

JÉSSICA APARECIDA GABIA

**COMPATIBILIDADE DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A FUNGICIDAS
QUÍMICOS**

Botucatu

2024

JÉSSICA APARECIDA GABIA

**COMPATIBILIDADE DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A FUNGICIDAS
QUÍMICOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientadora: Silvia Renata Siciliano
Wilcken

Botucatu

2024

G113c Gabia, Jéssica Aparecida
Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos a fungicidas químicos / Jéssica Aparecida Gabia. – Botucatu, 2024
61 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientadora: Sílvia Renata Siciliano Wilcken

1. viabilidade. 2. infectividade. 3. neps. 4. calda fungicida. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: COMPATIBILIDADE DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A FUNGICIDAS QUÍMICOS

AUTORA: JÉSSICA APARECIDA GABIA

ORIENTADORA: SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Prof.^a Dr.^a SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN (Participação Presencial)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu UNESP

Pesquisadora Dr.^a ANDRESSA LIMA DE BRIDA (Participação Presencial)
Nematologia / CropSolutions - Pesquisa, Tecnologia e Inovação Agropecuária Ltda

Prof.^a Dr.^a ADRIANA ZANIN KRONKA (Participação Presencial)
Protecao Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu UNESP

Botucatu, 01 de agosto de 2024

Aos meus amados pais,

Jair Donizete Gabia e Marlene Seisdedos Gabia,

dedico, e ao meu namorado,

Lucas Prado de Castro,

afereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A meus pais Jair e Marlene pelo incentivo e apoio ao lado da minha caminhada acadêmica.

À minha orientadora Silva Renata Siciliano Wilcken, pelo apoio, orientações, ensinamentos e pelo bom exemplo de pesquisadora que é para mim.

À Dra. Adriana Aparecida Gabia, pelas orientações e ensinamentos compartilhados.

Ao meu namorado Lucas Prado de Castro pela compreensão e parceria.

Ao Mateus Henrique de Toledo Gregio pela colaboração na realização do trabalho.

Ao Matheus Milani Pretto pela amizade, risadas e companheirismo ao longo do curso de mestrado.

Ao Deucleiton Amorim Jardim pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Agronomia – Proteção de Plantas pelos ensinamentos transmitidos.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) desempenham um papel fundamental no controle biológico de pragas agrícolas em que pelo menos uma fase de seu desenvolvimento ocorra no solo. Contudo, sua eficácia pode ser limitada pela exposição a produtos químicos agrícolas, como fungicidas, podendo causar mortalidade dos juvenis infectantes e reduzir a infectividade. Sendo assim o presente estudo teve como objetivo verificar compatibilidade de diferentes isolados de NEPs com fungicidas químicos registrados para a cultura da soja e avaliar a multiplicação dos isolados em *Spodoptera frugiperda* após a exposição em calda fungicida. Para o experimento, os isolados *Steinernema brazilense* CB06, *S. glaseri* CB01 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB, provenientes do Laboratório de Nematologia Agrícola da UNESP, Campus de Botucatu – SP, foram testados. As populações de *S. frugiperda* foram estabelecidas em laboratório a partir de lagartas coletadas na Fazenda Lageado (FCA/UNESP) durante a safra 2021/2022. Os fungicidas testados incluíram Sumilex 500 WP (Promicidona), Frowncide 500 SC (Fluazinam), Cercobin 875 WG (Tiofanato-metílico), Approve (Tiofanato-metílico + Fluazinam), Absoluto Fix (Clorotalonil), Fusão EC (Metominostrobin + Tebuconazol), Cerconil (Tiofanato-metílico + Clorotalonil) e Unizeb Gold (Mancozebe). A mortalidade dos NEPs foi avaliada em intervalos de 30 minutos, por um período de quatro horas (240 minutos) após exposição aos produtos. Todos os fungicidas apresentaram compatibilidade com os NEPs em laboratório, com mortalidade de juvenis infectantes (JIs) inferior a 7%. Já na multiplicação de JIs em *S. frugiperda* quando expostos a caldas fungicidas, o isolado *H. bacteriophora* HB, apresentou redução superior a 40% em sete dos oito tratamentos avaliados. Na análise do efeito do fungicida, todos os fungicidas foram classificados como levemente nocivos de acordo com o protocolo IOBC/WPRS para ao menos uma das espécies de NEPs.

Palavra-chave: viabilidade; infectividade; neps; calda fungicida.

ABSTRAC

Entomopathogenic nematodes (EPNs) play a fundamental role in the biological control of agricultural pests, especially those with at least one stage of development in the soil. However, their efficacy may be limited by exposure to agricultural chemicals, such as fungicides, which can cause mortality of infective juveniles and reduce infectivity. This study aimed to verify the compatibility of different EPNs isolates with fungicides registered for soybean crops and to evaluate the reproduction of these isolates in *Spodoptera frugiperda* after exposure to fungicide solutions. The experiment tested isolates *Steinernema brazilense* CB06, *S. glaseri* CB01, and *Heterorhabditis bacteriophora* HB, obtained from the Agricultural Nematology Laboratory of UNESP, Botucatu Campus – SP. Populations of *S. frugiperda* were established in the laboratory from larvae collected at Fazenda Lageado (FCA/UNESP) during the 2021/2022 growing season. The fungicides tested included Sumilex 500 WP (Procymidone), Frowncide 500 SC (Fluazinam), Cercobin 875 WG (Thiophanate-methyl), Approve (Thiophanate-methyl + Fluazinam), Absoluto Fix (Chlorothalonil), Fusão EC (Metominostrobin + Tebuconazole), Cerconil (Thiophanate-methyl + Chlorothalonil), and Unizeb Gold (Mancozeb). EPN mortality was assessed at 30-minute intervals over a period of four hours (240 minutes) following product exposure. All fungicides were compatible with the EPNs in laboratory conditions, with infective juvenile (IJ) mortality below 7%. However, in the reproduction of IJs in *S. frugiperda* when exposed to fungicide solutions, the *H. bacteriophora* HB isolate showed a reduction of over 40% in seven out of the eight treatments evaluated. In analyzing fungicide effects, all fungicides were classified as slightly harmful according to IOBC/WPRS protocol for at least one of the EPN species.

Keywords: viability; infectivity; epns; fungicide solution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Multiplicação de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema glaseri* CB01, após exposição de 240 minutos em caldas fungicidas a lagartas de *Spodoptera frugiperda*.....46
- Figura 2** – Multiplicação de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema braziliense* CB06, após exposição de 240 minutos em caldas fungicidas a lagartas de *Spodoptera frugiperda*.....48
- Figura 3** – Multiplicação de juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis bacteriophora* HB, após exposição de 240 minutos em caldas fungicidas a lagartas de *Spodoptera frugiperda*.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dieta artificial para criação de <i>Galleria mellonella</i> em laboratório.....	33
Tabela 2 – Caracterização dos tratamentos utilizados para os testes de compatibilidade.....	35
Tabela 3 – Composição da dieta artificial para criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> em condições de laboratório.....	37
Tabela 4 – Porcentagem (%) de mortalidade de JIs de <i>Steinernema glaseri</i> CB01 avaliados aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos após exposição em calda fungicida.....	42
Tabela 5 – Porcentagem (%) de mortalidade de JIs de <i>Steinernema brazilense</i> CB06 avaliados aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos após exposição em calda fungicida.....	43
Tabela 6 – Porcentagem (%) de mortalidade de JIs de <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HB avaliados aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos após exposição em calda fungicida.....	44
Tabela 7 – Efeito dos fungicidas (E%) após 240 minutos de contato com <i>Steinernema glaseri</i> CB01 a lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	47
Tabela 8 – Efeito dos fungicidas (E%) após 240 minutos de contato com <i>Steinernema brazilense</i> CB06 a lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	49
Tabela 9 – Efeito dos fungicidas (E%) após 240 minutos de contato com <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HB a lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Nematoides entomopatogênicos	21
2.2	Gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	21
2.2.1	Ciclo de vida dos gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	22
2.3	Bactérias simbióticas dos nematoides entomopatogênicos	24
2.4	Multiplicação de nematoides entomopatogênico.....	25
2.5	Uso de nematoides entomopatogênicos na agricultura	27
2.6	Controle de <i>S. frugiperda</i> com nematoides entomopatogênicos	28
2.7	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E Smith) (Lep.: Noctuidae).....	29
2.7.1	Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i>	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Obtenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs).	32
3.2	Criação de <i>Galleria mellonella</i> (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) em laboratóri.	32
3.3	Multiplicação e manutenção dos nematoides entomopatogênicos (NEPs).....	33
3.4	Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos a fungicidas químicos.....	34
3.5	Efeito dos fungicidas químicos na produção de nematoides entomopatogênicos em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E Smith) (Lep.: Noctuidae).....	36
3.6	Análises estatísticas	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	Compatibilidade de fungicidas químicos a nematoides entomopatogênicos	40
4.2	Multiplicação e infectividade de nematoides entomopatogênicos em <i>Spodoptera frugiperda</i> após exposição em calda fungicida.	44
5	CONCLUSÕES	53

REFERÊNCIAS.....	55
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A crescente rejeição ao uso intensivo de pesticidas tem impulsionado a busca por alternativas mais sustentáveis e menos nocivas ao meio ambiente e à saúde dos aplicadores. Diante deste cenário, reduzir o número de aplicações, substituições ou combiná-las com outras estratégias de manejo, como o uso de agentes biológicos, torna-se fundamental para garantir práticas agrícolas mais seguras e eficazes (Laznik; Trdan, 2014). Uma das alternativas para diminuir o uso de inseticidas químicos é o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs), principalmente os gêneros *Heterorhabditis* Poinar, 1976 e *Steinernema* Travassos, 1927 (Grewal; Jagdale, 2001; Grewal; Ehlers; Shapiro-Ilan, 2005; Laznik; Trdan, 2017).

Os NEPs são agentes de controle biológico conhecidos por ocorrerem naturalmente nos mais diferentes continentes, apresentando maior potencial de controle para insetos-pragas em que pelo menos uma fase de seu ciclo de vida ocorra no solo, como é o caso das lagartas do gênero *Spodoptera* (J.E Smith) (Lep.: Noctuidae) (Rohde et al., 2012; Lacey et al., 2015; Lewis et al., 2015; Okuma et al., 2022). O controle do inseto-praga no solo acontece logo após a penetração do juvenil infectante (J1/J3) pelas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) (Poinar; Grewal, 2012), uma vez na hemocele do inseto os juvenis de *Steinernema* e *Heterorhabditis* liberam bactérias simbióticas dos gêneros *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. respectivamente (Poinar, 1990; Adams; Nguyen, 2002; Grewal; Ehlers; Shapiro-Ilan, 2005), essas bactérias uma vez presentes na hemolinfa do inseto hospedeiro se multiplicam rapidamente liberando toxinas, matando-o por septicemia em um curto período de tempo (24 a 48 horas) (Dolinski, 2006; Voss et al., 2009).

Diversos estudos com *Steinernema* e *Heterorhabditis* comprovam a eficiência desses agentes no controle de diferentes espécies de insetos-pragas tanto em casa de vegetação como em campo (Sirjani; Lewis, Kaya, 2009; Brida, et al., 2019). Além disso, o uso combinado desses agentes com produtos químicos misturando-os em tanques de pulverização vem sendo estudadas nas últimas décadas como uma alternativa ao Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Shapiro-Ilan; Lewis; Behle; McGuire, 2001), atuando de forma sinérgica nas misturas, otimizando o tempo de aplicação e reduzindo custos (Rovesti, Deseo 1990; Grewal; Webber; Batterley, 1998), no entanto,

existem trabalhos demonstrando os efeitos negativos de diferentes grupos químicos sobre os nematoides entomopatogênicos, ocasionando a mortalidade e redução da virulência de determinados isolados de nematoides entomopatogênicos (Amizadeh et al., 2019). De certo modo, a compatibilidade de NEPs e produtos químicos varia do isolado de nematoides entomopatogênico, dos pesticidas químicos, das doses de aplicação e tempo de exposição (De Nardo; Grewal, 2003; García del Pino, Jové, 2005; Koppenhöfer, Grewal 2005).

