

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

**CONTROLE DE *Sphenophorus levis* E *Conotrachelus humeropictus*
PELO USO COMBINADO DE NEMATOIDES E FUNGOS
ENTOMOPATOGENICOS**

LUCAS DETOGNI SIMI

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp -
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Outubro – 2014

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

**CONTROLE DE *Sphenophorus levis* E *Conotrachelus humeropictus*
PELO USO COMBINADO DE NEMATOIDES E FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS**

LUCAS DETOGNI SIMI

Orientador: Prof. Dr. Antonio Batista Filho

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp -
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia
(Proteção de Plantas)

BOTUCATU-SP
Outubro – 2014

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

S591c Simi, Lucas Detogni, 1984-
Controle de *Sphenophorus levis* e *Conotrachelus humeropictus* e pelo uso combinado de nematoides e fungos entomopatogênicos / Lucas Detogni Simi. - Botucatu : [s.n.], 2014
xiii, 107 f. : ils. color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2014
Orientador: Antonio Batista Filho
Inclui bibliografia

1. Pragas - Controle biológico. 2. Bicudo da cana-de-açúcar. 3. Fungos. 4. Nematoides entomopatogênicos. I. Batista Filho, Antonio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “CONTROLE DE *Sphenophorus levis* E *Conotrachelus humeropictus* PELO
USO COMBINADO DE NEMATÓIDES E FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS”

ALUNO: LUCAS DETOGNI SIMI

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTONIO BATISTA FILHO

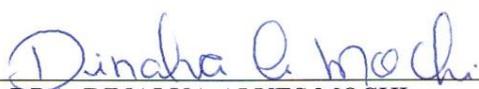
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. ANTONIO BATISTA FILHO



PROF. DR. LUIS GARRIGÓS LEITE



PROFA. DRA. DINALVA ALVES MOCHI



PROFA. DRA. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN



PROFA. DRA. REGIANE CRISTINA O. DE FREITAS BUENO

Data da Realização: 30 de outubro de 2014.

BIOGRAFIA DO AUTOR

LUCAS DETOGNI SIMI – Filho de Agostinho Simi e Zaira Isabel Detogni, nascido no município de Jaboticabal-SP, em 17 de agosto de 1984. Biólogo, graduado pelo Centro Universitário Barão de Mauá em Janeiro de 2006. Obteve o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária pela UNESP- Câmpus de Jaboticabal no ano de 2010, sendo bolsista da CAPES. Possui publicações na área de plantas daninhas e controle biológico de pragas, participou de diversos eventos nacionais e internacionais sobre controle biológico. Foi participante do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), residindo na Noruega e realizando trabalhos envolvendo o uso combinado de fungos e nematoides entomopatogênicos no “Norwegian Center for Agricultural and Environmental Research” (Bioforsk). Atualmente é estudante de Doutorado em Proteção de Plantas pela Faculdade de Ciências Agrônômicas/UNESP – Câmpus de Botucatu.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin
(1889-1977)

Aos meus pais, dedico.

À minha família, ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade e por ter sempre me dado o necessário para concluir o meu trabalho.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Antonio Batista Filho, pela oportunidade de cursar meu doutorado, por toda a estrutura oferecida para o meu trabalho ser realizado no Instituto Biológico, e por todos os ensinamentos, experiência e ajuda, que muitas vezes nem sabemos que estamos sendo auxiliados. Muito Obrigado!

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Luís Garrigós Leite, por todos os ensinamentos que levarei para a vida toda, pela ajuda sempre oportuna e necessária, e pela presença em cada um dos trabalhos realizados. Agradeço de coração, por me guiar para o caminho que às vezes, eu mesmo não acreditava estar certo. Foi uma experiência muito grande ter trabalhado ao seu lado.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr. Antonio Batista Filho, Prof. Dr. Luís Garrigós Leite, Prof^a. Dr^a. Dinalva Mochi, Prof^a. Dr^a. Silvia Renata Siciliano Wilcken, Prof^a. Dr^a. Regiane Cristina de Oliveira F. Bueno. Obrigado pelas correções e sugestões, e por fazerem este trabalho muito melhor.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, que possibilitaram, no aprendizado ou na prestação de serviços, a realização desse trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca do Lageado, Maria Lúcia e Máisa Coelho França, pelas correções e dedicação com meu trabalho.

Aos funcionários do Instituto Biológico, Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, Dr^a. Harumi Hojo, Dr. Valmir Antonio Costa, Estela, Valdemir, e tantos outros que possibilitaram esse trabalho ser concluído.

Aos funcionários da empresa Bio Controle, Métodos de Controle de Pragas Ltda., pelo fornecimento dos NEPs e pela boa vontade em sempre ajudar em nossos trabalhos.

Aos funcionários das Usinas Iracema, Usina São Luiz, Usina Maluf, Centro de Tecnologia Canavieira, pelo material e área cedidos para os experimentos.

Aos pesquisadores da CEPLAC e EMBRAPA RONDÔNIA, Onzeno Trevisan, José N. M. Costa e Leandro E. Oliveira, pela oportunidade de trabalharmos juntos, e por ceder a área para os experimentos.

Agradeço aos meus pais Agostinho Simi e Zaira Isabel Detogni, ao meu padrasto Waldir Gazeta e minha madrasta Dirce Barone. Essa tese foi concluída graças ao apoio e suor de vocês, pois eu não conseguiria sozinho. Muito obrigado por todo o apoio, carinho, paciência, determinação, e inspiração.

Aos meus irmãos Felipe Detogni Simi e Matheus Detogni Simi, e irmãos de coração Daniel Barone e Tânia Barone, pela amizade, companheirismo e carinho.

A toda minha família, minha avó Geni, meu avô Victorio (*in memoriam*), meus tios e tias, Ana Érica e Mozar, João Carlos e Márcia, Cristina, Alexandre e Cláudia, Zeca e Tereza (*in memoriam*), Angélica, Luzia e Antonio, e meus primos Tiago, Monize, Mellize, Jane, Adriana, Camila, Ricardo, Rodrigo, Paulinho, Katia, e a todos os meus familiares e entes queridos, meu muito obrigado.

À minha namorada, Bruna Mendonça, por todo o amor que tem por mim, por dividir os momentos felizes, por me apoiar nos piores momentos, por suportar nossa distância enquanto estive na Noruega, e mesmo de tão longe conseguir ser meu porto seguro. Eu só consegui por causa de ti, e de toda a força que você me deu. Muito obrigado por tanto carinho e amor sem fim, que parte desse seu coração. Muito Obrigado!

Ao Roberto, Laura e Tatiani Mendonça, por sempre me receber de braços abertos, e me acolher como filho, aconselhar nas horas boas e ruins, agradeço de coração.

À Roselaine Nunes da Silva Bueno, agradeço em especial, pelo companheirismo, paciência, ajuda e conselhos. Além do seu profissionalismo, sua amizade foi essencial e muito importante pra mim, e eu serei eternamente grato.

Aos amigos do Laboratório de Controle Biológico, Advaldo Francisco Barreto, Aline Maria Belasco de Almeida, Ana Beatriz Monteiro, Ana Paula Ferreira Pinto, Ana Paula dos Santos Barthels, Daysi Andrade Pena, Fabio Silver Schmidt, Fernanda Polastre Pereira, Juliana Magrinelli Onório Rosa, Julie Orozco, Lucas Berozzi, Mariana Garcia Martinez-Silva, Mário Kokubu, Natália Peixoto Calderari, Patrícia Ballone, Renata Marraschi, Rodrigo Santini Ferraz, Roselaine Nunes da Silva Bueno e Tatiane Pietrobon. Muito obrigado pelo companheirismo, pelas risadas, pela ajuda técnica e emocional, por compartilharmos os momentos tristes e felizes, os sucessos e frustrações, que nos deparamos no dia a dia da pesquisa. Vocês foram muito especiais para mim, e fizeram parte dessa conquista.

Aos meninos e sempre presentes membros honorários da República Casa Branca, meus queridos amigos, Mário Piazon Neto (Fanho), Javer Alves, Leonardo Gueli Miranda (Da Roça), Vítor Surian Gamba (Grilo), Alex Shinohara (Zeitona), Guilherme Rocha (Pakitão), Tadeo Rodriguez (Caracas), Elise Murakami, e Jessica Yoshida. Foi uma experiência inesquecível morar com vocês. Muito obrigado por me acolherem, por se tornarem amigos de verdade, que levarei com muito carinho por toda a minha vida.

Aos amigos da Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, que sempre foram muito solidários solícitos e muito queridos por mim, Regiane Iost, Adriana Gábia, Natalia Corniani, Maria Angélica Szymanski (Goró), Lilian Favare, Luana Herreira (Islô), Matheus Zorzeto Ferreira (Peixe-boi), Diego Scalossi Voltan (Verme), José Paulo Gonçalves, Lucivane Gonçalves, Juan Fernan Sierra, Joyce Helena Modesto, Letícia Moraes, Marcelo Soman, Rosilaine Araldi, Julio Cesar, Luiz Eduardo Pannuti, Elaine Ferrari de Brito, Andressa de Brida e Milena Leite.

Aos meus amigos, Flavia Renata Abe, Bruno Belesso, Camila Calliman, Fábio Silber Schmidt, Hilly Toratti, Amanda Valente, Renan Lopes, Igaro de Lima, Victor de Paula, Marcos Valério Garcia, Marielle Vieira, Shelvio Soares, Carolina Curi, Caio Curi, Pedro Martins, Patricia

Fumiko, Mariana Ortega, Luise B. Iazeta, Letícia Guadanhin, Rodrigo Drubi, Julia Ferreira Menezes, Camila Ferreira Menezes, Fernanda Mangolini e Catarina Horta. De alguns nos aproximamos, de outros nos afastamos, devido à distância ou pela correria, mas sempre se reconhece uma amizade sincera, e o apoio sincero de um amigo que nunca precisa de formalidades. Agradeço muito pela ajuda de vocês.

To researchers and workers from Bioforsk, Plant Health Division, Solveig Haukeland, Nina Trandem, Klingen Ingeborg, thanks for my internship opportunity, and the opportunity to work beside you. Thanks for all the hospitality and caring. Because of you, Norway will be in my heart forever.

Thanks to all Bioforsk staff, and to Sara Andrea Brunn, Karin Westrum, Maria Bjökman, Richard Meadow, Annette Folkedal, Anette Sundbye, Cecilie Sletteng, Stine Jacobsen, Sverre Storberget, thanks for the efficiency, friendship, and goodwill to help me.

Thanks to my housemates in Norway, Tommy Haugen, Synnøve Brændø Juvik, Camilla Helgerud, Marie Konstad and Sijie Kristiansen. Thanks for your patience in helping me, for all the learning about Norway, for your friendship and solidarity. You will be forever in my heart.

Thanks to the grower, Per Frederik Saxebøl, for providing the area for my experiment in Norway, and for let me eat as many strawberries I could.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO	1
2. SUMMARY	3
3. INTRODUÇÃO	5
4. REVISÃO DE LITERATURA	8
4.1 O bicudo-da-cana-de-açúcar, <i>Sphenophorus levis</i>	8
4.1.1 A importância da cana-de-açúcar no Brasil	8
4.1.2 Biologia	10
4.1.3 Danos.....	12
4.1.4 Monitoramento	13
4.1.5 Controle.....	13
4.2 A broca do cupuaçu, <i>Conotrachelus humeropictus</i>	16
4.2.1 A importância da cultura do cupuaçu.	16
4.2.2 Biologia	17
4.2.3 Danos.....	19
4.2.4 Controle.....	19
4.3 O Controle Biológico de pragas	20
4.4 Nematoides entomopatogênicos	21
4.5 Fungos entomopatogênicos	22
4.6 O Uso combinado de fungos e nematoides entomopatogênicos	22
5. REFERÊNCIAS	24

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I: CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Sphenophorus levis</i> (COLEOPTERA: DRYOPHTHORIDAE) POR MEIO DO USO COMBINADO DE FUNGOS E NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS.....	29
1. RESUMO.....	30
2. INTRODUÇÃO.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Seleção de isolados dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> para controle de adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	35
4.2 Produção de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio sólido.....	39
4.3 Uso combinado contra larvas de <i>Sphenophorus levis</i>	39
4.3.1 Obtenção de larvas de <i>Sphenophorus levis</i>	39
4.3.2 Fungo entomopatogênico.....	40
4.3.3 Nematóide entomopatogênico.....	40
4.3.4 Instalação e avaliação do experimento.....	40
4.3.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	42
4.4 Uso combinado contra adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	42
4.4.1 Obtenção dos insetos adultos.....	43
4.4.2 Fungos entomopatogênicos.....	43
4.4.3 Nematóide entomopatogênico.....	43
4.4.4 Instalação e avaliação do experimento.....	44
4.4.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	44
4.5 Experimentos de campo.....	45
4.5.1 Avaliação da presença de nematoides e fungos nativos.....	47
4.5.2 Avaliações de mortalidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i> em amostras de solo.....	47
4.5.3 Avaliação da infestação de larvas de <i>Sphenophorus levis</i> no rizoma da cana-de-açúcar.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Seleção de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> para controle de adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	49
5.2 Produção conídios de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio sólido.....	54

SUMÁRIO

	Página
5.3 Uso combinado de fungos entomopatogênicos com o nematoide <i>Steinernema brazilense</i> contra larvas de <i>Sphenophorus levis</i>	57
5.4 Uso combinado de fungos entomopatogênicos com o nematoide <i>Steinernema brazilense</i> contra adultos de <i>Sphenophorus levis</i>	61
5.5 Experimentos de campo	66
5.5.1 Avaliação da presença de nematoides e fungos nativos	66
5.5.2 Avaliações de mortalidade de larvas de <i>Galleria mellonella</i> em amostras de solo	66
5.5.3 Avaliação da infestação de larvas de <i>Sphenophorus levis</i> no rizoma da cana-de-açúcar.....	70
6. CONCLUSÃO	73
7. REFERÊNCIAS.....	74
CAPÍTULO II: CONTROLE DE <i>Conotrachelus humeropictus</i> PELA MISTURA DO NEMATOIDE <i>Steinernema brazilense</i> COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO <i>Beauveria bassiana</i>	
1. RESUMO	85
2. INTRODUÇÃO	86
3. OBJETIVOS	89
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	89
4.1 Seleção de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> para <i>Conotrachelus psidii</i>	89
4.2 Carreamento de conídios no solo.....	91
4.3 Efeito de combinações entre <i>Steinernema brazilense</i> e <i>Beauveria bassiana</i> na mortalidade de <i>Conotrachelus humeropictus</i>	93
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	94
5.1 Seleção de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> para <i>Conotrachelus psidii</i>	94
5.2 Carreamento de conídios do fungo no solo.....	95
5.3 Efeito de combinações entre <i>Steinernema brazilense</i> e <i>Beauveria bassiana</i> na mortalidade de <i>Conotrachelus humeropictus</i>	100
6. CONCLUSÕES.....	104
7. REFERÊNCIAS.....	104

1. RESUMO

O presente trabalho avaliou o uso combinado de fungos e nematoides entomopatogênicos contra o bicudo-da-cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, e contra a broca do cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus*. Contra *S. levis*, foi feita seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em adultos da praga, e testes de uso combinado em laboratório contra as fases de larva e adulto. Em campo, em área de cana-de-açúcar infestada naturalmente com *S. levis*, foram realizados 5 tratamentos (nematoide *Steinernema brazilense*, Bio NEP[®]; fungo *B. bassiana*; combinação nematoide + fungo; inseticida químico Regent Duo[®] e testemunha) foi avaliada a infestação de larvas de *S. levis* nas soqueiras de cana-de-açúcar, antes e após um ano da aplicação. Para verificação do tipo de interação, foram coletadas amostras de solo em 3 tempos. Na pré-aplicação, após uma semana e um mês da aplicação, e avaliada a mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* expostas às amostras de solo. Nos experimentos com *C. humeropictus*, foi feita seleção de isolados de *B. bassiana* em larvas de *Conotrachelus psidii*, usado como inseto teste. Os experimentos de campo avaliou-se a combinação de *B. bassiana* e *S. brazilense*, contra a larva de *C. humeropictus*. Também foi avaliada a capacidade do nematoide *S. brazilense* de carrear conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* em solo arenoso. No resultado obtido na seleção de isolados de fungos para *S. levis*, IBCB 170 de *B. bassiana* e IBCB 383 de *M. anisopliae* foram os mais eficientes, promovendo 80% e 72% de mortalidade, respectivamente. No ensaio contra larva de *S. levis*, observou-se efeito aditivo na mistura de *S. brazilense* com *B. bassiana*, promovendo 80% de mortalidade. No ensaio contra adultos, o

melhor tratamento foi *B. bassiana* + *S. brazilense*, que promoveu 40% de mortalidade, demonstrando interação aditiva. Nos experimentos de campo, a infestação de larvas de *S. levis* na soqueira de cana-de-açúcar foi reduzida com todos os tratamentos, com exceção da testemunha. A avaliação da interação de mortalidade de *G. mellonella* expostas a solos tratados em campo mostrou sinergismo uma semana após aplicação, e efeito aditivo um mês após aplicação, no tratamento com *S. brazilense* + *B. bassiana*. Esse tratamento de combinação foi mais eficiente, com diferença significativa dos agentes aplicados isoladamente. Na seleção de isolados de *B. bassiana* para *C. psidii*, os isolados IBCB 276 e IBCB 165 foram os mais promissores, com 86 e 84% de mortalidade confirmada, respectivamente. O isolado IBCB 276 foi produzido em arroz e aplicado em campo para controle de *C. humeropictus*. Nos ensaios de campo contra larvas de *C. humeropictus*, o nematoide e o fungo demonstraram-se patogênicos. O uso combinado demonstrou efeito aditivo, causando 65,6% de mortalidade na maior concentração. No estudo de carreamento de conídios, confirmou-se que o nematoide *S. brazilense* é capaz de carrear conídios de *B. bassiana* para camadas mais profundas do solo. O mesmo não foi observado com *M. anisopliae*.

Palavras-chave: Controle biológico, *Steinernema brazilense*, Broca-do-cupuaçu, Bicudo-da-cana-de-açúcar.

CONTROL OF *SPHENOPHORUS LEVIS* AND *CONOTRACHELUS HUMEROPICTUS* BY COMBINED USE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES. Botucatu, 2014. 117p.

Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LUCAS DETOGNI SIMI

Adviser: ANTONIO BATISTA FILHO

2. SUMMARY

This study evaluated the combined use of entomopathogenic fungi and nematodes against the sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*, and against the cupuaçu fruit borer, *Conotrachelus humeropictus*. To *S. levis*, we made a strain selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adults, and a testing of combined use in laboratory in larvae and adults of the pest. In field experiments, were applied the treatments: 1) nematode *Steinernema brazilense* (Bio NEP[®]); *B. bassiana*; *S. brazilense* + *B. bassiana*; chemical treatment with Regent Duo[®]; and control treatment. We evaluated the infestation of *S. levis* larvae in sugarcane ratoon, before and after one year of the application. To evaluate interactions between agents, soil samplings were performed one week, and one month after application, and evaluated the mortality of *Galleria mellonella* larvae exposed to these soil samples. To *C. humeropictus*, a strain selection of *B. bassiana* was made on larvae of *Conotrachelus psidii* (used as preliminary test), and field experiments using *B. bassiana* and *S. brazilense* against larvae of *C. humeropictus*. We also evaluated the ability of the nematode *S. brazilense* carrying conidia of *B. bassiana* and *M. anisopliae* in sandy soil. The results of strain selection to *S. levis*, *B. bassiana* IBCB 170 and *M. anisopliae* IBCB 383 were the most efficient, providing 80% and 72% of mortality, respectively. In tests against larvae of *S. levis*, additive effect was observed in the treatment *S. brazilense* + *B. bassiana*, providing 80% mortality. Against adults of *S. levis*, the best treatment was *B. bassiana* + *S. brazilense*, causing 40% of mortality, showing additive interaction. In the field experiments, the infestation *S. levis* larvae in sugarcane ratoon was reduced by all treatments, except for control. The assessment of mortality of *G. mellonella* exposed to soils samples showed synergistic and additive effects, one week and one month after application, respectively. The

combined use of *S. brazilense* + *B. bassiana* was the best treatment in the two time periods evaluated, differing significantly from agents applied alone. In the strain selection of *B. bassiana* to *C. psidii*, *B. bassiana* IBCB 276 and IBCB 165 were the most promising, with 86 and 84% of confirmed mortality, respectively. The study of carrying of conidia confirmed that the nematode *S. brazilense* can carry *B. bassiana* conidia down the soil layers. The same was not observed with *M. anisopliae*. In field trials against larvae of *C. humeropictus*, the nematode and the fungus were pathogenic. The combined use of *S. brazilense* + *B. bassiana* showed additive effect, which reached 65.6% of mortality at the highest concentration used.

Key words: Biological control, *Steinernema brazilense*, cupuaçu fruit borer, sugarcane weevil.

3. INTRODUÇÃO

O controle biológico de pragas na agricultura tem tido grande destaque nos últimos anos, como alternativa aos métodos de controle tradicionais, responsáveis por grandes problemas, como a resistência de pragas, contaminação do ambiente, prejuízos a insetos polinizadores, intoxicação do homem e de animais (ALVES, 1998; SÁNCHEZ-BAYO et al., 2013; PETTIS et al., 2013).

Os métodos de controle biológico são um componente do Manejo Integrado de Pragas (MIP), ao lado de outras medidas de controle de insetos e ácaros. É o alicerce de programas modernos de controle, juntamente com outras táticas como amostragem, definição do nível de controle e taxonomia (GALLO et al., 2002).

No Brasil, o uso de controle biológico estende-se a várias culturas, com destaque à cana-de-açúcar, no controle da broca-da-cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Ocorre também na mesma cultura o programa no controle das cigarrinha-da-folha da cana-de-açúcar, *Mahanarva posticata* (Stål, 1855) (Hemiptera: Cercopidae), e da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), com *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin

(ALVES et al., 2008). Todavia, o Brasil apresenta um grande potencial para o uso do controle biológico, com demanda para estabelecimento de programas de controle, para outras pragas e diversas culturas.

O bicudo ou gorgulho-da-cana-de-açúcar, *S. levis*, é a praga de solo mais importante e prejudicial à cultura no estado de São Paulo. As larvas desse inseto destroem o rizoma da planta, causando prejuízos da ordem de 30 toneladas de cana por hectare, além de reduzir a longevidade do canavial (LEITE et al., 2006). Estratégias para incrementar o controle dessa praga devem ser avaliadas, como métodos de aplicação, e novas abordagens na aplicação de agentes de controle.

Na cultura do cupuaçu, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) e cacau *T. cacao* (Linnaeus, 1758), uma praga de grande importância é a broca-do-cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus* (Fiedler, 1940) (Coleoptera: Dryophthoridae). Essa praga ocorre na Região Amazônica, particularmente nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Mato Grosso e, no Estado do Pará na região de Santarém embora, MENDES (1997). As perdas ocasionadas pelo inseto podem chegar a 50% da produção (LAKER; TREVISAN, 1992).

Há um crescente interesse do mercado em agricultura sustentável, e no manejo integrado de pragas. É crescente número de trabalhos que apresentam eficientes medidas de controle alternativas para o controle de pragas, menos agressivas ao meio ambiente e à saúde humana. O controle biológico destaca-se, através do uso de fungos, nematoides, e bactérias entomopatogênicas, bem como parasitoides e predadores (GALLO et al. 2002).

Os fungos entomopatogênicos são agentes causais de doenças de inúmeros artrópodes e apresentam uma grande importância na regulação natural de populações de insetos e ácaros pragas (MASCARIN; PAULI, 2010). Agem por contato com o corpo do hospedeiro, penetrando ativamente na cutícula através de enzimas, e colonizando o corpo do inseto, levando-o a morte em poucos dias (ALVES, 1998).

Os nematoides entomopatogênicos (NEPs) mais utilizados no campo do controle biológico dão pertencentes às famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae.

Possuem bactérias simbiontes, dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, responsáveis pela morte do hospedeiro. Possuem um estágio livre, o juvenil de terceiro estágio, ou juvenil infectivo ou infectante (JI). O JI penetra no inseto através de aberturas naturais (como abertura oral, anal ou espiráculos), ou ainda pelo seu tegumento. Em seguida, libera a bactéria no interior do inseto, onde esta se multiplica e digere a hemolinfa. O NEP alimenta-se da bactéria e dos tecidos digeridos. O NEP se reproduz e após algumas gerações, novos JI são formados e deixam o cadáver em busca de novos hospedeiros (KAYA; GAUGLER, 1993; POINAR JR., 1972).

Há evidências de que o uso combinado entre dois entomopatógenos pode incrementar a eficiência dos agentes no controle biológico de pragas, pois a mortalidade do inseto alvo tem sido maior que a resultante pelo uso dos agentes aplicados isoladamente (BARBERCHECK; KAYA, 1990). O presente trabalho envolve a combinação do uso de fungos e nematoide entomopatogênicos para controle de *S. levis* e *C. humeropictus*.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O bicudo-da-cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*

4.1.1 A importância da cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta que cresce em todo o mundo em regiões entre 22° N e S do Equador, pertence à família *Poaceae* junto com os gêneros *Zea* e *Sorghum*. Seis espécies de *Saccharum* são reconhecidas: *Saccharum officinarum* Linnaeus 1753, *Saccharum sinense* Roxb., *Saccharum barberi* Jesw., *Saccharum eduli* Hassk., *Saccharum spontaneum* Linnaeus, e *Saccharum robustum* Brandes; Jew Ex Grassl. O centro de origem está localizado nas regiões leste da Indonésia e da Nova Guiné (DANIELS; ROACH, 1987; MARTINS, 2004).

A importância da cana de açúcar pode ser atribuída a sua múltipla utilização, podendo ser empregada sob a forma de forragem para alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de açúcar, álcool, rapadura, melado e aguardente. Atualmente, a principal destinação da cana-de-açúcar cultivada no Brasil e a fabricação de açúcar e álcool (etanol), sendo no setor sucro-alcooleiro a principal parte do agronegócio brasileiro, além de ser referência para os demais países produtores de açúcar e álcool (BRASIL, 2007). A cana-de-açúcar (*S. officinarum*) é considerada como opção promissora para produção de

biocombustíveis e energia de origem renovável, o cultivo no Brasil ocorre em uma área estimada de 8.779,1 mil hectares (CONAB, 2013).

O Brasil é o principal exportador de etanol, e segundo CONAB (2013) a produção de etanol total foi de 23,64 bilhões de litros na safra 2012/13 e é estimada em 27,17 bilhões de litros para 2013/14. Essa produção de etanol concentra-se na região Centro-Oeste e Sudeste com cerca de 91,0% do total produzido, principalmente no estado de São Paulo com mais de 50% da produção nacional (Figura 1).

