

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

Seleção de nematoides entomopatogênicos para o controle de larvas de "fungus gnat", *Bradysia mabiusi*, e efeito da interação entre *Steinernema feltiae* e *Bacillus thuringiensis* na mortalidade do inseto

PATRÍCIA BALLONE

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Biológica no Agronegócio.

Orientador: Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

**São Paulo
2014**



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRÍCIA BALLONE

Título: SELEÇÃO DE ISOLADOS DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE LARVAS DE “fungus gnat”, *Bradysia mabiusi*, E EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE *Steinernema feltiae* e *Bacillus thuringiensis* NA MORTALIDADE DO INSETO

Orientador: Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Assinatura:

*Prof. (a) Dr.(a):

*Instituição:

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Ballone, Patricia.

Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos para o controle de larvas de “*fungus gnat*”, *Bradysia mabiusi*, e efeito da interação entre *Steinernema feltiae* e *Bacillus thuringiensis* na mortalidade do inseto. / Patricia Ballone. -- São Paulo, 2014.

50 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: **Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.**

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luís Garrigós Leite.

Versão do título para o inglês: Selection of isolated entomopathogenic nematode control of larvae “*fungus gnat*”, *Bradysia mabiusi*, and effect of interaction between *Steinernema feltiae* e *Bacillus thuringiensis* mortality in insect.

1. Controle biológico 2. Plantas ornamentais 3. Moscas-dos-fungos I. Ballone, Patricia II. Leite, Luís Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2014/016

A minha querida mãe,
Maria Aparecida Padovani,
exemplo de vida e trabalho,
que sempre esteve ao meu lado,
em todos os momentos
da minha vida e foi responsável
por tornar meus sonhos realidade

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou meu caminho, para que eu não desviasse meu foco.

Ao orientador, **Dr. Luís Garrigós Leite**, pela paciência, orientação e oportunidade de trabalho. Postura admirável frente ao trabalho e aos estudos.

Ao **Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida** por sempre resolver os problemas no laboratório, e sempre estar ali para nos amparar.

Ao **Dr. Valmir Antônio Costa** pela convivência, conselhos e ajuda que sempre está disposto a oferecer.

Ao **Dr. Antonio Batista Filho** pela amizade, alegria e abraços que distribui, alegrando todos do laboratório.

À **Dra. Zuleide Alves Ramiro** pelo convívio e exemplo único de profissionalismo a ser seguido.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico que tive o prazer em conhecer e pelos conhecimentos transmitidos.

Em especial a **Maria Elízia Pacheco**, pelos ensinamentos, paciência e pela amizade.

A todos os amigos de Pós Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio pelo companheirismo nos bons e maus momentos.

A minha amada mãe **Maria Aparecida Padovani** pelo amor, que em meio às dificuldades, conseguiu me criar, educar, oferecer tudo de melhor, sempre me apoiando em tudo.

Agradeço aos meus avós maternos **Maria Maia Padovani** e **Pedro Padovani**, que me criaram, me deram amor, carinho e são até hoje um exemplo para minha existência.

Agradeço ao meu marido, **Alessandro Heleno Filier** pelo amor, paciência, dedicação, compreensão e fidelidade.

Agradeço ao amigo **Eduardo de Souza Arruda**, exemplo profissional e pessoal. Em especial a família **Arruda**, exemplo de união.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo da vida.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Controle Biológico: Ana Paula Pinto, Ana Paula dos Santos Bartels, Daysi de Andrade, Érika Von Nowakonski, Lucas Detogni Simi, Mariana Garcia Martinez, Maria Elizia Pacheco, Renata Marraschi, Roselaine Nunes da Silva Bueno, Tatiane de Castro Pietrobon, Victória Rotelli e Franciele Lima pela paciência, ensinamentos, diversão, carinho e amizade.

E como bióloga não poderia deixar de agradecer aos meus amores Laika e Drika que retribuem esse amor que sinto por elas, pois toda vez que volto para minha casa me recebem como se eu fosse à pessoa mais importante do mundo.