Ao avaliar a compatibilidade dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) com produtos químicos, é preciso olhar além da simples sobrevivência dos juvenis infectantes. Embora os nematoides possam sobreviver após a exposição a certos produtos químicos, pode haver outros efeitos subletais, comprometendo a virulência dos NEPs, mesmo que a sobrevivência não pareça afetada. Diante ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo: (I) verificar compatibilidade de nematoides entomopatogênicos *Steinernema glaseri* CB01, *Steinernema braziliense* CB06 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB com fungicidas químicos registrado para a cultura da soja; (II) avaliar multiplicação e eficiência na infectividade dos isolados após 240 minutos de exposição em calda fungicida a lagartas de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nematoides entomopatogênicos

O filo Nematoda constitui um dos maiores grupos de metazoários, amplamente distribuído em diferentes nichos ecológicos, como ambientes terrestres, marinhos e de água doce (De Ley, 2006; Brenner; Wood, 1988). Os nematoides possuem corpo cilíndrico, alongado e não-segmentado, com grande variação em seus hábitos alimentares, sendo classificados como nematoides de vida livre, parasitas de plantas e parasitas de insetos, sendo este último grupo de interesse para o controle biológico de pragas agrícolas (Dolinski, 2006; De Ley, 2006; Brenner; Wood, 1988).

Até o momento, cerca de 30 famílias de nematoides foram descritas associadas a insetos e outros invertebrados. No entanto, apenas nove famílias apresentam espécies com potencial para o controle biológico de pragas, sendo elas: Allantonematidae, Iotonchiidae, Heterorhabditidae, Mermithidae, Parasitylenchidae, Sphaerulariidae, Steinernematidae e Tetradonematidae (Poinar, 1990; Kaya; Stock, 1997; Sundarababu; Sankaranarayanan, 1998). Dentre essas, as famílias Allantonematidae (ordem Tylenchida), Mermithidae (ordem Mermithida), e, especialmente, Heterorhabditidae e Steinernematidae (ordem Rhabditida) têm recebido maior atenção em razão de seu uso em programas de controle biológico (Lacey; Georgis, 2012; Popiel; Hominick, 1992; Almenara et al., 2012). A família Steinernematidae é composta por dois gêneros principais: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994. Já a família Heterorhabditidae possui um único gênero, *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Adams; Nguyen, 2002). No entanto, as espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são as mais estudadas e utilizadas em programas de manejo integrado de pragas, devido à sua eficácia em infestar uma ampla gama de insetos-praga (De Brida, 2017).

2.2 Gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*

Os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são amplamente encontrados em diversos habitats, como áreas de cultivo, florestas e pântanos, em praticamente todos

os continentes, exceto na Antártida (Griffin; Downes; Block, 1990; Hominick et al., 1996; Hominick, 2002). Dentro do gênero *Steinernema*, as espécies *Steinernema feltiae* e *Steinernema carpocapsae* apresentam a maior distribuição mundial, enquanto as espécies *Heterorhabditis bacteriophora* e *Heterorhabditis indica* são as mais amplamente distribuídas dentro do gênero *Heterorhabditis* (Poinar, 1990; Hominick, 2002).

O sucesso no controle biológico com os gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* deve-se à sua associação simbiótica com bactérias patogênicas dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente, pertencentes à família Enterobacteriaceae (Poinar, 1990; Forst; Downs; Boemare; Stackebrandt 1997). Essas bactérias, são Gram-negativas e não formam esporos, sendo anaeróbicas facultativas e ausentes de estágios resistentes, sendo encontradas principalmente nos juvenis infectantes (J3) dos nematoides entomopatogênicos ou na hemocele de inseto-cadáver (Forst; Clarke, 2002; Nagesh; Hussaini; Singh, 2002).

A associação entre nematoide e bactéria ocorre em duas fases principais: uma fase livre no solo, em que os juvenis infectantes carregam as bactérias simbióticas no intestino e procuram ativamente por um hospedeiro, e uma fase parasítica, onde, após a penetração no inseto-hospedeiro, os nematoides liberam as bactérias na hemocele. Essa simbiose beneficia ambas as partes, por um lado, as bactérias são responsáveis pela morte rápida do inseto (normalmente em 24 a 48 horas) e suprimem a ação de outros patógenos no cadáver, enquanto os nematoides se beneficiam da degradação do hospedeiro, usando-o como alimento e protegendo as bactérias no ambiente (Forst; Clarke, 2002; Dowds; Peters, 2002; Emelianoff et al., 2007).

2.2.1 Ciclo de vida dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*

O ciclo de vida dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) é dividido em três fases principais: ovo, estágios juvenis e fase adulta (composta por machos e fêmeas). A fase juvenil é subdividida em quatro estádios: J1, J2, J3 ou JI (juvenil infectante) e J4. Entre essas fases, o juvenil infectante (JI ou J3) é considerado a forma mais resistente do ciclo, sendo a única fase do ciclo capaz de sobreviver fora do inseto-hospedeiro, no ambiente, particularmente no solo. Essa resistência é atribuída à

presença de duas cutículas sobrepostas, derivadas das exúvias de estágios juvenis anteriores, que protegem suas aberturas corporais (boca e ânus), prevenindo a perda de umidade e, conseqüentemente, a sua dessecação, permanecendo viáveis no solo por longos períodos até encontrarem um novo hospedeiro (Lewis et al., 2006; Dolinski, 2006).

O ciclo de vida dos NEPs inicia-se a partir do momento que o juvenil infectante (J3), movendo-se livremente no solo, detecta e localiza um inseto-hospedeiro. A localização do hospedeiro é mediada por estímulos químicos presentes nas excreções ou secreções deixadas pelo inseto (Lewis et al., 2006; Almenara et al., 2012). Após localizar o hospedeiro, o juvenil infectante penetra no corpo do inseto através de suas aberturas naturais, como boca, espiráculos ou ânus. Uma vez dentro da hemocele do inseto, o nematoide libera simbiontes bacterianos, seja pela regurgitação ou através do ânus, liberando essas bactérias diretamente na hemolinfa do inseto (Woodring; Kaya, 1988). As bactérias simbióticas se multiplicam rapidamente, levando à morte do hospedeiro por septicemia, geralmente em 24 a 48 horas após infecção.

Após a morte do inseto, o juvenil infectante (J3) começa a se alimentar dos tecidos decompostos, alimentando-se do material em degradação e dos subprodutos liberados pelas bactérias. Nesse processo, o JI se transforma em juvenil funcional de terceiro estágio, realizando a muda (ecdise) para o quarto estágio juvenil (J4). Posteriormente, ocorre uma segunda ecdise, após a qual os juvenis se transformam em adultos de primeira geração. Dependendo da disponibilidade de alimento no cadáver do inseto-hospedeiro, várias gerações (1 a 3 gerações) podem se desenvolver no mesmo hospedeiro (Adams; Nguyen, 2002).

A duração do ciclo de vida, desde a infecção até a emergência de novos juvenis infectantes, varia entre as espécies de nematoides. Para espécies do gênero *Steinernema*, o ciclo completo leva de 7 a 10 dias, enquanto para o gênero *Heterorhabditis*, o ciclo pode durar entre 12 e 15 dias, sob condições favoráveis de temperatura, com média de 25°C (Sundarababu; Sankaranarayanan, 1998). Uma vez que o alimento é esgotado no hospedeiro, os juvenis infectantes recém-formados emergem e migram para o solo, carregando as bactérias simbióticas em seus intestinos. Esses juvenis permanecerão no solo até encontrarem e infectarem um novo hospedeiro, reiniciando o ciclo de vida (Kaya; Gaugler, 1993; Ferraz, 1998).

Apesar do ciclo de vida dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* ser semelhante em muitos aspectos, eles apresentam diferenças importantes na fase adulta. No gênero *Steinernema*, o dimorfismo sexual está presente desde a primeira geração, com a diferenciação entre machos e fêmeas. Já no gênero *Heterorhabditis*, os adultos de primeira geração são hermafroditas, com o dimorfismo sexual surgindo apenas a partir da segunda geração (Dix et al., 1992). Esta característica confere uma vantagem ao gênero *Heterorhabditis*, pois a penetração de um único juvenil infectante é suficiente para garantir a perpetuação da espécie, já que não há necessidade de copulação para a produção de novos juvenis (Grewal; Jagdale, 2001).

2.3 Bactérias simbióticas dos nematoides entomopatogênicos

As bactérias gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* desempenham um papel essencial na patogenicidade do nematoide, sendo responsáveis pela rápida morte do inseto hospedeiro e, simultaneamente, promovendo o desenvolvimento dos nematoides dentro do cadáver do inseto (Forst; Clarke, 2002; Dowds; Peters, 2002).

Os juvenis infectantes de *Steinernema* sp. carregam as bactérias do gênero *Xenorhabdus* em uma vesícula especializada, enquanto os juvenis de *Heterorhabditis* sp. transportam as bactérias do gênero *Photorhabdus* na região posterior do intestino (Kaya; Gaugler, 1993; Poinar, 1990; Forst; Clarke, 2002).

As espécies mais estudadas de *Xenorhabdus* incluem *Xenorhabdus nematophila*, que está associada a *Steinernema carpocapsae*, e *Xenorhabdus bovienii*, associada a *Steinernema feltiae* (Forst; Downs; Boemare; Stackebrandt 1997). Enquanto para *Heterorhabditis* a principal espécie simbiótica é *Photorhabdus luminescens*, que apresenta a característica única de bioluminescência, embora essa função não esteja diretamente relacionada à patogenicidade (Forst; Downs; Boemare; Stackebrandt 1997).

A bactéria *Photorhabdus luminescens* se destaca pela produção de compostos antibacterianos e antifúngicos, que protegem o cadáver do inseto da invasão de outros patógenos, garantindo o exclusivo aproveitamento do hospedeiro pelos nematoides. Além disso, *Photorhabdus* secreta toxinas TTSS (Toxinas de

Secreção do Tipo III), que são injetadas diretamente nas células do inseto, promovendo sua rápida morte (Boemare, 2002).

A relação entre os nematoides e suas bactérias simbióticas é mutualística, ambos os organismos se beneficiam dessa associação. Os nematoides por um lado proporcionam transporte e um ambiente protegido para as bactérias no intestino ou na vesícula especializada, enquanto as bactérias garantem a morte rápida do inseto-hospedeiro além de fornecem condições ideais para o desenvolvimento dos nematoides (Kaya; Gaugler, 1993; Dowds; Peters, 2002).

Além de atuar diretamente no controle do hospedeiro, as bactérias simbióticas também desempenham um papel fundamental na manutenção da infectividade dos juvenis infectantes. Estudos indicam que nematoides privados de suas bactérias simbióticas apresentam uma significativa redução em sua capacidade de matar os insetos-hospedeiros e de se reproduzir (Forst; Clarke, 2002).

2.4 Multiplicação de nematoides entomopatogênicos

A produção em larga escala de nematoides entomopatogênicos (NEPs), é crucial para sua aplicação no controle biológico de pragas. Esse processo envolve o cultivo eficiente de nematoides e suas bactérias simbióticas, garantindo a viabilidade e infectividade dos juvenis infectantes (JIs) em condições de campo. A produção e multiplicação dos nematoides entomopatogênico é realizada a partir do método in vivo, utilizando insetos-hospedeiros e a produção in vitro, sendo realizados em meios artificiais (Eberson; Lewis; Moore, 1990; Friedman, 1990).

O método in vivo é utilizado em laboratórios devido à simplicidade da técnica e ao baixo custo inicial. Nesse método, os nematoides são multiplicados em insetos hospedeiros, como larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) ou em larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: tenebrionidae), que são insetos suscetíveis à infecção pelos JIs. O ciclo de vida do nematoide se completa dentro do inseto-cadáver, resultando multiplicação de novos juvenis infectantes (JIs) que emergem do inseto-cadáver, sendo coletados em suspensão aquosa para posterior uso (Friedman, 1990; Kaya; Stock, 1997). Esse método tem como principal

vantagem a alta produção de juvenis infectantes com elevado potencial de infectividade, já que o ambiente do inseto é o meio natural de reprodução dos nematoides. No entanto, a produção em larga escala requer grandes quantidades de insetos, o que pode ser inviável em algumas situações (Eberson; Lewis; Moore, 1990).