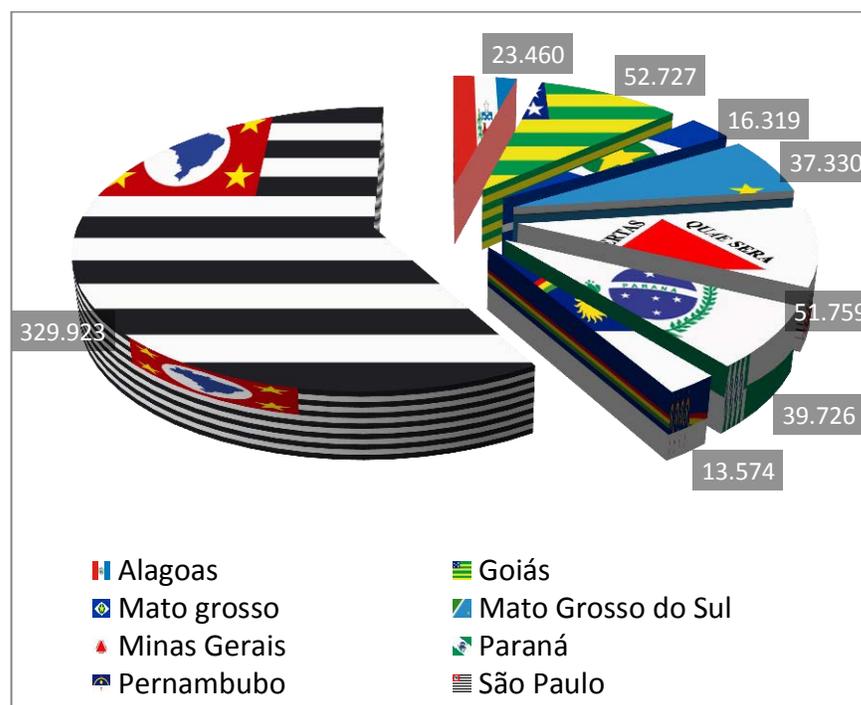


Figura 1. Produção de (em milhares de toneladas) de cana-de-açúcar nos oito principais Estados produtores brasileiros (UNICA, 2014).

O bicudo-da-cana-de-açúcar pertence à ordem Coleoptera, Família Dryophthoridae. São besouros que possuem a cabeça prolongada em um rostro de comprimento muito variável, antenas clavadas e conspicuamente geniculadas, uma das sinapomorfias da família. O corpo é compacto, de formato muito variável, e o tegumento bastante endurecido, glabro, pubescente ou revestido por escamas coloridas, às vezes metálicas. O comprimento pode variar de 0,5 a 90 mm (incluído o rostro). A grande maioria

das espécies é de pequeno tamanho (2-3 mm) e de colorido sombrio. As larvas são ápodas, subcilíndricas, em geral levemente encurvadas e pouco esclerotizadas; os tergitos abdominais possuem, em geral, 3 a 4 pregas transversais (COSTA et al., 1988).

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

O gênero é cosmopolita, sendo relatadas espécies pragas por todo o globo (ALONSO-ZARAZAGA; LYAL, 1999; GÜLTEKIN, 2013; PEREZ-DE LA O, 2014), ocorrendo inclusive em cana-de-açúcar (HALL, 1988).

O bicudo ou gorgulho-da-cana-de-açúcar, *S. levis*, é a praga de solo mais importante e prejudicial à cultura no estado de São Paulo. Foi coletada pela primeira vez no Brasil em bromeliáceas, danificando-as, e em 1977 foi relatado em cana-de-açúcar. Inicialmente restrito à região de Piracicaba, em 2006 já se encontrava em 53 municípios dos estados de São Paulo e Minas Gerais (PINTO et al., 2009).

4.1.2 Biologia

Esses insetos atacam perfilhos e colmos sadios e preferem solos claros, argilosos e úmidos (PINTO et al., 2009). Tem uma capacidade de voo restrita, sugerindo que a dispersão do inseto a longas distâncias dá-se através das mudas retiradas de local infestado. Os adultos caminham lentamente possibilitando a dispersão de um talhão para outro vizinho (LEITE et al., 2006).

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, uma vez que a fase larval é a que causa maiores prejuízos na cultura (ALMEIDA, 2005).

Estudos sobre a biologia do *S. levis*, realizados em condições de laboratório, com dieta artificial por Degaspari et al. (1987), observaram que a postura de ovos foi efetuada na parte interna de colmos de cana-de-açúcar, a uma profundidade que variou desde a superfície até um máximo de 4 mm. Foi ainda observado pelos autores, que por ocasião da postura, a fêmea abre com o rostro um orifício e o ovo é colocado individualmente.

De acordo com Pinto et al. (2009), a postura ocorre nos internódios basais e é endofítica, variando desde a superfície até alguns milímetros de profundidade. Os ovos possuem formato elíptico e sua coloração inicial é branco-leitosa, escurecendo à medida que se aproxima o momento da eclosão da larva. O período de incubação varia de sete a 12 dias. Além apresentar forma elíptica, os ovos apresentam $0,27 \text{ mm} \pm 0,04 \text{ mm}$ de comprimento e $0,10 \text{ mm} \pm 0,012$ de largura. O período de incubação pode variar de sete a 12 dias, sendo 8,40 dias em média e a viabilidade de 47,16% (DEGASPARI et al., 1987).

A larva recém-eclodida possui coloração branco-leitosa e com o desenvolvimento e a idade adquire coloração amarelada. Possui sobre o dorso e no primeiro segmento torácico, junto à cabeça, uma mancha castanho-escuro e espiráculos visíveis neste segmento e no abdome. A cabeça é de cor castanho-avermelhada e as mandíbulas são bem desenvolvidas. Para se locomover, a larva ápoda apoia-se nas paredes das galerias abertas para alimentação. A viabilidade larval é de 35,80% com duração média de 35,60 dias, podendo variar de 26 a 50 dias (DEGASPARI et al., 1987).

A larva de *S. levis* possui um traço transversal distinto marrom sobre o primeiro segmento dorsal torácico em forma de “w”, junto à cabeça, uma mancha castanho-escuro e espiráculos visíveis neste segmento e no abdome. As mandíbulas são bem desenvolvidas (PINTO et al., 2009). Pouco antes de a larva passar para a fase pupal, ela amplia a galeria em que se encontra, preparando a “câmara pupal”. Posteriormente, ela cessa seus movimentos, para de se alimentar, diminui de tamanho e passa à fase de pupa. Esse comportamento pode ser observado em indivíduos de campo, criados sobre a cana-de-açúcar (DEGASPARI et al., 1987).

A câmara pupal de *S. levis* é simples, friável, feita com serragem fina (PINTO et al., 2009). A pupa, logo após sua formação, é branco-leitosa do tipo exarada e

torna-se castanha à medida que se aproxima a emergência do adulto. O período pupal pode variar de cinco a 13 dias, com duração média de 10,50 dias, sendo a média de viabilidade pupal 93,53% (DEGASPARI et al., 1987).

O adulto de *S. levis*, geralmente é encontrado abaixo do nível do solo, possui coloração castanho-escuro com manchas pretas no dorso do tórax e listras longitudinais sobre os élitros. Move-se lentamente e simula estar morto quando tocado (tanatose). O macho é normalmente menor que a fêmea, com 9,70 mm \pm 0,10 mm de comprimento, variando entre 7,70 mm a 11,20 mm. Apresenta a região ventral mais pilosa, principalmente na coxa dianteira, onde as cerdas se agrupam, dando um aspecto de esponja (DEGASPARI et al., 1987).

A fêmea mede 11,90 mm \pm 0,10 mm de comprimento, variando entre 10,50 e 13,30 mm. Em condições de campo, realiza a postura endofítica nos rizomas da cana, abaixo do nível do solo. No laboratório, a fêmea abre um orifício com o rostro, que mede em média 3,40 mm \pm 0,05 mm de comprimento (DEGASPARI et al., 1987). Nas condições de laboratório, a longevidade do adulto foi de sete a 249 dias para fêmea e sete a 247 dias para macho, sendo em média 119,80 e 117,90 respectivamente (DEGASPARI et al., 1987).

Os adultos deste inseto caminham em média 9,60 m por mês, numa área de aproximadamente 98,20 m². Em campo, as fêmeas tendem a se deslocar mais que os machos, para realizarem as posturas. Nas condições de laboratório, com temperatura variando entre 27°C a 30°C, com doze horas de luz, o ciclo total do *S. levis* variou de 58 a 307 dias, sendo em média igual a 173, 2 dias (DEGASPARI et al., 1987). Embora o adulto apresente asa, não foi observado nenhum inseto se locomovendo através do voo, não ocorrendo também nenhuma captura de adulto em armadilhas luminosas instaladas próximas aos locais de ocorrência desta praga (DEGASPARI et al., 1987).

4.1.3 Danos

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 amarelecimento das folhas e morte do perfilho,

consequentemente, 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). Todos esses fatores levam a redução da tonelagem de cana produzida por hectare (PRECETTI; TERÁN, 1983). As larvas desse inseto destroem o rizoma da planta, causando prejuízos da ordem de 30 toneladas de cana por hectare, além de reduzir a longevidade do canavial (LEITE et al., 2006).

O sintoma de ataque se manifesta geralmente na época seca do ano, pois as larvas ao se alimentarem dos rizomas provocam o aparecimento de brotos amarelos, falhas na rebrota das soqueiras, podendo em certos casos, de acordo com o grau de infestação na cultura, causar a morte das canas (DEGASPARI *et al.*, 1987).

Os danos refletem-se no número, tamanho e diâmetro de colmos finais para a colheita, sendo que as perdas econômicas podem ser estimadas em relação à redução nas toneladas de cana esperadas por hectare. Em alguns locais, têm-se detectado de 50 a 60% de perfilhos atacados, ocasionando reduções de 20 a 30 toneladas por hectare (PINTO et al., 2009).

4.1.4 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, cortados 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 (ALMEIDA, 2005).

4.1.5 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 à seca dos rizomas.

Recomenda-se também eliminar o mato infestante que pode servir de alimento para larvas (PRECETTI; ARIGONI, 1990). Entretanto, essa prática apresenta resultado satisfatório somente no 1º corte, pois muitas larvas conseguem sobreviver alimentando-se da matéria orgânica deixada no campo, após a destruição das soqueiras, não afetando também as formas adultas do inseto (ALMEIDA, 2005).

É adotado também o uso de iscas tóxicas; na manutenção da área destruída livre de vegetação hospedeira por um período prolongado (> 3 meses) e no plantio com aplicação de fipronil (Regent 800 WG) (250 g/ha). Entretanto, apesar de todas essas medidas, ainda ocorre incremento nas populações da praga, sendo frequentes os registros de novas áreas infestadas. Isso demonstra a dificuldade de controle desse inseto, ressaltando a importância da continuidade de pesquisas na busca de alternativas mais eficazes (LEITE et al., 2006).

O uso de iscas tóxicas ainda é muito comum no campo, e estudos foram realizados visando aperfeiçoar a atração de adultos de *S. levis*, (GIRÓN-PÉREZ et al., 2009). Os dados obtidos indicaram que os entrenós da cana-de-açúcar misturados com melão a 10% e fermentados por 24h e 48h foram altamente atrativos a *S. levis*, superando outros substratos como casca de abacaxi + melão ou água, e cana + água. Os autores recomendaram o substrato como alternativa para o monitoramento e controle.

No controle biológico de *S. levis*, O instituto Biológico, em colaboração com o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e Universidade Federal de São Carlos (UFSCar/CCA), desenvolveram pesquisas procurando avaliar nematoides entomopatogênicos para o controle de *S. levis*. Para esses estudos, o Instituto Biológico contou também com a parceria da empresa Bio Controle Métodos de Controle de Pragas Ltda. As larvas do inseto foram susceptíveis aos nematoides *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. em condições de laboratório e casa de vegetação. O nematoide *Steinernema* sp., promoveu mortalidades acima de 70% na dosagem de 2,4 juvenis infectivos/cm², equivalente a 1 x 10⁸ juvenis infectivos/ha. Todas as larvas encontradas mortas dentro dos colmos de cana apresentaram sintomas de que foram infectadas pelos nematoides. Nos experimentos de

campo, aplicação dos nematoides esteve relacionada positivamente a ganhos na produção da cana-de-açúcar de 10 a 15 ton/ha (LEITE et al., 2006).

Tavares et al. (2007) avaliaram os efeitos dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* (Nematoda: Rhabditida), isolado IBCB n5 e *Steinernema* sp. IBCB n6 na mortalidade de larvas de *S. levis* em laboratório e casa-de-vegetação. *H. indica* IBCB n5 proporcionou mortalidades de 26, 63 e 95% em laboratório e 42, 65 e 85% em casa-de-vegetação, nas dosagens de 2,4; 12; e 60 juvenis infectivos (JI)/cm². Para *Steinernema* sp. IBCB n6, as mortalidades foram de 32, 47 e 42% em laboratório e 69, 73 e 73% em casa-de-vegetação, respectivamente.

Visando ao controle biológico dessa mesma praga, Giometti et al. (2011) avaliaram a virulência de 17 isolados de nematoides entomopatogênicos do gênero *Steinernema* e *Heterorhabditis* para adultos de *S. levis*. Os nematoides selecionados como mais virulentos em cada teste foram *Steinernema brazilense* (Nematoda: Rhabditida) IBCB n6, *Heterorhabditis* sp. IBCB n10, *Heterorhabditis* sp. IBCB n24 e *Heterorhabditis* sp. IBCB n44.

Em teste de campo realizado por Leite et al. (2012) na Usina São João, Município de Araras, SP, para avaliar a eficiência dos nematoides *S. brazilense* (IBCB n6) e *H. indica* (IBCB n5) contra o bicudo-da-cana-de-açúcar, e o efeito da associação desses agentes na dosagem de 1×10^8 JI/ha, com subdosagens do thiamethoxam 250 WG. Os nematoides *H. indica* e *Steinernema* sp., testados isoladamente, proporcionaram ganhos na produção de 10 e 15 t/ha, respectivamente, quando comparados a testemunha com rendimento de 101 t/ha. O melhor tratamento foi a combinação do nematoide *S. brazilense*. com o inseticida na subdosagem de 500 g p.c./ha, proporcionando um incremento na produção de cana de até 28 ton./ha.

Atualmente, existe no Brasil um produto biológico para o controle de *S. levis*, o produto Bio NEP[®], a base do nematoide entomopatogênico *S. brazilense*, isolado IBCB n6. O nematoide é produzido através do método de Bedding ou método da produção em esponja (BEDDING, 1981). A produção *in vitro* é uma parceria do Instituto Biológico, São Paulo, com a empresa Bio Controle, sediada no Município de Indaiatuba, São Paulo. O

nematoide está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para controle do bicudo-da-cana-de-açúcar *S. levis* (Coleoptera: Dryophthoridae), na dose recomendada de 1Kg/ha, com 400L de calda/ha (aplicação terrestre) (BRASIL, 2014).

Nematoides entomopatogênicos podem ser uma estratégia eficiente no controle de *S. levis* em campo, sendo necessário ampliar os estudos em condições naturais através de estudos de dosagem e diferentes métodos de aplicação em campo.

4.2 A broca do cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus*

4.2.1 A importância da cultura do cupuaçu.

O Brasil é um país de clima tropical, que se destaca pela sua grande biodiversidade, onde se encontram inúmeras frutas com potencial de exportação para o mercado internacional, devido ao seu sabor exótico e valor nutricional elevado. Dentre essas espécies, tem-se o cupuaçu, uma das frutas exóticas mais importante e tipicamente amazônica, pertencente à família das Sterculiaceas, sendo o estado do Pará o principal produtor, seguido pelo Amazonas, Rondônia, Acre, norte do Maranhão e Tocantins (VENTURIERI, 1993). Devido ao aumento da demanda pela polpa dessa fruteira que vem sendo exportada, principalmente na forma congelada, para Estados do Sul e Sudeste do Brasil e para países europeus, vem aumentando o interesse pelo seu cultivo (BASTOS et al., 2002).

O gênero *Theobroma* é o mais importante da família Sterculiaceae e pode ser encontrado cerca de 22 espécies originárias da América Tropical. Todas produzem frutos comestíveis e algumas espécies, acredita-se poder fazer um produto similar ao chocolate (CALZAVARA et al., 1984; VENTURIERI; AGUIAR, 1988). A maioria dessas espécies são ricas em gordura, proteína e amido, sendo que algumas delas apresentam de 1 a 3% de teobromina como também cafeína que pode estar presente em algumas dessas espécies (MONTEIRO, 1996).

Nos sistemas agroflorestais da região Norte, o cupuaçueiro é uma das mais importantes frutíferas exploradas comercialmente. Isto deve-se ao grande potencial existente no aproveitamento da polpa, das sementes e, também, devido à conquista de mercado em outras regiões do País e no exterior.

Dentre as pragas citadas em cupuaçueiro, a broca-dos- frutos, inseto pertencente ao gênero *Conotrachelus*, é a mais importante atualmente, devido aos danos causados pelas larvas, que se alimentam das sementes e constroem galerias no interior dos frutos, e por estar disseminado em alguns Estados da região Norte, principalmente em Rondônia e Amazonas, sendo que no Pará e no Acre o inseto não é tão freqüente (GARCIA et al., 1997).

4.2.2 Biologia

Dentro do gênero *Conotrachelus*, de acordo com Bondar (1937), ocorrem mais de 500 espécies, todas no Continente Americano, sendo 73 delas no Brasil. A maioria das espécies desenvolvem-se em frutos de árvores silvestres. *C. humeropictus* foi relatado como a espécie que ataca o cupuaçueiro na região Norte (TREVISAN; MENDES, 1991; VENTURIERI, 1993).

A broca *C. humeropictus* foi registrado pela primeira vez em 1981, atacando frutos de cacau, *T. cacao*, em Rondônia, mais especificamente no município de Cacoal (MENDES et al., 1982), sendo considerado uma das pragas mais importantes dessa cultura (TREVISAN, 1989). Foi constatado que essa espécie ataca ainda a jaboticabeira (*Eugenia cauliflora* D.C.) (SILVA et al., 1968), ocorrendo também, segundo Almeida; Almeida (1987), em plantas silvestres como o cacauí (*T. speciosum* Spreng.) e cacaarana (*T. microcarpum* Bern.).

Sob condições de laboratório, com temperatura controlada ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), fotofase natural de 12 horas e umidade relativa mantida a $80 \pm 10\%$, o ciclo de ovo até a emergência de adultos variou de $108,80 \pm 9,44$ dias para machos e $156,87 \pm 16,19$ dias para fêmeas (MENDES et al., 1997).

A oviposição ocorre numa profundidade de até três mm no pericarpo do fruto. Os ovos recém-colocados possuem a coloração branco-leitosa, tornando-se amarelo-palha à medida que se desenvolve. Sua forma é elíptica, com $0,26 \pm 0,01$ mm de comprimento e $0,16 \pm 0,01$ mm de largura. O período embrionário médio foi de $4,73 \pm 0,06$ dias. A viabilidade média dos ovos foi de 75,60%, mas o autor ressalta que em campo essa viabilidade

pode ser maior devido a ausência de manipulação e perda de água dos ovos, quando estão no interior dos frutos (MENDES et al., 1997).

As fêmeas adultas ovipositam preferencialmente na metade inferior do fruto, aumentando a preferência a partir dos dois meses de desenvolvimento do fruto. Além disso, frutos até um metro do solo são menos atacados que frutos com alturas superiores (TREVISAN, 1989).

A larva recém-eclodida apresenta cerca de $0,81 \pm 0,02$ mm de comprimento e coloração branco-leitosa. Ao atingir o máximo de desenvolvimento larval, em média 26,64 dias da eclosão, medindo $17,21 \pm 0,34$ mm de comprimento, coloração amarelada com cabeça de cor castanho-avermelhada e mandíbulas bem desenvolvidas. Após sofrer três ecdises no interior do fruto, a larva abandona-o abrindo um orifício, indicando estar prestes a iniciar a fase de pupação. A larva procura o solo e permanecerá ali nesta fase de pré-pupa.

Trevisan (1989) relatou que larvas oriundas de posturas efetuadas em frutos com quatro meses de idade completaram todo o seu ciclo larval no interior do fruto, os quais apresentaram maior incidência de danos mecânicos. Entretanto, posturas realizadas em frutos com 4,5 meses não conseguiram se desenvolver, por não haver tempo suficiente, já que a maturação e colheita dos frutos atingiram os cinco meses de idade, 30 dias após a postura no primeiro grupo de frutos. Assim, o período determinado em laboratório aproxima-se do que provavelmente ocorre em campo.

Nesta fase, o inseto cessa a alimentação e abandona o fruto, se dirigindo para o solo e preparando a “câmara pupal”, cessando também seus movimentos. O período desta fase é em média de 6,07 dias. A viabilidade é de 99,59%. (MENDES et al., 1997).

A pupa é do tipo exarada, quando recém-formada é branco-leitosa, tornando-se castanho claro à medida que se aproxima a eclosão do adulto. O período pupal é de 8 a 12 dias, e o período médio é de $9,62 \pm 0,10$ dias, até chegar à completa formação fisiológica do adulto, período que leva em média mais $4,56 \pm 0,11$ dias. A viabilidade pupal é de 97,12% (MENDES et al., 1997).

O adulto é de cor castanho-claro, com 9,87 mm de comprimento, e permanece por um período de 3 a 6 dias, praticamente imóvel na antiga “câmara pupal”. Passado esse período, 99,51% dos indivíduos emergem do solo. Os machos emergem do solo horas antes das fêmeas. A cópula ocorreu no mesmo dia da emergência. As fêmeas viveram em média 41,70 dias a mais do que os machos (MENDES et al., 1997).

O período de pré-oviposição foi de $16,20 \pm 0,49$ dias. O período de oviposição foi de $80,50 \pm 5,58$ dias, com uma fecundidade de 55 a 153 ovos, em média $108,47 \pm 6,21$ ovos, sendo as posturas diárias, com média de $1,29 \pm 0,03$ ovos/dia. As posturas são isoladas, com raros casos onde são constituídas por dois, três ou quatro ovos (MENDES et al., 1997).

4.2.3 Danos

A broca-do-cupuaçu, *C. humeropictus* ataca o fruto e torna sua polpa imprestável para o consumo (TREVISAN; MENDES, 1991; VENTURIERI, 1993) e as perdas chegam até 50% dos frutos, como relatado por Laker; Trevisan (1992).

Os danos diretos são ocasionados pelas larvas em virtude das galerias construídas na região da polpa e da destruição das sementes. Os danos indiretos ocorrem devido a entrada de microrganismos e insetos oportunistas através dos furos que são construídos pelas larvas quando as mesmas abandonam os frutos para empuparem no solo (AGUILLAR; GASPAROTTO, 1999). Os frutos que foram atacados, ao atingir o amadurecimento, apresentam polpa destruída pela fermentação causada pelos organismos decompositores (AGUILLAR; GASPAROTTO, 1999).

4.2.4 Controle

Ainda não existe tratamento químico eficiente para controlar a broca-do-fruto-do-cupuaçuzeiro (THOMAZINI, 1998; AGUILAR; GASPAROTTO, 1999), Principalmente pelo fato dos ovos e das larvas do inseto localizarem-se no interior dos frutos, dificultando a ação dos inseticidas, além disso, é provável a ocorrência de resíduos tóxicos na polpa, inviabilizando a comercialização do produto.

Pulverizações com endossulfan para controlar os adultos da broca-do-fruto do cupuaçu (GALLO et al., 2002) e de methamidophos, endossulfan, parathion methyl e fenthion para controle das larvas da broca-do-fruto-do-cacau, no casqueiro (MENDES; GARCIA, 1989) mostraram-se pouco eficientes e antieconômicas.

Mendes et al. (1997) avaliaram a eficiência dos entomopatógenos *Metharhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle das larvas de *C. humeropictus* obtendo, 42,72% e 52% de mortalidade das mesmas.

Lopes (2000) encontrou dois gêneros de parasitóides da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro: *Lixophaga* sp. (Diptera: Tachinidae) e *Urosigalphus* sp. (Hymenoptera: Braconidae).

Garcia et al. (1997) relatam que aproximadamente 70% das larvas de *Conotrachelus* sp. que penetram no solo para pupar não completam o ciclo e morrem devido ao ataque de fungos e outros parasitoides, evidenciando assim, possível potencial destes no controle da broca.

4.3 O Controle Biológico de pragas

Com a conscientização de que o uso irracional de pesticidas é incompatível para uma agricultura sustentável, tendo em vista os malefícios ao ambiente, saúde humana e polinizadores (SÁNCHEZ-BAYO et al., 2013; PETTIS et al., 2013), é crescente o aumento das pressões do mercado internacional em relação a adoção de práticas culturais sustentáveis para a exportação de produtos agrícolas.

Assim, diversos estudos vêm apresentando alternativas menos agressivas para o controle de pragas, com destaque para o uso de fungos, nematoides, bactérias entomopatogênicas, bem como parasitoides e predadores (GALLO et al. 2002). Quando se trata de pragas de solo, as chances de sucesso são maiores utilizando nematoides e fungos entomopatogênicos. Esses patógenos são inimigos naturais de diversas pragas no solo, e que sob condições favoráveis, promovem mortalidades nas populações dessas pragas (KAYA, 1987; SHAMSELDEAN; ABD-ELGAWAD, 1994).

4.4 Nematoides entomopatogênicos

Entre os nematoides entomopatogênicos, destacam-se aqueles pertencentes às famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, que possuem ciclos de vida semelhantes. Ambos são associados mutualisticamente às bactérias dos gêneros *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, respectivamente, que são as responsáveis pela morte do hospedeiro. Todo o ciclo de vida dos NEPs ocorre no interior do hospedeiro, com exceção do um estágio livre, ou juvenil de terceiro estágio, também chamado de juvenil infectivo ou infectante (JI), que não se alimenta e é mais resistente ao dessecamento, pois mantém a cutícula do estágio anterior. O JI penetra no inseto através de aberturas naturais (como abertura oral, anal ou espiráculos), ou ainda pelo seu tegumento. Em seguida, libera a bactéria no interior do inseto, onde se multiplica e digere a hemolinfa. O NEP, por sua vez, alimenta-se da bactéria e dos tecidos digeridos, completa o seu desenvolvimento, acasala e reproduz. Quando a fonte de alimento do cadáver é exaurida, novos JI são formados e deixam o cadáver em busca de outros hospedeiros (KAYA; GAUGLER, 1993; POINAR JR., 1972).

Nematoides 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 tem sido avaliada em diversos estudos, procurando selecionar isolados mais adaptados às adversidades de cada região.

Diferentes espécies de nematoides possuem comportamentos distintos, e são adaptados a diversas temperaturas, umidade, porosidade do solo, etc. Desse modo, a avaliação de nematoides se faz necessária, com o objetivo de selecionar isolados mais eficientes para uso em um programa de controle biológico de determinada praga. Estudos de formulação e técnicas de aplicação tentam amenizar os efeitos do clima. Essas formulações permitem maior persistência dos nematoides no ambiente, garantindo melhores resultados no controle de pragas. Os cuidados na aplicação também são fatores essenciais para garantir o sucesso desses agentes em níveis de controle de uma determinada praga (GEORGIS, 1990).