“A natureza é o único livro que
oferece um conteúdo valioso
em todas as suas folhas”
Goethe.

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
Lista de Tabelas	
Lista de Figuras	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. <i>Bradysia mabiusi</i> – Caracterização biológica, ecológica e taxonômica ...	4
3.2. Disseminadores de fitopatógenos.....	5
3.3. Aspectos favoráveis à ocorrência do inseto.....	6
3.4. Nematoides entomopatogênicos (NEPs) - Caracterização biológica, ecológica e taxonômica	6
3.5. Controle de <i>Bradysia mabiusi</i> com nematoides entomopatogênicos.....	8
3.6. Potencial de uso das bactérias	9
3.7. <i>Bacillus thuringiensis</i> - Caracterização biológica, ecológica e taxonômica	10
3.8. Os micro-organismos endofíticos como agentes de controle biológico .	11
3.9. A utilização do Bt como agente de controle biológico.....	12
3.9.1 Características dos cristais proteicos e seu mecanismo de ação	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Obtenção e manutenção dos insetos	17
4.2. Virulência de nematoides entomopatogênicos à larvas de <i>Bradysia mabiusi</i>	17
4.3. Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação de <i>Steinernema feltiae</i> , no controle de <i>Bradysia mabiusi</i>	21
4.4. Efeito da combinação de <i>Steinernema feltiae</i> com produto comercial a base de <i>Bacillus thuringiensis</i> , Vectobac® sobre as larvas de <i>Bradysia mabiusi</i>	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Virulência de nematoides entomopatogênicos à larvas de <i>Bradysia mabiusi</i>	23
5.2. Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação de <i>Steinernema feltiae</i> , no controle de <i>Bradysia mabiusi</i>	26
5.3 Efeito da combinação de <i>Steinernema feltiae</i> com o produto a base de <i>Bacillus thuringiensis</i> , Vectobac® sobre as larvas de <i>Bradysia mabiusi</i>	29
6. CONCLUSÕES	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

BALLONE, P. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE LARVAS DE “fungus gnat”, *Bradysia mabiusi*, E EFEITO DA INTERAÇÃO ENTRE *Steinernema feltiae* e *Bacillus thuringiensis* NA MORTALIDADE DO INSETO. Campinas, 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) - Instituto Biológico.

RESUMO

Bradysia são insetos da ordem Diptera, família Sciaridae, considerados importantes pragas em cultivos de cogumelo e viveiros de mudas, que atacam citros, fumo, ornamentais, morango e diversas outras plantas de importância econômica. No presente trabalho, em condições laboratoriais, foram testados isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) para avaliar a população de adultos emergentes da *Bradysia mabiusi*. Foram avaliados 14 isolados de nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* da Coleção de Entomopatogênicos “Odemar Cadim de Abreu”, Instituto Biológico. O procedimento utilizado foi padronizado para todos os testes, sendo estes potes plásticos contendo substrato orgânico, com ração de coelho para alimentação dos insetos. Estes foram levados à gaiola de infestação para oviposição dos adultos. Os tratamentos e a testemunha de água foram aplicados com auxílio de pipeta plástica, no substrato. Os potes foram fechados e acondicionados em câmara de crescimento com temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas ($T=25 + 1^{\circ}\text{C}$, $UR=70 + 10\%$, fotofase de 12 horas). Para avaliação do experimento foi colocado na parte superior dos recipientes uma fita dupla fase adesiva amarela (10 x 15 cm), o que permitiu a captura dos insetos adultos emergentes. Com os resultados, concluiu-se que os isolados de nematoides que apresentaram maior virulência para *Bradysia mabiusi* foram os *Steinernema* IBCB n° 2 (*S. carpocapsae*), IBCB n° 47 (*S. feltiae*) e o *Heterorhabditis* AM n° 124 (*H. amazonensis*), nos quais proporcionaram uma mortalidade total de 100% dos insetos. Para o teste de aplicação de diferentes épocas, concluiu-se que 21º dia de aplicação após a infestação do inseto, proporcionou um melhor controle da praga em questão. Para o teste de combinação, foi utilizado o nematoide *S. feltiae* associado ao produto comercial à base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), Vectobac®. Os tratamentos testados isoladamente em cada nível de dose proporcionaram mortalidade do inseto semelhante entre si, respectivamente de 8,98% de NEP (62 Juvenil Infectivo/pote) e 10,35% de Bt (0,17g/10L), de 14,81 (265 Juvenil Infectivo/pote) e 27,73 % (0,75g/10L) e de 28,33% (533 Juvenil Infectivo/pote) e 29,53% (1,5g/10L). Quando misturados, esses agentes apresentaram níveis de