Entretanto, a produção *in vitro*, envolve a multiplicação dos nematoides em meios artificiais, sem a necessidade de hospedeiros vivos. Existem dois subtipos desse método: a produção em meios líquidos e a produção em meios sólidos. No caso dos meios líquidos, os nematoides são cultivados em biorreatores, em um caldo nutritivo que contém os nutrientes necessários tanto para os nematoides quanto para as bactérias simbióticas (Ehlers, 2001), enquanto a produção em meio sólido envolve a multiplicação de nematoides em substratos como esponjas ou farelo de cereais (Shapiro-Ilan; Gozzo, 2009).

A produção *in vitro* oferece o controle preciso das condições de cultivo (temperatura, pH, nutrientes), maior escalabilidade e menor dependência de hospedeiros naturais. Além disso, os biorreatores permitem uma produção contínua e automatizada, aumentando a eficiência e reduzindo os custos em longo prazo (Friedman, 1990; Ehlers, 2001). Um dos desafios da produção *in vitro* é garantir que os nematoides produzidos mantenham a alta infectividade observada no meio *in vivo*.

Estudos indicam que os juvenis infectantes produzidos em condições *in vitro* podem apresentar menor resistência ao estresse ambiental e uma taxa de sobrevivência reduzida quando aplicados em campo (Shapiro-Ilan; Gaugler, 2002). Para contornar esses problemas, diversos ajustes nos meios de cultivo e técnicas de encapsulamento têm sido desenvolvidos, visando aumentar a resistência e a viabilidade dos nematoides. As técnicas de formulação envolvem a suspensão dos nematoides em soluções que permitem o armazenamento a longo prazo, sem perda significativa de viabilidade. Atualmente as formulações mais comuns são a desidratação parcial e o encapsulamento dos nematoides em matrizes gelatinosas ou poliméricas, a qual protegem os juvenis infectantes contra condições ambientais adversas, como calor e ressecamento durante a fase de armazenamento (Eberson; Lewis; Moore, 1990; Ehlers, 2001; Shapiro-Ilan; Lewis; Behle; McGuire, 2001)

2.5 Uso de nematoides entomopatogênicos na agricultura

O uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) tem se destacado no manejo integrado de pragas (MIP), não apenas como agentes de controle biológico isolado, mas também em associação com outros métodos, como o controle químico. Essa integração resulta em efeitos sinérgicos com diversos produtos fitossanitários, potencializando a eficácia no controle de pragas e contribuindo para a sustentabilidade do manejo agrícola (Kapranas et al., 2017; Devi; Nath, 2017), como Leite et al. (2006) que verificaram que a combinação do nematoide *Steinernema sp.* com o inseticida químico Tiametoxam 250WG resultou em uma mortalidade superior a 70% de adultos de *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae), resultado superior ao observado com a aplicação isolada dos juvenis infectantes de *Steinernema sp.*

Entretanto, certos compostos químicos podem reduzir a atividade e infectividade dos juvenis infectantes (Grewal; Webber; Batterley, 1998). A infectividade de *Steinernema feltiae* foi avaliada em contato com 19 produtos químicos. Embora a taxa de mortalidade das larvas de *Tenebrio molitor* não tenha sido afetada, a mortalidade dos juvenis infectantes variou de 7,04% a 8,86% após 72 horas de exposição a fungicidas, sendo essa taxa menor quando comparada à mortalidade provocada por inseticidas, que variou de 2,26% a 18,68% (Radová, 2010). Enquanto, Magnabosco et al. (2019) analisaram a compatibilidade de cinco produtos químicos utilizados no tratamento de sementes de milho (Maxim, Cruiser 350 FS, Fortenza 600 FS, Avicta 500 FS e Amulet) e um produto à base de nim com isolados de *Heterorhabditis amazonensis* GL e MC01. O fungicida Maxim (Fludioxonil), embora não tenha afetado a viabilidade dos nematoides, foi considerado nocivo para ambos os isolados, reduzindo a infectividade e a produção de novos JIs em 72% e 76%, respectivamente.

A eficácia dos NEPs também está diretamente relacionada à densidade populacional aplicada. Diversos estudos demonstram que a concentração de juvenis infectantes (JIs) é um fator crucial para o sucesso no controle biológico. Por exemplo, Andaló Moino Junior, Santa – Cecília (2004) observaram que fêmeas adultas de *Dysmicoccus texensis* apresentaram susceptibilidade ao isolado de *Steinernema carpocapsae* quando expostas a uma população de 25 JIs por inseto. Da mesma

forma, Rodrigueiro et al. (2008) relataram que o isolado *Heterorhabditis indica* IBCB-n05 foi capaz de provocar 100% de mortalidade em larvas de *Alphitobius diaperinus* com uma concentração de 40 JIs/cm². Já a potencialidade de NEPs para controle de *S. frugiperda* foi observado por Andaló et al., (2010), que verificaram a mortalidade de 100% e 97,6% das lagartas de *S. frugiperda* quando inoculadas com 200 JIs de *S. arenarium* e *Heterorhabditis* sp., respectivamente, em condições controladas. Esses resultados evidenciam que a densidade dos NEPs é um parâmetro chave para garantir a efetividade no campo.

Portanto, estudos adicionais de campo e laboratório são essenciais para avaliar a compatibilidade dos NEPs com fungicidas e outros produtos químicos. Essas avaliações permitem compreender melhor o comportamento dos nematoides em ambientes tratados, incluindo sua capacidade de localizar e infectar hospedeiros em condições adversas.

2.6 Controle de *S. frugiperda* com nematoides entomopatogênicos

Spodoptera frugiperda, popularmente conhecida como lagarta-do-cartucho, é uma praga amplamente distribuída e que afeta as principais culturas como milho, algodão e soja, especialmente na América Latina. O controle dessa praga é desafiador devido à sua alta capacidade de adaptação e resistência a inseticidas químicos. Nesse contexto, os nematoides entomopatogênicos (NEPs) emergem como uma alternativa promissora para o manejo integrado dessa praga, oferecendo uma solução sustentável e menos prejudicial ao meio ambiente (Garcia; Raetano; Leite, 2008).

Diversos estudos demonstram a eficácia de diferentes espécies de NEPs no controle de *S. frugiperda*. Entre os mais utilizados estão as espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, que são capazes de localizar, infectar e matar as larvas da praga em um curto período. Garcia, Raetano e Leite (2008) relatam que juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis indica* aplicados em condições laboratoriais foram eficazes no controle, causando mortalidade superior de 80% das larvas quando expostas a uma concentração de 100 JIs por cm². Já em testes realizados em campo com *H. indica* na cultura do milho indicaram que os nematoides podem ser eficazes na redução das populações de *S. frugiperda*, apresentando uma

redução de até 70% nas populações de lagartas em comparação com áreas não tratadas (Garcia; Raetano; Leite, 2008).

Experimentos realizados por Molina; Lezama; Lopez (1996) demonstraram que *Steinernema carpocapsae* é altamente eficaz no controle de larvas de *S. frugiperda*. O estudo mostrou que a mortalidade de larvas expostas a diferentes concentrações de *S. carpocapsae* variou de 70% a 95%, dependendo da dose aplicada e das condições ambientais. A eficácia foi superior quando os juvenis infectantes foram aplicados em ambientes com alta umidade (%). Garcia et al. (2008) também observaram que a mortalidade das larvas de *S. frugiperda* aumentou em condições de alta umidade, sugerindo que a aplicação de NEPs pode ser mais eficaz em períodos de maior disponibilidade de água no solo ou quando combinada com técnicas de irrigação.

A eficácia dos NEPs no controle de *S. frugiperda* está diretamente relacionada a fatores como umidade do solo, temperatura e densidade populacional dos nematoides. Temperaturas entre 20°C e 30°C são ideais para o desenvolvimento e ação dos nematoides (Sundarababu; Sankaranarayanan, 1998). No entanto, a umidade é um dos fatores mais críticos, pois os nematoides dependem da água no solo para se locomover e penetrar no hospedeiro (Kaya; Gaugler, 1993).

2.7 *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lep.: Noctuidae)

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lep.: Noctuidae), é uma das principais pragas que afetam diversas culturas agrícolas, sendo amplamente conhecida pelos danos causados à cultura do milho (Pogue, 2002). Originalmente, a *S. frugiperda* é atribuída às regiões tropicais e subtropicais das Américas. No Brasil, essa praga está disseminada por todo o território nacional, favorecida pelas condições ambientais (Cruz, 1995).

A lagarta-do-cartucho é praga polífaga, altamente destrutiva, que pode atacar mais de 325 espécies vegetais (Leiderman; Sauer, 1953; Pogue, 2002), incluindo culturas de alto valor econômico, como algodão, soja e milho (Bernardi, et al 2014). Apesar de ser capaz de infestar uma ampla gama de plantas hospedeiras, *S.*

frugiperda demonstra maior preferência por espécies da família Poaceae (gramíneas), como milho, sorgo e arroz (Luginbill, 1928; Cruz, 1995).

Na cultura do milho, o ataque por *S. frugiperda* inicia-se logo após a emergência das plântulas, com as lagartas neonatas alimentando-se das folhas. Se não controlada, a infestação pode progredir até as fases reprodutivas da planta, onde as lagartas atacam a espiga, comprometendo tanto a quantidade como qualidade do grão (Valicente, 2015). Na cultura da soja, lagartas de primeiro e segundo ínstar atacam as plântulas, cortando-as rente ao solo, além de se alimentarem das folhas e das vagens em formação (Barros; Torres; Bueno, 2010).

As perdas causadas pela lagarta variam de 10% a 70%, dependendo da cultivar, da variedade e do sistema de plantio adotado (Fernandes; Abreu; Christ; Rosa, 2019). Em sistemas de plantio direto e rotação de culturas, as perdas podem ser ainda maiores, devido à proteção oferecida pela palhada acumulada no solo, que facilita a sobrevivência dos ovos, lagartas e pupas, além de fornecer um fluxo contínuo de alimento (Gallo, 2002; Diez-Rodriguez; Omoto, 2001).

2.7.1 Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*

O ciclo de vida de *S. frugiperda* é composto por quatro estágios principais: ovo, larva (com seis ínstars), pupa e adultos (machos e fêmeas). As fêmeas adultas depositam seus ovos em grupos, geralmente nas folhas das plantas hospedeiras, formando massas que podem conter de 100 a 300 ovos por postura, embora uma única fêmea possa depositar de 1.000 a 2.000 ovos ao longo de sua vida (Cruz, 2002). O ciclo completo, do ovo até o adulto, pode ser concluído em cerca de 30 dias, dependendo das condições ambientais, principalmente da temperatura e da disponibilidade de alimento (Pinto; Parra; Oliveira, 2004; Zuchhi; Silveira Neto; Nakano, 1993).

Os ovos de *S. frugiperda* são pequenos, esféricos e inicialmente esbranquiçados, mudando para uma coloração marrom escura à medida que se aproxima a eclosão. A eclosão ocorre em aproximadamente 2 a 3 dias, quando expostos a temperaturas entre 25 °C e 30 °C, dando origem às lagartas neonatas

(Gallo, 2002; Pinto; Parra; Oliveira, 2004). As lagartas passam por seis ínstaes durante seu desenvolvimento larval, período em que se alimentam vorazmente das folhas das plantas hospedeiras, causando danos significativos às culturas (Moore; Hanks, 2004).

As larvas de último ínstar podem atingir até 4 cm de comprimento e apresentam uma coloração variada, com faixas longitudinais esverdeadas, marrons ou pretas, além de uma característica distintiva: uma linha em forma de "Y" invertido na cabeça (Valicente; Tuelher, 2009). Ao completar seu desenvolvimento larval, as lagartas se dirigem ao solo e se enterram, onde ocorre a fase de pupa. O estágio pupal tem duração de 8 a 9 dias, durante este tempo ocorre a metamorfose completa, transformando a larva em uma mariposa adulta. (Moore; Hanks, 2004).