4.5 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são patógenos de largo espectro. São capazes de atacar insetos aquáticos e fitófagos que vivem na parte aérea das plantas e no solo, podendo causar epizootias naturais. Podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo esta característica muito desejável e peculiar deste grupo. Alguns são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral, penetrando através do mesêntero (ALVES, 1998).

O modo de ação dos fungos possui vantagens em relação a outros entomopatógenos. O fungo penetra ativamente no inseto, por meio de uma combinação de degradação enzimática e pressão mecânica. Enzimas como proteases, lipases e quitinases, facilitam a penetração mecânica do fungo e o metabolismo do tubo germinativo, ocorrendo decomposição do tecido no entorno do local de penetração, na procutícula, com posterior colonização do corpo do inseto hospedeiro. Por seguinte, o fungo se multiplica nesse ambiente, levando o inseto à morte. Decorridas 72 horas da inoculação o inseto apresenta-se totalmente colonizado e, sobre o cadáver ocorre formação de grande quantidade de conidióforos e conídios (ALVES, 1998).

4.6 O Uso combinado de fungos e nematoides entomopatogênicos

O crescente uso de agentes de controle biológico desde 1980 tem motivado a pesquisa sobre estratégias para melhorar o controle de insetos-praga por meio de combinações de NEP com outros agentes biológicos. Ao longo das últimas três décadas, o número de publicações sobre o tema no campo do controle biológico aumentou de 26,7% em 1980 para 39,1% na década de 2000 (este numero é também cerca de 5% do total de publicações com NEPs) (SAN-BLAS, 2013).

A eficiência de um entomopatógenos pode ser melhorada, usando-o em combinação com outro patógeno. Dois agentes de controle quando aplicados juntos podem agir independentemente em um hospedeiro, e os efeitos observados serão aditivos ou

complementares. Eles também podem interagir sinergicamente ou antagonicamente, assim promovendo uma combinação mais ou menos eficiente que no caso do efeito aditivo (JAQUES; MORRIS, 1981).

Para melhorar a eficiência dos patógenos em campo, pesquisadores têm explorado a combinação de agentes biológicos e convencionais. No caso de nematoides, que atacam principalmente pragas de solo, aplicá-los juntamente com fungos entomopatogênicos poderia promover um acréscimo nos níveis de controle de determinada praga (ACEVEDO et al., 2007).

O uso combinado de fungos e nematoides tem apresentado bons resultados contra coleópteros em ensaios de laboratório (ANSARI et al., 2004) e em campo (ANSARI et al., 2006). Apesar de algumas exceções, nota-se em geral que as aplicações de misturas visam o controle inundativo dos agentes, haja vista que em boa parte dos casos, a reprodução e reciclagem de ambos os agentes é prejudicada. As rápidas mortalidades observadas geralmente ocorrem em detrimento da manutenção do patógeno no ambiente (ACEVEDO et al., 2007).

Os cultivos da cana-de-açúcar e do cupuaçu são ambientes promissores para o uso combinado de nematoides e fungos, possuindo microclima favorável para aplicação e áreas cultivadas que suportam um programa de controle biológico. As pragas *S. levis* e *C. humeropictus* possuem hábitos que favorecem o uso dessa abordagem para o seu controle, sendo interessante investigar a eficiência dessa técnica.

5. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J. P. M. et al. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 187-192, 2007.

AGUILAR, J. A. D.; GASPAROTTO, L. **Aspectos cronológicos e biológicos da brocado-fruto (*Conotrachelus* sp. FIEDLER, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) no cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) e seu controle**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, 1999. 17 p. (Documentos, 3).

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

ALVES, S. B. et al. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 69-110.

ANSARI, M. A. et al. Field trials against *Hoplia philantus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 453-459, 2006.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 172-180, 2004.

BARBECHECK, M. E.; KAYA, H. K. Interactions between *Beauveria bassiana* and the Entomogenous Nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 225-234, 1990.

BASTOS, M. S. R.; GURGEL, T. E. P.; SOUSA FILHO, M. S. M. Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 24, p. 240-242, 2002.

BONDAR, G. Curculionídeos do gênero *Conotrachelus* nocivos ao cacauzeiro. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 41-43, 1937.

CALZAVARA, B. B. G.; MÜLLER, C. H.; KAHAWAGE, O. N. C. **Fruticultura tropical: o cupuaçuzeiro; cultivo, beneficiamento e utilização do fruto**. Belém: EMBRAPA/CPATU, 1984. 101 p.

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

GARCIA, M. V. B; PAMPLONA, A. M. S. R.; MORAES, L.A.C. **Pragas do cupuaçuzeiro: a broca-do-fruto**. Manaus: Embrapa, 1997.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: GAUGLER, R.; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Florida: Boca Raton, 1990. p. 173-191.

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

JAQUES, R. P.; MORRIS, O. N. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and different crops. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. Londres: Academic Press, 1981. p. 695-715.

KAYA, H. K. Diseases caused by nematodes. In: FUXA, J. R.; TANADA Y. (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley, 1987. p. 453-470.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 38, p. 181-206, 1993. DOI: 10.1146/annurev.en.38.010193.001145

LAKER, H. A.; TREVISAN, O. The increasing importance of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (Schum) in the Amazon Region of Brasil. **Cocoa Growers Bulletin**, Bournville, v. 45, p. 45-52, 1992.

LEITE, L. G. et al. Alternativa de controle. **Cultivar grandes culturas**, Pelotas, v. 83, p. 30-33, 2006.

LEITE, L. G. et al. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus sp.* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 40-48, jan./mar. 2012.

LOPES, C. M. D. A. **Biologia, comportamento e flutuação populacional da broca-do-fruto do cupuaçuzeiro *Conotrachelus sp. aff humeropictus* (Coleoptera: Curculionidae)**. 2000. 90 f. Tese (Tese de Doutorado)-Universidade do Amazonas, Manaus, 2000.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PALLINI, A. (Ed.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa, MG: Epamig, 2010. v. 4, p. 169-195.

MENDES, A. C. B.; GARCIA, J. J. S.; TREVISAN, O. Ocorrência de coleobrocas nos frutos do cacauzeiro em Rondônia. **Informe Fitossanitário**, v. 2, p. 1-3, 1982.

MENDES, A. C. B.; MAGALHÃES, B. P.; OHASHI, O. S. Biologia de *Conotrachelus humeropictus*, FIEDLER, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), praga do cacauzeiro e do

cupuaçuzeiro na Amazônia brasileira. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 27, n. 2, p. 135-144, 1997.

MENDES, A. C. B. et al. Danos de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae): Nova praga do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) na Amazônia brasileira. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 17, p. 19-28, 1988.

MENDES, A.C. B.; TREVISAN, O.; GARCIA, J. J. S. Flutuação populacional de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), broca dos frutos do cacaueiro *Theobroma cacao* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12., 1989, Belo Horizonte., **Resumos...** Belo Horizonte, MG: Sociedade Entomológica do Brasil, 1989. p. 123.

MONTEIRO, W. R.: Gênero *Theobroma*: distribuição e importância econômica. In: WORKSHOP SOBRE AS CULTURAS DE CUPUAÇU E PUPUNHA NA AMAZÔNIA, 1., 1996, Manaus. **Anais...** Manaus, AM: EMBRAPA, 1996. p. 96-109.

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

PETTIS, J. S. et al. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-8, jul. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.

POINAR JR, G. O. Nematode as facultative parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, Jaboticabal, v. 17, p. 103-122. 1972.

SAN-BLAS, E. Progress on entomopathogenic nematology research: a bibliometric study of the last three decades: 1980-2010. **Biological Control**, Orlando, v. 66, p. 102-124, 2013.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; TENNEKES, H. A.; GOKA, K. Impact of systemic insecticides on organisms and ecosystems. In: STANISLAV TRDAN, S. (Ed.), **Insecticides**: development of safer and more effective technologies. Rijeka: Intech, 2013. p. 367-416. DOI: 10.5772/52831.

SHAMSELDEAN, M. M.; ABD-ELGAWAD, M. M. Natural occurrences of the insect pathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in Egyptian soils. **Afro-asian Journal of Nematology**, Luton, v. 4, n. 2, p. 151-154, 1994.

SILVA, A. G. A. et al. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores; insetos hospedeiros e inimigos naturais**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Laboratório Central de Patologia Vegetal, 1968. v. 1, n. 2, 622 p.

THOMAZINI, M. J. **Medidas para o controle da broca-dos-frutos do cupuaçuzeiro**. Rio Branco: Embrapa Acre, 1998, 4 p. (Instruções técnicas, 11).

TREVISAN, O. **Comportamento da broca dos frutos *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), em Rondônia**. 1989. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Entomologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

TREVISAN, O. Manejo Integrado das pragas do cacauzeiro na região amazônica: *Conotrachelus humeropictus*. **Folha Técnica - Superintendência do Desenvolvimento da Região Cacaueira no Estado do Pará**, n. 1, p. 1-2, ago. 2011.

TREVISAN, O.; MENDES, A. C. B. Ocorrência de *Conotrachelus humeropictus* Fiedler, 1940 (Coleoptera: Curculionidae) em frutos de cupuaçu *Theobroma grandifolium* (Willd. Ex Spreng; Shun.) (Sterculiaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13, 1991, Recife. **Resumos....** Recife: Sociedade Entomológica do Brasil, 1991. p.137.

VENTURIERI, G. A.; AGUIAR, J. P. L. Composição do chocolate de amêndoas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 18, p. 3-8, 1988.

VENTURIERI, G.A. **Cupuaçu**: a espécie, sua cultura, usos e processamento. Belém: Clube do Cupu, 1993. 108 p.

**CAPÍTULO I: CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sphenophorus levis* (COLEOPTERA:
DRYOPHTHORIDAE) POR MEIO DO USO COMBINADO DE FUNGOS E
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS.**

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Sphenophorus levis* (COLEOPTERA: DRYOPHTHORIDAE) POR MEIO DO USO COMBINADO DE FUNGOS E NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS.

1. RESUMO

O bicudo-da-cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis*, é uma das principais pragas de solo da cana-de-açúcar, causando prejuízos da ordem de 30 t/ha. Nematoides e fungos entomopatogênicos são inimigos naturais de pragas de solo, sendo potenciais agentes para o controle biológico de *S. levis*. O presente trabalho selecionou isolados de fungos entomopatogênicos, para seu uso combinado com o produto Bio NEP[®], a base do nematoide entomopatogênico *Steinernema brazilense* isolado IBCB n6, para controle em campo de *Sphenophorus levis*. O trabalho iniciou com a seleção de isolados dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para adultos da praga, e avaliação dos três melhores isolados na produção em arroz. O uso combinado do fungo *Beauveria bassiana* isolado IBCB 170 e do fungo com o produto Bio NEP[®] foi avaliado em laboratório contra larvas artificialmente infestadas em toletes de cana-de-açúcar, semienterrados em potes contendo areia fina umedecida a 10%. A eficiência do uso combinado de *M. anisopliae* e *B. bassiana* com o nematoide *S. brazilense* foi avaliada contra adultos de *S. levis* em laboratório. O melhor tratamento de combinação foi levado a campo. Os experimentos de campo avaliaram a aplicação dos tratamentos: 1) *B. bassiana*; 2) *S. brazilense*; 3) *B. bassiana* + *S. brazilense*; 4) inseticida químico Fipronil + Alfa-Cipermetrina (Regent Duo[®]); 5) testemunha; na infestação de larvas de *S. levis* em soqueiras de cana-de-açúcar. Para avaliação da interação entre o fungo e o nematoide, foram feitas amostras de solo uma semana e um mês após aplicação, e a mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* expostas às amostras do solo tratado foi avaliada. Os resultados do ensaio de seleção de isolados contra adultos mostraram diferenças significativas entre os isolados avaliados, obtendo melhores resultados *B. bassiana* IBCB 170, e *M. anisopliae* IBCB 383, causando mortalidades de 80,00 e 72,00%, respectivamente. Na avaliação da produção em arroz, o *B. bassiana* IBCB 170 superou os outros isolados, com $200,95 \times 10^9$ con./g de arroz, enquanto que *M. anisopliae* IBCB 383 não diferiu dos demais, com $11,25 \times 10^8$ con./g de arroz. Nos ensaios contra larva de *S. levis*, observou-se efeito aditivo na mistura de *S.*

brazilense com *B. bassiana*, promovendo 80% de mortalidade, enquanto os agentes isolados promoveram 60 e 3%, respectivamente. No ensaio de uso combinado contra adultos, o tratamento *B. bassiana* + *S. brazilense* promoveu 40% de mortalidade, mostrando interação aditiva. A mistura de *M. anisopliae* com *S. brazilense* (28%) demonstrou antagonismo. O fungo *B. bassiana* causou mortalidade em 28% dos adultos, e *S. brazilense* (Bio NEP[®]) causou 24% de mortalidade. Todas as mortalidades observadas foram causadas por nematoides. Nos experimentos de campo, a infestação de larvas e *S. levis* foi reduzida em todos os tratamentos, com exceção da testemunha. A avaliação da interação entre os agentes, por meio da avaliação da mortalidade de *G. mellonella* expostas às amostras de solo tratado, o tratamento *B. bassiana* + *S. brazilense* mostrou efeito sinérgico e aditivo, uma semana e um mês após aplicação, respectivamente. Esse tratamento de uso combinado foi o mais eficiente nos dois tempos avaliados, diferindo estatisticamente dos agentes aplicados isoladamente. Uma semana após aplicação, o uso combinado promoveu 37,9% de mortalidade das larvas, contra 22,9 e 5,8% causadas isoladamente pelos agentes *S. brazilense* e *B. bassiana*, respectivamente. Um mês após a aplicação o efeito da mistura foi aditivo, causando 20,4% de mortalidade nas larvas, enquanto que *S. brazilense* causou 10,0% e *B. bassiana* 5,8% de mortalidade.

Palavras-chave: Controle biológico, *Steinernema brazilense*, Interação, Bicudo-da-cana-de-açúcar.

2. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e álcool de etanol, com área cultivada de 9.752.328 hectares. Na safra 2012/2013, a produção brasileira de cana-de-açúcar atingiu mais de 588.478.000 toneladas (UNICA, 2014). O aumento da demanda por etanol tem criado grandes expectativas no mercado sucroalcooleiro. Por ser um combustível renovável e menos poluente que os combustíveis fósseis, o etanol tem atraído a atenção dos países da comunidade europeia, Japão e os Estados Unidos, que além de diminuir a emissão dos gases que causam o efeito estufa, também querem diminuir a dependência ao petróleo. Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA, 2014), o setor sucroalcooleiro foi responsável por aproximadamente 2% do PIB nacional e 31% do PIB agrícola no Brasil em 2012, empregando cerca de 4,5 milhões de pessoas.

O estado de São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, com 5.172.611 hectares de cana plantada em 2012 (UNICA, 2014). O complexo de pragas nessa cultura é grande, destacando-se o bicudo-da-cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Dryophthoridae), que vem assumindo grande importância neste estado, principalmente por estar se disseminando em áreas onde a incidência ainda não havia sido registrada (ALMEIDA, 2005). Esse fato se deve principalmente ao descuido no transporte de mudas infestadas de uma região para outra, uma vez que o inseto possui baixa taxa de dispersão, da ordem de 6,60 a 11,10 metros por mês (DEGASPARI et al., 1987).

O gênero *Sphenophorus* é distribuído em todas as regiões zoogeográficas do globo, e são considerados cosmopolitas (ALONSO-ZARAZAGA; LYAL, 1999). Este gorgulho no Brasil foi identificado pelo prof. Sérgio A. Vanim, do Instituto de Biociências da USP, São Paulo, como sendo *S. levis* (DEGASPARI et al., 1987).

A importância de *S. levis* como praga da cana-de-açúcar no Brasil somente foi conhecida a partir de 1977, sendo que em 1989 o inseto foi detectado em 14 municípios ao redor de Piracicaba, causando a morte de 50-60% dos perfilhos ainda na fase de cana-planta, com cinco a sete meses de crescimento (PRECETTI; ARIGONI, 1990). Em um levantamento mais recente, *S. levis* foi encontrado distribuído nas regiões Central (Araraquara, São Carlos, Jaú, etc.); Sul (Assis, Ourinhos); Nordeste (Pradópolis) e Leste (Leme,

Pirassununga, Araras, São João da Boa Vista, Santa Cruz das Palmeiras, etc.), estando portanto em quase todas as regiões de cultivos de cana-de-açúcar do estado de São Paulo (LEITE et al., 2006).

As larvas do inseto são responsáveis pelo maior dano. Se abrigam dentro do rizoma da cana, e o uso de inseticidas químicos não proporciona um controle satisfatório. 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).

Para manter a elevada produtividade da cana-de-açúcar, 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. Considerando o ciclo-de-vida e o hábito do inseto, o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, vêm se mostrando efetivos no controle de diversas espécies de curculionídeos que ocorrem nos EUA (SHAPIRO-ILAN, et al., 2002).

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

Uma das estratégias investigadas contra pragas de solo, principalmente na Europa, é o uso combinado de nematoides com fungos entomopatogênicos (BARBERCHECK; KAYA, 1990; BARBERCHECK; KAYA, 1991a; SHAPIRO-ILAN et al, 2004; ANSARI et al., 2006; ANSARI et al., 2004), para controle desses coleópteros e outras pragas. Os resultados geralmente apresentam níveis satisfatórios de mortalidade.

Uma das razões para o sucesso no uso destes agentes se deve a associação que possuem com bactérias simbiotas dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, armazenadas no intestino dos juvenis infectivos, os quais invadem o corpo do hospedeiro e

liberam estas bactérias, que causam a morte rápida do inseto. O nematoide alimenta-se da bactéria e dos tecidos do inseto, reproduzindo-se por varias gerações. Em consequência da escassez de nutrientes, milhares de juvenis infectivos (JI) deixam o cadáver do inseto, em busca de novos hospedeiros (FERRAZ, 1998).

Os fungos entomopatogênicos são patógenos de largo espectro e podem causar epizootias naturais em insetos. São capazes de infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, larvas, pupas e adultos, sendo esta característica muito desejável e peculiar deste grupo. Alguns são virulentos e a maioria é altamente especializada na penetração via tegumento, o que os coloca em vantagem quando comparados com outros grupos de patógenos que só entram no inseto por via oral, penetrando através do mesêntero (ALVES, 1998).

Não existem estudos sobre o uso combinado de fungos e nematoides contra larvas ou adultos de *S. levis*. Esse tipo de estratégia pode incrementar o controle da praga em campo, mas são necessários estudos em laboratório e seleções de isolados para alcançar o sucesso.

O cultivo da cana-de-açúcar é um ambiente promissor para o uso combinado de nematoides e fungos, possuindo manejo de pragas com outros agentes de controle biológico, microclima adequado para aplicação, grandes áreas cultivadas e um histórico que dão arrimo ao comércio de agentes de controle biológico.

3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Selecionar isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* contra adultos de *Sphenophorus levis*;
- Avaliar a produção de conídios dos melhores isolados da seleção de *B. bassiana* e *M. anisopliae* para *S. levis*;
- Avaliar o uso combinado de *B. bassiana* e *Steinernema brazilense* contra larvas de *S. levis* em condições de laboratório;

- Avaliar o uso combinado de *B. bassiana* e *M. anisopliae* com *S. brazilense* contra adultos de *S. levis* em condições de laboratório
- Avaliar a mortalidade de larvas de *Galleria mellonella*, expostas a amostras de solo de cana-de-açúcar aplicado com *S. brazilense*; *B. bassiana*; *S. brazilense* + *B. bassiana*; inseticida químico Regent Duo; e testemunha;
- Avaliar o efeito da aplicação de *B. bassiana*; *S. brazilense*; *B. bassiana* + *S. brazilense*; e do inseticida químico Regent Duo[®], na infestação de larvas de *S. levis* na touceira de cana-de-açúcar naturalmente infestada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de isolados dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para controle de adultos de *Sphenophorus levis*.

4.1.1 Obtenção dos insetos adultos

Os insetos adultos foram obtidos através de duas coletas em campo, realizadas na Usina Iracema, localizada no município de Iracemápolis, São Paulo, durante mês de março de 2012. Utilizou-se como alvo a fase adulta do inseto, devido à fácil obtenção pela coleta em campo. Foram feitas iscas com colmos de cana-de-açúcar cortados longitudinalmente, colocados com a face interna em contato com o solo e cobertos com folhagem. Após cinco dias, as iscas foram recolhidas e os insetos levados ao laboratório.

Os adultos passaram por um período de quarentena, sendo mantidos em caixas de polipropileno, com volume de 5 Litros. Colmos de 10 cm de cana-de-açúcar foram oferecidos como dieta, sendo substituídos a cada sete dias.

4.1.2 Fungos entomopatogênicos

Os isolados dos fungos foram obtidos do Banco de Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu”, mantido no Centro Experimental do Instituto Biológico, Campinas, São Paulo. Foram testados 15 isolados de *Beauveria* sp. e 15 isolados de *Metarhizium* sp. (respectivamente Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1. Isolados de *Beauveria* sp. utilizados no experimento.

Isolado	Hospedeiro original	Local de coleta
IBCB 170	Solo	Iracemópolis, SP
IBCB 81	Solo	Casvavel, PR
IBCB 82	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Goiânia, GO
IBCB 35	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Cruz das Almas, BA
IBCB 241	<i>Oryzophagus oryzae</i>	Pindamonhangaba, SP
IBCB 246	<i>Hypothenemus hampei</i>	Taubaté, SP
IBCB 67	<i>Hypothenemus hampei</i>	São José do Rio Pardo, SP
IBCB 102	Solo	Cosmópolis, SP
IBCB 28	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Miracatu, SP
IBCB 276	Solo	Ribeirão Preto, SP
IBCB 31	<i>Nezara viridula</i>	Piracicaba, SP
IBCB 18	<i>Hypothenemus hampei</i>	Tapiratiba, SP
IBCB 239	<i>Hypothenemus hampei</i>	Campinas, SP
IBCB 206	Solo	Ribeirão Preto, SP
IBCB 66	<i>Hypothenemus hampei</i>	São José do Rio Pardo, SP

Tabela 2. Isolados de *Metarhizium* sp. utilizados no experimento.

Isolado	Hospedeiro original	Local de coleta
IBCB 383	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Araras, SP
IBCB 410	Solo	Iporanga, SP
IBCB 350	Solo	Valparaíso, SP
IBCB 353	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Valparaíso, SP
IBCB 384	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Sertãozinho, SP
IBCB 364	<i>Anthonomus grandis</i>	Araras, SP
IBCB 177	Solo	Cascavel, PR
IBCB 425	Solo	Iporanga, SP
IBCB 418	Solo	Iporanga, SP
IBCB 59	cigarrinha de pastagem	Alagoas, MG
IBCB 156	Solo	Cascavel, PR
IBCB 333	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Valparaíso, SP
IBCB 351	Solo	Guariba, SP
IBCB 391	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Tabapuã, SP
IBCB 52	cigarrinha de pastagem	Conquista, MG

Os isolados foram produzidos em placas com meio BDA (Batata-dextrose-ágar) e revigorados em larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Linnaeus, 1758), e posteriormente reinoculados em placas com meio de cultura BDA, e incubados durante 20 dias em estufa tipo B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 20 dias de cultivo, os conídios da superfície das colônias foram transferidos para tubos contendo solução de Tween 80[®] 0,1% e a suspensão foi padronizada em $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. Foram realizados testes de viabilidade de acordo com a metodologia de Francisco et al. (2006). Só foram utilizados para inoculação nos os testes quando a viabilidade dos conídios foi superior a 90%.

4.1.3 Virulência de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para adultos de *Sphenophorus levis*

Foram feitas suspensões dos fungos, com o volume de 50 mL, padronizadas a $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. Grupos de 10 insetos foram imersos por 60 segundos na suspensão, em um béquer com capacidade de volume de 250 mL. Posteriormente, foram individualizados em placas de polipropileno (6,0 x 2,0 cm) e mantidos em jejum por 24 horas. Após esse período foi fornecido um tolete de cana-de-açúcar de 1,0 cm para cada inseto (Figura 2). Os toletes foram trocados a cada sete dias.

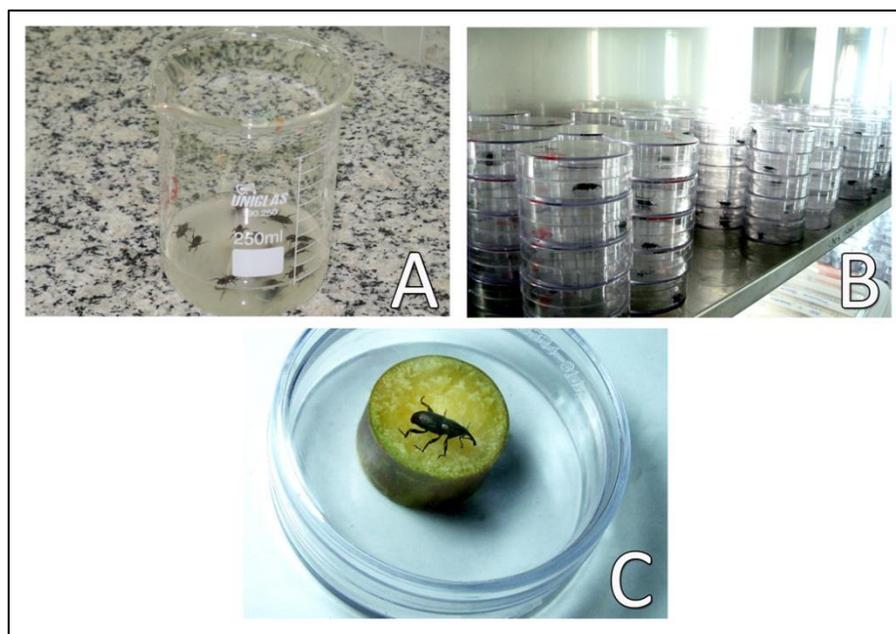


Figura 2: Seleção de fungos entomopatogênicos para adultos de *Sphenophorus levis*: A) Imersão do inseto em 50 mL da suspensão; B) Individualização dos insetos em placas de polipropileno; C) Após 24h de jejum, oferecimento de tolete de cana-de-açúcar.

A avaliação da mortalidade ocorreu sete e 14 dias após a aplicação do fungo, e os insetos mortos foram mantidos em câmara úmida, por um período adicional de mais 12 dias, para confirmar a mortalidade, caracterizada pela extrusão do patógeno.

4.1.4 Delineamento experimental e análise estatística

Os ensaios foram organizados segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com grupos de 10 insetos por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para execução das análises, foi utilizado o software SASTM versão 9.0 (SAS INSTITUTE, 2000).

4.2 Produção de conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio sólido

Os três melhores isolados selecionados para adultos de *S. levis* foram avaliados quanto à sua produção para utilização em campo, utilizando, como substrato, arroz parboilizado Tipo 1, segundo a metodologia utilizada por Leite et al. (2003). Foram feitas cinco repetições para cada isolado, sendo que cada repetição consistia de um saco com 300 g arroz.