mortalidade significativamente maior de 57,87% na menor dose (62 Juvenil Infectivo/pote + 0,17g/10L), 60,87% na intermediária (265 Juvenil Infectivo/pote + 0,75g/10L) e 80,99% na maior (533 Juvenil Infectivo/pote + 1,5g/10L). Isso sugere um efeito aditivo.

Palavras - chaves: Controle Biológico, Plantas ornamentais, Moscas-dos-fungos.

BALLONE, P. SELECTION OF ISOLATED entomopathogenic nematode CONTROL OF LARVAE "fungus gnat", *Bradysia mabiusi*, AND EFFECT OF INTERACTION BETWEEN *Steinernema feltiae* and *Bacillus thuringiensis* MORTALITY IN INSECT. Campinas, 2014. Dissertation (Mestrado em Health, Food Safety and Environmental Agribusiness) - Instituto Biológico.

ABSTRACT

Bradysia are insects of the order Diptera, family Sciaridae considered important pests in mushroom crops and nurseries, which attack citrus, tobacco, ornamentals, strawberries and many other plants of economic importance. In this study, under laboratory conditions, were tested isolates of entomopathogenic nematodes (NEPs) to assess the population of emerging adults *Bradysia mabiusi*. We evaluated 14 isolates of entomopathogenic nematodes (NEPs) of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* Collection of Entomopathogenic "Odemar Cadim de Abreu," Biological Institute. The procedure was standardized for all tests, which are plastic pots containing organic substrate with rabbit chow feeding insects. These were taken to the cage for oviposition infestation of adults. The treatments and the witness of water were applied with the aid of plastic pipette, the substrate. The jars were sealed and placed in growth with temperature, relative humidity and light controlled conditions (T = 25 + 1 ° C, RH = 70 + 10%, photoperiod of 12 hours) camera. For evaluation of the experiment was placed on top of the adhesive layer a yellow containers (10 x 15 cm) double-sided tape, which allowed the capture of adult insects emerging. With the results, it is concluded that the isolates of nematodes that showed greater virulence *Bradysia mabiusi* were *Steinernema* IBCB n ° 2 (*S. carpocapsae*), IBCB n° 47 (*S. feltiae*) and *Heterorhabditis* AM n° 124 (*H. amazonensis*), in which provided a total mortality of 100% of the insects. For the application of different testing times, it was concluded that 21 days after the application of insect infestation, gave better control of the pest in question. For the test combination, *S. feltiae* nematode associated with the commercial product based on *Bacillus thuringiensis* (Bt), Vectobac® was used. The treatments tested alone at each dose level yielded similar insect mortality among themselves, respectively 8.98% of NEP (62 infective juvenile / pot) and 10.35% of Bt (0.17g / 10L), 14.81% (265 infective juvenile / pot) and 27.73% (0.75 g / 10L) and 28.33% (533 infective juvenile / pot) and 29.53% (1.5g / 10L). When mixed, these agents showed significantly higher levels of mortality of 57.87% at the lowest dose (62 infective juvenile / pot + 0.17g / 10L), 60.87% in the intermediate (265 infective juvenile / pot +

0.75g / 10L) and 80.99% at the highest (533 infective juvenile / pot + 1.5g / 10L). This suggests an additive effect.