Os adultos são noturnos e têm alta mobilidade, sendo capazes de voar longas distâncias em busca de áreas adequadas para a oviposição e alimentação (Pinto; Parra; Oliveira, 2004). A rápida capacidade de completar seu ciclo de vida, aliada à alta fecundidade das fêmeas, permite que *S. frugiperda* se prolifere rapidamente e colonize novas áreas, tornando seu manejo um grande desafio para os agricultores. Além disso, as condições ambientais, como temperatura e umidade, desempenham um papel crucial no desenvolvimento e sobrevivência da praga, acelerando seu ciclo de vida em condições favoráveis (Degrande; Melo; Fernandes, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no laboratório de Nematologia Agrícola do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias – FCA/UNESP, câmpus de Botucatu – SP.

3.1 Obtenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs).

Três isolados de nematoides entomopatogênicos, *Steinernema brazilense* CB06, *Steinernema glaseri* CB01 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB, foram obtidos no Banco de Nematoides Entomopatogênicos do Laboratório de Nematologia Agrícola da FCA/UNESP. Os isolados foram multiplicados seguindo o método *in vivo* com adaptações de Woodring, Kaya (1988), utilizando-se lagartas de quinto e sexto ínstar de *Galleria mellonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Pyralidae) de criações estabelecidas em laboratório.

3.2 Criação de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) em laboratório

Para a criação de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) em laboratório, caixas de abelha do tipo Langstroth infestadas por lagartas da traça-da-cera foram doadas pela empresa Zé Colmeia – Fábrica de Caixas.

Inicialmente, as lagartas foram retiradas das caixas e colocadas em frascos de vidro com dieta artificial (Tabela 1) até atingirem a fase adulta. Os adultos foram então separados e transferidos para novos frascos de vidro, juntamente com sanfonas de papel, para acasalamento e postura dos ovos. As sanfonas de papel contendo os ovos foram retiradas, as posturas recortadas e colocadas em novos frascos de vidro com tampa de tela de aço, para a eclosão das lagartas, que permaneceram nesses frascos até atingirem o 5º e 6º ínstar, para inoculação, ou a fase adulta, para manutenção da população.

Tabela 1 – Dieta artificial para criação de *Galleria mellonella* em laboratório.

Ingredientes	Quantidade
Farelo de trigo	200g
Farinha de trigo	200g
Gérmen de trigo	200g
Caseína	200g
Levedura de cerveja	120g
Glicerina	130mL
Mel	250mL
Água destilada autoclavada	50mL
Favo de mel (opcional)	

Fonte: Adaptado de Woodring, Kaya 1988.

Durante toda a experimentação, as criações de *G. mellonella* foram mantidas em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $70 \pm 10\%$. A manutenção da criação foi realizada em dias alternados, incluindo a reposição da dieta artificial, separação dos adultos e ovos e a limpeza dos frascos de vidro.

3.3 Multiplicação e manutenção dos nematoides entomopatogênicos (NEPs)

A multiplicação e manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos foram realizadas utilizando placas de Petri (90 mm x 15 mm) contendo duas folhas de papel filtro, nas quais foram transferidas cinco lagartas de *G. mellonella* nos estágios de quinto e sexto ínstar. As lagartas foram inoculadas com 1,5 mL de suspensão aquosa contendo aproximadamente 1.000 juvenis infectantes (JIs) (200 JIs/lagarta). Após a inoculação, as placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara climatizada (BOD) regulada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e sem fotoperíodo.

Após 72 horas, as lagartas mortas foram transferidas para armadilhas de White com adaptações (White, 1927), as quais consistem em uma placa de Petri (90 mm x 15 mm) contendo uma folha de papel filtro, disposta sobre uma placa de Petri (150 mm x 25 mm) contendo 5 mL de água destilada. Essas armadilhas foram vedadas

com filme plástico e mantidas em câmara climatizada (BOD), regulada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e sem fotoperíodo.

A partir do quinto dia após a montagem da armadilha de White, as placas foram observadas diariamente até a emergência dos juvenis infectantes (JIs). Ao ser notada a presença dos nematoides, a suspensão foi descartada, e adicionados novamente 5 mL de água destilada na armadilha de White com adaptações (White, 1927), que foi vedada e mantida em câmara climatizada (BOD), por 24 horas. Durante 10 dias, a suspensão contendo os juvenis infectantes com 24 horas de emergência era recolhida e armazenada em câmara climatizada (BOD) a $15 \pm 2^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e sem luminosidade, por no máximo cinco dias.

3.4 Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos a fungicidas químicos

Para o estudo da compatibilidade dos NEPs a fungicidas químicos, foram selecionados oito fungicidas registrados junto ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), sendo: Sumilex 500 WP (Promicidona), Frowncide 500 SC (Fluazinam), Cercobin 875 WG (Tiofanato – metílico), Approve (Tiofanato – metílico + Fluazinam), Absoluto Fix (Clorotalonil), Fusão EC (Metominostrobin + Tebuconazol), Cerconil (Tiofanato metílico + Clorotalonil) e Unizeb Gold (Mancozebe). Para a testemunha, foi utilizado água potável. As doses de cada produto utilizado nos ensaios foram determinadas com base na recomendação de bula para controle de doenças fúngicas na cultura da soja, adotando-se a maior dose recomendada a fim de agravar os possíveis efeitos sobre os nematoides (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos tratamentos utilizados para os testes de compatibilidade.

Nome Comercial	Princípio Ativo	Concentração (g/L) ¹ ou (g/Kg) ²	Formulação	Dose p.c. ³ (g/ha) ⁴ ou (mL/ha) ⁵	Volume Calda (L/ha) ⁶
T1 – Testemunha (água)	--	--	--	--	--
T2 – Sumilex 500 WP	Promicidona	500 g/Kg	WP	1000 g/ha	200
T3 – Frownicide 500 SC	Fluazinam	500 g/L	SC	1000 mL/ha	200
T4 – Cercobin 875 Wg	Tiofanato - metílico	875 g/Kg	WP	700 g/ha	200
T5 - Approve	Tiofanato – metílico e Fluazinam	375 g/Kg e 375 g/Kg	WG	1000 g/ha	200
T6 – Absoluto Fix	Clorotalonil	720 g/L	SC	2000 mL/ha	200
T7 – Fusão EC	Metominostrobina e Tebuconazol	110g/L e 165 g/L	EC	725 mL/ha	200
T8 – Cerconil	Tiofanato – Metílico e Clorotalonil	140 g/L e 350 g/L	SC	2000 mL/ha	200
T9 – Unizeb Gold	Mancozebe	750g/kg	WG	3000g/ha	300

¹grama por litro; ²grama por kilo; ³dose comercial; ⁴gramas por hectare; ⁵ mililitros por hectare; ⁶ litros por hectare. WP: Pó molhável; SC: suspensão concentrada; WG: Grânulos dispersíveis em água; EC: concentrado emulsionável.

Os fungicidas foram diluídos em um litro de água potável, conforme a concentração máxima recomendada em caso de alta infestação. Após o preparo da calda, 5 mL da calda foram adicionados em tubos de ensaio, sendo acrescentado 200 µL de suspensão aquosa contendo em média 100 juvenis infectantes com 24 horas de emergência.

As avaliações de viabilidade dos nematoides entomopatogênicos ocorreram até 240 minutos, sendo realizadas em oito períodos com intervalo de 30 minutos entre si, até atingirem os 240 minutos após a imersão em calda fungicida. Para cada tratamento, foram adotadas oito repetições realizadas ao longo do tempo. De modo a evitar possível decantação entre o produto e o diluente (água), as suspensões foram agitadas a cada 10 minutos em agitador magnético. Para uma melhor visualização dos nematoides entomopatogênicos em microscópio óptico, precedeu-se a limpeza dos nematoides removendo o máximo possível dos produtos fitossanitários, para isso a suspensão contendo produto mais nematoide foi despejada sobre peneira de 500 mesh e lavada cuidadosamente com jato de água corrente, após a lavagem o volume final foi reajustado para 3 mL. Foram considerados mortos os nematoides que não responderam ao estímulo após adição de 50uL de NaOH na suspensão.

3.5 Efeito dos fungicidas químicos na produção de nematoides entomopatogênicos em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lep.: Noctuidae).

Para o bioensaio de infectividade, uma criação de *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lep.: Noctuidae) foi mantida em laboratório, a partir de lagartas coletadas em áreas experimentais da Fazenda Lageado FCA/UNESP, campus Botucatu, durante a safra 2021/2022.

Após a coleta as lagartas foram colocadas individualmente em copos plásticos com tapas contendo 7 g de dieta artificial (Tabela 3) até a fase de pupa, quando foram separadas e colocadas em pote de vidro contendo vermiculita autoclavada (120° a 30min), os quais foram vedados com tecido voil. Após a emergência dos adultos, sanfonas de papel tolha e potes contendo algodão embebido com mel 10% foram adicionados aos potes de vidro. Após 48 horas da postura, as sanfonas de papel foram retiradas, recortadas as posturas e adicionadas em potes plásticos com capacidade de 250mL até a eclosão das neonatas. As lagartas foram separadas individualmente em novos recipientes plásticos contendo dieta artificial devido ao canibalismo. Uma parte da criação foi utilizadas para teste de infectividade enquanto as demais eram

mantidas para manutenção da população. As criações de *S. frugiperda* foram mantidas em sala climatizada com temperatura controlada a 25 ± 2 °C.

Tabela 3 – Composição da dieta artificial para criação de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório.

Ingredientes	Quantidade
Feijão-branco	102,90 g
Germe-de-trigo	82,30 g
Farelo de soja	41,20 g
Leite em pó	30,90 g
Levedo de cerveja	51,40 g
Ágar	18,90 g
Solução vitamínica	8,20 mL
Nipagin	4,10 g
Ácido ascórbico	4,90 g
Ácido sórbico	2,50 g
Tetraciclina	0,10 g
Formaldeído (40%)	5 mL
Água potável	1400 mL

Fonte: Greene, Leppla, Dickerson, 1976.

Foram utilizados dez tratamento sendo: T1 - Testemunha inoculada; T2 - Sumilex 500 WP (Promicidona), T3 - Frowncide 500 SC (Fluazinam), T4 - Cercobin 875 WG (Tiofanato – metílico), T5 - Approve (Tiofanato – metílico + Fluazinam), T6 - Absoluto Fix (Clorotalonil), T7 - Fusão EC (Metominostrobina + Tebuconazol), T8 - Cerconil (Tiofanato metílico + Clorotalonil), T9 - Unizeb Gold (Mancozebe) e T10 - Testemunha absoluta (água potável).

Inicialmente foram preparados 200 mL de calda conforme a concentração máxima recomendada, adicionando 40.000 JIs (200 JIs/mL) com 24 horas de emergência. Os nematoides ficaram expostos a calda fungicida por 240 minutos, a cada 30 minutos a calda fitossanitária era agitada em agitador magnético afim de evitar possível separação entre produto e diluente (água). Após 240 minutos de exposição dos nematoides em calda fungicida, uma alíquota de 1mL contendo aproximadamente 200 JIs foi retirado e aplicado diretamente sobre lagartas de *S. frugiperda* de quarto e quinta instar dispostas individualmente em potes plásticos com tampa contendo 7 g de dieta artificial. Para a testemunha inoculada, os nematoides foram diluídos em água destilada, já a testemunha absoluta foi inoculada com 1mL de

água potável. Para cada tratamento foi utilizado 12 repetições contendo 1 lagarta por repetição.

Após o período de 3 dias foi verificada a mortalidade das lagartas de *S. frugiperda*. As lagartas mortas foram retiradas e transferidas para armadilha de White (1927) com adaptações, sendo vedadas com plástico filme e mantidas em BOD 25 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$, onde permaneceram por 15 dias para verificar e quantificar a emergência de JIs. Após 15 dias as armadilhas de White (1927), a suspensão contendo os nematoides entomopatogênicos foram recolhidos em potes de coleta e mantidos em BOD a $15^\circ \text{C} \pm 2$ °C até a contagem em câmara de Peters sobre microscópio ótico.

