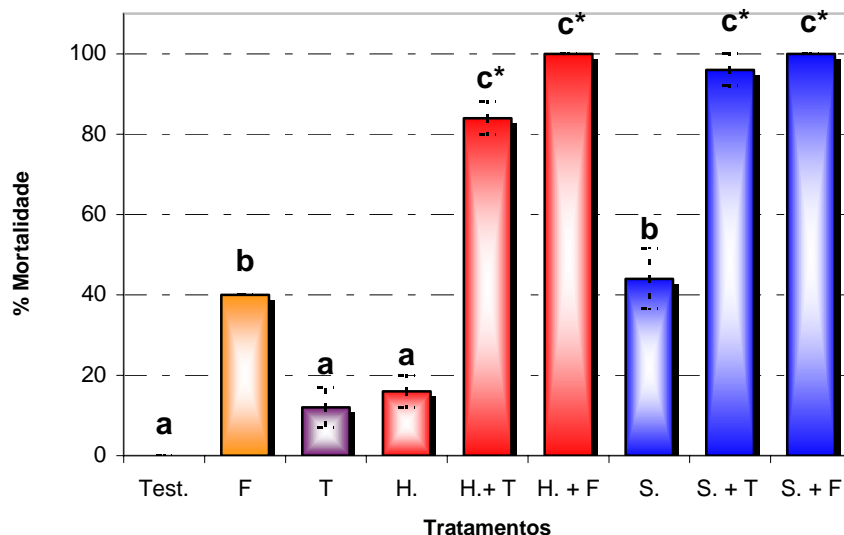


Figura 9. Mortalidade de adultos de *S. levis* tratados com os nematóides *H. indica* (H) e *Steinernema* sp. (S) na dosagem de 60 JI/cm², em combinações com os inseticidas thiamethoxam (T) (250 g p.c./ha) e fipronil (F) (125 g p.c./ha.), em laboratório (T^o=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05). * Sinergismo.

No segundo ensaio, avaliando a associação do *H. indica* e *Steinernema* sp. com fipronil e imidacloprid (Confidor 700WG) nas subdosagens de 62,5 g p.c/ha e 250 g p.c./ha, respectivamente, os nematóides e os inseticidas testados isoladamente proporcionaram níveis de mortalidade das formas adultas de apenas 10,2%, 36,6%, 10,2% e 6,8%, respectivamente, tendo apenas o *Steinernema* sp. diferido significativamente da testemunha (F=21,918; P<0,001) (Figura10). Nas misturas *H. indica* + imidacloprid e *Steinernema* + fipronil, os níveis de mortalidade aumentaram para 46,60% e 76,60%, respectivamente, tendo apenas a mistura com fipronil diferido significativamente dos demais tratamentos (F=21,918; P<0,001).

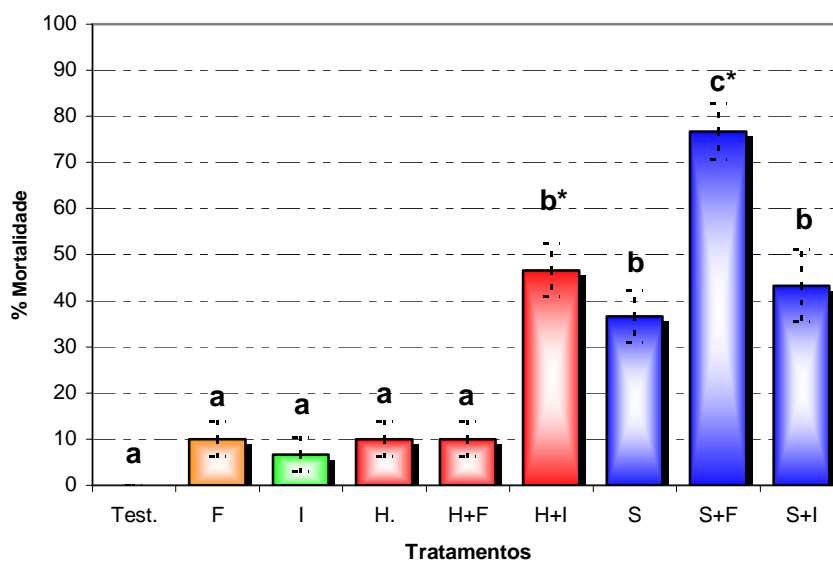


Figura 10. Mortalidade de adultos de *S. levis* tratados com os nematóides *H. indica* (H) e *Steinernema* sp. (S) na dosagem de 60 JI/cm², em combinações com os inseticidas imidacloprid (I) (250 g p.c./ha) e fipronil (F) (62,5 g p.c./ha), em laboratório (T°=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05). * Sinergismo.