Key - words: Biological Control, Ornamental Plants, Fungus gnat

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais ordens de insetos susceptíveis às toxinas *Bacillus thuringiensis*
.....13

Tabela 2 - Isolados de nematoides entomopatogênicos com suas respectivas procedências, depositados na Coleção de Entomopatogênicos “Odemar Cadim de Abreu”, Instituto Biológico18

Tabela 3 - População de adultos de *Bradysia mabiusi*, originados de larvas de inseto expostas a diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos, em laboratório.....24

Tabela 4: População de adultos de *Bradysia mabiusi* originadas de larvas alimentadas com combinação de Vectobac e *S.feltiae* em laboratório.....30

Lista de Figuras

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Bradysia mabiusi</i>	4
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>	7
Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura mostrando diferentes tipos de cristais de <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
Figura 5 - Multiplicação de Nematoides entomopatogênicos (NEPs).....	19
Figura 6 - Inoculação de Nematoides entomopatogênicos (NEPs).....	20
Figura 7 - Montagem de experimento.....	20
Figura 8 - Densidade de <i>Bradysia mabiusi</i> emergidos de potes submetidos a infestação prévia com o inseto e inoculados com o nematoide <i>Steinernema feltiae</i> em três doses e em diferentes períodos após a infestação.....	28

1. INTRODUÇÃO

Bradysia são insetos da ordem Diptera, família Sciaridae. Hoje é uma das principais pragas que ocorrem em cultivos protegidos (GALLO *et al.*, 2002). No Brasil, este inseto danifica principalmente plantas ornamentais e causa grandes prejuízos também em mudas de diversas culturas, tais como, citros, fumo, morango e outras (PAIVA 2004; RADIN *et al.* 2006).

A fase adulta do inseto é responsável pela transmissão de fitopatógenos e a fase larval danifica o sistema radicular, devido à alimentação, causando lesões e facilitando a entrada de patógenos na raiz, dentre eles *Pythium* e *Fusarium* (LEATH & NEWTON, 1969; GRAHAM & MCNEILL, 1972).

A praga apresenta ampla distribuição biogeográfica, ultrapassando 100 gêneros em todo o mundo (ZANUNCIO *et al.* 1996), sendo mais de 190 espécies encontradas na América do Sul (AMORIM, 1992). *Bradysia coprophila* (Lintner) tem sido constatada como praga de muitas plantas cultivadas em casa de vegetação, incluindo ornamentais, pepino, alface, e em 1991 foi detectada pela primeira vez no Brasil atacando estacas de eucaliptos (ZANUNCIO *et al.* 1996)

Outra espécie encontrada no Brasil é *Bradysia mabiusi* relatada atacando plantas ornamentais no município de Holambra, São Paulo (LEITE *et al.* 2007). Até 2009, nenhum produto químico ou biológico havia sido registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o controle deste inseto (MAPA, 2009).

Uma das principais alternativas para o controle da praga, e que já vem sendo utilizada no controle de *Bradysia* sp. disponível em países da América do Norte e da Europa é o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) e da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti).

Os NEPs possuem a capacidade de buscar o hospedeiro em ambientes críticos, penetrando no inseto e liberando uma bactéria simbiote que causa septicemia do hospedeiro num período de 24 a 72 horas (FERRAZ, 1998; ACEVEDO, 2005). Já a bactéria Bti, atua no inseto por ingestão, constituindo-se da mistura da bactéria na forma de esporo e de um cristal proteico formado pela bactéria, que se dissolve no intestino do inseto e leva a uma toxicemia. Nessas condições, o esporo germina e a bactéria se reproduz, causando morte do inseto em 48 horas.

Como as larvas de *B. mabiusi* são encontradas no substrato atacando o sistema radicular, o uso de nematoides entomopatogênicos poderia ser uma alternativa para o controle da praga, sendo que o estudo de seleção de isolados é uma etapa fundamental para determinar quais nematoides podem ser utilizados no controle

e manejo do inseto praga (STUART et al. 2004; DOLINSKI & MOINO, 2006; GREWAL et al. 1994).