O efeito dos tratamentos sobre a infectividade dos nematoides entomopatogênicos sobre lagartas de *S. frugiperda* foi classificado conforme o protocolo IOBC (*International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants*), através da seguinte fórmula adaptada (Peters, Poullot, 2004).

$E\% = 100 - (100 - \text{mortalidade corrigida}\% - \text{redução da infectividade}\% - \text{redução na produção}\%)$.

Para achar a mortalidade corrigida foi utilizada a fórmula de Abbott (1925):

$$M_{corr} \% = \left(\frac{Mt\% - Mc\%}{100 - M\%} \right) \times 100$$

M_{corr} = mortalidade corrigida; Mt: porcentagem de mortalidade no tratamento e Mc: mortalidade no controle (testemunha inoculada).

A porcentagem de redução da infectividade dos nematoides foi calculada através da porcentagem de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas no controle (testemunha inoculada) utilizando a seguinte fórmula (Peters, Poullot, 2004):

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

$R_{inf}\%$ = porcentagem de redução da infectividade no tratamento em comparação ao controle; It: mortalidade nos tratamentos e Ic: mortalidade no controle (testemunha inoculada).

A produção de juvenis infectantes foi obtida através da quantificação dos JIs produzidos das lagartas de *S. frugiperda*. A redução da produção o tratamento em comparação com o tratamento controle foi obtida utilizando a seguinte fórmula (Peters, Poullot, 2004):

$$R_{fec} \% = \left(1 - \frac{F_t}{F_c}\right) \times 100$$

R_{fec}% = porcentagem na produção de JIs no tratamento em comparação ao controle; F_t: produção no tratamento; F_c: produção no controle (testemunha inoculada).

Após ser encontrado os valores de E%, o efeito do fungicida foi classificado seguindo o protocolo *IOBC*, sendo: 1 – Inócuo (<30%); 2 – Levemente nocivo (>30% e <79%); 3 – moderadamente nocivo (>79% e <99%) e 4 – Nocivo (>99%).

3.6 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk ($p < 0,05$), como os dados não atingiram a normalidade, os mesmos foram submetidos primeiro a transformação $\sqrt{x + 0,5}$ para adequação da normalidade, após adequação foi realizado Análise de Variância (ANOVA), e para a comparação das médias foi utilizado o teste Scott-Knott ($P > 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Compatibilidade de fungicidas químicos a nematoides entomopatogênicos

De maneira geral, a mortalidade dos juvenis infectantes (JIs) das espécies *Steinernema glaseri* CB01, *Steinernema brazilense* CB06 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB foi relativamente baixa quando expostos às caldas fungicidas.

No entanto, foi observado que as espécies de nematoides entomopatogênicos possuem respostas distintas às exposições prolongadas. A espécie *S. brazilense* CB06 apresentou uma maior mortalidade (6,05%) (Tabela 5) quando comparada a *S. glaseri* CB01 (5,07%) (Tabela 4) e *H. bacteriophora* HB (3,93%) (Tabela 6). Essa variação pode ser atribuída às diferenças intrínsecas entre as espécies, como a espessura da cutícula e a sensibilidade a componentes químicos (Rhode et al., 2013). Estudos anteriores indicam que as espécies do gênero *Heterorhabditis* tendem a ser mais tolerantes a condições ambientais adversas e à produtos químicos (Krishnayya; Grewal, 2010).

A exposição ao tratamento T9 - Unizeb Gold (Mancozebe) resultou em uma redução significativa na viabilidade dos JIs de *S. glaseri* CBO1 (5,07%) e *S. brazilense* CB06 (6,05%) após 240 minutos de exposição. Enquanto os tratamentos T3 - Frowncide 500 SC (Fluazinam), T5 - Approve (Tiofanato – metílico + Fluazinam) e T7 - Fusão EC (Metominostrobin + Tebuconazol) apresentaram mortalidade inferior a 2,60% dos JIs nas espécies de nematoides entomopatogênicos avaliadas.

A toxicidade de determinados produtos químicos e o tempo de exposição podem reduzir a eficiência dos nematoides. No presente estudo, a mortalidade dos JIs aumentou com o tempo de exposição, especialmente nos tratamentos com T2 - Sumilex 500WP (Promicidona) e T9 - Unizeb Gold (Mancozebe), reforçando a necessidade de reduzir o tempo de contato entre os nematoides e os produtos químicos. Nos primeiros 60 minutos do tempo de exposição dos JIs aos fungicidas, os juvenis de *S. glaseri* CB01 e *S. brazilense* CB06 não apresentaram mortalidade, enquanto *H. bacteriophora* HB mostrou mortalidade de JIs em sete dos nove tratamentos avaliados, já nos primeiros 30 minutos. Isso demonstra uma maior sensibilidade dos juvenis infectantes de *H. bacteriophora*, especialmente quando

exposto ao fungicida T2 - Sumilex 500WP (Promicidona), que resultou na maior taxa de mortalidade. A sensibilidade temporal deve ser considerada no momento da aplicação, principalmente em campo, uma vez que exposições curtas reduzem a mortalidade dos NEPs (Krishnayya; Grewal, 2010).

O desempenho dos nematoides entomopatogênicos juntamente com a sua combinação com produtos químicos pode ser altamente dependente da duração da exposição (Koppenhöfer; Grewal 2005). A capacidade de sobrevivência dos JIs em contato com produtos químicos pode ser atribuída à presença de uma dupla cutícula no juvenil infectante (J3), que proporciona proteção contra fatores bióticos e abióticos (Dolinski, 2006). Essa camada extra de proteção é um dos fatores que tornam os nematoides entomopatogênicos mais resistentes a condições adversas e a produtos químicos, tornando-os uma ferramenta valiosa no manejo integrado de pragas (MIP). A aplicação conjunta de nematoides e fungicidas deve ser realizada logo após a preparação da calda, a fim de minimizar o tempo de exposição dos JIs aos produtos químicos e garantir a máxima viabilidade e infectividade dos nematoides

Além disso, é importante ressaltar que diferentes cepas de nematoides podem apresentar variações de compatibilidade com os grupos químicos testados. No presente estudo, *S. glaseri* CB01 e *S. brazilense* CB06 apresentaram uma mortalidade maior que *H. bacteriophora* HB quando expostos pelo mesmo período, o que pode ser atribuído às diferenças na estrutura cuticular ou nas respostas fisiológicas das espécies (Rovesti; Deseo, 1990).

Tabela 4 – Porcentagem (%) de mortalidade de JIs de *Steinernema glaseri* CB01 avaliados aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos após exposição em calda fungicida.

Tratamento	Princípio ativo	Mortalidade (%)							
		30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
T1 - Testemunha inoculada	---	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
T2- Sumilex 500 WP	Promicidona	0,00a	0,00a	0,18a	0,00a	0,55a	0,75a	1,16a	4,05b
T3 - Frownicide 500 SC	Fluazinam	0,00a	0,00a	0,28a	0,00a	0,64a	2,14b	1,25a	1,28a
T4 - Cercobin 875 WG	Tiofanato – metílico	0,00a	0,00a	0,63a	0,00a	1,22a	1,88b	2,03a	3,25b
T5 - Approve	Tiofanato – metílico + Fluazinam	0,00a	0,00a	0,14a	0,00a	2,33a	0,25a	1,17a	1,61a
T6 - Absoluto Fix	Clorotalonil	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,49a	0,28a	2,30a	1,11a
T7 – Fusão EC	Metominostrobin a + Tebuconazol	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	2,54a	0,00a	0,86a	2,08a
T8 - Cerconil	Tiofanato metílico + Clorotalonil	0,00a	0,00a	0,30a	0,00a	1,41a	0,78a	1,77a	1,09a
T9 - Unizeb Gold	Mancozebe	0,00a	0,00a	0,63b	0,00a	2,56a	2,49b	1,13b	5,07b
F		-	-	2,21	-	0,89	2,07	0,38	2,28

Médias nas colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Porcentagem (%) de mortalidade de JIs de *Steinernema brazilense* CB06 avaliados aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos após exposição em calda fungicida.

Tratamento	Princípio ativo	Mortalidade (%)							
		30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
T1 - Testemunha inoculada	---	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
T2 - Sumilex 500 WP	Promicidona	0,00a	0,00a	0,56a	0,00a	1,30a	0,76a	1,59a	0,73a
T3 - Frownicide 500 SC	Fluazinam	0,00a	0,00a	0,63a	0,00a	1,70a	1,66b	1,55a	0,63a
T4 - Cercobin 875 WG	Tiofanato – metílico	0,00a	0,00a	0,63a	2,29b	0,90a	0,00a	1,41a	1,67a
T5 - Approve	Tiofanato – metílico + Fluazinam	0,00a	0,00a	2,48b	0,53a	1,32a	0,00a	0,27a	2,27a
T6 - Absoluto Fix	Clorotalonil	0,00a	0,00a	3,20b	0,12a	4,43a	0,40a	1,29a	1,09a
T7 - Fusão EC	Metominostrobina + Tebuconazol	0,00a	0,00a	0,28a	0,87a	0,89a	0,33a	0,72a	1,64a
T8 - Cerconil	Tiofanato metílico + Clorotalonil	0,00a	0,00a	0,29a	0,69a	3,21a	1,41b	0,64a	1,28a
T9 - Unizeb Gold	Mancozebe	0,00a	0,00a	0,40a	1,24b	1,84a	1,46b	2,33b	6,05b
F		-	-	2,01	2,41	1,25	1,95	1,25	2,21

Médias nas colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Porcentagem (%) de mortalidade de JIs de *Heterorhabditis bacteriophora* HB avaliados aos 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 minutos após exposição em calda fungicida.

Tratamento	Princípio ativo	Mortalidade (%)							
		30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
T1 - Testemunha inoculada	---	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
T2 - Sumilex 500 WP	Promicidona	0,79a	1,70b	2,20b	1,19a	1,19a	2,20b	1,80a	3,93b
T3 - Frowncide 500 SC	Fluazinam	0,13a	0,50a	1,22a	0,98a	1,70a	2,20b	1,10a	2,39b
T4 - Cercobin 875 Wg	Tiofanato – metílico	0,00a	0,13a	0,43a	0,97a	0,59a	0,87a	1,04a	1,28a
T5 - Approve	Tiofanato – metílico + Fluazinam	0,00a	0,00a	0,00a	0,62a	0,37a	0,40a	0,00a	0,48a
T6 - Absoluto Fix	Clorotalonil	0,12a	1,45b	1,08a	1,36a	1,00a	0,79a	0,86a	3,31b
T7 - Fusão EC	Metominostrobina + Tebuconazol	0,11a	0,40a	0,74a	0,65a	0,31a	0,81a	1,48a	2,21a
T8 - Cerconil	Tiofanato metílico + Clorotalonil	0,14a	1,10b	0,72a	1,73a	0,69a	0,89a	0,87a	0,90a
T9 - Unizeb Gold	Mancozebe	0,12a	0,98b	0,79a	0,78a	0,93a	1,37b	1,22a	0,94a
F		1,37	2,35	2,07	1,02	1,68	2,83	1,32	3,97

Médias nas colunas seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

4.2 Multiplicação e infectividade de nematoides entomopatogênicos em *Spodoptera frugiperda* após exposição em calda fungicida.

Houve mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em todos os tratamentos, quando inoculadas com a calda de pulverização contendo os juvenis infectantes em exposição durante 240 minutos. Devido à ausência de mortalidade no controle (testemunha absoluta) não foi necessário realizar o cálculo de mortalidade corrigida.

A multiplicação de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema glaseri* CB01, *Steinernema brazilense* CB06 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB após exposição de 240 minutos em calda fungicida estão representados na figuras 1, 2 e 3

respectivamente, já para efeito do fungicida (E%) de *Steinernema glaseri* , *Steinernema brazilense* CB06 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB após 240 minutos de contato com fungicidas químicos a lagartas de *Spodoptera frugiperda* estão representados na tabelas 7, 8 e 9 respectivamente.