A avaliação foi realizada 12 dias após a inoculação dos conídios, retirando-se três amostras de 1 grama de cada saco. Cada amostra foi suspensa em solução de Tween 80[®] 0,1%, passando por 3 diluições seriadas de 1:9 mL. A contagem foi feita em microscópio, com auxílio de câmara de Neubauer.

4.3 Uso combinado contra larvas de *Sphenophorus levis*.

Avaliou-se, em condições de laboratório, o uso de fungo entomopatogênico em combinação com um nematoide entomopatogênico. Os tratamentos aplicados foram:

1. *B. bassiana* a $1,0 \times 10^8$ conídios/mL;
2. *S. brazilense* na concentração de 3,0 JI/cm² (230 JI/inseto);
3. *B. bassiana* + *S. brazilense*, nas mesmas concentrações acima;
4. Testemunha (Tween 80[®] 0,1%).

4.3.1 Obtenção de larvas de *Sphenophorus levis*

Foram utilizadas larvas de 25 dias *S. levis*, provenientes de criação sob dieta artificial em laboratório, mantida no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), no município de Piracicaba, SP.

4.3.2 Fungo entomopatogênico

O fungo utilizado foi *B. bassiana*, isolado IBCB 170 de *B. bassiana*, selecionado anteriormente para adultos de *S. levis*. O isolado foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura de batata-dextrose-ágar (BDA). Em seguida, as placas foram incubadas durante 15 dias em estufa tipo BOD a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, e após esse período foram preparadas suspensões fúngicas em solução de Tween 80[®] 0,1%, nas concentrações $1,0 \times 10^8$ com/mL. Foram aplicados 5 mL de suspensão por repetição, pulverizando a superfície do solo com um total de 5×10^8 conídios.

Foram realizados testes de viabilidade de acordo com a metodologia de Francisco et al. (2006).

4.3.3 Nematóide entomopatogênico

Foi utilizado o produto Bio Nep[®], que consiste do nematóide *S. brazilense* isolado IBCB n6, produzido “in vitro” pelo processo da esponja segundo Bedding (1981), pela empresa Biocontrole, localizada em Indaiatuba, SP. A aplicação foi feita em suspensão aquosa com o auxílio de pulverizador manual, aplicando 5 mL por repetição, o equivalente a 230 JI/inseto. A pulverização foi realizada manualmente, a 10 cm da superfície do solo, atingindo toda a área superficial.

4.3.4 Instalação e avaliação do experimento

A suspensão contendo a mistura de *S. brazilense* + *B. bassiana* foi preparada e homogeneizada 5 minutos antes da aplicação, realizada com auxílio de pulverizador manual, da mesma metodologia e volume de aplicação que os outros tratamentos.

Toletes de cana-de-açúcar, com comprimento de aproximadamente 8,0 cm e com 4,0 cm de diâmetro, foram artificialmente infestados com larvas de 25 dias de idade. Com o auxílio de furadeira elétrica, foram feitas perfurações de 1,5 cm de profundidade, inserindo uma larva por tolete e fechando o orifício com areia fina umedecida a 10%. Em cada pote de 1000 mL de volume e 154 cm^2 de área, dois toletes infestados foram semienterrados verticalmente a uma profundidade de 5 cm em solo arenoso umedecido a 10% (Figura 3).

Cada repetição consistiu em cinco potes plásticos, cada um contendo dois toletes de cana-de-açúcar infestados com o inseto.



Figura 3. Etapas da infestação artificial de toletes de cana-de-açúcar com larvas de *Sphenophorus levis*. A) Toletes de cana cortados a 8,0 cm; B) Perfuração com auxílio de furadeira elétrica; C) Infestação com uma larva de *S. levis* por colmo de cana-de-açúcar; D) Toletes semienterrados em potes plásticos contendo 800 g de areia fina umedecida a 10%.

A mortalidade foi avaliada sete dias após a aplicação pela abertura dos toletes e localização das larvas nas galerias. Para a confirmação da mortalidade, as larvas mortas foram transferidas para câmaras úmidas, que consistem em placas de Petri contendo algodão umedecido e mantidas à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotofase de 12h, durante 7 dias.

4.3.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os ensaios foram organizados segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com grupos de 10 insetos por repetição e cinco repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para execução das análises, foi utilizado o software SASTM versão 9.0 (SAS INSTITUTE, 2000).

Determinou-se o tipo de interação (sinérgico, aditivo ou antagônico) entre nematoide e fungo entomopatogênico utilizando um procedimento originalmente descrito por Finney (1964) e modificado por McVay et al. (1977). A mortalidade proporcional esperada M_E para a combinação nematoide + fungo foi calculada por $M_E = M_{Nema} + M_{Fungo} (1 - M_{Nema})$, onde M_{Nema} e M_{Fungo} são, respectivamente, as mortalidades proporcionais observadas causadas pelo nematoide e pelo fungo aplicados isoladamente. O resultado obtido foi calculado em um teste de χ^2 obtido por $\chi^2 = (M_{NemaFungo} - M_E)^2 / M_E$, onde $M_{NemaFungo}$ é a mortalidade observada no tratamento de combinação nematoide + fungo. O resultado foi comparado ao valor da tabela do χ^2 para 1 grau de liberdade e 95% de confiança. Se o valor de χ^2 é inferior ao da tabela, a interação é considerada como aditiva; se o valor supera o da tabela, a relação é significativa (antagonista ou sinérgica). Se a diferença $M_{NemaFungo} - M_E = D$ possuir um valor positivo, a interação é sinérgica, e se D possuir um valor negativo, a interação é considerada antagonista.

4.4 Uso combinado contra adultos de *Sphenophorus levis*

Avaliou-se em laboratório o uso combinado de fungos e nematoides entomopatogênicos contra adultos do bicudo-da-cana-de-açúcar. Os tratamentos foram:

1. *B. bassiana* 1×10^8 con./mL
2. *M. anisopliae* $1,10^8$ con./mL
3. *S. brasilense* 15 JI/inseto
4. *S. brasilense* + *B. bassiana*, nas mesmas concentrações acima
5. *S. brasilense* + *M. anisopliae*, nas mesmas concentrações acima
6. Testemunha (Tween 80[®] 0,1%)

4.4.1 Obtenção dos insetos adultos

Os insetos foram obtidos através de uma coleta em campo, realizadas na Usina Maluf, no município de Santo Antônio de Posse, São Paulo, durante mês de maio de 2012. Foram feitas iscas com colmos de cana-de-açúcar cortados transversalmente, colocados com a face interna em contato com o solo e cobertos com folhagem. Após cinco dias as iscas foram recolhidas e os adultos levados ao laboratório.

Os adultos passaram por um período de quarentena, sendo mantidos em caixas de polipropileno de 5 Litros de volume. Colmos de 10 cm de cana-de-açúcar foram oferecidos como dieta, sendo substituídos a cada sete dias.

4.4.2 Fungos entomopatogênicos

Os isolados utilizados foram o IBCB 383 de *M. anisopliae*, e o IBCB 170 de *B. bassiana*, selecionados anteriormente para adultos de *S. levis*.

Estes foram revigorados utilizando-se adultos de *S. levis*, e posteriormente inoculados em placas contendo meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar), e incubados durante 20 dias em estufa tipo B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após este período foram preparadas suspensões fúngicas em solução de Tween 80 0,1%, padronizadas em $1,0 \times 10^8$ conídios/mL. A aplicação foi feita em suspensão aquosa com o auxílio de torre de Potter, regulada a 15 lb/pol². Foram realizados testes de viabilidade de acordo com a metodologia de FRANCISCO et al. (2006).

4.4.3 Nematóide entomopatogênico

O nematóide *S. brazilense* isolado IBCB n6 foi produzido “in vitro” pelo processo da esponja segundo Bedding (1981), pela empresa Biocontrole, localizada em Indaiatuba, SP. A concentração utilizada foi de 1×10^8 JI/ha, ou 1 JI/cm² e a aplicação foi feita em suspensão aquosa com o auxílio de torre de Potter, regulada a 15 lb/pol².

4.4.4 Instalação e avaliação do experimento

Cinco adultos de *S. levis* foram colocados por pote plástico, contendo 300 g de areia tipo fina lavada, umedecido a 10%. Os adultos foram colocados 24 horas antes da aplicação para aclimatação.

A aplicação dos nematoides e dos fungos entomopatogênicos foi feita em suspensão de Tween 80[®] 0,1%, aplicando-se em cada pote 5,0 ml de suspensão sobre o solo. A suspensão contendo a mistura de nematoide + fungo entomopatogênico foi preparada 5 minutos antes da aplicação, sendo homogeneizada e aplicada através de torre de Potter, com 15 lb/pol² de pressão, da mesma maneira que os outros tratamentos.

A avaliação da mortalidade foi realizada 14 dias após a aplicação dos entomopatógenos. Os insetos mortos foram mantidos em placas contendo papel filtro umedecidos, para confirmação da mortalidade por fungos ou nematoides. Foi considerada mortalidade confirmada por fungos quando houve extrusão do patógeno, e por nematoides quando se observou a saída de juvenis infectivos pelo cadáver do inseto.

4.4.5 Delineamento experimental e análise estatística

Os ensaios foram organizados segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com grupos de cinco insetos por repetição e cinco repetições por tratamento. Os experimentos foram feitos duas vezes. Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para execução das análises, foi utilizado o software SAS[™] versão 9.0 (SAS Institute, 2000).

Determinou-se o tipo de interação (sinérgico, aditivo ou antagônico) entre os nematoides e fungos entomopatogênicos utilizando um procedimento originalmente descrito por FINNEY (1964) e modificado por MCVAY et al. (1977).

4.5 Experimentos de campo

Os experimentos de campo foram realizados na Usina São Luiz, no município de Ourinhos, SP. A área possuía cana-de-açúcar de quarto corte, e é infestada naturalmente por *S. levis* (Figura 4). Dois talhões foram utilizados nos experimentos, com área total de 16200 m² para cada experimento. Os ensaios foram instalados no mês de dezembro de 2013 e a colheita foi realizada no mês de outubro de 2014.



Figura 4. Área do experimento. Latitude 22°53'32''; Longitude 49°42'17''; altitude 454,04 m.

Os tratamentos aplicados foram:

- 1) *B. bassiana* 10 Kg/ha
- 2) *S. brasilense* 10⁸ JI/ha
- 3) *B. bassiana* 10 kg/ha + *S. brasilense* 10⁸ JI/ha
- 4) Inseticida químico Regent Duo[®]
- 5) Testemunha

O fungo utilizado foi *Beauveria bassiana* isolado IBCB 170, proveniente do Banco de Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu”, mantido no Centro Experimental do Instituto Biológico, localizado no município de Campinas, SP. O fungo foi

revigorado em adultos de *S. levis* e posteriormente produzido em arroz, de acordo com a metodologia utilizada por Leite et al. (2003).

Foi utilizado o produto Bio NEP[®], a base do nematoide *S. brazilense* isolado IBCB n6, produzido pela empresa Bio Controle, através do método de Bedding (1982), que consiste da produção em esponja embebida com meio de cultura à base de proteína animal.

Foram utilizados 10 Kg de fungo por hectare, na concentração de $1,0 \times 10^9$ con./g de arroz. Os nematoides foram aplicados na concentração de $1,0 \times 10^8$ /ha.

Para aplicação dos agentes foi usado trator com disco abrindo um sulco de 10 cm de profundidade na linha de plantio e aplicação simultânea, inoculando os produtos no subsolo (Figura 5). Foi utilizado um volume de calda de 50 Litros para cada tratamento. A instalação do primeiro experimento foi realizada dia 04/12/13 e a do segundo experimento no dia 11/12/13. O croqui experimental utilizado está detalhado na Figura 6.



Figura 5: Detalhe do disco e do bico aplicador.

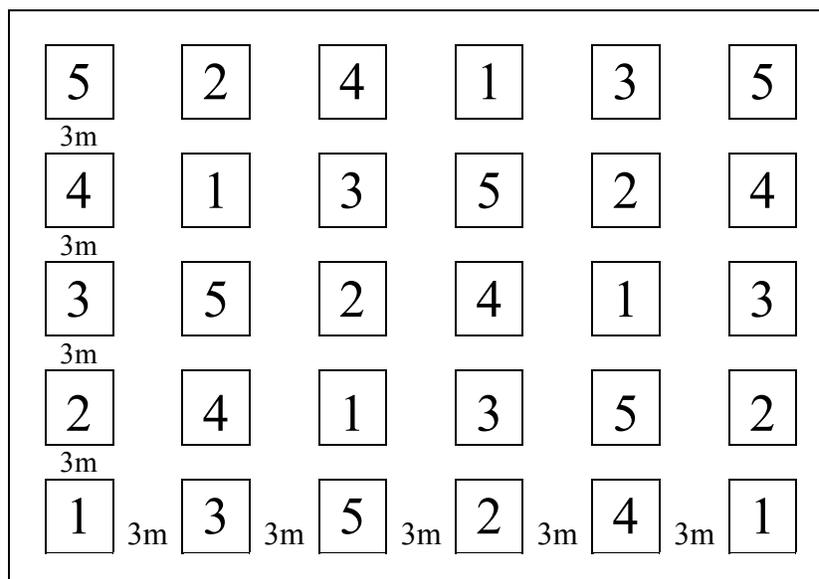


Figura 6. Croqui experimental

4.5.1 Avaliação da presença de nematoides e fungos nativos

Foi realizada uma pré-avaliação para verificar a presença de fungos e nematoides nativos da área do experimento. Foram retiradas amostras de 4 Kg de solo de cada parcela, posteriormente levadas ao laboratório. Em cada amostra foi adicionado 200 mL de água, e inseridos dois envelopes metálicos, contendo em cada um 5 larvas de *G. mellonella*. Após 5 dias os envelopes foram retirados e a mortalidade das larvas foi avaliada.

4.5.2 Avaliações de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* em amostras de solo

Foram coletadas duas amostras de 4 Kg de solo por parcela. Cada amostra consistiu de duas sub-amostras de 2 kg cada, retiradas de dois pontos diferentes dentro da parcela. Ao todo, foram feitas 12 amostras de solo por tratamento. As amostras para avaliação foram coletadas em dois tempos: uma semana e um mês após a aplicação do experimento, nos dois experimentos de campo.

Foram adicionados 200 mL de água a cada amostra, e inseridos dois envelopes metálicos contendo 5 larvas de *G. mellonella*. Após cinco dias da inserção das armadilhas, estas foram retiradas, sendo a mortalidade das larvas avaliada.

No laboratório, cada uma das amostras foi umedecida com 200 mL de água e foram inseridas duas armadilhas metálicas por amostra, contendo cinco larvas de *G. mellonella*. Após cinco dias, as armadilhas foram retiradas e foi verificada a mortalidade, separando as larvas por coloração para detectar a presença de *Heterorhabditis* sp. ou *Steinernema* sp. As larvas mortas foram transferidas para armadilha de White e após sete dias os juvenis infectivos coletados foram submetidos ao processo de *cross-breeding*, onde foi comprovada a mortalidade pelo nematoide que foi aplicado. Todo o ensaio foi repetido por duas vezes.

As larvas que não sofreram mortalidade por nematoides, após os primeiros cinco dias, foram acondicionadas em placas de Petri com algodão umedecido, e mantido por mais 10 dias em estufa tipo B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, para verificar se ocorreria mortalidade pelo fungo entomopatogênico *B. bassiana*.

Foram realizados dois experimentos com cinco tratamentos e seis repetições cada, sob o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). As parcelas possuíam 540 m^2 ($18 \times 30 \text{ m}^2$), uma área de 32400 m^2 por tratamento. Cada experimento possuiu uma área total de 16200 m^2 .

Após as avaliações, foi realizada a média da mortalidade das larvas de ambos os experimentos. Sendo assim, os dados finais consistindo de 5 tratamentos e 6 repetições, foram dispostos em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Duncan a 1% de probabilidade. Para execução das análises, foi utilizado o software SASTM versão 9.0 (SAS INSTITUTE, 2000).

Determinou-se o tipo de interação (sinérgico, aditivo ou antagonista) entre os nematoides e fungos entomopatogênicos utilizando um procedimento originalmente descrito por Finney (1964) e modificado por McVay et al. (1977).

4.5.3 Avaliação da infestação de larvas de *Sphenophorus levis* no rizoma da cana-de-açúcar

Foi realizada avaliação da infestação do rizoma (ou touceira) da cana-de-açúcar da área do experimento, naturalmente infestadas com larvas de *S. levis*. As avaliações foram realizadas antes da aplicação (03/12/2013) e 12 meses após a aplicação dos agentes (02/12/2014). As touceiras das plantas foram retiradas pela abertura de trincheiras (0,5 m de comprimento x 1,0 m de largura x com 0,5 m de profundidade). Após a retirada da touceira, estas foram abertas e examinadas para realizar a busca por larvas de *S. levis*. Foram retiradas as touceiras de quatro plantas, escolhidas ao acaso, de cada parcela do experimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para controle de adultos de *Sphenophorus levis*

5.1.1 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*

Todos os isolados foram patogênicos contra adultos do bicudo-da-cana-de-açúcar. As mortalidades observadas variaram de 80 a 38%, apresentando diferenças estatísticas entre si, enquanto a testemunha apresentou mortalidade de 4%. O mais alto valor de mortalidade foi atingido com o isolado IBCB 170, seguido pelos resultados obtidos com os isolados IBCB 81 e IBCB 82. Todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha, com exceção de IBCB 206 e IBCB 66 (Tabela 3).

Tabela 3. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para controle de adultos de *Sphenophorus levis*.

Isolado	Mortalidade confirmada (%) + E.P.	Hospedeiro original	Local de coleta
IBCB 170	80,00 ± 0,00 a	Solo	Iracemópolis, SP
IBCB 81	64,00 ± 9,27 ab	Solo	Casvavel, PR
IBCB 82	64,00 ± 10,29 ab	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Goiânia, GO
IBCB 35	60,00 ± 5,47 ab	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Cruz das Almas, BA
IBCB 241	58,00 ± 5,83 ab	<i>Oryzophagus oryzae</i>	Pindamonhangaba, SP
IBCB 246	56,00 ± 7,48 ab	<i>Hypothenemus hampei</i>	Taubaté, SP
IBCB 67	52,00 4,89 ab	<i>Hypothenemus hampei</i>	São José do Rio Pardo, SP
IBCB 102	50,00 ± 10,48 ab	Solo	Cosmópolis, SP
IBCB 28	48,00 ± 8,00 ab	<i>Cosmopolites sordidus</i>	Miracatu, SP
IBCB 276	48,00 ± 7,34 ab	Solo	Ribeirão Preto, SP
IBCB 31	48,00 ± 10,67 ab	<i>Nezara viridula</i>	Piracicaba, SP
IBCB 18	46,00 ± 8,12 ab	<i>Hypothenemus hampei</i>	Tapiratiba, SP
IBCB 239	46,00 ± 9,27 ab	<i>Hypothenemus hampei</i>	Campinas, SP
IBCB 206	38,00 ± 8,60 bc	Solo	Ribeirão Preto, SP
IBCB 66	38,00 ± 3,74 bc	<i>Hypothenemus hampei</i>	São José do Rio Pardo, SP
Testemunha	4,00 ± 4,00 c	–	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. E.P.: Erro padrão;

Não existem muitos trabalhos na literatura selecionando fungos entomopatogênicos para o bicudo-da-cana-de-açúcar, mas existem trabalhos utilizando isolados fúngicos contra insetos da família Dryophthoridae.

Não foi encontrada relação da mortalidade aferida com o hospedeiro original, semelhante ao que foi observado por Almeida et al. (2009), selecionando isolados de *B. bassiana* para *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Dryophthoridae). O mesmo fato também foi relatado por Batista Filho et al. (1989), também selecionando isolados de *B. bassiana* para controle de *C. sordidus*.

Em um dos poucos trabalhos publicados sobre patogenicidade de fungos entomopatogênicos contra *S. levis*, Badilla; Alves (1991) avaliaram em condições de laboratório (T: 26 ± 0,5°C, UR: 70% e fotofase de 12 horas) a mortalidade, o tempo letal e o número de conídios por adultos provenientes de campo, quando inoculados com diferentes isolados do fungo *B. bassiana*. O isolado 447, procedente de Cuiabá-MS, com hospedeiro

original *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), teve maiores percentuais de eficiência em todos os parâmetros avaliados. Já em condições de campo, utilizando toletes de cana (25 cm de comprimento) impregnados com o fungo, na concentração de $4,9 \times 10^{11}$ conídios por tolete, ocasionou 92,3% de mortalidade. Apesar de apresentar eficiência, a grande demanda de mão-de-obra torna esse método não aplicável a grandes áreas de plantio.

Os resultados obtidos neste experimento com o isolado IBCB 66 (38%) se assemelham aos obtidos em experimentos contra *C. sordidus* (BATISTA FILHO et al., 1991; BATISTA FILHO et al., 1995, BATISTA FILHO et al., 1996), apresentando valores médios de 40% de mortalidade confirmada. Resultados superiores foram obtidos por Jordão et al. (1999), em experimentos de seleção de isolados de *B. bassiana* contra *C. sordidus*, o isolado em questão causou 45% de mortalidade da broca.

Nussenbaum; Lecuona (2012) selecionaram alguns isolados de *B. bassiana* contra o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae). Não houve patogenicidade da maior parte dos isolados avaliados, mas com o isolado Bb 301, isolado originalmente de *Dyscinetus hidrophilides* (Coleoptera: Scarabaeidae), o autor obteve 92% de mortalidade. Diferentemente do atual experimento, foi observado maior virulência com os isolados de *M. anisopliae*.

A variabilidade dos isolados utilizados neste trabalho foi grande, promovendo mortalidades que variaram de 38 a 80%, o que ratifica a necessidade de uma seleção de isolados apropriada de isolados previamente aos testes de campo. Essa variação na virulência também foi observada em trabalhos de Domingues da Silva (2001), que selecionou 12 isolados de *B. bassiana* de diferentes origens para controle de *A. grandis*, obtendo valores de mortalidade que variaram entre 15% a 83%. A diferença de mortalidade dos adultos causada pelo entomopatógeno é observada com frequência em ensaios de seleção, podendo estar associada com a variabilidade genética existente na espécie *B. bassiana*, com a baixa virulência do isolado e com a especificidade e tolerância ao hospedeiro (ALVES, 1998).

O isolado IBCB 170 foi o mais virulento contra adultos de *S. levis*, diferindo estatisticamente dos demais, sendo o mais indicado para utilização em campo.

6.1.2 Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae*

Dentre os quinze isolados de *M. anisopliae* avaliados, todos foram patogênicos para adultos de *S. levis*. Os valores de mortalidade oscilaram de 36 a 72% (Tabela 4). A maior mortalidade foi causada pelo isolado IBCB 383, proveniente de Araras, São Paulo, originalmente encontrado parasitando a cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*.

Tabela 4. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* para controle de adultos de *Sphenophorus levis*.

Isolado	Mortalidade confirmada (%) + E.P.	Hospedeiro original	Local de coleta
IBCB 383	72,00 ± 8,60 a	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Araras, SP
IBCB 410	68,00 ± 9,69 a	Solo	Iporanga, SP
IBCB 350	68,00 ± 5,83 a	Solo	Valparaíso, SP
IBCB 353	68,00 ± 6,63 a	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Valparaíso, SP
IBCB 384	68,00 ± 7,35 a	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Sertãozinho, SP
IBCB 364	66,00 ± 9,80 a	<i>Anthonomus grandis</i>	Araras, SP
IBCB 177	66,00 ± 5,09 a	Solo	Cascavel, PR
IBCB 425	54,00 ± 9,27 a	Solo	Iporanga, SP
IBCB 418	52,00 ± 8,60 a	Solo	Iporanga, SP
IBCB 59	50,00 ± 4,47 a	cigarrinha de pastagem	Alagoas, MG
IBCB 156	46,00 ± 8,12 ab	Solo	Cascavel, PR
IBCB 333	42,00 ± 7,35 ab	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Valparaíso, SP
IBCB 351	36,00 ± 2,44 ab	<i>Solo</i>	Guariba, SP
IBCB 391	36,00 ± 4,00 ab	<i>Mahanarva fimbriolata</i>	Tabapuã, SP
IBCB 52	36,00 ± 15,36 ab	cigarrinha de pastagem	Conquista, MG
Testemunha	9,20 ± 3,14 b	-	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

E.P.: Erro padrão;

Semelhante ao observado na seleção de isolados de *B. bassiana*, o melhor isolado encontrado não foi aquele originalmente isolado de um hospedeiro da mesma família de *S. levis*. O mesmo fato foi observado por Fernandes et al. (2011), quando não encontrou diferenças estatísticas na mortalidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) entre isolados originados do mesmo hospedeiro e de outras ordens de artrópodes. A gama de hospedeiros que um isolado pode infectar com sucesso é determinada

por fatores temporais e espaciais, bem como por interações fisiológicas (CASTRILLO et al., 2005).

Contra o bicudo-do-algodoeiro, *A. grandis*, os autores Nussenbaum; Lecuona (2012) avaliaram a patogenicidade de 28 isolados de *M. anisopliae*, imergindo adultos durante 15 segundos em uma suspensão de conídios padronizados a $5,0 \times 10^8$ con./mL. Assim como no presente trabalho, os autores observaram patogenicidade de todos os isolados testados contra o curculionídeo. As mortalidades variaram de 32 a 100%, sendo que 46% dos isolados causaram mortalidades maiores que 90%. Os resultados foram superiores ao dos obtidos no presente estudo, entretanto isso pode ser devido às diferentes metodologias, pois os autores utilizaram uma concentração de conídios cinco vezes maior (5×10^8 /ml), e um período de avaliação mais longo (20 dias).

Na busca por um isolado de *M. anisopliae* para controle do gorgulho-da-ameixa, *Conotrachelus nenuphar* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Curculionidae), Alston et al., (2005) avaliaram 13 isolados do fungo contra larvas do inseto. Sete dias após a aplicação, os isolados ARSEF 23, ARSEF 1187 e ARSEF 2575 destacaram-se, promovendo mortalidades confirmadas superiores a 80%. Os autores ainda avaliaram a aderência de conídios à cutícula da larva, mas não encontraram correlações entre a virulência e a alta capacidade de aderência dos conídios à cutícula. Os valores de mortalidade observados pelo autor são semelhantes aos encontrados no presente trabalho, valendo ressaltar que apesar de utilizarmos uma concentração maior de conídios, o alvo da seleção de isolados para *S. levis* é o inseto adulto, mais resistente à infecção.

Em ensaio semelhante, Fanti; Alves (2013) selecionaram isolados de *M. anisopliae* para o controle de adultos da broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), imergindo adultos em uma suspensão padronizada a $1,0 \times 10^8$ con./mL. Os isolados IBCB 383, IBCB 410 e IBCB 352 de *M. anisopliae* provocaram mortalidades confirmadas de 43, 70 e 93%, enquanto no presente experimento, estes mesmos isolados promoveram mortalidades de 72, 68, 68% de adultos de *S. levis*, respectivamente. Esta variação da patogenicidade é observada com certa frequência em bioensaios de seleção,

podendo estar associada a fatores como baixa virulência do isolado, especificidade e tolerância do hospedeiro (Alves, 1998).