2. OBJETIVOS

- Avaliar a virulência de nematoides entomopatogênicos para o controle de larvas de *Bradysia mabiusi*.
- Avaliar o efeito de diferentes doses e épocas de aplicação de *Steinernema feltiae* no controle de larvas de *Bradysia mabiusi*.
- Avaliar o efeito da combinação de *S.feltiae* com o produto comercial a base de *Bacillus thuringiensis*, Vectobac® sobre larvas de *Bradysia mabiusi*

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Bradysia mabiusi* – Caracterização biológica, ecológica e taxonômica

Para a maioria dos insetos do gênero *Bradysia*, a morfologia e biologia se assemelham. Os adultos são pequenas moscas (2,5 cm de comprimento) de coloração cinza a preta, com pernas finas e longas, que colocam ovos (0,25 mm) amarelados, geralmente em grupos. Destes ovos eclodem as larvas, que medem até 0,6 mm de comprimento. Com ampla distribuição geográfica, os insetos ocorrem principalmente em ambientes sombreados e úmidos. As larvas que passam por quatro instares larvais e se alimentam principalmente de fungos, os quais se desenvolvem em materiais vegetais em decomposição e têm ocorrência natural em solos, como agentes decompositores de material orgânico (TAVARES, 2010; GRAHAM & MCNEILL, 1972).

Os períodos de desenvolvimento do inseto são de 4-6 dias para a fase de ovo, 12-14 dias para a de larva, e 3-4 dias para a de pupa. O ciclo de ovo a ovo pode ser completado em 20 a 25 dias (FIGURA 1).