Ambos os isolados de nematoides entomopatogênicos apresentaram redução no número de juvenis infectantes produzidos após 15 dias de armadilha de White (1927) adaptada, entretanto o isolado *S. brazilense* CB06 apresentou maior produção de JIs quando comparados a *S. glaseri* CB01 e *H. bacteriophora* HB. A multiplicação de juvenis infectantes na testemunha apresentou produção média de 1440 JIs, 1520 JIs e 1495 JIs para as espécies *Steinernema glaseri* CBO1, *Steinernema brazilense* CB06 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB respectivamente (Figuras 1, 2 e 3).

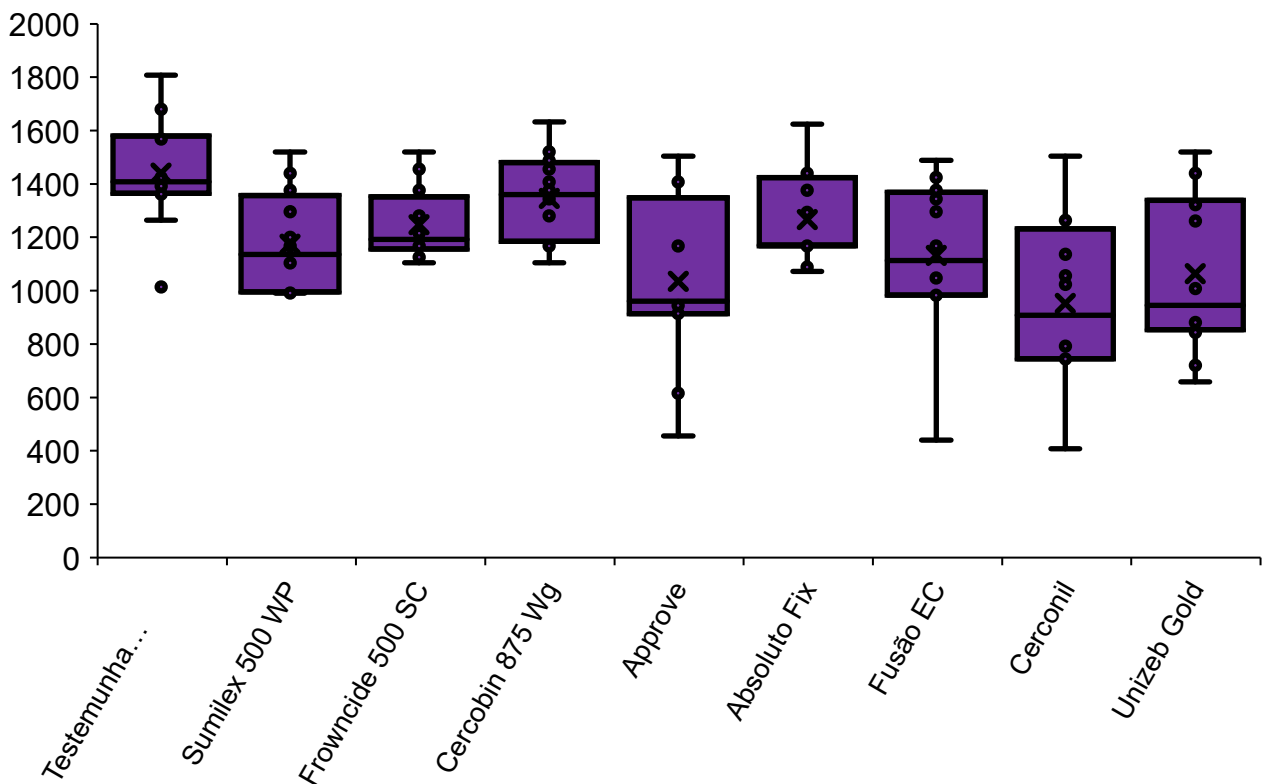
Isolados *Steinernema brazilense* IBCBn 06 e *Heterorhabditis HB* foram compatíveis com seis dos onze inseticidas avaliados para controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), entretanto *S. brazilense* IBCBn 06 apresentou menor número de produção de JIs em pupas (105 JIs) de *Ceratitis capitata* quando comparado com *H. bacteriophora* HB (1.047 JIs) ao serem aplicados em conjunto com o produto espinetorame considerado inócuo para ambos os isolados (Jean-Baptiste; De Brida; Bernardi *et al.*, 2021)

O protocolo IOBC sugere classificação na Eficiência de Mortalidade (E%) para inseticidas químicos, não havendo essa escala para fungicidas. Entretanto, durante a experimentação foi verificada diferenças estatísticas na produção de JIs em ambas as espécies de nematoides, apresentando diferenças de até 48% quando comparados a testemunha. Levando em conta os mesmos parâmetros de avaliações os fungicidas foram classificados seguindo os protocolos da IOBC, sendo classificados inócuo e levemente nocivo.

Para *Steinernema glaseri* CB01 os tratamentos T3 - Frowncide 500 SC (Fluazinam), T4 - Cercobin 875 WG (Tiofanato- metílico) e T6 - Absoluto Fix (Clorotalonil) reduziram a produção média de JIs em 13%, 6% e 12% quando comparados a produção média da testemunha (Figura 1), sendo classificados como inócuo conforme o protocolo IOBC. Em contrapartida, os tratamentos T5- Approve (Tiofanato – metílico + Fluazinam), T7 - Fusão EC (Metominostrobina + Tebuconazol), T8 - Cerconil (Tiofanato metílico + Clorotalonil) e T9 - Unizeb Gold (Mancozebe),

reduziram a produção de JIs de *S. glaseri* CB01 em 28%, 21%, 33% e 26% respectivamente quando comparados a produção média de JIs na testemunha inoculada (Figura 1). Além da redução no número de indivíduos, ambos os tratamentos reduziram a infectividade dos nematoides em 41,74%, 36,70%, 70,76% e 60,80% respectivamente sendo classificados como levemente nocivo (Tabela 7).

Figura 1 – Multiplicação de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema glaseri* CB01, após exposição de 240 minutos em caldas fungicidas a lagartas de *Spodoptera frugiperda*



Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Efeito dos fungicidas (E%) após 240 minutos de contato com *Steinernema glaseri* CB01 a lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamento	Mcorr%	Rinf%	Rfec%	E%	Classe IOBC
T1 - Testemunha inoculada	0	0	0	0	1 – Inócuo
T2 - Sumilex 500 WP	0	16,66	27,82	44,48	2 – Levemente nocivo
T3 - Frowncide 500 SC	0	0	14,87	14,87	1 – Inócuo
T4 - Cercobin 875 WG	0	8,33	13,69	22,02	1 – Inócuo
T5 - Approve	0	8,33	33,41	41,74	2 – Levemente nocivo
T6 - Absoluto Fix	0	0	14,60	14,60	1 – Inócuo
T7 - Fusão EC	0	8,33	28,37	36,70	2 – Levemente nocivo
T8 - Cerconil	0	24,99	45,77	70,76	2 – Levemente nocivo
T9 - Unizeb Gold	0	24,99	35,81	60,80	2 – Levemente nocivo

Mcorr% = mortalidade corrigida; Rinf% = redução na infecção; Rfec% = redução na produção; E% = efeito do fungicida.

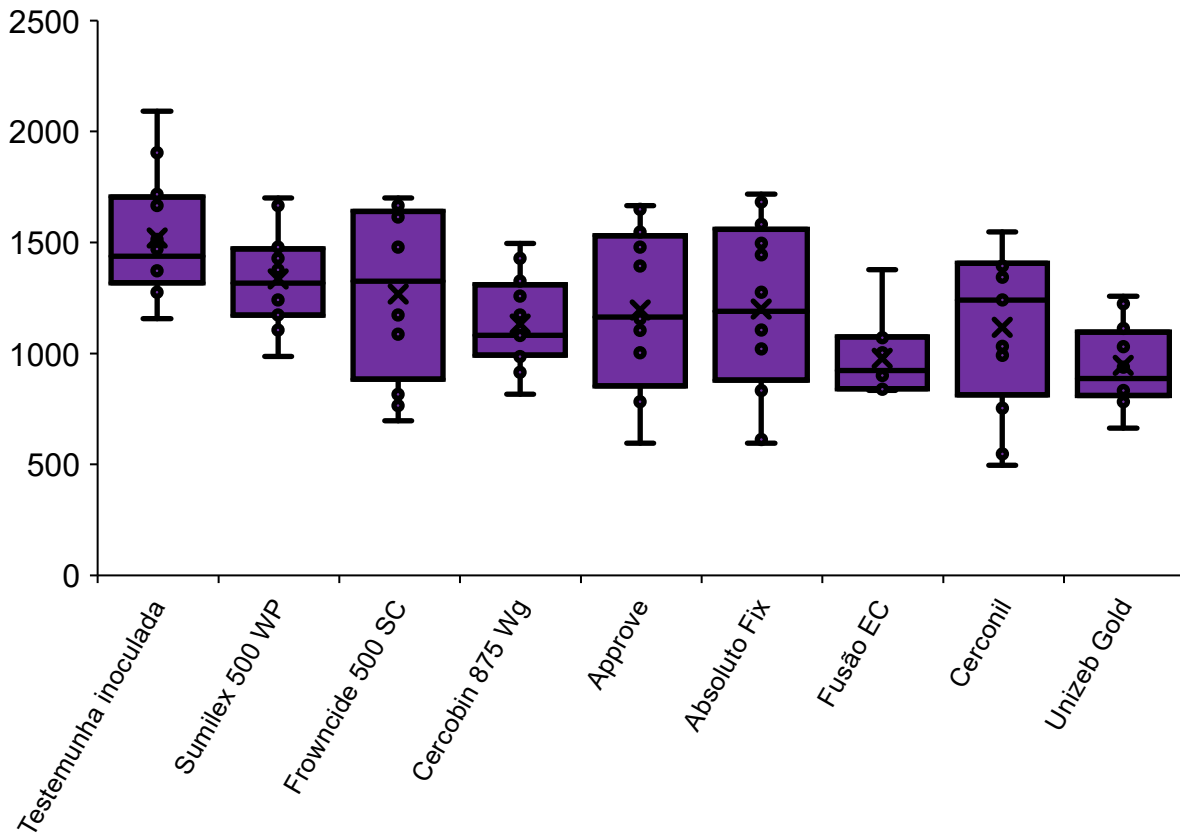
Para *Steinernema brazilense* CB06 o tratamento T2 - Sumilex 500 WP (Promicidona) foi o único tratamento em que a produção média dos JIs comparado a testemunha reduziu em 12%, os demais tratamentos apresentaram redução de 17% a 37% na produção média de nematoides quando comparados a testemunha.

Semelhante a *S. glaseri* CB01 os produtos T3 - Frowncide 500 SC (Fluazinam), T5 - Approve (Tiofanato – metílico + Fluazinam), T7 - Fusão EC (Metominostrobina + Tebuconazol), T8 - Cerconil (Tiofanato metílico + Clorotalonil) e T9 - Unizeb Gold (Mancozebe), reduziram a infectividade (%) em 42,21%, 45,72%, 61,51%, 40,50% e 65,84% respectivamente de *S. brazilense* CB06.

Entre as espécies do gênero *Steinernema*, *S. glaseri* CB01 apresentou menores índices (%) na redução de produção de juvenis infectantes e na infectividade quando comparados os mesmos parâmetros para *S. brazilense* CB06. Andaló Moino Junior, Santa – Cecília (2004) observaram que a espécie *S. glaseri* apresentou maior

resistência, produção e infectividade quando expostos a produtos fitossanitários quando comparadas com espécies do mesmo gênero.