O isolado IBCB 383 de *M. anisopliae* foi selecionado como mais virulento contra adultos de *S. levis*.

5.2 Produção conídios de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meio sólido

Os isolados fúngicos selecionados para adultos de *S. levis* foram avaliados na produção em arroz parboilizado, a fim de obter no término do processo um isolado que obtenha eficiência contra a praga, como também facilidade na produção em maior escala.

5.2.1 Produção de *Beauveria bassiana*

Os testes de produção em arroz, avaliando a produção dos três melhores isolados de cada espécie fúngica mostraram diferenças significativas somente para os isolados de *B. bassiana* (Tabela 5). O melhor desempenho foi observado com o isolado IBCB 170, produzindo $200,95 \times 10^9$ ($2,0 \times 10^{11}$) conídios/grama de arroz parboilizado. Esse isolado também promoveu a maior mortalidade confirmada de adultos de *S. levis*.

Tabela 5. Produção de conídios, por grama de arroz parboilizado, de isolados de *Beauveria bassiana* selecionados para adultos de *Sphenophorus levis*, cultivados a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com ausência de fotofase.

Isolado	Conídios/g de arroz x 10^9 +E.P.	Germinação (%)
IBCB 81	$3,86 \pm 1,38$ b	$94,26 \pm 0,64$ a
IBCB 82	$7,42 \pm 0,45$ b	$96,57 \pm 0,87$ a
IBCB 170	$200,95 \pm 77,76$ a	$96,26 \pm 0,72$ a
Teste F	274,84**	2,79 ^{NS}
C.V. (%)	16,66	1,35

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. E.P.: Erro padrão; **Significativo a 1% de probabilidade; ^{NS} não significativo; C.V. (%): coeficiente de variação.

A conidiogênese promovida pelo isolado (IBCB 170) foi significativamente maior que os outros dois isolados testados, e mostra resultados superiores aos encontrados na literatura. A produção obtida pelo isolado UNIOESTE 04 foi de $8,3 \times 10^8$ con./g de arroz (ROHDE et al., 2006), os autores observaram ainda que apesar do crescimento micelial, houve baixa produção de conídios. Este fato não foi observado no presente experimento com nenhum dos isolados testados.

A produção de conídios dos isolados IBCB 81 e 82 ($3,86$ e $7,42 \times 10^9$ con./g, respectivamente) de arroz são semelhantes aos encontrados na literatura. Zappelini et al. (2005) obtiveram esporulação de $5,0 \times 10^9$ conídios com o isolado IBCB 66 de *B. bassiana*, utilizando o método bifásico de produção. Com o mesmo isolado, o autor alterou o método de produção com a adição de glicerina e extrato de levedura ao substrato, obtendo uma produção de $3,03 \times 10^9$ con./g de arroz (ZAPPELINI et al., 2006).

O teste de produção feito por Neves; Alves (2000) também mostra resultados inferiores na conidiogênese. Os isolados 447 e 760 de *B. bassiana* resultaram em uma produção de respectivos $2,66 \times 10^9$ e $0,12 \times 10^9$ con./g de arroz. Os autores, entretanto, não avaliaram a viabilidade dos conídios.

Almeida et al. (2009) selecionando isolados de *B. bassiana* para o controle de *C. sordidus*, obtiveram resultados de produção inferiores aos obtidos no presente trabalho com o isolado IBCB 170, no entanto os resultados obtidos nos testes de viabilidade de conídios foram semelhantes. A produção dos isolados obtidos pelos autores com IBCB 74, IBCB 87 e IBCB 146 de *B. bassiana* foram $1,27$; $1,19$; e $1,29 \times 10^{10}$ con./g de arroz, com viabilidades de $95,4$; $93,6$; e $93,0\%$ respectivamente.

5.2.2 Produção de *Metarhizium anisopliae*

Nos resultados de produção de conídios e viabilidade dos isolados de *M. anisopliae* não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 6). O isolado IBCB 383 apresentou boa produção, e conferiu maior mortalidade aos adultos de *S. levis* nos ensaios de seleção, sendo assim selecionado para os ensaios de uso

combinado contra adultos em laboratório. A germinação dos conídios se manteve acima de 95% com os três isolados avaliados.

Tabela 6. Produção de conídios, por grama de arroz parboilizado, de isolados de *Beauveria bassiana* selecionados para adultos de *Sphenophorus levis* cultivados a $25\pm 1^\circ\text{C}$, com ausência de fotofase.

Isolado	Conídios/g de arroz x 10^8 + E.P.)	Germinação (%)
IBCB 383	11,25 ± 1,47 a	97,67 ± 1,45 a
IBCB 350	11,67 ± 0,67 a	96,20 ± 1,61 a
IBCB 410	9,50 ± 2,13 a	96,00 ± 1,76 a
Teste F	0,56 ^{NS}	0,32 ^{NS}
C.V. (%)	34,96	2,88

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a % de probabilidade. E.P.: Erro padrão; ^{NS}Não significativo; C.V. (%): coeficiente de variação.

Em experimento semelhante e utilizando um mesmo isolado do presente trabalho, LOUREIRO et al. (2005) avaliou a produção de conídios de *M. anisopliae*. Embora a germinação de conídios tenha sido inferior, variando de $0,86 \times 10^8$ con./g de arroz com o isolado IBCB 482, até $2,22 \times 10^8$ con./g de arroz com o isolado IBCB 410, a germinação de conídios obtidas pela autora também foram superiores a 95%, com exceção do isolado IBCB 482, com 80,33% de conídios viáveis.

Resultados superiores na conidiogênese foram verificados por Neves; Alves (2000), que obtiveram produções de $3,37 \times 10^9$; $1,53 \times 10^9$; e de $1,04 \times 10^9$ con./g de arroz com os isolados ESALQ 1037, E9 e ESALQ 1097 de *M. anisopliae*.

A produção de conídios verificada por SENE et al. (2010) em arroz polido (meio padrão) e arroz vermelho foram semelhantes as observadas neste experimento, com produções de $9,59 \times 10^8$ e $6,92 \times 10^8$ con./g, respectivamente, porém, a viabilidade média observada foi de 84,46% para o substrato arroz polido. Os autores avaliaram a germinação de conídios 12 horas após a inoculação, enquanto no presente experimento o período foi de 15 horas após a inoculação.

Existem relatos de produções inferiores, como descritas por TAKADA (2002), que utilizando a mesma técnica de produção do presente trabalho, obteve rendimento de $2,40 \times 10^8$; $2,32 \times 10^8$; $2,25 \times 10^8$; e $7,0 \times 10^6$ con./g de arroz, para os isolados IBCB 104, IBCB 233, IBCB 103 e E9, respectivamente.

Algumas diferenças encontradas na produção de conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* devem-se a pequenas alterações das condições ambientais, e também à heterogeneidade entre os processos industriais, variedades de arroz, entre outros fatores (ALVES, 1998). Contudo, a produção dos isolados avaliados apresenta resultados positivos, mostrando-se potenciais para produção em maior escala para utilização em campo.

5.3 Uso combinado de fungos entomopatogênicos com o nematoide *Steinernema brazilense* contra larvas de *Sphenophorus levis*

O tratamento com *B. bassiana* promoveu mortalidade confirmada de 3,33% de larvas, enquanto que com o nematoide as mortalidades se elevaram para 60%. O melhor resultado foi obtido pelo uso combinado do fungo *B. bassiana* com o nematoide *S. brazilense*, que mostrou 80% de mortalidade, diferindo estatisticamente da testemunha e do fungo aplicado isoladamente (Figura 7).

As larvas de *S. levis* mostraram alta susceptibilidade ao tratamento com *S. brazilense* e com seu uso combinado com *B. bassiana*. Foi observada uma interação aditiva entre *S. brazilense* e *B. bassiana* (Tabela 7). As mortalidades observadas no tratamento de uso combinado foram exclusivamente causadas por nematoides. O nematoide também demonstrou capacidade de penetrar no colmo de cana-de-açúcar e promover a mortalidade da larva dentro da galeria, feita por ela mesma para alimentação e subsequente pupação (Figura 8).

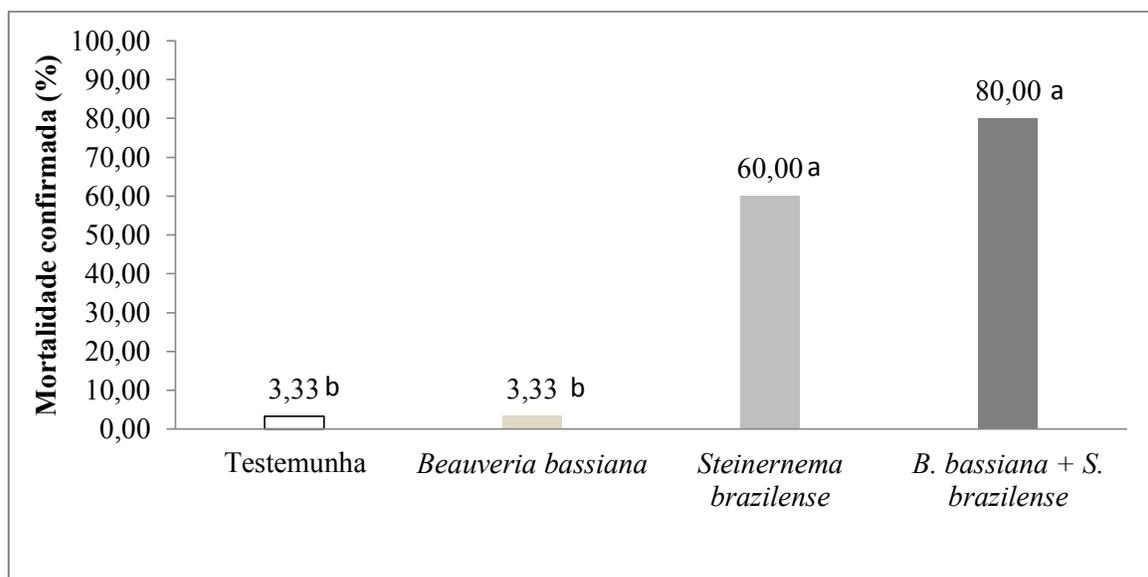


Figura 7. Mortalidade de larvas de *Sphenophorus levis* submetidas a aplicação do nematoide entomopatogênico *Steinernema brazilense* IBCB n6 (230 JI/inseto) e do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* IBCB 170 (1×10^8 con./mL), em tratamentos isolados e de combinação dos agentes.

Tabela 7. Mortalidade de larvas de *Sphenophorus levis* após tratamento com *Beauveria bassiana* e *Steinernema brazilense*, aplicados isoladamente e em combinação; mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h.

Tratamento	Mortalidade observada (%) ¹	Mortalidade esperada (%) ²	χ^2	Interações ³
Testemunha	3,33 b	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>	3,33 b	-	-	-
<i>Steinernema brazilense</i>	60,00 a	-	-	-
<i>B. bassiana + S. brazilense</i>	80,00 a	73,20	0,63	Aditivo

¹Médias de mortalidade seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Mortalidade esperada $M_E = M_{\text{Nema}} + M_{\text{Fungo}} (1 - M_{\text{Nema}})$, onde M_{Nema} e M_{Fungo} são, respectivamente, as mortalidades proporcionais observadas causadas pelo nematoide e pelo fungo aplicados isoladamente.

³Interações baseadas na relação de χ^2 de mortalidade esperada : observada.

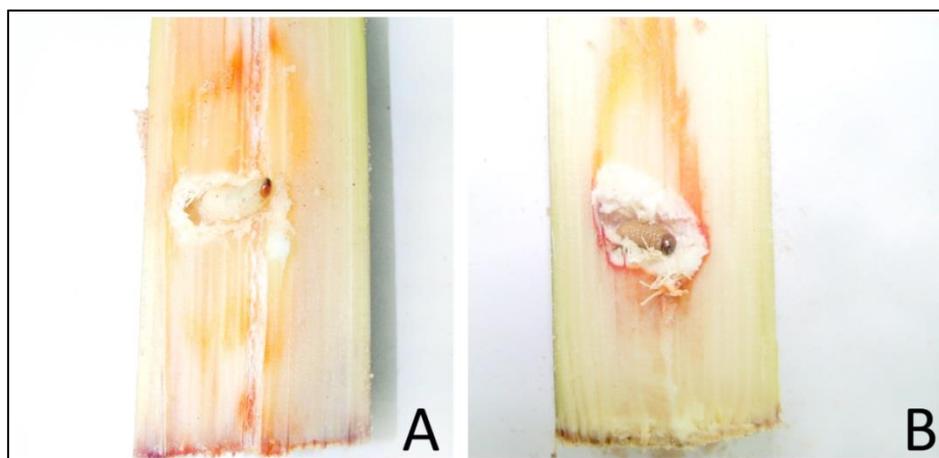


Figura 8. A) Larva do tratamento controle, saudável; B) Larva tratada com uso combinado de *S. brazilense* com *B. bassiana* isolado IBCB 170, apresentando mortalidade causada pelo nematoide.

A capacidade do nematoide localizar o hospedeiro no interior do colmo de cana-de-açúcar também foi relatada por Tavares et al. (2007). Os autores observaram a habilidade dos nematoides *Steinernema* sp. e *Heterorhabditis indica* localizar o hospedeiro, locomovendo-se inicialmente pelo solo até encontrar o orifício no rizoma e, posteriormente, entrar na galeria até localizar o hospedeiro. Essa habilidade também foi verificada por Cabanillas (2003) verificando a virulência do nematoide *S. riobrave* contra larvas de *A. grandis*, onde o entomopatógeno demonstrou grande habilidade para localizar e matar o inseto dentro do capulho.

No presente trabalho a mortalidade de larvas de *S. levis* foi semelhante aos encontrados por Tavares et al, (2007), com os nematoides entomopatogênicos *H. indica* isolado IBCB n5 e *Steinernema* sp. isolado IBCB n6 contra larvas de *S. levis*, em laboratório e casa de vegetação. Avaliaram-se as dosagens de 2,4; 12; e 60 juvenis infectivos por cm². *H. indica* proporcionou mortalidades de 26, 63 e 95% em laboratório e 42, 65 e 85% em casa de vegetação, nas respectivas dosagens. Com *Steinernema* sp., as mortalidades foram de 32, 47 e 42% em laboratório e 69, 73 e 73% em casa-de-vegetação, respectivamente. As mortalidades com *Steinernema* sp. IBCB n6 se assemelham aos resultados do atual experimento, onde foi utilizada a dose de 15 JI/cm², promovendo 60% de mortalidade de larvas de *S. levis*.

O uso combinado do fungo com o nematoide no atual trabalho proporcionou um incremento de 60% para 80% na mortalidade das larvas, mostrando uma interação positiva entre o isolado IBCB 170 de *B. bassiana* e o nematoide entomopatogênico *S. brazilense*. O aumento na mortalidade e a diminuição dos tempos letais nos hospedeiros são comumente relatados em trabalhos de uso combinado de fungos e nematoides entomopatogênicos (BARBERCHECK; KAYA, 1990; ACEVEDO et al., 2007; ANSARI et al., 2008)

Apesar das mortalidades observadas no atual experimento serem exclusivamente promovidas por *S. brazilense*, ensaios de patogenicidade mostraram que nematoides e fungos podem desenvolver-se concomitantemente na hemocele do hospedeiro em diferentes áreas do corpo do inseto durante uma infecção dupla (TARASCO et al., 2011). A eficiência de infecção e desenvolvimento por ambos os entomopatógenos é influenciado pelo meio de cultura da produção, temperatura, umidade, virulência dos agentes e concentrações utilizadas (ACEVEDO et al 2007; ANSARI et al 2004; BARBERCHEK; KAYA, 1990;. JABBOUR et al., 2011; TARASCO et al., 2011).

Em testes com o mesmo fungo entomopatogênico utilizado no atual trabalho, Schulte et al. (2009) observaram que o uso combinado de *B. bassiana* com *S. carpocapsae* contra larvas de *Indarbela dea* (Swinhoe, 1890) (Lepidoptera: Cossidae) foi extremamente eficiente, causando 100% de mortalidade da população em duas semanas, enquanto que os agentes aplicados isoladamente levaram 3 semanas para causar a mesma mortalidade, e no caso de *B. bassiana* somente para estádios mais jovens da larva.

O incremento nas mortalidades com o uso combinado de fungos e nematoides é constantemente relatado, porém Acevedo et al. (2007) ressaltam que o aumento nas mortalidades e redução dos tempos letais, podem ocorrer em detrimento da reprodução dos patógenos. No presente trabalho foi observado aumento nas mortalidades, mas a reprodução dos patógenos não foi avaliada, mas a produção de juvenis infectivos foi observada nos tratamentos somente com nematoide e de aplicação combinada com o fungo.

Ainda segundo Acevedo et al. (2007), o uso de dois isolados virulentos de nematoide e fungo não necessariamente resulta numa morte mais rápida do inseto. Nos resultados observados pelos autores, a combinação de um isolado altamente virulento de nematoide e um medianamente virulento de fungo, resultou numa mortalidade mais rápida. Portanto, seleções cuidadosas dos isolados devem ser feitas anteriormente ao uso em campo, para que não sejam utilizados isolados que apresentem antagonismo.

A interação aditiva observada entre *B. bassiana* IBCB 170 e *S. brazilense* IBCB n6 gera uma oportunidade de reduzir as populações de larva de *S. levis* em campo, e mitigar a aplicação de inseticidas químicos que não apresentam grande eficiência contra a praga. Contudo, testes devem ser realizados para verificar a eficiência dos entomopatógenos em condições de campo, e testar estratégias de aplicação visando incrementar a eficiência do processo.

5.4 Uso combinado de fungos entomopatogênicos com o nematoide *Steinernema brazilense* contra adultos de *Sphenophorus levis*

A aplicação do nematoide *S. brazilense* causou 24% de mortalidade confirmada dos adultos, enquanto o tratamento com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* resultou em 30 e 28% de mortalidade, respectivamente. O uso combinado dos entomopatógenos contra adultos de *S. levis* promoveu efeitos distintos para cada espécie de fungo. A mistura dos agentes *S. brazilense* com *M. anisopliae* não aumentou as mortalidades (28%), enquanto que a mistura com *B. bassiana* incrementou o valor para 40% (Figura 9).

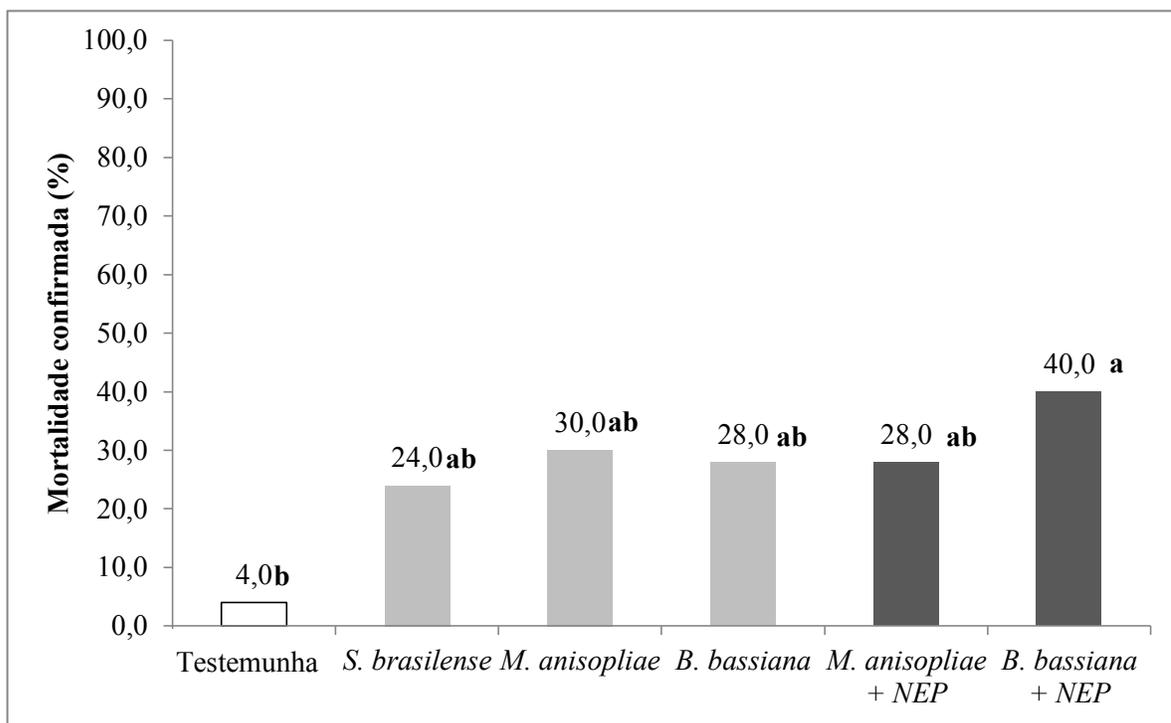


Figura 9. Mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* submetidos a aplicação do nematoide entomopatogênico *Steinernema brasilense* (15 JI/inseto) e do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (1×10^8 con./mL), em tratamentos isolados e de combinação dos agentes.

O tratamento de uso combinado com *B. bassiana*, apesar de não diferir dos outros tratamentos, gerou uma interação de natureza aditiva, que se reproduzido em campo pode acarretar em ganhos expressivos na colheita. O tratamento com *M. anisopliae* não apresentou bom desempenho, acarretando em uma interação antagonista entre os agentes de controle (Tabela 8).

Nos tratamentos de uso combinado dos agentes, as mortalidades dos adultos de *S. levis* foram causadas exclusivamente pelo NEP. Esse fato pode ser devido à rápida colonização do cadáver do inseto pelas bactérias simbiotes do nematoide, impossibilitando o desenvolvimento da infecção fúngica, que levaria mais tempo. Na infecção conjunta de *B. bassiana* com *S. feltiae*, Kaya; Barbercheck (1990), relataram que após 12h da aplicação, a bactéria simbiote *Xenorhabdus* sp. estava presente na hemocele de larvas de *G.*

mellonella, e sua presença tão precoce pode inviabilizar a infecção pelo fungo, que segundo Garcia et al. (2008) levaria cerca de 18 h para iniciar a germinação no corpo do hospedeiro, e 48 horas para iniciar a penetração no tegumento.

Tabela 8. Mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* após tratamento com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Steinernema brazilense*, aplicados isoladamente e em tratamentos de combinação, mantidos a $25\pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h.

Tratamento	Mortalidade observada (%) ¹	Mortalidade esperada (%) ¹	χ^2	Interação ³
Testemunha	4,00 b	-	-	-
<i>Metarhizium anisopliae</i>	30,00 ab	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>	28,00 ab	-	-	-
<i>Steinernema brazilense</i>	24,00 ab	-	-	-
<i>M. anisopliae</i> + <i>S. brazilense</i>	28,00 ab	46,00	7,04	Antagonista
<i>B. bassiana</i> + <i>S. brazilense</i>	40,00 a	45,28	0,62	Aditiva

¹Médias de mortalidade seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

²Mortalidade esperada $M_E = M_{\text{Nema}} + M_{\text{Fungo}} (1 - M_{\text{Nema}})$, onde M_{Nema} e M_{Fungo} são, respectivamente, as mortalidades proporcionais observadas causadas pelo nematoide e pelo fungo aplicados isoladamente.

³Interações baseadas na relação de χ^2 de mortalidade esperada : observada.

Existem avaliações da virulência de NEPs contra o bicudo-da-cana-de-açúcar. Em experimentos de laboratório, Giometti et al. (2011) avaliaram 17 isolados de NEPs contra adultos de *S. levis*. Os selecionados como mais virulentos foram *S. brazilense* IBCB n6, *Heterorhabditis* sp. IBCB n10, *Heterorhabditis* sp. IBCB n24 e *Heterorhabditis* sp. IBCB n44, sendo os únicos que diferiram estatisticamente da testemunha, com 45%, 40%, 31% e 20% de mortalidade na concentração de 240 JI/inseto. Considerando que os autores utilizaram 5 insetos por pote, de raio 7,5 cm, para efeitos de comparação foi feita a conversão da concentração, que seria aproximadamente 7 JI/cm². Os dados mostram semelhanças nas mortalidades encontradas para o isolado IBCB n6. No presente trabalho as mortalidades foram menores, porém com uma dose reduzida, de 1 JI/cm².

O alvo dos trabalhos envolvendo o uso combinado de nematoides e fungos entomopatogênicos, grande maioria, é contra a fase larval de coleópteros, havendo também publicações contra lepidópteros e outras ordens. Entretanto, quando se trata deste tipo

de abordagem envolvendo a eficiência contra adultos, o número de trabalhos realizados é escasso. Os NEPs possuem patogenicidade contra insetos adultos, porém a susceptibilidade é significativamente menor contra esta fase (LEBECK, 1993; TRDAN et al., 2006).

Em experimentos contra larva de *Curculio nucum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae), Batalla-Carrera et al. (2013) avaliaram a mistura dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* com os nematoides *S. carpocapsae* (isolado B14), *S. feltiae* (isolado D114), *Steinernema*. sp. (isolado D122) e *H. bacteriophora* (isolado DG46). Os autores não verificaram efeitos aditivos e sinérgicos, e obtiveram 80% de mortalidade na mistura de *M. anisopliae* com nematoides, mortalidades superiores das observadas para adultos no atual trabalho, mas condizentes com as obtidas contra larvas de *S. levis*.

Resultados semelhantes aos do presente experimento foram observados por Choo et al. (2002) que avaliaram em testes de campo a combinação do nematoide *S. carpocapsae* com *H. bacteriophora* ou *Beauveria brongniartii* contra (Coleoptera: Scarabaeidae) e *Exomala orientalis* (Waterhouse, 1875) (Coleoptera: Scarabaeidae). A combinação das duas espécies de nematoides não apresentou sinergismo, e não aumentou significativamente a eficiência de controle comparado aos nematoides isoladamente, mas a combinação de *S. carpocapsae* com *B. brongniartii* proporcionou uma mortalidade significativamente maior do que o fungo aplicado isoladamente.

Na mistura de *S. brazilense* + *M. anisopliae* foi verificada uma interação antagonista, no presente trabalho. Casos de antagonismo entre nematoides e fungos entomopatogênicos são relatados na literatura. Shapiro-Ilan et al. (2004) relataram antagonismo do fungo quando aplicado com o nematoide *H. indica*, para controle de larvas de *C. caryae*. As mortalidades foram menores para a combinação dos agentes, nas duas concentrações testadas, em relação aos agentes aplicados isoladamente. Houve também antagonismo em uma das concentrações aplicadas na mistura de *B. bassiana* com *S. carpocapsae*. O autor ressalta que compostos liberados pelos fungos podem prejudicar o desenvolvimento da infecção pelas bactérias simbiotes, assim como as bactérias também liberam substâncias que podem prejudicar a infecção fúngica.