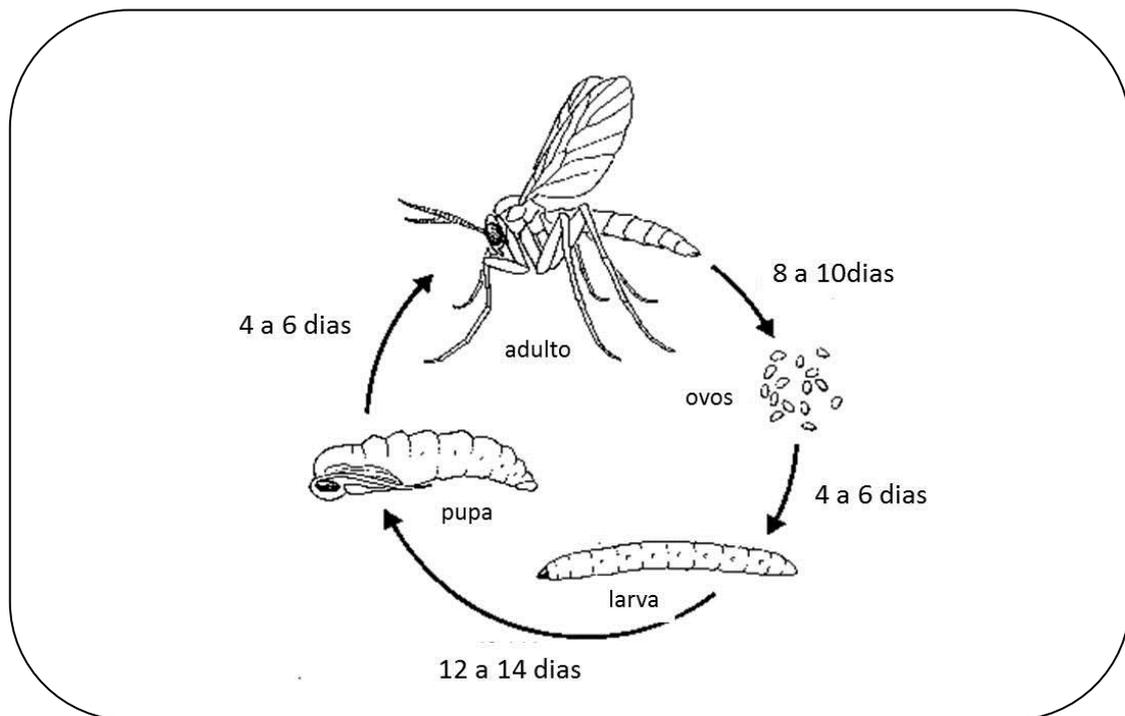


Figura 1: Ciclo de vida de *Bradysia mabiusi*
Fonte: Google imagens

No Brasil, algumas espécies têm importância para estudos básicos de genética (*Bradysia hygida*), e outras têm sido relatadas como pragas de essências florestais (*Bradysia croprophila*), plantas ornamentais e cogumelos (*Bradysia difformis* e *Bradysia ocellaris*) (GRAHAM & MCNEILL, 1972; TAVARES, 2010; GALLO et al. 2002). Esses insetos causam danos em diferentes espécies de plantas ornamentais, incluindo violeta africana, cravo, crisântemo, ciclamens, lillium, gerânios, impatiens e bico de papagaio (AMORIM, 1992). Além disso, são encontrados frequentemente em estufas de mudas cítricas, especialmente de porta-enxertos. No entanto, as espécies ainda não foram identificadas (TAVARES, 2010; LEATH & NEWTON, 1969).

As larvas são consideradas fitófagas (plantas), coprófagas (estercos) e micetófagas (fungos) (GRAHAM & MCNEILL, 1972; PAIVA, 2004; RUTHERFORD et al. 1985). Alguns fungos como ascomicetos, basidiomicetos e mixomicetos fazem parte da sua dieta natural. Sob condições adversas, com altas temperaturas e baixa umidade, as larvas se agregam para evitar a dessecação. Acreditava-se que as elas se alimentam exclusivamente de matéria orgânica morta e fungo, porém foi demonstrado que as larvas são capazes de se desenvolverem em raízes de plantas jovens e saudáveis, além de causar danos e morte das sementes. Este comportamento parece ser determinado pela disponibilidade de fontes alimentares primárias, que são os fungos (LEATH & NEWTON, 1969; ZANUNCIO et al. 1996; RADIN et al. 2006).

3.2. Disseminadores de fitopatógenos

HARRIS et al. (1995) citam o envolvimento destes insetos com a ocorrência de fitopatógenos. Por viverem em ambientes úmidos, no solo ou em substratos, as larvas são capazes de disseminar o oomiceto *Pythium* ou fungos como *Fusarium*, *Colletotrichum* ou *Botrytis*. Larvas de *Bradysia impatiens* que ingeriram oósporos e micélio de *Phyitium aphanidermatum* e se alimentaram de plantas jovens de pepino, rapidamente introduziram este fungo nas plantas (GRAHAM & MCNEILL, 1972; PAIVA, 2004; RUTHERFORD et al. 1985). Também foi observada a permanência de oósporos, adquiridos pela larva, até a fase adulta, porém com baixa frequência – 1,67%. Não foi constatada a transmissão externa do oomiceto pelos adultos, ou seja, as moscas não carregaram oosporos do fitopatógeno (OLSON et al. 2002; PAIVA, 2004; RADIN et al. 2006). Apesar de ter sido comprovada a transmissão de fungos e oomicetos por insetos de hábito alimentar do tipo mastigador, como as larvas de moscas, esta é considerada uma transmissão mecânica, e na maioria dos casos, facultativa; ou seja, a transmissão pode ocorrer eventualmente, o que de forma

alguma diminui a importância da associação do inseto com fitopatógenos (GRAHAM & MCNEILL, 1972; TAVEIRA, 1995).

3.3. Aspectos favoráveis à ocorrência do inseto

Os substratos de origem vegetal usados para cultivo de plantas em ambiente protegido podem permitir o desenvolvimento de fungos, que servem de alimento às larvas da mosca. Baixas populações de larvas ocorreram em meios muito úmidos ou muito secos. Teoricamente, é possível selecionar um substrato que maximize o crescimento das plantas e minimize o desenvolvimento das larvas. O tipo de substrato, sua origem e seu estado de decomposição, bem como o manejo da água no cultivo, parecem ser fatores importantes para o desenvolvimento destes insetos (LINDQUIST et al., 1985; OLSON et al., 2002).