Figura 2 – Multiplicação de juvenis infectantes (JIs) de *Steinernema brazilense* CB06, após exposição de 240 minutos em caldas fungicidas a lagartas de *Spodoptera frugiperda*



Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

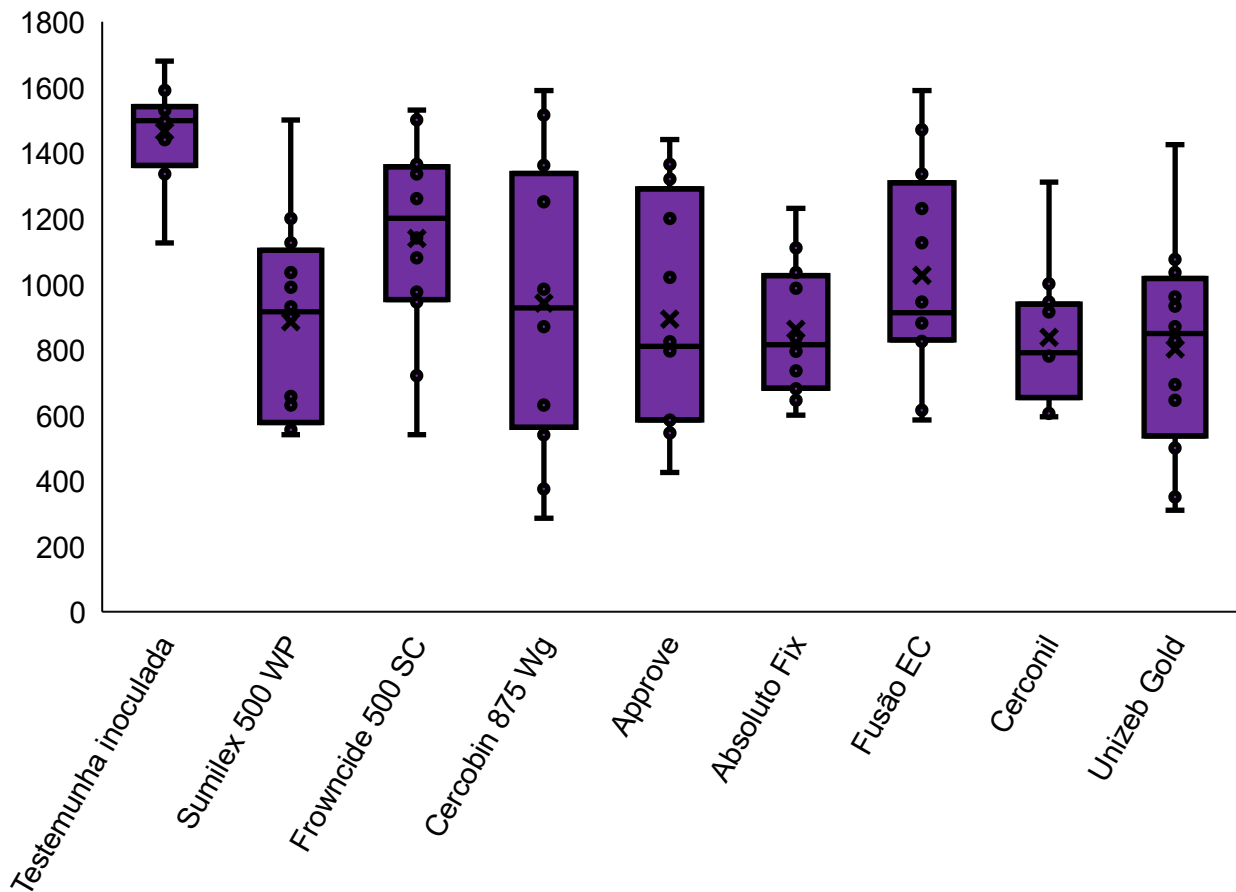
Tabela 8 – Efeito dos fungicidas (E%) após 240 minutos de contato com *Steinernema brazilense* CB06 a lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Tratamento	Mcorr%	Rinf%	Rfec%	E%	Classe IOBC
T1 - Testemunha inoculada	0	0	0	0	1 – Inócuo
T2 - Sumilex 500 WP	0	0	12,14	12,14	1 – Inócuo
T3 - Frowncide 500 SC	0	16,66	28,55	45,21	2 – Levemente nocivo
T4 - Cercobin 875 WG	0	0	28,91	28,91	1 – Inócuo
T5 - Approve	0	8,33	27,39	45,72	2 – Levemente nocivo
T6 - Absoluto Fix	0	0	21,09	21,09	1 – Inócuo
T7 - Fusão EC	0	16,66	44,85	61,51	2 – Levemente nocivo
T8 - Cerconil	0	8,33	32,17	40,50	2 – Levemente nocivo
T9 - Unizeb Gold	0	16,66	49,18	65,84	2 – Levemente nocivo

Mcorr% = mortalidade corrigida; Rinf% = redução na infecção; Rfec% = redução na produção; E% = efeito do fungicida.

Para *Heterorhabditis bacteriophora* HB, o tratamento T3 - Frowncide 500 SC (Fluazinam) foi o único tratamento em que a redução na produção de JIs esteve abaixo de 25%, além de ser o único produto químico classificado como inócuo no efeito do fungicida (E%) sobre os JIs. Os demais fungicidas químicos reduziram em mais de 40% a produção de JIs quando comparados a testemunha (Figura 3). Além da redução na produção de JIs o efeito do fungicida (E%) superior a 40% sendo ambos os tratamentos classificados como levemente nocivos segundo o protocolo IOBC (Tabela 9).

Figura 3 – Multiplicação de juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis bacteriophora* HB, após exposição de 240 minutos em caldas fungicidas a lagartas de *Spodoptera frugiperda*



Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

Tabela 9 – Efeito dos fungicidas (E%) após 240 minutos de contato com *Heterorhabditis bacteriophora* HB a lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamento	Mcorr%	Rinf%	Rfec%	E%	Classe IOBC
T1 - Testemunha inoculada	0	0	0	0	1 – Inócuo
T2 - Sumilex 500 WP	0	0	40,79	40,79	2 – Levemente nocivo
T3 - Frowncide 500 SC	0	0	23,82	23,82	1 – Inócuo
T4 - Cercobin 875 WG	0	8,33	41,85	50,18	2 – Levemente nocivo
T5 - Approve	0	8,33	44,89	53,22	2 – Levemente nocivo
T6 - Absoluto Fix	0	8,33	46,83	55,16	2 – Levemente nocivo
T7 - Fusão EC	0	16,67	41,13	57,79	2 – Levemente nocivo
T8 - Cerconil	0	16,67	47,84	64,53	2 – Levemente nocivo
T9 - Unizeb Gold	0	0	43,36	46,36	2 – Levemente nocivo

Mcorr% = mortalidade corrigida; Rinf% = redução na infecção; Rfec% = redução na produção; E% = efeito do fungicida.

No experimento de compatibilidade os isolados *S. glaseri* CB01, *S. brasilense* CB06 e *H. bacteriophora* apresentaram viabilidade de 93% JIs vivos quando expostos as caldas fitossanitárias, entretanto os oitos fungicidas reduziram a multiplicação de JIs resultando na diminuição da infectividade dos isolados.

De maneira semelhante, Dias, Brida, Jean-Baptiste *et al.*, (2024) observaram que os isolados *H. amazonensis* IBCBn 24 e *H. bacteriophora* HB apresentaram melhor viabilidade de JIs após 48 horas de exposição a inseticidas químicos além de apresentarem as melhores taxas (%) de infectividade entre os isolados, entretanto a redução na eficiência E% foi maior quando comparados com os isolados *S. carpocapsae* IBCBn 02 e *S. brasilense* IBCBn 06.

Segundo Laznik, Vidrih, Trdan (2012) mesmo após o contato com pesticidas químicos os JIs possam permanecer vivos, entretanto um produto químico ainda pode reduzir locomoção do nematoide, reduzir a atração pelo hospedeiro, diminuir a infectividade e reprodução. Essas informações corroboram com as observações de Andaló, Moino Junior, Santa – Cecília (2004), Negrison Junior *et al.*, (2010) onde verificaram que os nematoides compatíveis após o período de exposição com inseticidas químicos apresentaram redução significativamente na infectividade (%). Isto ocorre devido a capacidade de produtos químicos reduzirem a quantidade de lipídios presentes no intestino dos nematoides, diminuindo assim sua energia e capacidade de locomoção e infectividade (Sabino, Moino Junior, Andaló, 2014).

A aplicação NEPs para controle de pragas vem se tornando uma prática rotineira na agricultura moderna (Brida *et al.*, 2019), seu uso com produtos químicos garante economia de tempo e custo ao aplicador em programas de manejo integrado de pragas e doenças (MIPD) (Koppenhöfer, Grewal 2005). Com resultados obtidos nessa pesquisa, o uso de *S. glaseri* CB01, *S. brazilense* CB06 e *H. bacteriophora* HB sozinhos ou combinados com fungicidas químicos pode diminuir o uso de inseticidas químicos no controle de *Spodoptera frugiperda* em campo. Entretanto novos trabalhos em campo são necessários, a fim de comprovar os efeitos dos produtos aos nematoides entomopatogênicos, visto que em laboratório a exposição dos JIs ao produto são máximas, enquanto em campo diversos fatores (bióticos e abióticos) podem influenciar nas respostas.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que os nematoides entomopatogênicos *Steinernema glaseri* CB01, *Steinernema braziliense* CB06 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB apresentam compatibilidade com os fungicidas testados e são capazes de se efetuar o parasitismo em *Spodoptera frugiperda* após a exposição a esses produtos por 4 horas (240 minutos). A baixa taxa de mortalidade observada nos tratamentos com fungicidas aponta que esses produtos podem ser aplicados em conjunto com NEPs sem comprometer sua viabilidade e eficácia no controle biológico.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, n. 2, p. 265-266, 1925.
- ADAMS, B. J.; NGUYEN, B. Taxonomy, and systematics. *In*: Gaugler, R. (Ed). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI, p. 1-34, 2002.
- ALMENARA, D.P. *et al.* Nematoides Entomopatogênicos. *In*: INCTEM. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. INCTEM: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Brasília, cap.16, p. 1-40, 2012.
- AMIZADEH, M. *et al.* Interaction between the entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae* and select chemical insecticides for management of the tomato leafminer, *Tuta absoluta*. **Biocontrol**, v. 46, p. 709-721, 2019.
- ANDALÓ, V., *et al.* Avaliação de nematoides entomopatogênicos em condições de laboratório e casa-de-vegetação visando ao controle de *Spodoptera frugiperda*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1860-1866, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000151>. Acesso em: 10 mar. 2024.
- ANDALÓ, V., MOINO JUNIOR, A., SANTA-CECILIA, L.V.C., SOUZA, G.C. Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos para a cochonilha-da raiz do cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Instituto Biológico**, São Paulo, v.7, n.2, p.181-187, abr. 2004
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.
- BERNARDI, O.; *et al.* Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection**, v. 58, p. 33-40, 2014.
- BOEMARE, N. Biological and taxonomical diversity of entomopathogenic nematode-bacteria complexes. **Biological Control**, v. 25, n. 3, p. 217-227, 2002.
- BRENNER S.; WOOD, W. B (Ed.). The nematode *Caenorhabditis elegans*. **Cold Spring Harbor**, New York, USA, v. 1, p. 667, 1988.
- BRIDA, A. L. *et al.* Virulence of entomopathogenic nematode to pupae and adults of *Drosophila suzukii* in laboratory. **Revista Científica Rural**, Bagé – RS, v. 2, p. 126-48 138, 2019.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. **EMBRAPA-CNPMS**, Sete Lagoas, p. 45, 1995.
- CRUZ, I. Manejo da resistência de insetos-praga a inseticidas, com ênfase em *Spodoptera frugiperda* (Smith). **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, p. 15, 2002.
- DE BRIDA, A. L.; *et al.* Entomopathogenic nematodes in agricultural areas in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45-54, 2017.