No terceiro ensaio, envolvendo a associação do *H. indica* e *Steinernema* sp., em três dosagens cada, com fipronil e thiamethoxam nas subdosagens de 62,5 g p.c./ha e 250 g p.c./ha, respectivamente, todos os tratamentos com nematóides e inseticidas testados isoladamente proporcionaram mortalidade do inseto abaixo de 23,33%, exceto as duas maiores dosagens de *Steinernema* sp., 12 e 60 JI/cm², com níveis de mortalidade de 33,33% e 50%, respectivamente, diferindo significativamente da testemunha, porém não entre si (F=25,824; P=0,075) (Figura 11A). Nas misturas dos nematóides com fipronil, ocorreu um aumento nos níveis de mortalidade do inseto, tendo apenas os tratamentos com *Steinernema* 12 JI/cm² (63,3%) e *Steinernema* 60 JI/cm² (53,33%) diferidos significativamente daqueles com os respectivos nematóides, nas respectivas dosagens, sem a mistura com produto químico (F=25,824; P<0,001). Nas misturas dos nematóides com thiamethoxam, os níveis de mortalidade aumentaram ainda mais, alcançando 66,67% na

mistura envolvendo *H. indica* 60 JI/cm², e 70% a 83,33% naquelas envolvendo as três dosagens de *Steinernema* sp., com todos esses tratamentos diferindo significativamente daqueles com os respectivos nematóides, nas respectivas dosagens, sem a mistura com produto químico (F=25,824; P<0,001).

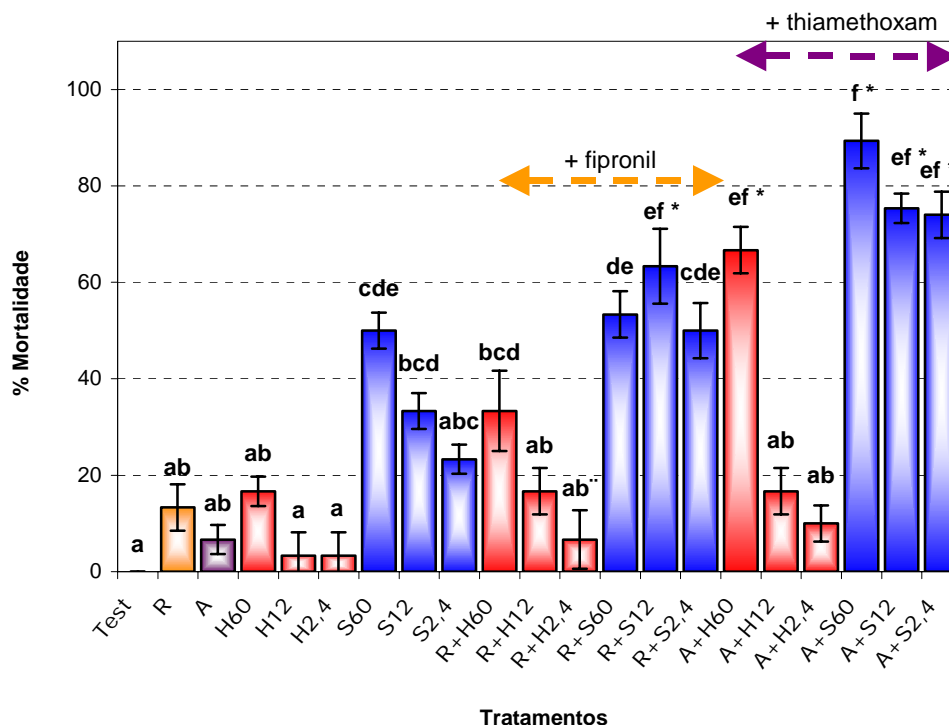


Figura 11. Mortalidade de adultos de *S. levis* tratados com os nematóides *H. indica* (H) e *Steinernema* sp. (S) nas dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm², em diferentes combinações com os inseticidas fipronil (R) (62,5 g p.c./ha) e thiamethoxam (A) (250 g p.c./ha), em laboratório (T^o=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05). * Sinergismo.

Nos três ensaios, o nematóide *Steinernema* sp. proporcionou melhor taxa de mortalidade de adultos, apresentando-se mais eficiente comparado ao *H. indica*. Esses dados reforçam a preferência pelo *Steinernema* sp. para uso no controle de *S. levis*, podendo infectar tanto as larvas, com altos níveis de mortalidade conforme verificado em testes anteriores, quanto os adultos (Figura 11A). Segundo Smith (1994), todos os estágios imaturos desses insetos são susceptíveis a nematóides entomopatogênicos, sendo que os adultos da espécie *S. venatus* são suscetíveis também ao nematóide *S. carpocapsae*. Em teste contra adultos do curculínideo *S. hispidulus*, o nematóide *H. bacteriophora* proporcionou até 48% de mortalidade do inseto na dosagem de 100 JI/inseto (LOYA & HOWER JR., 2003).

Ainda para *Steinernema* sp., no terceiro ensaio houve uma pequena resposta na mortalidade do inseto em função do aumento da dosagem do nematóide misturado aos produtos químicos, com níveis de 50% a 63,33% na mistura com fipronil, e de 70% a 83,33% na mistura com thiamethoxam. Essas pequenas respostas foram observadas também nos testes contra larvas, nos quais já foram apresentadas e discutidas as prováveis razões para isso.