A ocorrência do inseto nos cultivos protegidos pode ser monitorada usando-se placas adesivas de cor amarela como armadilhas. Um esquema de distribuição das armadilhas em forma de “W” foi sugerido para o monitoramento em estufas (RUTHERFORD et al., 1985). Outro método de avaliação da densidade populacional é a utilização de discos de batata, colocados sobre o substrato, para a contagem de larvas (HARRIS et al., 1995).

Dentre os métodos de controle inclui-se o uso de inseticidas químicos em pulverização, para controle de adultos, ou na forma de irrigação sobre o substrato, para o controle de larvas. No controle de larvas tem sido recomendado os inseticidas Confidor (Imidaclopridi 700g/Kg) 20g de p.c./100L, e Clorpirifós (480g/L) 75mL de p.c./100L, via irrigação (ZANETTI & LEITE, 2004).

3.4. Nematoides entomopatogênicos (NEPs) - Caracterização biológica, ecológica e taxonômica

Associações, espécie – específicas e simbióticas, com bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* tornaram os nematoides capazes de invadir e matar um grande número de espécies de insetos, originando o hábito entomopatogênico (FERRAZ, 1998). O termo designa a capacidade de gerar patogênese nos insetos, tanto por ação do nematoide que libera toxinas (KAYA, 1990; NGUYEN, 2010), quanto pela ação das bactérias associadas, que se reproduzem apesar do sistema imune do inseto, incapaz de barrar-lhes seu crescimento (FORST et al. 2010).

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) das famílias *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae* são agentes de controle biológico promissores e particularmente efetivos, quando aplicados a insetos que habitam ou passam parte do seu ciclo de vida no solo (AGUILLERA et al. 2001).

A forma larval de resistência dos NEPs é conhecida como juvenil infectante (JI), e encontrada livre no solo. Este juvenil infectivo consegue evitar dessecação e conferir maior tempo de sobrevivência, pois possui duas cutículas superpostas e seus orifícios naturais (boca e ânus) encontram-se fechados. Cada espécie de nematoide possui uma única espécie de bactéria associada a ele, essa monocultura de bactéria fica localizada dentro de seu tubo digestivo e estas são responsáveis pela morte do inseto (MILSTEAD, 1979).

O ciclo de vida inicia-se com a entrada do JI no inseto. No gênero *Steinernema*, o JI penetra no organismo pela boca ou espiráculos. Chegando ao hemoceloma, o JI libera a bactéria que reside no seu trato intestinal. Esta vai se reproduzir e causar septicemia no hospedeiro e a morte deste entre 24 a 48 horas (SPRINGER, 1995). Os juvenis se tornam adultos de primeira geração podendo ser machos ou fêmeas, ocorrendo assim à cópula (SMITH, 1991). Os ovos fertilizados são postos, mas alguns são retidos no interior da fêmea até a eclosão dos juvenis de estágio 1 (J1). Estes irão romper a parede do corpo da mãe e se alimentarão do inseto (FIGURA 2).