- DE LEY, P. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny. In: WormBook (org) The *C. elegans* Research Community. California, USA, 2006. Disponível em: <https://www.wormbook.org/chapters/www.quicktourdiversity/quicktourdiversity.html>. Acesso em: mar. 2024.
- DE NARDO, E.; GREWAL, P. Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) with Pesticides and Plant Growth Regulators Used in Glasshouse Plant Production. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, p. 441-448, 2003.
- DEGRANDE, P. E.; MELO, E. P.; FERNANDES, M. G. Esporádica perigosa. **Cadeia Técnica Cultivar**, p. 3-6, 2005
- DEVI, G.; NATH, D. Entomopathogenic nematodes: A tool in biocontrol of insect pests of vegetables. **Agricultural Reviews**, v. 38, n. 2, 2017.
- DIAS, S. D. C.; DE BRIDA, A.L.; JEAN-BAPTISTE, M.C, *et al.* Compatibility of Entomopathogenic Nematodes with Chemical Insecticides for the Control of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Plants**, v. 13, p. 632, 2024.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000200016>. Acesso em: 23 jun. 2024.
- DIX, I.; *et al.* The identification of biological species in the genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) by cross breeding second Generation amphimictic adults. **Parasitology**, v. 104, p. 509- 518, 1992.
- DOLINSKI, C. Developing a research and extension program for control of the guava weevil in Brazil using entomopathogenic nematodes. **Journal of Nematology**, Piracicaba, v. 38, p. 270, 2006.
- DOWDS, B. V. A.; PETERS, A. Virulence mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**, CABI Publishing, New York, p. 79-98, 2002.
- EBERSON, B.; LEWIS, E.; MOORE, R. Production of entomopathogenic nematodes for biological control. **Journal of Nematology**, v. 22, n. 2, p. 281-287, 1990.
- EHLERS, R. U. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 623–633, 2001.
- EMELIANOFF, V.; *et al.* Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species. **Parasitology research**, v. 100, p. 657–659, 2007.
- FERNANDES, F. O.; ABREU, J. A.; CHRIST, L. M.; ROSA, A. P. S. A. Efficacy of Insecticides Against *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797). **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 1, p. 494-503, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5539/jas.v11n1p494>. Acesso em: 09 mar. 2024.
- FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides entomopatogênicos. In: Alves, S. B. **Controle microbiano de insetos**, FEALQ, Piracicaba, ed. 2, cap. 11, p. 541-67, 1998.
- FORST, S.; CLARKE, D. Bacteria-nematode symbiosis. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**, CABI Publishing New York, p. 57-77, 2002.

FORST, S.; DOWDS, B.; BOEMARE, N.; STACKEBRANDT, E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: Bugs that kill bugs. **Annual Review of Microbiology**, v. 51, p. 47–72, 1997.

FRIEDMAN, M. J. Commercial production and development of entomopathogenic nematode. In: POINAR, G.O. (Ed.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. CRC Press, Boca Raton, v. 35, n. 3, p. 477-485, 1990.

GALLO, D. *et al.* Entomologia agrícola. **FEALQ**, Piracicaba, 2002. Acesso em: 10 mai. 2024.

GARCÍA DEL PINO, F.; JOVÉ, M. Compatibility of entomopathogenic nematodes with fipronil. **Journal of helminthology**, v. 79, p. 333–337, 2005.

GARCIA, L. C.; RAETANO, C.G.; LEITE, L.G. Application technology for the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *Steinernema* sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 3, p. 305-311, mai, 2008.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GREWAL, P. S.; EHLERS, R. U. SHAPIRO-ILAN, D. I. Nematodes as Biological Control Agents. Wallingford UK: **CABI**, 2005.

GREWAL, P. S.; JAGDALE, G.B. Biology, and management of foliar nematodes. **The Hosta Journal**, Bolton, v. 32, p. 64-66, 2001.

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

GRIFFIN, C. T.; DOWNES, M.J.; BLOCK, W. Tests of Antarctic soils for insect parasitic nematodes. **Antarctic Science**, v. 3, p. 221-222, 1990.

HOMINICK, W. M.; *et al.* Entomopathogenic Nematodes: Biodiversity, Geographical Distribution, and the Convention on Biological Diversity. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 317–332, 1996.

HOMINICK, W.B. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. CAB International, Wallingford, p. 115-143, 2002.

JEAN-BAPTISTE, M. C.; BRIDA, A. L.; BERNARDI, D., *et al.* Effectiveness of Entomopathogenic Nematodes Against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Pupae and Nematode Compatibility with Chemical Insecticides, **Journal of Economic Entomology**, v. 114, cap. 1, p. 248–256, fev.2021.

KAPRANAS, A. *et al.* Efficacy of entomopathogenic nematodes for control of large pine weevil *Hylobius abietis*: effects of soil type, pest density and spatial distribution. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 2, p. 495-505, 2017.

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

- KAYA, H. K.; STOCK, S. P. Techniques in insect nematology. *In*: Lacey, L. A. (Ed). **Manual of Techniques in Insect Pathology**, Academic Press, San Diego, p. 281-324, 1997.
- KOPPENHÖFER, A. M.; GREWAL, P. S. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. *In*: GREWAL, P. S. **Nematodes as Biocontrol Agent**. CABI Publishing, p. 363-381, 2005.
- KRISHNAYYAAND, P. V.; GREWAL, P. S. Effect of Neem and selected fungicides on the viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, cap. 2, p. 259–266, 2010.
- LACEY, L. A.; GEORGIS, R. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology*, v. 44, p. 218-225, 2012.
- LACEY, L.A. *et al.* Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p.1-41, 2005.
- LAZNIK, Z.; TRDAN, S. Influence of herbicides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *International Journal of Pest Management*, v. 63, n.2, p. 105-111, 2017.
- LAZNIK, Z.; TRDAN, S. The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under laboratory conditions. **Pest Management Science**, v. 70, p. 784-789, 2014.
- LAZNIK, Z.; VIDRIH, M.; TRDAN, S. The effects of different fungicides on the viability of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. carpocapsae* Weiser, and *Heterorhabditis downesi* Stock, Griffin & Burnell (Nematoda: Rhabditida) under laboratory conditions. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, cap. 1, p. 62- 67, 2012.
- LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbot & Smith, 1797). **O Biológico**, v. 19, p. 105-113, 1953.
- LEITE, L. G. *et al.* Nematoides entomopatogênicos no controle de pragas. *In*: Pinto, A de S. *et al* (Org). **Controle biológico de pragas na prática**. ESALQ, Piracicaba, p. 45-54, 2006.
- LEWIS, E. E. *et al.* Trophic Relationships of Entomopathogenic Nematodes in Agricultural Habitats. **Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests**, p. 137-161, 2015.
- LEWIS, E. E.; *et al.* Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Maryland Heights, v. 38, p. 66-79, 2006.
- LUGINBILL, P. The fall armyworm. **Technical Bulletin**, v. 34, n. 138, p. 1-91, 1928.
- MAGNABOSCO, M. E. B. *et al.* Compatibilidade entre nematoides entomopatogênicos e produtos fitossanitários utilizados no tratamento de sementes de milho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6, p. 2487–2496, 2019. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/33789>. Acesso em: 9 mar. 2024.

- MOLINA, J.O.; LEZAMA, R. G.; LOPEZ, E. M. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Mexico. *Journal of Entomological Science*, v. 31, n. 1, p. 41-47, 1996
- MOORE, R.G.; HANKS, L.M. Aerial dispersal and host plant selection by neonate *Thyridopteryx ephemeraeformis* (Lepidoptera: Psychidae). **Ecological Entomology**, v. 29, p. 327-335, 2004.
- NAGESH, M.; HUSSAINI, S. S.; SINGH, S. P. Isolation, and characterization of symbiotic bacteria from *Heterorhabditis* spp. and *S. carpocapsae* Weiser. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**, v. 8, p. 38-42, 2002.
- NEGRISOLI, A. S., JR.; *et al.* Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. **Crop Protect.** v, 29, p. 545–549, 2010.
- OKUMA, D. M. *et al.* Large-Scale Monitoring of the Frequency of Ryanodine Receptor Target-Site Mutations Conferring Diamide Resistance in Brazilian Field Populations of Fall Armyworm, *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects**, v. 13, n. 7, p. 626-628, 2022.
- PETERS, A.; POULLOT, D. Side effects of surfactants and pesticides on entomopathogenic nematodes assessed using IOBC advanced guidelines. **IOBC/WPRS Bull**, v. 27, p. 67–72, 2004.
- PINTO, A. S.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N. Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos do milho e sorgo. **ESALQ/USP** Ribeirão Preto, p. 19-26, 2004.
- POGUE, G.M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Society of America**, v. 43, p. 202, 2002.
- POINAR, G.O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *In*: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, p. 23-61, 1990.
- POINAR, G.O.; Grewal P. S. History of entomopathogenic nematology. **Journal of Nematology**, v. 44, p. 153-161, 2012.
- POPIEL, I.; HOMINICK, W. M. Nematodes as biological control agents: part II. **Advances in Parasitology**, v. 31, p. 381-431, 1992.
- RADOVÁ, S. Effect of selected pesticides on the vitality and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). **Plant Protection Science**, Czech Academy of Agricultural Sciences, v. 46 n. 2, p 83-88, 2010.
- RODRIGUEIRO, T. S. C. *et al.* Eficiência de *Heterorhabditis indica* ibcb-n05 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no controle de *Alphitobius diaperinus* (coleóptera: tenebrionidae) sob comedouros de granja avícola. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 3, p. 279-284, 2008. Disponível em: SciELO - Brasil - EFICIÊNCIA DE <i>HETERORHABDITIS INDICA</i> IBCB-N05 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) NO CONTROLE DE <i>ALPHITOBIUS DIAPERINUS</i> (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) SOB COMEDOUROS DE GRANJA AVÍCOLA EFICIÊNCIA DE <i>HETERORHABDITIS INDICA</i> IBCB-N05 (RHABDITIDA:

HETERORHABDITIDAE) NO CONTROLE DE *ALPHITOBIUS DIAPERINUS* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) SOB COMEDOUROS DE GRANJA AVÍCOLA. Acesso em: mar. 2024

ROHDE, C.; *et al.* Compatibility of entomopathogenic nematodes and aqueous plant extracts aiming at the control of fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1033-1042, maio/jun, 2013.

ROVESTI, L.; DOSEO, K. V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes: *Steinernema carpocapsae* Weiser and *Steinernema feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematology**, v. 36, n. 2, p. 237-245, 1990.

SABINO, P. H. S.; MOINO JUNIOR, A.; ANDALÓ, V. Effects of some insecticides on the neutral lipid percentage, survival, and infectivity of *Steinernema carpocapsae* ALL and *Heterorhabditis amazonensis* JPM 4. **Nematoda**, v. 1, n.1, 2014.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GAUGLER, R. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 137–146, 2002.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOZZO, F. In vitro liquid culture of entomopathogenic nematodes: progress and obstacles. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 202–210, 2009.

SHAPIRO-ILAN, D.I., LEWIS, E.E., BEHLE, R.W., MCGUIRE, M.R., 2001. Formulation of entomopathogenic nematode-infected-cadavers. *Journal of invertebrate pathology*, v. 78, p. 17–23, 2001.

SIRJANI, F.O., LEWIS, E.E., & KAYA, H.K. Evaluation of entomopathogenic nematodes against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 48, p. 274-280, 2009.

SUNDARABABU, R.; SANKARANARAYANAN, C. Biological control of insects using nematodes. *In*: Trivedi, P. C. (Ed). **Recent advances in plant nematology**. CBS Publishers and Distributors, New Delhi, p. 153-170, 1998.

VALICENTE, F. H. Manejo Integrado de Pragas na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, p. 13, 2015.

VALICENTE, F.; TUELHER, E. S. Controle biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* com *Baculovirus*. **EMBRAPA/CNPMS**, Sete Lagoas, v. 114, 2009.

VOSS, M. et al. Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos. **Embrapa Trigo**: Passo Fundo, 2009.

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

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of biology and techniques. **Southern cooperative series bulletin**, Arkansas, v. 331, p. 30, 1988.

ZUCHHI, R.S.; SILVEIRA NETO, S. S.; NAKANO, O. Guia de Identificação de pragas agrícolas, **FEALQ**, Piracicaba, 1993.