Nem sempre a mistura entre *M. anisopliae* e NEPs apresenta interação antagonista. Ao contrário do presente experimento, Ansari (2008) observou efeitos aditivos e sinérgicos de *M. anisopliae* na mistura com os nematoides *S. kraussei*, *S. carpocapsae*, e com *H. bacteriophora*, no controle da larva de *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Curculionidae), misturando o fungo com substrato em sacos de cultivo de morango, e aplicando os NEPs subsequentemente, e após 1 e 2 semanas. O sinergismo foi observado principalmente quando o nematoide foi aplicado 1 e 2 semanas após o fungo, com exceção de *S. kraussei*, que interagiu sinérgicamente somente na aplicação no mesmo dia da aplicação do fungo. Os autores verificaram que diferentes tempos de aplicação podem incrementar as mortalidades, dependendo da espécie utilizada.

Um dos mecanismos que podem gerar interações antagonistas foram esclarecidos por Tarasco et al. (2011). Os autores avaliaram a competição pela hemocele de *G. mellonella*, tratada com *B. bassiana* e *S. ichnusae*. Em seus trabalhos, o fungo e a bactéria foram cultivados em meio líquido e os compostos liberados foram extraídos, esterilizados e liofilizados. A compatibilidade dos compostos liberados foi avaliada. O estudo mostrou que os compostos liberados pelo fungo interferiram no crescimento da bactéria simbiote, do mesmo modo, os compostos produzidos pelas bactérias foram prejudiciais ao crescimento do fungo.

Trabalhos de Chen et al. (1994) comprovaram que compostos liberados pela fase um de *Xernorhabdus nematophilus* (isolados de *S. carpocapsae*), *X. bovienii* (simbiontes de *S. feltiae* e *S. intermedia*) e *Photorhabdus luminescens* (de *H. megidis*) e pela fase dois de *X. nematophilus* possuem atividade antifúngica. Os compostos apresentam atividade microbiana contra diversos fungos, e maior eficiência dos compostos são observados durante a fase um da bactéria.

Apesar de alguns dos compostos envolvidos serem conhecidos, pouco se sabe sobre os fatores que desencadeiam a produção e liberação dos mesmos, que serão essenciais e levarão a uma interação benéfica ou antagonista entre nematoides e fungos entomopatogênicos. Futuros estudos são necessários para compreender a natureza e o gatilho destas interações, e testes de seleção e combinação de isolados devem ser feitos previamente a

utilização em campo, que deve focar em uma estratégia inundativa de aplicação dos agentes de controle.

5.5 Experimentos de campo

5.5.1 Avaliação da presença de nematoides e fungos nativos

A avaliação da mortalidade de *G. mellonella* nas amostras de solo mostrou uma população predominante de *Heterorhabditis* sp., promovendo mortalidades médias de 58,3% das larvas, e se encontrando presente em quase todas as amostras de solo coletadas. Foi observado uma pequena população de *Steinernema* sp. em algumas amostras, que foi responsável por uma mortalidade de 5,0% das larvas de *G. mellonella*. O fungo *Beauveria* sp. nativo da área do experimento promoveu mortalidades de apenas 2,0% das amostras.

A população de Heterorhabditídeos encontrada neste ambiente pode estar ligada a porosidade do solo. Já que a motilidade dos nematoides é reduzida quando a porosidade se torna menor (KAYA, 1990). Levando em conta o solo de textura mais fina, a presença em maior número de indivíduos do gênero *Heterorhabditis* sp. pode estar ligada a este fato, devido aos seus JIs possuírem um tamanho menor que os indivíduos do gênero *Steinernema* sp.

A presença de raízes de plantas pode afetar a distribuição e a infectividade do gênero *Steinernema*. Choo et al. (1989) avaliaram a capacidade de busca de hospedeiros dos nematoides *H. heliothidis* e *S. feltiae* na presença e ausência de raízes de milho. Foi constatado que enquanto *H. heliothidis* promoveu altas mortalidades nos dois casos, *S. feltiae* teve médias de mortalidade reduzidas no tratamento com raízes. Assim como o milho, a cana-de-açúcar se situa na Família Poaceae e possui raízes muito semelhantes, podendo haver essa mesma interferência.

5.5.2 Avaliações de mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* em amostras de solo

O efeito do uso combinado dos agentes foi mais acentuado na primeira semana após a aplicação, sendo observada uma interação sinérgica entre o fungo e o

nematoide entomopatogênico. Na segunda semana, o uso combinado apresentou uma queda na mortalidade, mas ainda apresentando as maiores mortalidades dentre os tratamentos, e mostrando interação aditiva (Tabela 9). Contudo, pode ocorrer uma migração dos nematoides para camadas mais profundas do solo em busca de hospedeiros. Isso poder reduzir consideravelmente o número de JI/cm³ de solo das amostras retiradas, um mês após aplicação.

Tabela 9. Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* expostas a solo de cultivo de cana-de-açúcar, coletado após aplicação mecanizada de *Beauveria bassiana* e *Steinernema brazilense*, isoladamente e em tratamentos de combinação.

Tratamento	Período (após aplicação)	Mortalidade observada (%) ¹	Mortalidade esperada (%) ²	χ^2	Interação ³
Testemunha	1 semana	0,00 c	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>	1 semana	5,83 c	-	-	-
<i>Steinernema brazilense</i>	1 semana	22,92 b	-	-	-
<i>B. bassiana</i> + <i>S. brazilense</i>	1 semana	37,92 a	27,41	4,03	Sinérgico
Testemunha	1 mês	0,00 c	-	-	-
<i>Beauveria bassiana</i>	1 mês	5,83 bc	-	-	-
<i>Steinernema brazilense</i>	1 mês	10,00 b	-	-	-
<i>B. bassiana</i> + <i>S. brazilense</i>	1 mês	20,42 a	15,25	1,75	Aditivo

¹Médias seguidas de mesma letra, dentro do mesmo tempo de aplicação, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Médias de mortalidades originais, mas resultados transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$ [(1 semana após aplicação: F=25,27; C.V.(%): 54,53); (1 mês após aplicação: F=26,02; C.V.(%):48,22.)].

²Mortalidade esperada $M_E = M_{Nema} + M_{Fungo} (1 - M_{Nema})$, onde M_{Nema} e M_{Fungo} são, respectivamente, as mortalidades proporcionais observadas causadas pelo nematoide e pelo fungo aplicados isoladamente.

³Interações baseadas na relação de χ^2 de mortalidade esperada : observada.

A mortalidade das larvas de *G. mellonella* expostas às amostras de solo coletadas uma semana após a aplicação foi de 22,9% com *S. brazilense*, e 5,8% com *B. bassiana*, aplicados isoladamente. Já com os tratamentos combinados, o nematoide promoveu 20,4% e o fungo 17,5%, totalizando 37,92% no tratamento de uso combinado (Figura 10).

Um mês após aplicação, as mortalidades sofreram uma redução. O nematoide e o fungo aplicados isoladamente promoveram, respectivamente, 10 e 5,8% de mortalidade das larvas. No uso combinado destes agentes, o fungo promoveu 4,2%, enquanto o nematoide promoveu 16,3% de mortalidade, totalizando 20,42% com ambos os agentes (Figura 11).

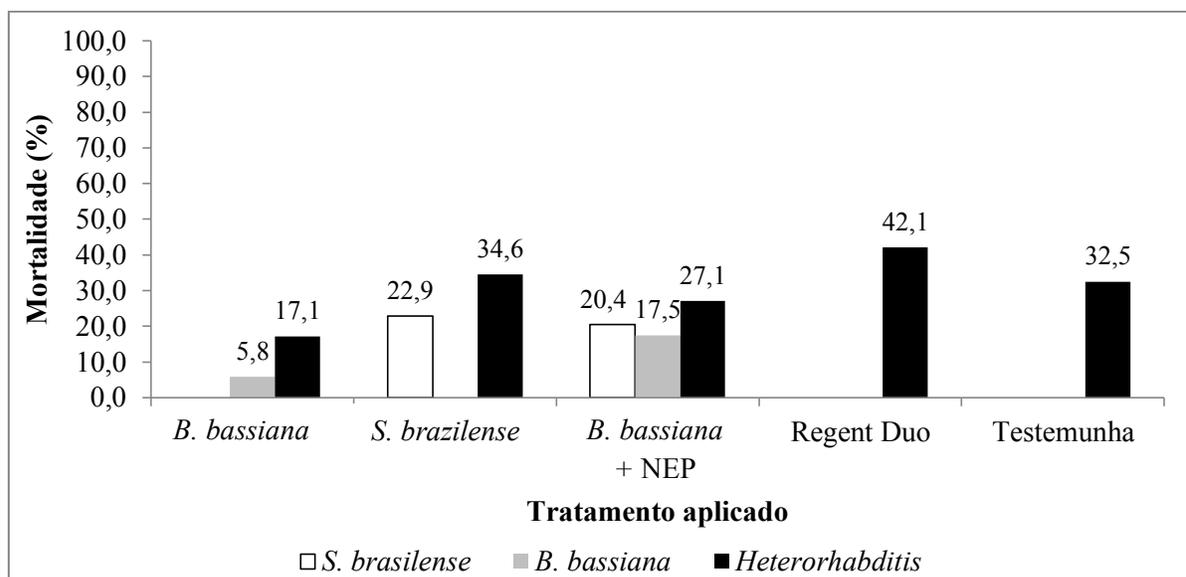


Figura 10: Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* expostas a amostras de solo colhidas do ensaio de campo uma semana após aplicação de *B. bassiana* 10 kg/ha, *S. brasilense* 10⁸ JI/ha, *B. bassiana* 10 kg/ha + *S. brasilense* 10⁸ JI/ha, e Regent Duo[®]. No tratamento testemunha foi aplicado água.

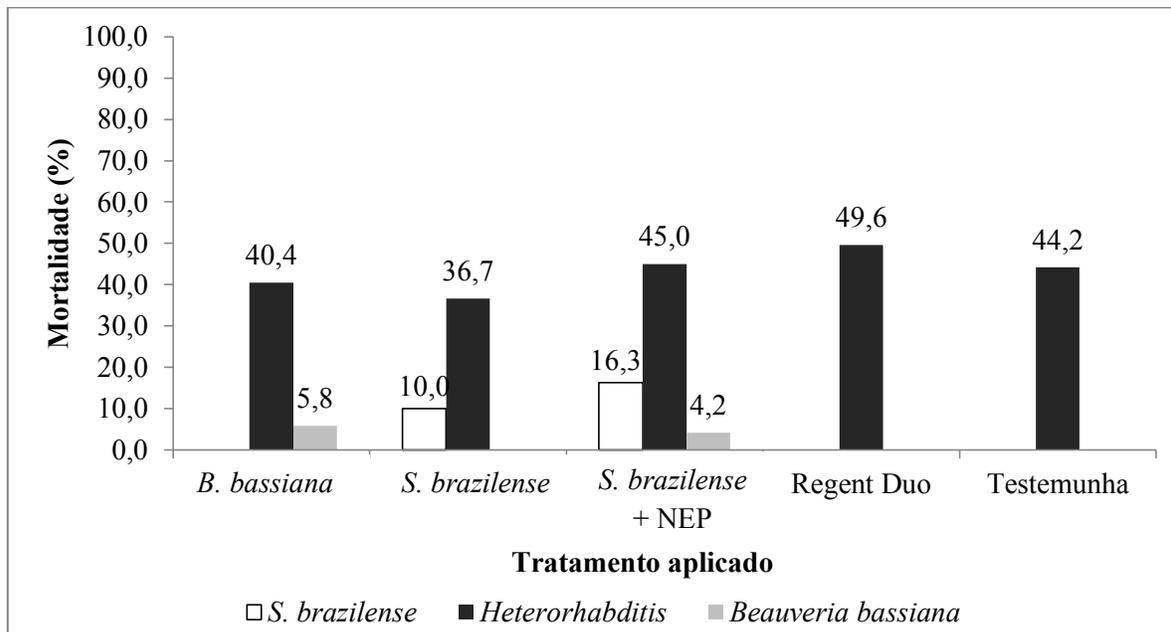


Figura 11: Mortalidade de larvas de *Galleria mellonella* expostas a amostras de solo colhidas do ensaio de campo um mês após aplicação de *B. bassiana* 10 kg/ha, *S. brasilense* 10⁸ JI/ha, *B. bassiana* 10 kg/ha + *S. brasilense* 10⁸ JI/ha, e Regent Duo. No tratamento testemunha foi aplicado água.

Larvas de lepidópteros apresentam alta susceptibilidade ao uso combinado de fungos e nematoides, possuindo vários casos de sucesso relatados. A aplicação de *B. bassiana* e *H. heliothidis* resultou na morte mais rápida de larvas de último instar de *G. mellonella* em trabalhos de Barbercheck; Kaya (1990). Os mesmos autores avaliaram a aplicação combinada de *B. bassiana* com *H. bacteriophora*, observando altos níveis de mortalidade em larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) (BARBERCHECK; KAYA, 1991b). Em ambos os trabalhos, os autores relataram ser uma vantagem se o tratamento for aplicado inundativamente. Apesar de obter-se uma mortalidade maior e mais rápida do hospedeiro, o potencial de reciclagem do nematoide e também da capacidade reprodutiva do fungo foram reduzidos.

Resultados semelhantes contra o mesmo hospedeiro deste experimento foram relatados por Zayed et al. (2003). Os autores testaram a mistura do fungo *B. bassiana* com os NEPs *H. bacteriophora* e *Steinernema* sp. contra o último instar de *G. mellonella*. Duas concentrações foram utilizadas (500 e 1500 JI/mL). No tratamento com *Steinernema* sp. + *B. bassiana*, ambas as concentrações mostraram acréscimos na mortalidade. Assim como no presente experimento, os autores não observaram infecção por ambos os patógenos no mesmo cadáver.

Acevedo et al. (2007) avaliaram os efeitos da infecção conjunta de dois isolados de *M. anisopliae* com *H. bacteriophora*, contra larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). Os autores relataram melhores resultados com a mistura do nematoide com um isolado mediamente virulento. Apesar da mortalidade mais rápida dos hospedeiros, a reprodução dos patógenos foi afetada. Diferentemente do presente ensaio, as mortalidades observadas pelos autores ocorreram apenas por nematoides.

Efeito sinérgico também foi observado sobre larvas de Lepidoptera em trabalho realizado por Schulte et al. (2009), os quais avaliaram a infecção combinada de *B. bassiana* e *S. carpocapsae* contra *I. dea*. Os tratamentos com uso combinado apresentaram resultados superiores aos de aplicação em comparação aos patógenos aplicados isoladamente.

Em ensaios de patogenicidade utilizando larvas de *G. mellonella*, Tarasco et al. (2011) avaliaram a competição na hemocele pelo nematoide *S. ichnusae* aplicado com o fungo *B. bassiana*, sendo os dois isolados do mesmo nicho ecológico. Ao contrário do presente experimento, os autores não observaram efeitos aditivos ou sinérgicos, e relataram antagonismo entre os agentes. Com o método utilizado pelos autores, foi possível observar desenvolvimento de ambos os agentes no mesmo cadáver.

Os mecanismos que levam às interações aditivas ou sinérgicas são incertos, mas é possível que os insetos expostos ao fungo tornem-se mais debilitados e, subsequentemente, são mais susceptíveis ao NEPs. Também se especula que os insetos debilitados passam a aumentar o ritmo respiratório, atraindo os nematoides, devido ao maior gradiente de CO₂ (ANSARI et al., 2008). As observações de mortalidade em larvas de *G. mellonella* inferem um potencial para utilização deste método contra *S. levis*. Em compensação às reduções na reciclagem dos agentes, o uso inundativo proporciona uma mortalidade mais rápida e um incremento significativo na mortalidade dos hospedeiros.

5.5.3 Avaliação da infestação de larvas de *Sphenophorus levis* no rizoma da cana-de-açúcar

O número de larvas por touceira foi reduzido em todos os tratamentos, com exceção da testemunha. A menor infestação foi constatada com o uso do NEP *S. brasiliense*, aplicado isoladamente e em mistura com o fungo *B. bassiana* (0,13 larvas/planta em ambos os tratamentos). No tratamento testemunha houve incremento do número de larvas de 0,46 para 0,50 larvas/planta (Figura 12).

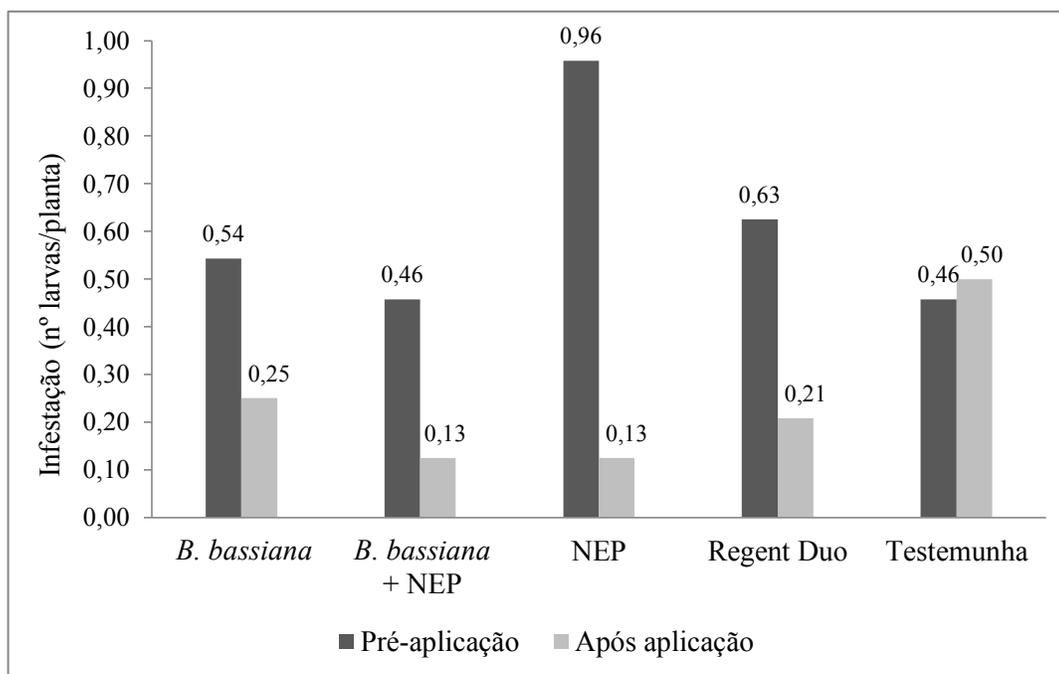


Figura 12. Número de larvas de *Sphenophorus levis* encontradas por planta de cana-de-açúcar naturalmente infestadas pela praga, antes e após aplicação com *Beauveria bassiana*; *B. bassiana* + *Steinernema brazilense*; *S. brazilense*; com o inseticida químico Regent Duo[®]; e testemunha.

O resultado obtido demonstra que pode ter ocorrido o controle das larvas de *S. levis* nas touceiras da cana-de-açúcar, como também pode ter ocorrido o controle de outras fases do ciclo do inseto, e a reciclagem do nematoide no ambiente, reduzindo a população da praga no campo. Em geral, insetos adultos demonstram ser uma importante fonte de inóculo, o que serviria de fonte de para reciclagem e persistência desses agentes no campo (KAYA, 1990).

Trabalhos contra larvas e adultos de *S. levis* foram realizados por Tavares et al. (2009), em condições de laboratório, avaliando a eficiência dos NEPs *H. indica* e *S. brazilense* IBCB n6 (12 JI/cm²) em combinação com o inseticida químico tiametoxan, contra larvas de *S. levis*. Os nematoides aplicados isoladamente ou em mistura promoveram mortalidades do inseto entre 75 a 87,5%, sem diferenças significativas entre esses tratamentos. O resultado indicou não haver nenhuma contribuição na utilização da

mistura com o inseticida químico. Semelhantemente ao presente estudo, as larvas foram reduzidas a infestações semelhantes, tanto no uso combinado com o fungo, como com pela aplicação somente com o NEP.

O presente trabalho é pioneiro no uso combinado de fungos e nematoides contra *S. levis* em campo. Mas existem trabalhos de campo utilizando a combinação do nematoide *S. brazilense* com inseticidas químicos. Trabalhos de Leite et al. (2012) avaliaram os efeitos da aplicação dos NEPs *S. brazilense* e *H. indica*, em combinações com os inseticidas químicos tiametoxam e fipronil, na mortalidade de *S. levis* e do escarabeídeo *Leucothyreus* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae), e na produção de cana-de-açúcar. A aplicação dos nematoides e dos inseticidas químicos incrementaram a produção de cana-de-açúcar, e o nematoide *S. brazilense* foi mais eficiente no controle de *S. levis*, apesar de não diferir estatisticamente de *H. indica*. O uso combinado de *S. brazilense* (10^8 JI/ha, mesma dose utilizada no atual trabalho) com subdoses de fipronil (62,5 g/ha) e tiametoxam (200 g/ha) foi o tratamento mais eficiente no controle de *Leucothyreus* sp.

Nematoides entomopatogênicos vêm sendo utilizados no controle de outros insetos do gênero *Sphenophorus* sp. Pragas de gramados e pastagens, nos EUA e Japão, conhecidas como bicudos-das-gramíneas (GEORGIS; POINAR JR, 1989; KLEIN, 1990; WATSCHKE et al., 1995). Os ínstaes iniciais do período larval destas pragas escavam galerias no caule e rizoma das gramíneas, enquanto os estádios mais maduros alimentam-se dos órgãos subterrâneos, ficando mais expostos aos nematoides, o que proporciona uma grande eficiência da técnica, variando de 70 a 91,2% de controle, numa dose de $2,5 \times 10^9$ JI/ha (SHAPIRO-ILAN et al., 2002), diferentemente com o que ocorre com a larva de *S. levis*. No período larval, todos os ínstaes permanecem no interior do rizoma da cana-de-açúcar, dificultando a procura desse inseto pelo nematoide.

Apesar da maior dificuldade na busca do hospedeiro, os resultados no presente experimento mostram que o NEP foi capaz de encontrar a larva no interior do colmo me laboratório, e reduziu a infestação nas touceiras nos ensaios de campo, não havendo diferenças entre o NEP aplicado isoladamente em relação ao uso combinado com *B. bassiana*.

Por outro lado, mais trabalhos são necessários, objetivando aperfeiçoar a técnica de uso combinado de fungos e nematoides entomopatogênicos contra *S. levis* e outras pragas. Estudos em campo avaliando a produção em áreas aplicadas, efeitos de dosagens e número de aplicações, além do desenvolvimento de outras técnicas de aplicação e tecnologias para a formulação dos agentes devem ser realizados no futuro, para aprimoramento desse tipo de abordagem.

6. CONCLUSÃO

- Os fungos IBCB 383 de *M. anisopliae* IBCB 383 e *B. bassiana* IBCB 170 foram os mais virulentos para adultos de *S. levis*;
- Os fungos IBCB 383 de *M. anisopliae* e IBCB 170 de *B. bassiana* foram selecionados na produção em meio sólido;
- O uso combinado de *B. bassiana* e *S. brazilense* promoveram efeito aditivo na mortalidade de larvas *S. levis*;
- Contra adultos de *S. levis*, o uso combinado de *B. bassiana* e *S. brazilense* promoveu efeito aditivo, enquanto que a combinação de *M. anisopliae* e *S. brazilense* promoveu efeito antagonista;
- Larvas de *G. mellonella* mostraram-se susceptíveis ao fungo *B. bassiana* e ao nematoide *S. brazilense*. Os tratamentos de uso combinado mostraram efeitos sinérgicos e aditivos, uma semana e um mês após aplicação, respectivamente;
- A infestação de larvas de *S. levis* na touceira de cana-de-açúcar foi reduzida com o uso de *B. bassiana*; *S. brazilense*; *B. bassiana* + *S. brazilense*; e com o inseticida químico Regent Duo[®].

7. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J. P. M. et al. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p.187-192, 2007.

ALMEIDA, A. M. B. et al. G. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Cosmopolites sordidus* (GERMAR, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p.489-493, 2009.

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

ALONSO-ZARAZAGA, M. A.; LYAL, C. H. C. **A World catalogue of families and genera of Curculionidae (Insecta: Coleoptera) (Excepting Scolytidae and Platypodidae)**. Barcelona: Entomopraxis S.C.P. Edition, 1999. 315 p.

ALSTON, D. G. et al. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. **Biological Control**, Orlando, v. 35, p. 163-171, 2005.

ALVES, S. B. et al. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 69-110.

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

ANSARI, M. A. et al. Field trials against *Hoplia philantus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 453-459, 2006.

ANSARI, M. A.; SHAH, F. A.; BUTT, T. M. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, control. **Entomologia experimentalis et applicata**, Dordrecht, v. 129, p. 340-347, 2008.

ANSARI, M. A.; SHAH, F. A.; BUTT, T. M. The entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* and *Metarhizium anisopliae* work synergistically in controlling overwintering larvae of the black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in strawberry growbags. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 20, p.99-105, 2010.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 172-180, 2004.

BADILLA, F. F.; ALVES, S. B. Control del picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vauire (Col.: Curculionidae) con *Beauveria bassiana* y *Beauveria brogniartii* en condiciones de laboratorio y campo. **Revista Interamericana de Ciencias Agrícolas**, San Jose, v. 41, n. 2, p. 237-243, 1991.

BARBERCHECK, M. E.; KAYA, H. K. Interactions between *Beauveria bassiana* and the Entomogenous Nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p.225-234, 1990.

BARBERCHECK, M. E.; KAYA, H. K. Effect of host condition and soil texture on host finding by the entomogenous nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 20, n. 2, p. 582-589, 1991a.

BARBERCHECK, M.; KAYA, H. K. Competitive interactions between Entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 20, n. 2, p.707-712, 1991b.

BATALLA-CARRERA, L. et al. Isolation and virulence of entomopathogenic fungi against larvae of hazelnut weevil *Curculio nucum* (Coleoptera: Curculionidae) and the effects of

combining *Metarhizium anisopliae* with entomopathogenic nematodes in the laboratory. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 101-125, 2013. DOI: 10.1080/09583157.2012.741681

BATISTA FILHO, A. et al. Controle de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) por Fipronil e seu Efeito sobre *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 2, p. 47-51, 1996.

BATISTA FILHO, A. et al. Enhanced activity of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. associated with mineral oil against *Cosmopolites sordidus* (Germar) adults. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 405-408, 1995.

BATISTA FILHO, A. et al. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no controle do moleque da bananeira *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 4, p.35-40, 1991.

BATISTA FILHO, A. et al. Virulência de diferentes isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. à *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 56, p. 46, 1989. Suplemento 1.

BEDDING, R. A. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**, Leiden, v. 27, p. 109-114, 1981.

BIOSEV. Louis Dreyfus Commodities Company – Setor Sucroalcooleiro. CIDADE, 2013. Disponível em: <<http://ri.biosev.com>>. Acesso em: 18 ago. 2014.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balço nacional de cana-de-açúcar e agroenergia**. Brasília, DF, 2007. 139 p.

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

CASTRILLO, L. A.; ROBERTS, D. W.; VANDENBERG, J. D. The fungal past, present, and future: germination, ramification, and reproduction. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 89, p. 46-56, 2005.