As elevadas taxas de mortalidade de adultos obtidas, no segundo ensaio, com a mistura de *H. indica* + imidacloprid e *Steinernema* sp. + fipronil, e no terceiro ensaio com as misturas de *Steinernema* sp. na dosagem de 12 JI/cm² + fipronil, e *Steinernema* nas três dosagens (2,4, 12 e 60 JI/cm²) + thiamethoxam, diferiram significativamente e superaram a somatória das mortalidades obtidas com os nematóides e inseticidas das respectivas misturas, testados isoladamente nos respectivos ensaios, o que demonstra um efeito sinérgico decorrente dessas misturas. Koppenhöfer et al. (2002) avaliaram misturas de *H. bacteriophora* e *S. glaseri* com thiamethoxam, no controle de larvas de *Exomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae), verificando efeitos sinérgicos quando essas misturas foram comparadas aos nematóides e ao inseticida testados isoladamente. A associação de nematóides entomopatogênicos com o inseticida imidacloprid já vem sendo avaliada para o controle de larvas de escarabeídeos, proporcionando bons resultados de controle e, em muitos casos, apresentando efeito sinérgico na mortalidade dos insetos (KOPPENHÖFER & KAYA, 1998; KOPPENHÖFER et al., 2000; KOPPENHÖFER et al., 2003).

A mistura de *H. indica* com fipronil também proporcionou um efeito sinérgico na mortalidade do inseto, porém esse efeito ocorreu somente no primeiro ensaio quando o inseticida foi avaliado na dosagem de 125 g p.c./ha, bastante acima da dosagem usada no segundo e terceiro ensaio (62,5 g p.c./ha). Isso sugere que a dosagem do inseticida também pode interferir no efeito da combinação nematóide-inseticida. No segundo ensaio ocorreu um efeito sinérgico na mistura de *H. indica* com imidacloprid, mas não da mistura de *Steinernema* sp. com esse inseticida, sendo que no terceiro ensaio, ocorreu um efeito sinérgico resultante das misturas de *Steinernema* sp. na dosagem de 12 JI/cm² com fipronil, porém não ocorreu sinergismo na mistura da maior dosagem do nematóide com o inseticida. Portanto, esses ensaios sugerem que a espécie e dosagem do nematóide também podem interferir no efeito da combinação nematóide-inseticida. Nishimatsu & Jackson (1998) também verificaram que a dosagem do inseticida, e a dosagem e espécie do nematóide também podem determinar o efeito da combinação nematóide-inseticida. Koppenhöfer et al. (2002) verificaram que o hospedeiro também determina o efeito da associação entre nematóides e inseticidas químicos quando constataram dois efeitos opostos da associação thiamethoxam + *H. bacteriophora* contra larvas de duas espécies de insetos: (1) efeito sinérgico contra *E. orientalis* e (2) efeito antagônico contra *Maladera castanea*.

Diversos fatores ou combinações de fatores têm sido relatados como possíveis causas dos efeitos de sinergismo obtidos com misturas de nematóides mais inseticidas, estando estes fatores geralmente mais associados aos efeitos que os inseticidas causam no inseto, do que aqueles provocados pelo nematóide. Em teste com larvas do scarabeídeo *Cyclocephala* spp., o sinergismo obtido com mistura de *H. bacteriophora* mais imidacloprid pode ser causado por mudanças no comportamento do inseto quando afetado pelo inseticida, deixando de limpar a cutícula ou mandíbula, como geralmente faz para eliminar ou remover nematóides ou outros inimigos naturais (GAUGLER et al., 1994). Em teste com larvas do crisomelídeo *Diabrotica* spp., a maior eficácia da combinação nematóide-inseticida pode ser devido aos efeitos que o inseticida causa no inseto, como paralização e convulsão, tornando-o um alvo mais fácil para o nematóide, e mais suscetível a infecção. Além disso, o aumento da atividade metabólica e a redução nos movimentos direcionais do inseto resultam em um aumento na concentração de CO₂ ao seu redor, o qual é utilizado por nematóides entomopatogênicos para a localização do hospedeiro (NISHIMATSU &

JACKSON, 1998). Os efeitos de sinergismo obtidos nas combinações nematóide-inseticida também podem ser provocados pelos efeitos de estresse que o inseticida causa no inseto, afetando a sua fisiologia e seus mecanismos de defesa humoral, e conseqüentemente, tornando-o mais suscetível as infecções por nematóides (CUI et al., 1993; WANG et al., 1994). O aumento na eficácia da combinação nematóide-inseticida também pode ser devido a um aumento na movimentação e na atividade de nictação do nematóide, conforme tem sido observado para o nematóide *S. carpocapsae* (ISHIBASHI & TAKII, 1993).