CHEN, G.; DUMPHY, G. B.; WEBSTER, J. M. Antifungal Activity of Two *Xenorhabdus* Species and *Photorhabdus luminescens*, Bacteria Associated with the Nematodes *Steinernema* Species and *Heterorhabditis megidis*. **Biological Control**, Orlando, v. 4, p. 157-162, 1994.

CHOO, H. Y. et al. Entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp. And *Heterorhabditis bacteriophora*) and a fungus *Beauveria bassiana* for biological control of the White grubs, *Ectinohoplia rufipes* and *Exomala orientalis*, in Korean golf courses. **BioControl**, Dordrecht, v. 47, p.177-192, 2002.

CHOO, H. Y. et al. Entomopathogenic nematodes: host finding ability in the presence of plant roots. **Environmental Entomology**, College Park, Annapolis, v. 18, n. 6, p. 1136-1140, 1989.

COSTA, C.; VANIN S. A.; CASSARI-CHEN, S. A. **Larvas de Coleoptera do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1988. 282 p.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J. **Sugarcane improvement through breeding**. New York: Elsevier, 1987. p. 84.

DEGASPARI, N. et al. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 6, p. 553-558, 1987.

DOMINGUES DA SILVA, C. A. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 243-247, 2001.

FANTI, A. L. P.; ALVES, L. F. A. Isolados de fungos entomopatogênicos visando ao controle da broca da erva-mate (*Hedypathes betulinus*) Klug (Coleoptera: Cerambycidae). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1567-1478, jul./ago., 2013.

FERNANDES, E. K. K.; ANGELO, I. C.; RANGEK, D. E.; BAHIENSE, T. C.; MORAES, A. M.; ROBERTS, D. W.; BITTENCOURT, V. R. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 182, p. 307–318, 2011.

FERRAZ, L. C. C. B. **Nematoides entomopatogênicos**. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 541-570.

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

GARCIA, M. V. et al. Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 855-863, 2008.

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

GEORGIS, R.; POINAR JR, G. O. Field effectiveness of entomophilic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. In: LESLIE, A. R.; METCALF, R. L. (Ed.). **Integrated pest management for turfgrass and ornamentals**. Boca Raton: CRC, 1989. p. 213-224.

GIOMETTI, F. H. C. et al. Virulência de nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.81-86, 2011.

GIRÓN-PÉREZ, K. et al. Atração de curculionídeos de *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) a fragmentos vegetais em diferentes estados de conservação. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 842-846, 2009.

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

GOULART, R. M. et al. Efeito da associação do nematoide *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: Sociedade Entomológica do Brasil, 2004. p. 305.

GÜLTEKIN, L. A New Record Billbug, *Sphenophorus abbreviatus* (F.) (Coleoptera: Curculionoidea: Dryophthoridae) from Turkey. **Journal of the Entomological Research Society**, v. 15, n. 3, p. 37-40, 2013.

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

JABBOUR, R. et al. Entomopathogen biodiversity increases host mortality. **Biological Control**, Oxford, v. 59, p. 277-283, 2011.

JAQUES, R. P.; MORRIS, O. N. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and diferente crops. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. Londres: Academic Press, 1981. p. 695-715.

JORDÃO, A. L. et al. M. Caracterização e Eficiência de Isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Controle de *Cosmopolites sordidus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 107-111, 1999.

KAYA, H. K. Diseases caused by nematodes. In: FUXA, J. R.; TANADA Y. (Ed.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley, 1987. p. 453-470.

KAYA, H. K. Soil ecology. In: GAUGLER, R; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 93-116.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 38, p. 181-206, 1993. DOI: 10.1146/annurev.en.38.010193.001145

KLEIN, M. G. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. In: GAUGLER, R; KAYA, H. K. (Ed.). **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 195-214.

LEBECK, L. M. et al. Host stage suitability of the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 62, n. , p. 58-63, 1993.

LEITE, L. G. et al. Alternativa de controle. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 83, p.30-33, 2006.

LEITE, L. G. et al. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus sp.* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 40-48, jan./mar. 2012.

LEITE, L. G. et al. Processos de produção. In: LEITE, L. G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto, 2003. p. 33-44

LOUREIRO, E. S. et al. Produção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, selecionados para o controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1954). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, SP, v. 72, n. 4, p. 469-472, 2005.

NEVES, P. J.; ALVES, S. B. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Conitermes cumulans*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 4, 2000. DOI: 10.1590/S1516-89132000000400004.

NUSSENBAUM, A. L.; LECUONA, R. E. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato as microbial control agents against the boll weevil

(*Anthonomus grandis*) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 110, p. 1-7, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.01.010

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

PETTIS, J. S. et al. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.

PINTO, A. S.; BOTELHO, P. S. M.; DE OLIVEIRA, H. N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP2, 2009. 108 p.

POINAR JR, G. O. Nematode as facultative parasites of insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 17, p. 103-122. 1972.

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

ROHDE, C. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. E *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 231-240, 2006.

SAN-BLAS, E. Progress on entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980-2010. **Biological Control**, Orlando, v. 66, p. 102-124, 2013.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; TENNEKES, H. A.; GOKA, K. Impact of systemic insecticides on organisms and ecosystems. In: STANISLAV TRDAN, S. (Ed.). **Insecticides: development of safer and more effective technologies**. Rijeka: Intech, 2013. p. 367-416. DOI: 10.5772/52831.

SCHULTE, M. J. et al. Entomopathogens (*Beauveria bassiana* and *Steinernema carpocapsae*) for biological control of bark-feeding moth *Indarbela dea* on field-infested litchi trees. **Pest Management Science**, Sussex, v. 65, n. 1, p.105-112, 2009.

SENE, L. et al. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agrícolas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 449-456, 2010.

SHAMSELDEAN, M. M.; ABD-ELGAWAD, M. M. Natural occurrences of the insect pathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) in Egyptian soils. **Afro-Sasian Journal of Nematology**, Luton, v. 4, n. 2, p. 151-154, 1994.

SHAPIRO-ILAN, D. I. et al. Effects of combining an entomopathogenic fungi or bacterium with entomopathogenic nematodes on mortality of *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, Oxford, v. 30, p. 119-126, 2004.

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**. Wallingford: CAB international, 2002. p. 333-355.

TAKADA, H. M. **Patogenicidade e seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae)**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

TARASCO, E. et al. Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 693-704, 2011.

TAVARES, F. M. et al. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1 p. 12-19, 2007.

TAVARES, F. M. et al. Efeitos sinérgicos de combinações entre nematoides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e inseticidas químicos na mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay**, Piracicaba, v. 4, n. 7, 2009.

TERÁN, 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, DF. **Resumos...** Brasília, DF: Sociedade Entomológica do Brasil, 1983. p. 5.

TRDAN, S.; VIDRIH M.; VALIC, N. Activity of four entomopathogenic nematode species against young adults of *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) under laboratory conditions. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart,, v. 113, n. 4, p. 168-173, 2006.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. Produção de Cana – Brasil. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

WATSCHKE, T. L.; DERNOEDEN, P. H.; SHETLAR, D. J. **Managing turfgrass pests**. Boca Raton: CRC, 1995. 384 p.

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

ZAPPELINI, L. O. et al. Produção de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* a partir do método bifásico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 74, 2005.

ZAPPELINI, L. O.; ALMEIDA, J. E. M.; GASSEN, M. H. Produção de *Beauveria bassiana* em arroz a partir do método bifásico. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS, 4., 2006, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto Biológico, 2006. CD-ROM.

ZAYED, A. et al. Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* sp. I: in vivo effects on host preference of the nematode and on pathogen progeny production in the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Eflatounia**, Cairo, v. 3, p. 15-24, 2003.

CAPÍTULO II: CONTROLE DE *Conotrachelus humeropictus* PELA MISTURA DO NEMATOIDE *Steinernema brazilense* COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana*.

CONTROLE DE *Conotrachelus humeropictus* PELA MISTURA DO NEMATOIDE *Steinernema brazilense* COM O FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana*.

1. RESUMO

A broca do cupuaçu *Conotrachelus humeropictus* é uma das principais pragas da cultura, podendo ocasionar perdas de 50% na produção. O presente trabalho envolveu uma seleção prévia de isolados de *Beauveria bassiana*, realizada em larvas de *Conotrachelus psidii*, inseto teste, mais próximo taxonomicamente à *C. humeropictus*. Com o objetivo de avaliar causa-efeitos da interação na aplicação combinada, foi estudada a capacidade de o nematoide carrear conídios de *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pelas camadas de solo, dividido em 0-4 cm, 4-7 cm e 7-10 cm de profundidade. O presente trabalho também objetivou estabelecer um método de controle biológico para a broca do cupuaçu, através do uso do fungo *B. bassiana* 10 kg/ha e do nematoide entomopatogênico *Steinernema brazilense* 1, 3, 9 e 27 JI/cm², aplicados em tratamentos isolados e em combinação. Na seleção de isolados de *B. bassiana* para *C. psidii*, os isolados IBCB 276 e IBCB 165 foram os mais promissores, com 86 e 84% de mortalidade confirmada, respectivamente. O isolado IBCB 276 foi utilizado em campo para controle de *C. humeropictus*. No estudo de carreamento de conídios, confirmou-se que o nematoide *S. brazilense* é capaz de carrear conídios de *B. bassiana* para camadas mais profundas do solo. Quando somente *B. bassiana* é aplicado, o fungo permanece principalmente na primeira camada (0-4 cm) e quando aplicado com o nematoide, o fungo é encontrado principalmente nas camadas mais profundas (4-7 e 7-10 cm de profundidade). O mesmo não foi observado com *M. anisopliae* Tanto aplicado isolado e em combinação com o Bio NEP[®], o fungo foi encontrado somente na camada superficial do solo. Nos ensaios de campo contra larvas de *C. humeropictus*, *B. bassiana* promoveu 15,6% de mortalidade. O nematoide nas concentrações 1, 3, 9 e 27 JI/ cm² promoveu, respectivamente 33,3; 37,8; 42,2 e 60,0% de mortalidade, e na combinação das mesmas concentrações do NEP com *B. bassiana* (10 kg/ha), as mortalidade foram incrementadas para 34,4; 47,8; 57,8 e 65,6%, respectivamente, observando-se interação aditiva entre os dois entomopatógenos.

Palavras-chave: Controle biológico, Controle microbiano, Interação, Uso combinado.

2. INTRODUÇÃO

Conotrachelus humeropictus (Fiedler, 1940) (Coleoptera: Dryophthoridae) é um inseto cujas larvas (também conhecidas pelo nome de broca) atacam os frutos do cacauzeiro e cupuaçuzeiro, causando estragos que depreciam o produto e causam perdas que podem chegar a 50% da produção (LAKER; TREVISAN, 1992).

A broca de *C. humeropictus* no Brasil só ocorre na Região Amazônica, particularmente nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Mato Grosso e, no Estado do Pará na região de Santarém embora, MENDES (1997), tenha feito referência à ocorrência desta praga em cupuaçuzeiros nos municípios de Castanhal e Acará e nos cacauais das várzeas da região, porém a suspeita precisa ser confirmada.

O cupuaçuzeiro e o cacauzeiro são os principais hospedeiros os quais permitem o inseto completar o ciclo, mas suspeita-se de outras fruteiras a serem confirmadas. As fêmeas dos insetos fazem pequenos cortes na superfície dos frutos onde depositam seus ovos. Em média são depositados de um a quatro ovos no interior dos cortes. Após um período de quatro a seis dias a larva sai do ovo e penetra no interior do fruto onde permanecerá entre 25 e 35 dias promovendo os estragos nas sementes e polpa. Quando termina esta fase, a larva abre um orifício no fruto e sai para completar o ciclo no solo, onde entra na fase de pupa e passa para a fase de adulto em aproximadamente 35 dias. Depois sairá do solo para começar um novo ciclo de vida (figura 1).

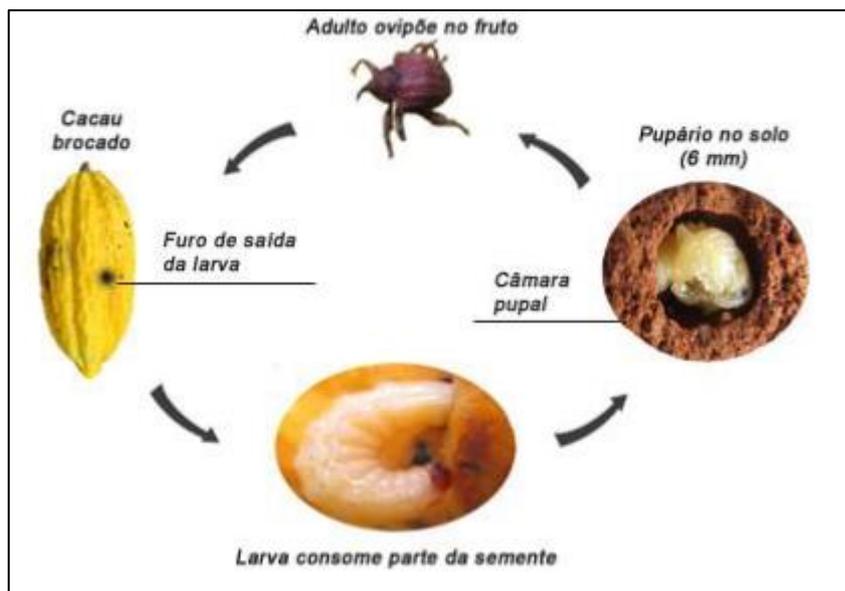


Figura 1: Ciclo biológico de *Conotrachelus humeropictus* (TREVISAN, 2011).

Durante o ciclo de vida as larvas de quarto ínstar ficam expostas à diversos entomopatógenos, já que o inseto permanece por 2-3 meses no solo, principal reservatório dos agentes de controle microbiano de insetos. Entre os entomopatógenos estão os nematoides e os fungos, importantes controladores de pragas de solo.

Os nematoides *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Steinernematidae; Heterorhabditidae) são parasitas letais e hábeis para infectar uma diversidade de espécies de insetos, principalmente aqueles que habitam o solo. Diferem de outros entomopatógenos por estabelecerem uma associação mutualística com as bactérias do gênero *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp., respectivamente. Esses nematoides apresentam estágio imaturo de vida livre, conhecido como juvenil infectivo o qual vive no solo, são aptos para penetrarem no hospedeiro por meio das aberturas naturais: boca, ânus e espiráculos, e, no caso dos heterorhabditídeos, também pela cutícula. Na hemocele do hospedeiro, liberam a bactéria simbiótica causando doença e morte por septicemia entre 24 e 72 horas. Após completar duas ou três gerações, no interior do inseto, o nematoide emerge do hospedeiro depredado e sai em busca de um novo inseto para infectar (KAYA e GAUGLER, 1993; CAMPBELL; KAYA, 2000; DOWDS e PETERS, 2002).

Os fungos são patógenos de largo espectro, capazes de atacar insetos aquáticos e fitófagos que vivem na parte aérea das plantas e no solo, podendo causar epizootias naturais. Podem infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, como ovos, pupas e adultos, sendo esta característica muito desejável e peculiar deste grupo. (ALVES, 1998). Os fungos entomopatógenos vêm sendo estudados, no Brasil, há mais de sessenta anos. Um programa muito conhecido de utilização de fungo no Brasil é o do controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* em cana-de-açúcar com *M. anisopliae* (ALVES, 1998).

Há evidências de que o uso combinado entre dois entomopatógenos pode incrementar a eficiência dos agentes no controle biológico de pragas, pois a mortalidade do inseto alvo tem sido maior que a resultante pelo uso dos agentes aplicados isoladamente. Por exemplo, a combinação de nematoides com a bactéria *Paenibacillus popilliae*, anteriormente conhecida como *Bacillus popilliae* (Dutky, 1941) ou com *Bacillus thuringiensis* (Berliner) cepa Buibui, proporcionou aumento significativo na mortalidade de larvas de corós quando comparada aos agentes testados isoladamente (THURSTON et al., 1994; KOPPENHÖFER; KAYA, 1997). O mesmo ocorreu quando avaliado a combinação do fungo *M. anisopliae* com o nematoide *H. bacteriophora* contra a praga de gramíneas *Hoplia philanthus* (Füessly, 1775) (Coleoptera: Scarabaeidae), promovendo controle de até 95% em condições de campo (ANSARI, et al. 2006).

Os mecanismos responsáveis pelas interações sinérgicas são pouco conhecidos, mas sabe-se que um agente pode causar estresse ou alterar o comportamento do inseto alvo (por exemplo: estimulando a alimentação ou aumentando o movimento), tornando-o mais suscetível ao outro entomopatógeno. (ANSARI et al., 2004). Os insetos expostos a *B. thuringiensis* muitas vezes se alimentam menos, tornando-se mais enfraquecidos e mais vulneráveis para os nematoides entomopatogênicos (KOPPENHÖFER KAYA, 1997).

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo:

- Avaliar diferentes isolados do fungo *Beauveria bassiana* contra larvas do gorgulho da goiaba, *Conotrachelus psidii*, utilizado como inseto-teste;
- Avaliar o efeito da mistura de *Steinernema brazilense* com *Beauveria bassiana* e com *Metarhizium anisopliae*, no carreamento de conídios dos fungos no solo;
- Avaliar o efeito de diferentes combinações entre o nematoide *S. brazilense* e o fungo *B. bassiana* na mortalidade de *Conotrachelus humeropictus*, em condições de campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para *Conotrachelus psidii*

Foram avaliados isolados de *B. bassiana* contra larvas do gorgulho-da-goiaba, *Conotrachelus psidii* (Marshall, 1922) (Coleoptera: Dryophthoridae), buscando selecionar o melhor isolado para uso em campo contra a broca-do-cupuaçu, *C. humeropictus*. Foi utilizado o gorgulho-da-goiaba devido a dificuldades na obtenção de larvas de *C. humeropictus*, presente somente na região Amazônica. Utilizou-se então o inseto mais próximo taxonomicamente disponível, o gorgulho da goiaba, *C. psidii*.

Os isolados dos fungos foram obtidos do Banco de Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu”, mantido no Centro Experimental do Instituto Biológico, no Município de Campinas, São Paulo (Tabela 1). Os isolados foram revigorados em larvas de *Galleria mellonella*, e posteriormente inoculados em placas contendo meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar), e incubados durante 20 dias em estufa tipo B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após 20 dias de cultivo, os conídios da superfície das colônias foram transferidos para tubos contendo solução de Tween 80[®] 0,1% e a suspensão foi padronizada em $1,0 \times 10^7$ conídios/mL. Foram realizados testes de viabilidade de

acordo com a metodologia de FRANCISCO et al. (2006). Só foram utilizados para inoculação nos insetos quando a viabilidade dos conídios foi maior que 90%.

Os insetos utilizados no ensaio foram obtidos frutos de goiaba atacados, coletados de pomares no município de Valinhos, SP. Os frutos foram abertos manualmente e as larvas de quarto ínstar coletadas e acondicionadas em bandejas contendo areia fina umedecida a 10%, mantidas a uma temperatura de $16^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tabela 1. Isolados de *Beauveria bassiana* utilizados para seleção contra a broca-do-cupuaçu, *Conotrachelus psidii*.

Isolado	Hospedeiro	Data	Município de coleta
IBCB 07	Solo	01/08/98	Cascavel-PR
IBCB 28	<i>Cosmopolites sordidus</i>	01/02/86	Miracatu-SP
IBCB 31	<i>Nezara viridula</i>	01/03/86	Piracicaba-SP
IBCB 35	<i>Cosmopolites sordidus</i>	01/03/86	Cruz das Almas-BA
IBCB 67	<i>Hypothenemus hampei</i>	01/09/86	S. J. do Rio Pardo-SP
IBCB 81	Solo	01/07/99	Cascavel-PR
IBCB 82	<i>Cosmopolites sordidus</i>	01/01/89	Goiânia-GO
IBCB 102	Solo	01/01/99	Cosmópolis SP
IBCB 165	Solo	01/05/99	Espigão Azul-PR
IBCB 170	Solo	01/05/99	Iracemópolis-SP
IBCB 206	Solo	01/05/99	Ribeirão Preto-SP
IBCB 239	<i>Hypothenemus hampei</i>	01/06/99	Campinas-SP
IBCB 241	<i>Oryzophagus oryzae</i>	01/06/99	Pindamonhangaba-SP
IBCB 246	<i>Hypothenemus hampei</i>	01/06/99	Taubaté-SP
IBCB 276	Solo	01/06/99	Ribeirão Preto-SP

As larvas foram banhadas em grupos de 10 em suspensão fúngica por 60 segundos. Após esse procedimento foram transferidas para potes plásticos, colocando-se 10 larvas de *C. psidii* por pote. Os potes foram mantidos em $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias. Após esse período os potes foram abertos e a mortalidade das larvas foi aferida.

Para cada isolado e para a testemunha (água), foram considerados 5 repetições, sendo cada repetição representada por um pote plástico com 300 g de areia fina lavada umedecida a 10%.

Foi utilizado o Delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para execução das análises, foi utilizado o software SAS versão 9.0 (SAS INSTITUTE, 2000).

4.2 Carreamento de conídios no solo

Com o intuito de elucidar um dos fatores que contribuem para uma maior mortalidade no uso combinado de nematoides e fungos, foi investigada a capacidade do nematoide de carrear conídios para camadas mais profundas do solo, ampliando uma chance de contato do fungo com o hospedeiro.

Foram utilizados os isolados IBCB 383 de *M. anisopliae* e IBCB 170 de *B. bassiana*. Estes entomopatógenos são mantidos em culturas estoques no Banco de Entomopatógenos do Instituto Biológico. Para utilização nos ensaios, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio BDA, acondicionadas em câmara climatizada a $28 \pm 0,5$ °C, com fotofase de 12 horas, por 20 dias.

O nematoide *S. brazilense* IBCB n6 está preservado em cultura estoque no Banco de Entomopatógenos do Instituto Biológico. O nematoide foi produzido "in vitro" pelo processo da esponja segundo BEDDING (1981), pela empresa Bio Controle.

Foram avaliados cinco tratamentos: 1) Testemunha (água); 2) *Beauveria bassiana* – $3,0 \times 10^8$ conídios; 3) *Metarhizium anisopliae* - $3,0 \times 10^8$ con; 4) *Steinernema brazilense* – 3 JI/cm², equivalente a 50 JI/inseto; 5) *B. bassiana* 3×10^8 con. + *S. brazilense* – 3 JI/cm² (50 JI/inseto); 6) *M. anisopliae* – 3×10^8 con.+ *S. brazilense* – 3 JIcm² (50 JI/inseto). Todos os tratamentos foram aplicados em um volume total de 3 mL.

Para cada tratamento foram consideradas 3 repetições, sendo cada repetição representada por um copo de 700 mL de volume preenchidos com areia fina lavada, esterilizada e umedecida a 10% com água destilada autoclavada, delimitado externamente em camadas de 0-4 cm, 4-7 cm e 7-10 cm abaixo da superfície do solo, como mostra a Figura 3. No fundo do copo foram colocadas 5 larvas de *G. mellonella*, agrupadas

em uma pequena gaiola preparada com tela de metal, para atração dos nematoides em direção à camada de solo mais abaixo/profunda.



Figura 2. Copos com estratificação do solo, utilizados no experimento.

A aplicação foi realizada com o auxílio de pipeta, com a inoculação dos 3 mL de suspensão na superfície do solo. Sete dias após aplicação, cada copo foi cortado transversalmente nas demarcações, com o auxílio de um bisturi superaquecido, visando permitir a separação das camadas de solo (estratificar) para avaliação da concentração de esporos nas diferentes profundidades.

De cada uma das 3 camadas de solo, foram retirados 1,0 g e colocados em tubos contendo 10 mL de Tween 80[®] 0,1%. Foi feita uma diluição seriada 1:9 e desta suspensão, foi retirado 0,1 mL e inoculado em placas contendo meio BDA com antibiótico para evitar o crescimento de bactérias. Cada amostra foi inoculada em triplicata. Após 4 dias de cultivo em estufa tipo B.O.D. ($25\pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12h) as unidades formadoras de colônias (U.F.C.) foram contadas.

A mortalidade das lagartas da camada mais profunda de solo foi avaliada pela abertura das armadilhas metálicas. O agente causal da morte foi confirmado mantendo as larvas em placas de Petri, contendo em sua base duas unidades de papel de filtro circular umedecido, para observação após alguns dias de uma possível produção de juvenis infectivos ou esporulação do fungo.



Figura 3. Estrato de solo (profundidade de 4-7cm) separado dos demais com auxílio da lâmina metálica.

Foi utilizado o Delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade. Para análise dos dados foi utilizado o software SAS (versão 9.0).

O experimento foi repetido quatro vezes no tempo e foram unidos como um só experimento com 12 repetições.

4.3 Efeito de combinações entre *Steinernema brazilense* e *Beauveria bassiana* na mortalidade de *Conotrachelus humeropictus*

Ensaio de campo foram conduzidos avaliando o efeito da mistura do nematoide *S. brazilense*, em diferentes doses, com o fungo *B. bassiana* na dose de 10 Kg/ha visando o controle da broca do cupuaçu em condições de campo.

O trabalho foi realizado em cultivo de cupuaçu localizado na Estação Experimental da CEPLAC em Ouro Preto do Oeste, RO, no mês de março de 2013. Foram considerados 10 tratamentos representados pelo nematoide *Steinernema brazilense* nas doses de 1, 3, 9 e 27 JI/cm²; pelo nematoide nas mesmas doses misturados ao fungo *Beauveria bassiana* IBCB 276 (10 Kg/ha), pelo fungo testado isoladamente na mesma dose, e pela testemunha.

Para cada tratamento foram consideradas 3 repetições distribuídas em blocos ao acaso, sendo cada repetição representada por uma parcela de 1 m² contendo 3

envelopes preparados com tela antiafídio, parcialmente enterrados em distribuição ao acaso, com a parte superior mantida aberta. Dentro de cada envelope foi adicionado solo do mesmo local, até a sua metade, e mais cinco larvas do inseto. Em seguida os envelopes foram fechados na sua abertura superior com grampeador, e o nematoide foi distribuído na parcela com o auxílio de frasco de Erlenmeyer, adicionando em cada parcela 100 mL da suspensão do(s) agente(s).

A avaliação foi realizada 21 dias após a aplicação, mediante a contagem de insetos vivos e mortos dentro dos envelopes.

O experimento foi repetido três vezes seguindo exatamente a mesma metodologia. As médias foram transformadas em $\arcsen \sqrt{x/100}$ e os dados analisados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para *Conotrachelus psidii*

Os isolados de *B. bassiana* apresentaram grande variabilidade na virulência para larvas de *C. psidii*, com mortalidade variando de 8 a 86%. As maiores mortalidades foram ocasionadas pelos isolados IBCB 276 e IBCB 165, promovendo mortalidades de larvas de *C. psidii* de 86 e 84%, respectivamente, porém sem diferenciar pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, de outros 6 isolados: IBCB 241 (78% de mortalidade), IBCB 067 (72%), IBCB 206 (66%), IBCB 081 (64%), IBCB 239 (58%) e IBCB 28 (58%), como mostra a Tabela 2.