Os nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp. se reproduziram dentro dos adultos de *S. levis* infectados no terceiro ensaio, sendo que os números de juvenis infectivos emergidos por larva do inseto foram ligeiramente superiores nos tratamentos com os nematóides testados isoladamente, de 39.595 e 8.297, respectivamente, comparados aos tratamentos envolvendo os mesmos nematóides misturados aos inseticidas fipronil (38.170 e 5.185, respectivamente) e thiamethoxam (32.825 e 6.866, respectivamente) (Figura 11B) (Tabela 5). O nematóide *H. indica* gerou uma maior produção de juvenis infectivos por adulto do inseto, assim como no teste com larvas, quando comparado ao *Steinernema*, sendo que os motivos para isso já foram discutidos anteriormente no teste com larvas. Esse estudo demonstra ainda ocorrer um ligeiro decréscimo na produção desses nematóides quando reproduzidos na forma adulta do inseto, comparada a forma de larva, sendo um dos prováveis motivos para isso a maior resistência das formas, resultando em um menor número de nematóides que penetram ou sobrevivem dentro do inseto. Em geral, os adultos demonstram ser uma importante fonte de inóculo para a multiplicação de *H. indica* e *Steinernema* sp., principalmente em áreas tratadas com a mistura de *Steinernema* sp. mais thiamethoxam.

O presente estudo demonstrou que o nematóide *Steinernema* sp. é o mais adequado para uso no controle de larvas e adultos de *S. levis*, podendo ser recomendado na dosagem de 2,4 JI/cm² já que não houve diferença significativa entre as dosagens, sendo essa a mais econômica, para testes no campo. Considerando-se que o nematóide deve ser aplicado na faixa de 30 cm de largura em cada lado da linha de cana-de-açúcar, e que o espaçamento entre linha é de 140 cm, a dosagem de 2,4 JI/cm² pode equivaler a uma dosagem de 1 x 10⁸ JI/ha. Essa dosagem equivalente por hectare é menor que aquela recomendada para o controle dos gorgulhos da raiz do citros com *H. indica*, na Flórida, EUA (MCCOY et al., 2002), sendo bastante inferior comparada às dosagens recomendadas para vários outros

nematóides, no controle de outras espécies de insetos, as quais podem chegar à $2,4 \times 10^9$ JI/ha (GEORGIS, 1990).

Tabela 5. Número de juvenis infectivos dos nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp. produzidos por adulto de *S. levis* ($T^{\circ}=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}=70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas)

Nematóide	Quantidade de adultos	Média de juvenis infectivos produzidos por adulto	Máx. *	Mín. *
<i>Steinernema</i>	5	8297,4	10556	4667
<i>Steinernema</i> +fipronil	3	5185,3	7336	2558
<i>Steinernema</i> +thiamethoxam	7	6865,7	11236	1259
<i>H. indica</i>	7	39595,42	65695	17556
<i>H. indica</i> +fipronil	8	38170,5	58964	14566
<i>H. indica</i> +thiamethoxam	6	32825,83	61223	10287

(*) Valor máximo e mínimo

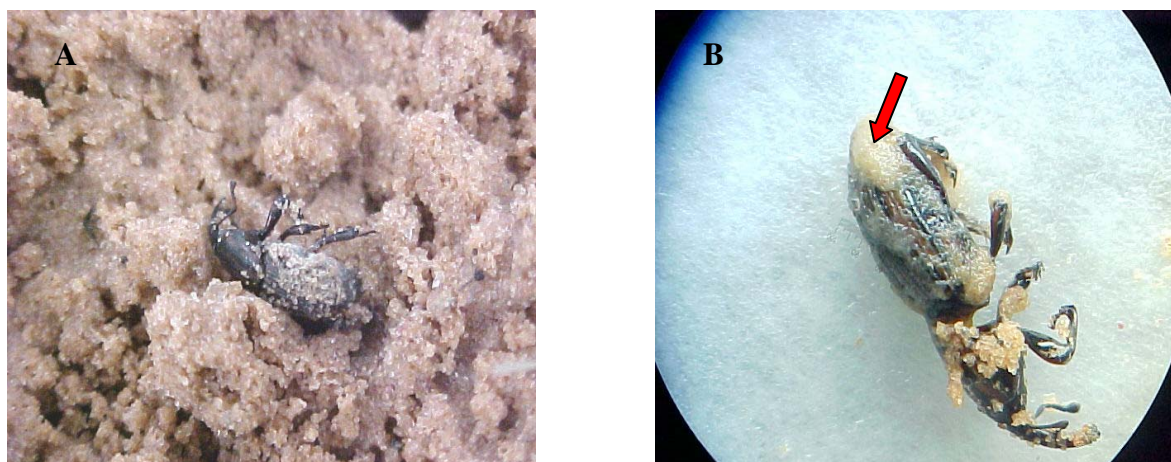


Figura 11. (A) Adultos de *S. levis* morto pela combinação *Steinernema* sp. + thiamethoxam e (B) Juvenis infectivos emergindo do inseto (massa esbranquiçada sobre o inseto indicada pela seta).

4.3. Eficiência de *H. indica* e *Steinernema* sp. no controle de *S. levis* em área de soqueira de cana-de-açúcar e o efeito desses agentes com thiamethoxam

O número de formas biológicas (larvas, pupas e adultos) de *S. levis* encontrados nas touceiras examinadas logo após o corte do canavial e a porcentagem de dano ocasionados pela praga às touceiras, não diferiram estatisticamente e não apresentaram qualquer relação com os tratamentos empregados no experimento (Tabela 6). Porém, na testemunha foi observado maior dano causado pela praga, o que deveria ser esperado, uma vez que nesse tratamento nada foi feito para controlar a praga. Há que se considerar na interpretação deste parâmetro o fato de que o canavial era de terceiro corte e com cerca de 5 meses no momento da instalação do experimento, sendo possível que parte expressiva desses danos possam ter sido ocasionadas antes da instalação do experimento e aqui englobados juntamente com as injúrias causadas após a instalação do mesmo.

A combinação *Steinernema* + thiamethoxam (Actara 250WG) embora não tenha diferido significativamente dos demais tratamentos, proporcionou um ganho bastante elevado na produção (28,2 toneladas por hectare), sendo que os demais tratamentos envolvendo o nematóide ou thiamethoxam, proporcionaram ganho na produção variável de 6 a 25 toneladas/ha (Figura 12). O nematóide *Steinernema* sp. proporcionou um ganho na produção de 15 toneladas por hectare, superior ao ganho obtido com *H. indica* (10 toneladas/ha), o que reforça a preferência pelo primeiro nematóide para uso no controle de *S. levis*. A menor produção foi obtida na testemunha o que é coerente com os dados de danos causados pela praga, também maior neste tratamento (Tabela 7). Ao se analisar o rendimento da cana no ensaio, observou-se um ganho de produção para todos os tratamentos com nematóide e inseticida comparados a testemunha, sendo que os ganhos acima de 10 toneladas podem ser considerados expressivos (BORGES⁵).

Esses resultados sugerem que o nematóide *Steinernema* sp. é uma alternativa viável para o controle de *S. levis*, podendo ser usado isoladamente ou associado a subdosagem do inseticida thiamethoxam. A dosagem do nematóide usada nesse estudo pode ser considerada economicamente viável se comparada com as dosagens de nematóides

⁵ BORGES, L. A. (Usina União São João Açúcar e Álcool S.A. – Araras). Comunicação Pessoal, 2005.

utilizadas no controle de *S. pulvulus* e *S. venatus*, que são na ordem de $2,0 \times 10^9$ JI/ha (Smith, 1994). Kopenhagen et al. (2002) obtiveram 100% de mortalidade de larvas de 3º instar de *E. orientalis* e *Popillia japonica*, com a associação de subdosagem do inseticida imidacloprid e o nematóide *H. bacteriophora*, demonstrando o grande potencial que as combinações dos dois agentes podem proporcionar no controle de pragas e na redução do uso de agentes químicos no campo. Cabe ressaltar, que mais experimentos devem ser realizados com esses nematóides no controle de *S. levis*, no campo, procurando-se obter informações mais precisas a respeito do assunto.

Tabela 6. Total de formas biológicas (larvas, pupas e adultos) de *S. levis*/trincheira (0,5 x 0,5 x 0,3 m) encontrados nas avaliações realizadas após a colheita, e porcentagem de plantas de cana-de-açúcar danificadas pelo inseto (\pm Erro Padrão) (Araras, Novembro de 2004)

Tratamentos	Formas Biológicas	Danos (%)
Thiamethoxam (500 g p.c./ha)	1,4 \pm 0,97 a	22,7 \pm 3,46 a
Thiamethoxam (1000 g p.c./ha)	0,4 \pm 0,24 a	22,7 \pm 6,21 a
Thiamethoxam (1500 g p.c./ha)	1,4 \pm 0,74 a	21,7 \pm 3,67 a
<i>Steinernema</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha)	1,2 \pm 0,58 a	22,8 \pm 2,12 a
<i>Steinernema</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (500 g p.c./ha)	0,6 \pm 0,40 a	28,2 \pm 4,64 a
<i>H. indica</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha)	0,2 \pm 0,20 a	20,1 \pm 3,33 a
<i>H. indica</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (500 g p.c./ha)	0,8 \pm 0,58 a	22,9 \pm 2,42 a
<i>Steinernema</i> (10^8 JI/ha)	0,4 \pm 0,24 a	21,5 \pm 4,87 a
<i>H. indica</i> (10^8 JI/ha)	1,0 \pm 0,77 a	18,5 \pm 4,47 a
Testemunha	0,2 \pm 0,20 a	31,1 \pm 2,12 a

(*) Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 7. Produção (\pm Erro Padrão) de cana-de-açúcar (t/ha) obtidas na colheita nos tratamentos em área sob ataque de *S. levis* (Col: Curculionidae)(Araras, Novembro de 2004)