O isolado IBCB 276 foi o que promoveu a maior mortalidade, sendo assim, o escolhido para a mistura com o nematoide *S. brazilense* visando o controle da broca-do-cupuaçu, *C. humeropictus* em condições de campo.

Tabela 2. Mortalidade de larvas de *Conotrachelus psidii* por isolados de *Beauveria bassiana*, padronizadas em $1,0 \times 10^7$ conídios/mL.

Isolado	Mortalidade + E.P. (%)	Hospedeiro original
IBCB 276	86,00 ± 0,40 a	Solo
IBCB 165	84,00 ± 0,60 a	Solo
IBCB 241	78,00 ± 0,73 ab	<i>Oryzophagus oryzae</i>
IBCB 067	72,00 ± 1,06 abc	<i>Hypothenemus hampei</i>
IBCB 206	66,00 ± 0,81 abcd	Solo
IBCB 081	64,00 ± 0,51abcd	Solo
IBCB 239	58,00 ± 0,97 abcde	<i>Hypothenemus hampei</i>
IBCB 028	52,00 ± 0,66 abcdef	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 170	46,00 ± 1,12 bcdef	Solo
IBCB 007	38,00 ± 0,73 cdefgh	Solo
IBCB 035	36,00 ± 0,60 defgh	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 246	28,00 ± 0,73 efghi	<i>Hypothenemus hampei</i>
IBCB 102	22,00 ± 0,37 fghi	Solo
IBCB 082	14,00 ± 0,51 ghi	<i>Cosmopolites sordidus</i>
IBCB 031	08,00 ± 0,37 ji	<i>Nezara viridula</i>
Testemunha	00,00 ± 0,00 i	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de mortalidade originais, mas dados para análise transformados em $\arcsen \sqrt{x/100}$. C.V. (%) = 23,70; F = 14,39**.

**significativo a 1% de probabilidade.

5.2 Carreamento de conídios do fungo no solo

Na avaliação da mortalidade de lagartas, presentes na camada mais profunda para atrair os NEPs, o tratamento somente com *S. brasilense* ocasionou 100% de mortalidade, enquanto a aplicação isolada de *B. bassiana* e *M. anisopliae* não promoveram mortalidade. Nos testes de combinação dos agentes, foi observada 100% de mortalidade em ambos os tratamentos, sendo causadas exclusivamente por nematoides. O grupo controle não apresentou mortalidade.

Resultados semelhantes foram observados por Acevedo et al. (2007) quando avaliaram fungos e nematoides inoculados simultaneamente em lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). As mortes ocorreram exclusivamente pelos nematoides que apresentaram tempos Letais TL_{100} significativamente menores. O número de JIs por larva, porém, foi menor nos tratamentos envolvendo as misturas.

Para as diferentes combinações com *B. bassiana*, não foi encontrado a presença do fungo na testemunha e no tratamento nematoide aplicado isoladamente, o que já era esperado e demonstra a ausência de contaminações da execução do experimento (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3. Unidades formadoras de colônias/g de solo, em diferentes profundidades, após 10 dias da aplicação de *Beauveria bassiana*, de *Steinernema brazilense* e da combinação de ambos os agentes.

Tratamento	Profundidade (cm)	U.F.C./ g de solo
<i>Beauveria bassiana</i>	0-4	1170,92 a
	4-7	5,00 c
	7-10	15,50 c
<i>Steinernema brazilense</i>	0-4	0,00 c
	4-7	0,00 c
	7-10	0,00 c
<i>S.brazilense</i> + <i>B. bassiana</i>	0-4	94,17 bc
	4-7	272,49 b
	7-10	235,50 b
Testemunha	0-4	0,00 c
	4-7	0,00 c
	7-10	0,00 c

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Com relação à aplicação do fungo isoladamente sobre a superfície do solo, os conídios foram encontrados em maior concentração na camada superficial do solo, com 1170,92 colônias/g de solo, tendo sido encontrada também pequena concentração de conídios nas camadas abaixo, porém sem diferir da testemunha (Tabela 3 e Figura 4).

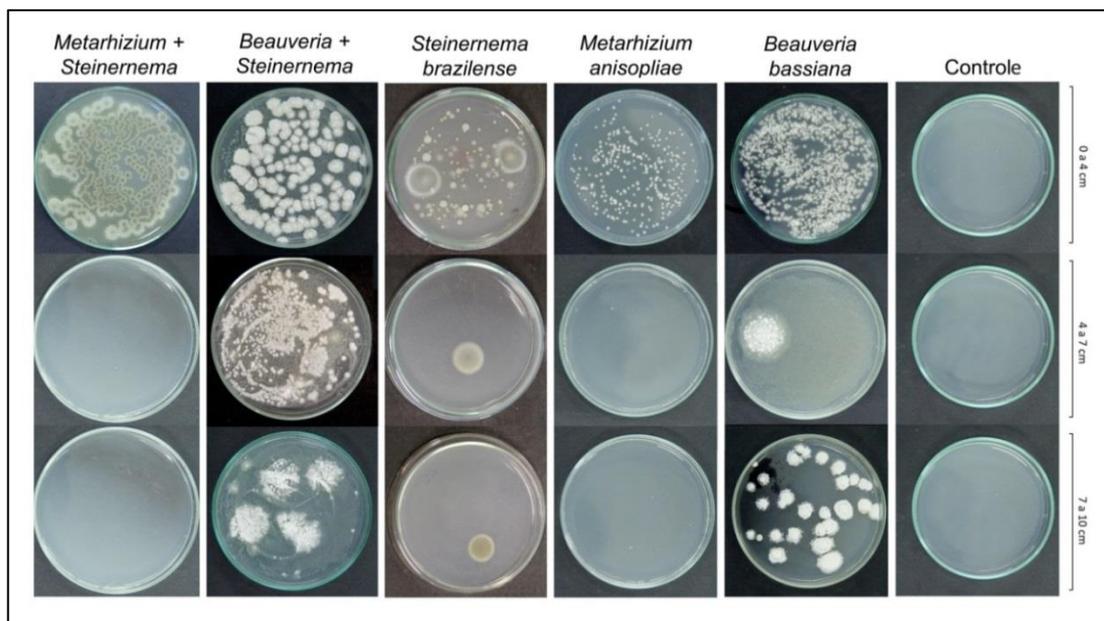


Figura 4. Placas de Petri com meio BDA apresentando unidades formadoras de colônia das respectivas camadas de solo de todos os tratamentos.

Por outro lado, na aplicação da mistura *S. brazilense* + *B. bassiana*, foi encontrado menor número de U.F.C. na camada superficial do solo e grande número nas camadas mais profundas, apresentando diferença significativa com o fungo aplicado isoladamente (tratamento somente com *B. bassiana*).

Este fato indica que juvenis infectivos de *S. brazilense* usados em mistura com suspensão de conídios de *B. bassiana*, podem carregar o fungo para camadas mais profundas de solo arenoso conforme os nematoídes locomovem-se nesse ambiente.

Nos testes feitos com o fungo *M. anisopliae*, semelhantemente ao ensaio com *B. bassiana*, não foi encontrado a presença do fungo na testemunha e no tratamento em que o nematoíde foi aplicado isoladamente. Porém, resultados distintos foram encontrados nos tratamentos com o fungo. No tratamento com *M. anisopliae* aplicado isoladamente, o fungo foi isolado somente na primeira camada de solo (0-4 cm) (Tabela 4).

Na mistura de *S. brazilense* + *M. anisopliae*, diferentemente do que ocorreu para *S. brazilense* + *B. bassiana*, não foi encontrado fungo nas camadas mais profundas de solo, sendo observado unicamente na faixa de 0-4 cm de profundidade, assim como no fungo aplicado isoladamente (Tabela 4).

Os conídios podem ser carreados no perfil do solo, entretanto a mobilidade é influenciada pela textura do solo e pela matéria orgânica. Solos arenosos com baixos teores de matéria orgânica retem menores quantidades de conídios em relação à solos mais argilosos e com maior teor de matéria orgânica (IGNOFFO et al., 1977; STOREY; GARDNER, 1988).

Tabela 4. Unidades formadoras de colônias/g de solo, em diferentes profundidades, após 10 dias da aplicação de *Metarhizium anisopliae*, de *Steinernema brazilense* e da combinação de ambos os agentes.

Tratamento	Profundidade (cm)	U.F.C./g de solo
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0-4	1610,50 a
	4-7	0,00 b
	7-10	0,00 b
<i>Steinernema brazilense</i>	0-4	0,00 b
	4-7	0,00 b
	7-10	0,00 b
<i>S.b. + M.a.</i>	0-4	1062,50 a
	4-7	0,00 b
	7-10	0,00 b
Testemunha	0-4	0,00 b
	4-7	0,00 b
	7-10	0,00 b

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

O solo arenoso pode permitir maior transporte de alguns conídios devido à maior porosidade. Em testes realizados por Ignoffo et al. (1977), conídios do fungo *Nomuraea rileyi* foram movidos até 10,5 cm de profundidade em solo arenoso após uma precipitação 16,25 cm de chuva. Por outro lado, em solo tipo silte-argila, 90% dos conídios foram encontrados na camada superficial de 2 cm. Os resultados obtidos pelos autores demonstram que os solos arenosos são mais propícios ao carregamento vertical dos conídios.

Trabalhando com formulações comerciais de *Beauveria bassiana*, Storey; Gardner (1987) aplicaram conídios suspensos em água sobre colunas de 30 cm de solo e observaram movimento descendente por até 15 cm de profundidade. Segundo Storey; Gardner (1988), conídios puros de *B. bassiana* aspergidos no solo com pequeno volume de água, foram encontrados na camada mais superficial, de até 5 cm, tanto em solos mais arenosos como em solos mais argilosos. No presente estudo, a maior concentração de conídios nas maiores profundidades, obtidas com a mistura *B. bassiana* + *S. brazilense*, indica que o nematoide tem um papel importante na movimentação vertical dos conídios, principalmente quando não há grandes volumes de água envolvidos, decorrentes da calda de aplicação ou da chuva.

Para conídios de *M. anisopliae*, Salazar et al. (2007) constataram percolação por até 15 cm de profundidade em solo arenoso. Porém, o ensaio foi realizado com volume de água para saturação do solo, favorecendo ainda mais a percolação dos conídios. No presente estudo, o pequeno carreamento dos conídios de *M. anisopliae* pode ser devido ao menor volume de água usado na aplicação, aos menores poros da areia fina e possivelmente ao maior tamanho do conídio comparado ao de *B. bassiana*. Os conídios de *M. anisopliae* talvez sejam removidos mais facilmente pelo nematoide ao se locomover na areia.

A forésia também foi relatada com outros tipos de organismos. Recentemente, estudos em casa-de-vegetação demonstraram existir uma interação de forésia entre o nematoide *S. carpocapsae* e o fungo *B. bassiana* com minhocas *Lumbricus terrestres* (Linnaeus, 1758) (Haplotaxida: Lumbricidae), ocorrendo melhor dispersão e maior atuação dos entomopatógenos sobre larvas de *Curculio caryae* (Latreille, 1802) (Coleoptera: Curculionidae) na presença do anelídeo. Assim, a presença da minhoca e de outros agentes foréticos contribuem para a dispersão de conídios e de juvenis infectivos pelas camadas de solo (SHAPIRO-ILAN; BROWN, 2013).

O presente estudo demonstra que o nematoide *S. brazilense* pode auxiliar no carreamento vertical dos conídios de *B. bassiana* para camadas mais profundas do solo, podendo contribuir para uma maior deposição do fungo sobre o inseto e, conseqüentemente, para uma maior mortalidade do inseto decorrente do efeito fungo + nematoide ou de efeitos sinérgicos causados pelos dois agentes em conjunto.

Fungos entomopatogênicos são agentes que dependem do contato direto com o inseto para causar infecção (ALVES, 1998) e, portanto, são mais usados para o controle de pragas da parte aérea ou da superfície do solo, já que, para o controle de pragas subterrâneas, o solo pode representar uma barreira para o carreamento dos conídios e contato com o hospedeiro. Assim, a sua aplicação em combinações com nematoides pode estender o movimento dos conídios para distâncias maiores no solo, com maiores chances de alcançar o hospedeiro, além de poder potencializar a virulência do nematoide por deixar o inseto possivelmente mais debilitado e suscetível a esse agente. Quando o fungo penetra no inseto, ocorre uma série de processos que ativam os corpos de defesa na hemolinfa do hospedeiro. Quando os conídios em alta concentração alcançam o inseto, vários deles conseguem penetrar a cutícula, sobrecarregando as defesas do hospedeiro e deixando-o mais susceptível ao nematoide, o que pode ocasionar a sua morte e reduzir as populações mais rapidamente que a aplicação dos agentes isoladamente (WILSON et al., 2001).

5.3 Efeito de combinações entre *Steinernema brazilense* e *Beauveria bassiana* na mortalidade de *Conotrachelus humeropictus*

Todos os tratamentos com nematoide + fungo proporcionaram maior mortalidade que os tratamentos de nematoide testado isoladamente nas respectivas doses, porém sem diferenças significativas entre os mesmos (Figura 6). Os melhores tratamentos foram *S. brazilense* (9 JI/cm²) + *B. bassiana*; *S. brazilense* - 27 JI/cm² + *B. bassiana* e *S. brazilense* - 27 JI/cm², os quais diferiram significativamente dos demais tratamentos.

Os níveis de controle obtidos com o nematoide aplicado isoladamente não passaram de 60% em dose elevada (27 JI/cm²), sugerindo que os estudos devem continuar na busca de nematoides cada vez mais virulentos para a fase larval do inseto. O nematoide testado isoladamente na menor dose causou 33,3% de mortalidade do inseto, demonstrando maior eficiência de controle comparado ao fungo (10 Kg/ha) com 15,6% de mortalidade, embora não tenha ocorrido diferença significativa entre esses tratamentos (Figura 6).

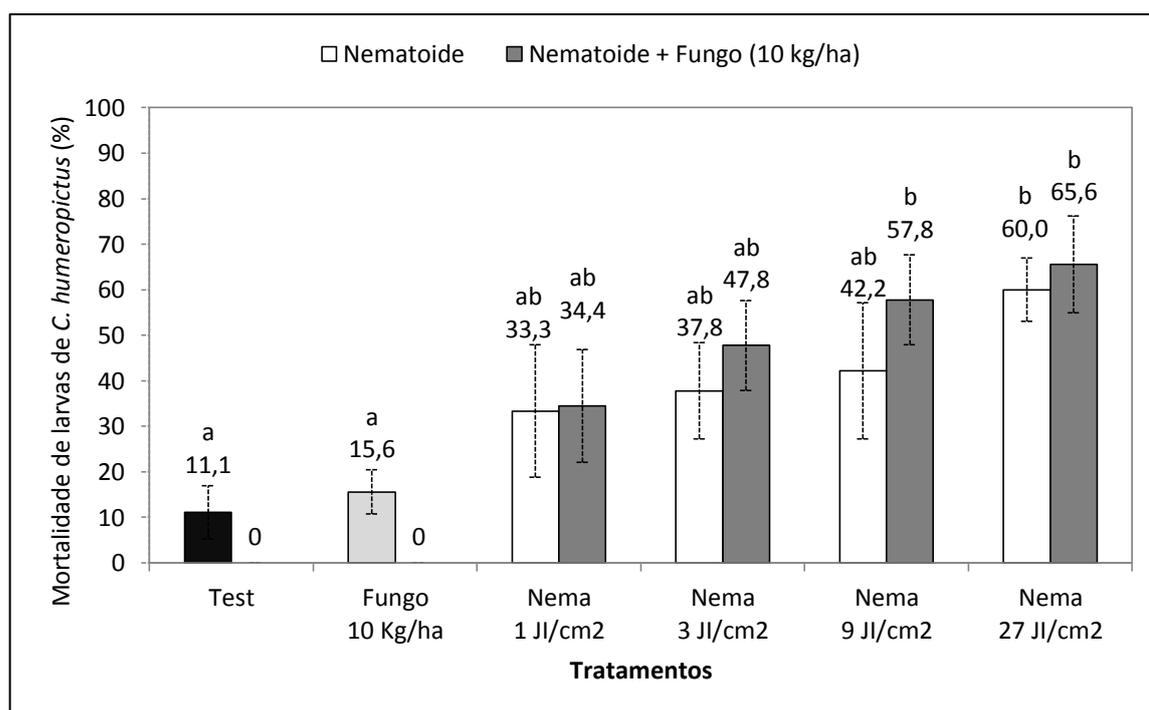


Figura 6. Mortalidade de larvas de *Conotrachelus humeropictus* expostos ao nematoide *Steinernema brazilense* nas doses de 1, 3, 9 e 27 JI/cm² (1, 3, 9 e 27 x 10⁸ JI/ha), testado isoladamente e em misturas com o fungo *Beauveria bassiana* na dose de 10 Kg/ha.

As interações entre o fungo entomopatogênico *B. bassiana* e o NEP *S. brazilense* foram aditivas em todas as concentrações aplicadas. (Tabela 5).

Tabela 5. Interação entre *Steinernema brazilense* e *Beauveria bassiana*, aplicados em campo para o controle de larvas de *Conotrachelus humeropictus*.

Tratamento	M _O ¹ (%)	M _E ² (%)	χ ²	Tipo de Interação ³
<i>S. brazilense</i> 1 JI/cm ² + <i>B. bassiana</i>	34,4	43,70	1,97	aditiva
<i>S. brazilense</i> 3 JI/cm ² + <i>B. bassiana</i>	47,8	47,50	0,01	aditiva
<i>S. brazilense</i> 9 JI/cm ² + <i>B. bassiana</i>	57,8	64,38	0,67	aditiva
<i>S. brazilense</i> 27 JI/cm ² + <i>B. bassiana</i>	65,6	70,97	0,41	aditiva

¹M_O: mortalidade observada e confirmada.

²M_E: Mortalidade esperada = M_{Nema} + M_{Fungo} (1 - M_{Nema}), onde M_{Nema} e M_{Fungo} são, respectivamente, as mortalidades proporcionais observadas causadas pelo nematoide e pelo fungo aplicados isoladamente.

Interações baseadas na relação de χ² de mortalidade esperada : observada.

A mistura de *S. brazilense* com *B. bassiana* gerou um aumento na mortalidade do inseto de no máximo 15,6% quando comparada ao respectivo tratamento do nematoide testado isoladamente na concentração de 9 JI/cm², sugerindo que a mistura desse nematoide com esse isolado de *B. bassiana* pode não ser financeiramente compensadora devido a alta dose de fungo utilizada (10 Kg/ha).

Diversos estudos avaliam o uso combinado entre fungos e nematoides entomopatogênicos, com observações de efeitos aditivos ou sinérgicos na mortalidade de insetos (ANSARI et al., 2006; ACEVEDO et al., 2007; SHAPIRO-ILAN et al., 2004; ANSARI et al., 2008). Em geral, uso combinado de agentes incrementa a mortalidade, porém pode agir negativamente na reprodução dos entomopatógenos, reduzindo a produção de JI's ou de conídios. Por este motivo, é recomendada uma estratégia inundativa de aplicação (ACEVEDO et al., 1997).

É provável que o incremento da mortalidade seja causado pelo estresse ao qual o inseto é submetido na aplicação de dois ou mais inimigos naturais. Um estressor como um fungo ou nematoide entomopatogênico pode debilitar o inseto-alvo e aumentar a sua susceptibilidade a outro agente de controle. Isso pode incrementar o controle da praga ou reduzir o Tempo Letal (TL). Isso eventualmente leva a um efeito aditivo ou sinérgico, resultante da aplicação combinada de vários agentes de controle (SHAOHUI et al., 2014).

Outra vantagem no uso combinado de agentes, além do incremento na taxa de mortalidade, é promover a mortalidade da praga mais rapidamente. Tarasco et al. (2011) verificaram que a aplicação da mistura *B. bassiana* + *Heterorhabditis heliothidis* pode reduzir o tempo letal do hospedeiro. No presente experimento, a larva de *C. humeropictus* mostrou-se susceptível, e torna-se interessante realizar a aplicação nesta fase.

Efeitos aditivos foram relatados em trabalhos contra *Curculio caryae*, por Shapiro-Ilan et al. (2004), no qual os autores observaram efeito aditivo na aplicação do fungo *M. anisopliae* com o nematoide *H. indica*. Todavia, verificaram efeitos antagônicos com aplicação das misturas de *B. bassiana* com *H. indica*, *H. indica* + *I. fumosorosea*, *S. carpocapsae* + *I. fumosorosea*, além das misturas da bactéria *Serratia marcescens* com *S. carpocapsae* e com *H. indica*.

Os fatores envolvidos na natureza das interações não foram totalmente elucidados. Pode ocorrer a produção de substâncias que prejudicam o outro agente. Em experimentos de Ansari et al. (2005), bactéria simbiote *Photorhabdus luminescens* promoveu efeito antagonista a *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *B. brongniartii* e *Isaria fumosoroseum*, inibindo o crescimento e a produção de conídios. Os autores também relataram redução no crescimento das bactérias simbiotes, causadas por compostos antimicrobianos liberados pelos fungos entomopatogênicos. O fator que desencadeia a produção e liberação dos compostos ainda é desconhecido, portanto ensaios de seleção e compatibilidade são necessários.

Compostos antimicrobianos podem ser liberados tanto pelos fungos entomopatogênicos, quanto pelas bactérias simbiotes dos NEPs (TARASCO et al., 2011). Desta forma, algumas estratégias demonstram que diferentes tempos de aplicação entre o fungo e o nematoide são mais eficientes em promover sinergismo entre dois ou mais agentes (ANSARI et al., 2004; ANBESSE et al., 2008).

No presente trabalho, a mistura de *S. brazilense* + *B. bassiana* aplicados no mesmo tempo causou efeitos aditivos nas doses utilizadas. Novos estudos devem ser realizados visando avaliar outros tempos de aplicação, e o uso de outras espécies de nematoides. A combinação de nematoides entomopatogênicos com o fungo *M. anisopliae* também deve ser avaliada, já que é o patógeno mais frequentemente encontrado sobre larvas de *Conotrachelus humeropictus* em condições naturais de campo, e também pelo fato de diversos estudos apontarem aumento na mortalidade das pragas subterrâneas pelo uso combinado desse fungo com nematoides entomopatogênicos.

6. CONCLUSÕES

- Os isolados IBCB 276 e IBCB 165 de *B. bassiana* foram os mais virulentos para larvas de *C. Psidii*;
- Juvenis infectivos de *S. brasilense* (IBCB n6) usados em mistura com suspensão de conídios de *B. bassiana*, (isolado IBCB 170) podem carrear o fungo para camadas mais profundas de solo arenoso;
- A mistura de *S. brasilense* com *B. bassiana* (IBCB 276) causou efeito aditivo na mortalidade de larvas de *Conotrachelus humeropictus*, em todas as concentrações utilizadas.

7. REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J. P. M. et al. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 96, p. 187-192, 2007.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

ANBESSE, S. A.; ADGE, J. B.; GEBRU, W. M. Laboratory screening for virulent entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema yirgalamense*) and fungi (*Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*) and assessment of possible synergistic effects of combined use against grubs of the barley chafer *Coptognathus curtipennis*. **Nematology**, Leiden, v. 10, n. 5, p. 701-709, 2008.

ANSARI, M. A.; SHAH, F. A.; BUTT, T. M. Combined use of entomopathogenic nematodes and *Metarhizium anisopliae* as a new approach for black vine weevil,

Otiorhynchus sulcatus, control. **Entomologia experimentalis et applicata**, Amsterdam, v. 129, p. 340-347, 2008.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Antagonism between entomopathogenic fungi and bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 50, p. 465-475, 2005.

ANSARI, M. A.; TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 172-180, 2004.

ANSARI, M. A. et al. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 453-459, 2006.

BEDDING, R. A. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. **Nematologica**, Leiden, v. 27, p. 109-114, 1981.

CAMPBELL, J. F.; KAYA, H. K. Influence of insect associated cues on the jumping behavior of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* spp.). **Behaviour**, Leiden, v. 137, p. 591-609, 2000.

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence Mechanisms. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic Nematology**. New York: CABI, 2002. p. 79-98.

FRANCISCO, E. A. et al. Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1309-1312, 2006.

IGNOFFO, C. M. et al. Vertical movement of conidia of *Nomuraea rileyi* through sand and loam soils. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, n. 2, p. 163-164, 1977.

KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 38, p. 181-206, 1993. DOI: 10.1146/annurev.en.38.010193.001145

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K.; Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. **Biological Control**, Orlando, v. 8, p.131-137, 1997.

LAKER, H. A.; TREVISAN, O. The increasing importance of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) (Schum) in the Amazon Region of Brasil. **Cocoa Growers Bulletin**, Bournville, n. 45, p. 45-52, 1992.

MENDES, A. C. B.; MAGALHÃES, B. P.; OHASHI, O. S. Biologia de *Conotrachelus humeripictus*, FIEDLER, 1940 (Coleoptera: Curculionidae), praga do cacauzeiro e do cupuaçuzeiro na Amazônia brasileira. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 27, n. 2, p. 135-144, 1997.

SALAZAR, A. M. P. et al. Desplazamiento de conidias de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em columnas de tres series de suelo. **Agricultura Técnica**, Santiago de Chile, v. 67, n. 3, p. 236-243, 2007.

SAS INSTITUTE. Statistical Analysis System .Versão 9.0. Cary: SAS Institute, 2000.

SHAOHUI, W. et al. Interaction between entomopathogenic nematodes and entomopathogenic fungi applied to third instar southern masked chafer white grubs, *Cyclocephala lurida* (Coleoptera: Scarabaeidae), under laboratory and greenhouse conditions. **Biological Control**, Orlando, v. 76, p. 65-73, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.05.002>.

SHAPIRO-ILAN, D.; BROWN, I. Earthworms as phoretic hosts for *Steinernema carpocapsae* and *Beauveria bassiana*: Implications for enhanced biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 66, p. 41-48, 2013.

SHAPIRO-ILAN, D. I. et al. 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.

STOREY, G. K.; GARDNER, W. A. Vertical movement of commercially formulated *Beauveria bassiana* conidia through four Georgia soil types. **Environmental Entomology**, College Park, v. 16, p. 178-181, 1987.

STOREY, G. K.; GARDNER, W. A. Movement of an aqueous spray of *Beauveria bassiana* into the profile of four Georgia soils. **Environmental Entomology**, College Park, v. 17, p. 135-139, 1988.

THURSTON, G. S.; KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Characterizing the enhanced susceptibility of milky disease-infected scarabaeid grubs to entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, Orlando, v. 4, p. 67-73, 1994.

TREVISAN, O. Manejo Integrado das pragas do cacaueteiro na região amazônica: *Conotrachelus humeropictus*. **Folha Técnica - Superintendência do Desenvolvimento da Região Cacaueira no Estado do Pará**, n. 1, p. 1-2, ago. 2011.

TARASCO, E. et al. Laboratory studies on the competition for insect haemocoel between *Beauveria bassiana* and *Steinernema ichnusae* recovered in the same ecological niche. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 693-704, 2011.

WILSON, K. et al. Melanism and disease resistance in insects. **Ecology Letters**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 637-649, 2001.