Tratamentos	Total Produzido
Thiamethoxam (500 g p.c./ha)	119,8 \pm 3,75 a
Thiamethoxam (1000 g p.c./ha)	118,0 \pm 11,35 a
Thiamethoxam (1500 g p.c./ha)	126,8 \pm 4,45 a
<i>Steinernema</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha)	108,4 \pm 5,84 a
<i>Steinernema</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (500 g p.c./ha)	129,8 \pm 5,96 a
<i>H. indica</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (250 g p.c./ha)	114,3 \pm 7,20 a
<i>H. indica</i> (10^8 JI/ha) + Thiamethoxam (500 g p.c./ha)	112,8 \pm 11,75 a
<i>Steinernema</i> (10^8 JI/ha)	117,3 \pm 10,51 a
<i>H. indica</i> (10^8 JI/ha)	111,8 \pm 7,50 a
Testemunha	101,5 \pm 7,60 a

(*) Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

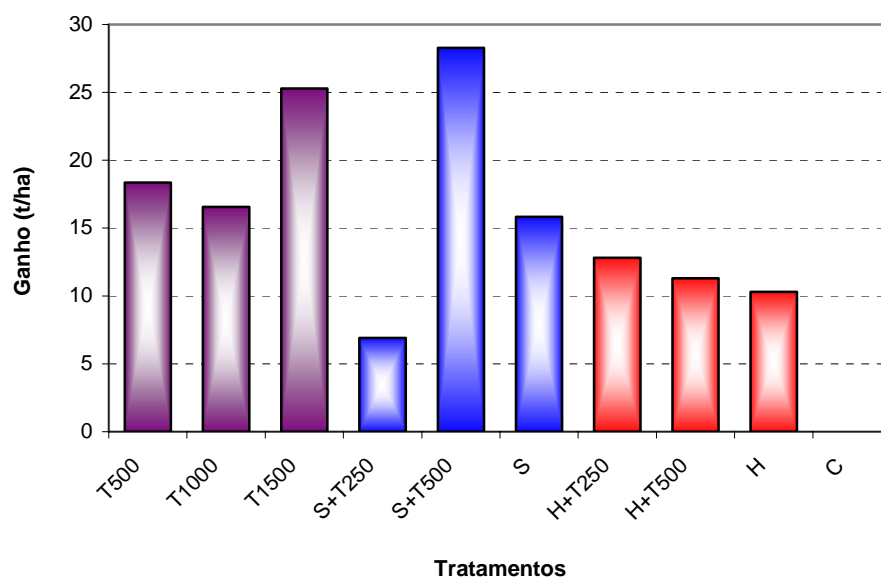


Figura 12. Ganho na produção de cana-de-açúcar (t/ha) obtido com os diferentes tratamentos, comparados à testemunha. T=Thiamethoxam (250, 500, 1000 e 1500 g p.c./ha), S=*Steinernema*, H=*H. indica* e C=Testemunha.

5. CONCLUSÕES

- *Steinernema* sp. e *H. indica* são patogênicos a larvas e adultos de *S. levis*.
- O nematóide *H. indica* gera maior produção de JIs em larvas e adultos de *S. levis* quando comparado com o nematóide *Steinernema* sp.
- Os inseticidas fipronil e thiamethoxam não afetam a viabilidade de juvenis infectivos.
- A associação de *Steinernema* sp. e *H. indica*, na dosagem de 12 JI/cm², com o inseticida thiamethoxam (250 g p.c./ha) não promove aumento na mortalidade de larvas de *S. levis* comparado com os nematóides testados isoladamente, em laboratório.
- A associação de *H. indica*, na dosagem de 60 JI/cm², com fipronil (62,5 g p.c./ha) proporciona um efeito sinérgico na mortalidade de adultos, em laboratório.

- As associações de *Steinernema* sp., nas dosagens de 2,4, 12 e 60 JI/cm², com thiamethoxam (250 g p.c./ha) e do nematóide na dosagem de 12 JI/cm², com fipronil (62,5 g p.c/ha), proporcionam um efeito sinérgico na mortalidade de adultos.
- O sinergismo obtido com a combinação *Steinernema* sp. – thiamethoxam proporciona maior mortalidade de *S. levis* que a combinação *H. indica* – thiamethoxam e *Steinernema* sp. – fipronil, independente da dosagem utilizada para os nematóides.
- O nematóide *Steinernema* sp é uma alternativa viável para o controle de *S. levis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, J. P. M.; MOINO JR., A.; CAVALCANTI, R. S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, F. A. Amostragem e avaliação de técnicas para isolamento de nematóides entomopatogênicos nativos obtidos em Lavras, Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 17-23, 2005.

ALMEIDA, L. C. Bicudo da cana-de-açúcar. **Boletim Técnico C. T. C.**, Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, p. 1-3, 2005.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ,1998. 1163p.

AMBROS, C. M. G.; CARREGARI, L. C.; LISI, L.; LEITE, L. G.; GOULART, R. M. GOULART, T. M.; TAVARES, F. M.;BUSSOLA, R. A. Controle da traça *Opogona sacchari* (Lepidoptera: Tineidae) com nematóide entomopatogênico *Steinernema feltiae* em cultivo de shiitake. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife, **Anais...** Recife: 2005. p. 119.

ANDALÓ, V.; MOINO JR., A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C. Compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro.

Nematologia Brasileira, Brasília, v. 28, n. 2, p. 149-158, 2004.

BADILLA, F. F.; ALVES, S. B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolado 447 ao gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera Curculionidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12., 1989, Belo Horizonte, **Resumos...** Belo Horizonte: 1989. p. 257.

BEEDING, R. A. Large scale production, storage and transport of the insect nematodes *Neoplactana* spp. and *Heterorhabditis* spp. **Annual Applied Biological**, v. 104, p. 117-120, 1984.

BOTELHO, P. S. M.; DEGASPARI, N.; ARAUJO, S. M. S. S.; ARAUJO, J. R.; ALMEIDA, L. C. Ciclo biológico do *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), praga da cana-de-açúcar, em dieta artificial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 8., 1983, Brasília, **Resumos...** Brasília: 1983. p. 004.

BUSSOLA, R. A. et al. Eficiência dos nematóides *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) no controle da mosca fungus gnats, *Bradysia* sp. (Díptera: Sciaridae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife, **Anais...** Recife: 2005. p. 117.

CRUZ, B. P. B. Pragas de culturas e controle biológico. Campinas: Fundação Cargill, 1988, p. 26-28.

CABANILLAS, H. E. Suscetibility of the boll weevil to *Steinernema riobrave* and other entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 82, p. 188-197, 2003.

COSTA, C.; VANIN, S. A.; CASARI-CHEN, S. A. **Larvas de coleóptera do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia Universidade de São Paulo, 1988, p. 260-261.

CUI, L.; GAUGLER, R.; WANG, Y. Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, p. 73-78, 1993.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S. M.; ALMEIDA, L. C.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 6, p. 553-558, 1987.

DUNCAN, L. W.; DUNN, D. C.; BAGUE, G.; NGUYEN, K. Competition between entomopathogenic and free-living bacterivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Nematology**, v. 35, n. 2, p. 187-193, 2003.

EHLERS, R. U. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 56, p. 623-633, 2001.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides Entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 541-569, 1998.

FOWLER, H.G.; GARCIA, C.R. Nematodes (Rhabditida: *Steinernema feltiae*) as natural control agents of mole crickets (Orthoptera: Gryllotalpidae): field and laboratory studies. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 48, n. 4, p. 789-795, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J.

D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GAUGLER, R.; WANG, Y.; CAMPBELL, J. F. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 64, p. 193-199, 1994.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Eds.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Florida: Boca Raton, p. 173-191, 1990.

GESELL, S. G. Billbugs.1983. Disponível em:

<http://www.ento.psu.edu/extension/fact_sheets.htm>. Acesso em: 08 jan. 2006, 16:36:09.

GLAZER, I. Survival Biology. In: GAUGLER, R. (Ed). **Entomopathogenic Nematology**. New Jersey: Rutgers University, p. 169-187, 2002.

GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. Formação de um banco de nematóides entomopatogenicos no Instituto Biológico, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, **Livro de Resumos...** São Pedro: 2003. p. 83.

GOULART, R. M.; BUSSOLA, R. A.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; MACHADO, L. A.; GINARTE, C. M. A.; BATISTA FILHO, A. Efeito da associação do nematóide *Steinernema* sp. (Nematoda: Steinernematidae) com thiamethoxam na mortalidade de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 20., 2004, Gramado, **Programa e Resumos...** Gramado: 2004. p. 305.

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

GREWAL, P. S. Insect parasitic nematodes for turfgrass – Pest Management. Disponível em: <http://www.oarde.ohio-state.edu/nematodes/turfgrass_pest_management.htm>. Acesso em: 17 dez. 2005, 21:45:10.

HALL, D. G. Insects and mites associated with sugarcane in Florida. **Florida Entomologist**, Florida, v. 71, n. 2, p. 138-150, 1988.

HAYES, W. P. The maize billbug or elephant bug (*Sphenophorus maidis* Chittn.). **Technical Bulletin**, Kansas State Printing Plant, Kansas, v. 6, p. 1-27, 1920.

HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed). **Entomopathogenic Nematology**. Rutgers University: New Jersey, p. 115-143, 2002.

ISHIBASHI, N.; TAKKI, S. Effects of insecticides on movement, nictation, and infectivity of *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 2, p. 204-213, 1993.

KOPPENHOFER, A. M.; KAYA, H. K. Sinergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: A novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 618-623, 1998.

KOPPENHOFER, A. M.; BROWN, I. M.; GAUGLER, R.; GREWAL, P. S.; KAYA, H. K.; KLEIN, M. G. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 245-251, 2000.

KOPPENHOFER, A. M.; COWLES, R. S.; COWLES, E. A.; FUZY, E. M.;
BAUMGARTNER, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for
entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Orlando, v. 24, p. 90-97, 2002.

KOPPENHOFER, 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.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; GOULART, R. M.; GUEDES, J. V. C.; DINARDO, M.
Pathogenicity of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* spp. (Nemata: Rhabditida), in different
dosages, against the citrus root weevil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM OF
INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8., 2002, Foz do Iguaçu,
Program and Abstracts... Foz do Iguaçu: 2002. p. 55.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; AGUILLERA, M. M., RODRIGUES, R. C. D.;
NEGRISOLI JR., A. S. Patogenicidade de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (Nematoda:
Rhabditida) à ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, (*Mahanarva fimbriolata*).
Revista de Agricultura, Piracicaba, v. 78, n. 1, p. 139-148, 2003.

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

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

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**, San Diego, v. 83, p. 63-72, 2003.

MCCOY, C. W.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; DUNCAN, L.W.; NGUYE, K. Entomopathogenic nematodes and other natural enemies as mortality factors for larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 19, p. 182-190, 2000.

MCCOY, C. W., DUNCAN, L. W., STUART, R. J.; SHAPIRO, D. W. Development of entomopathogenic nematodes as a manegement tactic for citurs root weevils in Florida. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8., 2002, Foz do Iguacu, Brazil, **Proceedings...** Foz do Iguacu: 2002. p. 312.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA , PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/> >. Acesso em: 8 jan. 2005, 17:33:24.

NISHIMATSU, T.; JACKSON, J. J. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 2, p. 410-41, 1998.

PAIVA, P. E. B.; GARCIA, J. F.; AGUILLERA, M. M. Ocorrência do nematóide entomopatogênico, *Heterorhabditis* Poinar, 1976, em áreas de citros no estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., 2003, São Pedro, **Livro de Resumos...** São Pedro: 2003. p. 93.

PATEL, M. N.; WRIGHT, D. J. Fatty acid composition of neutral lipid energy reserves from infective juveniles of entomopathogenic nematodes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118B, p. 341-348, 1997.

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

PRECETTI, A. A. C.; TERAN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 e *Metamasius hemipterus* (L., 1765) (Col., Curculionidae). In: REUNIÃO TÉCNICA COPERSUCAR, 1983, Piracicaba, **Reunião Técnica Agrônômica...** São Paulo: 1983. p. 32-37.

PRECETTI, A. A. C.; ARIGONI, E. DE B. Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico COPERSUCAR**, Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 3-15, 1990.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; MCCOY, C. W. Effects of culture method and formulation on the virulence of *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Nematology**, v. 32, n. 3, p. 281-288, 2000.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; KOPPENHÖFER, A. M. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: GAUGLER, R. (Ed). **Entomopathogenic Nematology**. Rutgers University: New Jersey, p. 333-355, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; STUART, R.; MCCOY, C. W. Comparison of beneficial among strains of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, for control of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 28, p. 129-136, 2003.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; JACKSON, M.; REILLY, C. C.; HOTCHKISS, M. W. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 119-126, 2004.

SMITH, K. A. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes. 1994. Disponível em: <<http://www.fftc.agnet.org/library/article/tb139a.html>>. Acesso em: 21 set. 2005, 10:31:13.

STOCK, P.S. Presence of *Steinernema scapterisce* (Nguyen et Smart) parasitizing the mole cricket *Scapteriscus borellii* in Argentina. **Nematologia Mediterranea**, v.20, n. 2, p. 163-165, 1992.

STUART, R. J.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; JAMES, R. R.; NGUYEN, K. B.; MCCOY, C. W. Virulence of new and mixed strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* to larvae of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Biological Control**, Orlando, v. 30, p. 439-445, 2004.

TAVARES, F. M.; BUSSOLA, R. A.; GOULART, R. M.; LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; BATISTA FILHO, A. Pathogenicity of *Heterorhabditis* sp. and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) against larvae of *Bradysia* sp. (Diptera: Sciaridae). In: LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND NEMATODES, 2., 2003, Campos dos Goytacazes, **Proceedings...** Campos dos Goytacazes: 2003. p. 28.

TERAN, F. O.; PRECETTI, A. A. C. M. Flutuação populacional e outros aspectos bioecológicos de *Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus* (Col., Curculionidae); pragas da cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 8., 1983, Brasília, **Resumos...** Brasília: 1983. p. 005.

TERAN, F. O.; PRECETTI, A. A. C. M.; HENRIQUE, B. C. Desenvolvimento de armadilhas específicas para *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., 1986, Rio de Janeiro, **Resumos...** Rio de Janeiro: 1986. p. 361.

TREVERROW, N. L.; BEDDING, R. A. Development of a system for the control of the banana weevil borer, *Cosmopolitus sirdidus* with entomopathogenic nematodes. In: BEDDING, R.; AKHURST, R.; KAYA, H. (Ed.) **Nematodes and the biological control of insect pests**. Australia: CSIRO, p. 41-77, 1993.

ÚNICA: UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Produção de Cana – Brasil. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/pages/estatisticas.asp#> >. Acesso em: 7 jan. 2005, 15:55:26.

WANG, Y.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 66, p. 178-184, 1994.

WOODRUFF, R. E. The hunting billbug, *Sphenophorus venatus vestitus* Chittenden, in Florida (Coleoptera, Curculionidae). **Entomology Circular**, Florida Department of Agriculture, Florida, n. 45, p. 1-2, 1966.