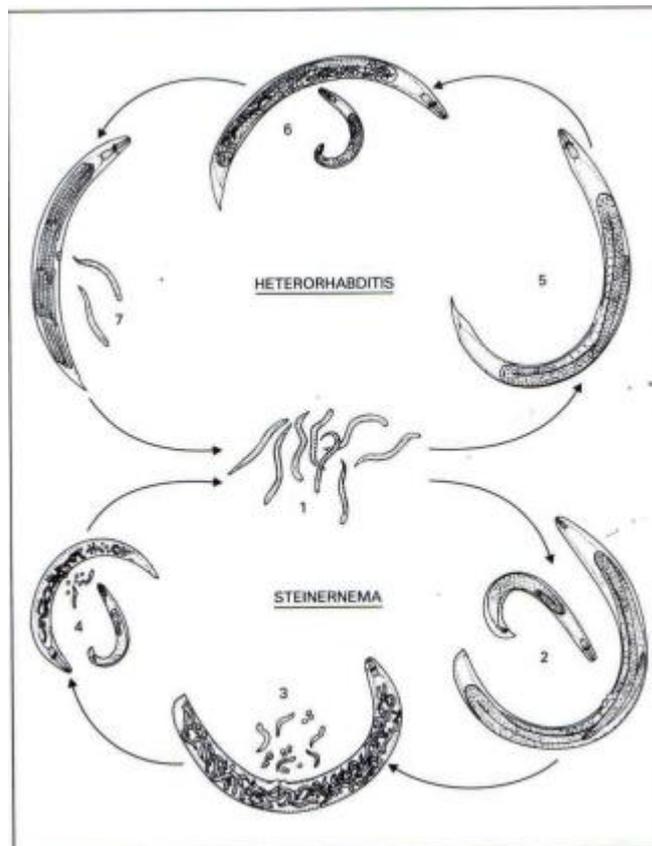


Figura 2. Ciclos de vida de *Steinernema* e *Heterorhabditis*
Fonte: POINAR (1990).

Os J1 completarão o ciclo passando por J2, J3, J4 e adultos de segunda geração. Estes adultos de segunda geração são menores que os de primeira geração, eles copulam e novos ovos e juvenis são liberados (POINAR, 1990).

Os NEPs se alimentam dos nutrientes liberados pelas bactérias e delas próprias. O ciclo de reprodução acaba quando o alimento se esgota, conseqüentemente os JIs se deslocam para o ambiente, procurando outro hospedeiro para recomeçar seu ciclo (NGUYEN; SMITH, 1991).

Ao contrário do que ocorre em *Steinernema*, os JIs de *Heterorhabditis* não precisam utilizar orifícios naturais do inseto para penetração, pois possuem um dente córneo que lhes permite perfurar a cutícula do inseto. Geralmente essas perfurações são feitas nas regiões mais finas e flexíveis, como entre os segmentos apendiculares (FORST et al. 2002). Apesar desta diferença, o ciclo de *Heterorhabditis* é bem semelhante ao do *Steinernema*. As diferenças são que os adultos de primeira geração do gênero *Heterorhabditis* são hermafroditas com morfologia de fêmeas (DOLINSKI & MOINO, 2006). Essas “fêmeas hermafroditas” produzem primeiramente espermatozoides que ficam armazenados na espermateca à espera dos ovócitos que serão produzidos. Se um único JI de *Heterorhabditis* infectar um inseto, terá sucesso, pois não há necessidade de cópula entre adultos de primeira geração para a produção de ovos fertilizados (MILSTEAD, 1979).

O aparecimento de machos e fêmeas acontece a partir da segunda geração, e nela a reprodução ocorre por fertilização cruzada. Os nematoides do 3º estágio retêm sempre um inóculo de bactéria em seu intestino, que liberados para o meio externo, onde permanecem até nova infecção (NGUYEN; BEDDING & MILLER, 1981).

3.5. Controle de *Bradysia mabiusi* com nematoides entomopatogênicos

As infestações de *Bradysia mabiusi* nos cultivos protegidos, com gerações contínuas e sobrepostas do inseto, têm levado a maioria das estratégias de controle a se tornarem ineficientes. Alguns inseticidas químicos tais como o diazinon e oxamyl não são muito eficientes no controle das moscas e podem ser fitotóxicos para as plantas novas desde a fase de plântulas (“seedlings”). Além disso, a aplicação de piretróides contra adultos é ineficiente devido à contínua imigração e emergência de novas gerações de adultos oriundos dos substratos (DELLACQUA, 2011).

As primeiras tentativas de uso de NEPs como agentes de controle da *Bradysia mabiusi* em cultivo protegido foram realizadas no final dos anos de 80 (BEDDING & MILLER, 1981; NEDSTAM & BURMAN, 1990). Várias espécies de nematoides, incluindo *Steinernema feltiae*, *Steinernema carpocapsae*, *Steinernema arenarium*

(*Steinernema anomalí*), *Steinernema riobrave*, *Steinernema glaseri* e *Heterorhabditis bacteriophora* foram avaliados, mas somente *S. feltiae* provou ser tão efetivo quanto os inseticidas químicos no controle de *Bradysia mabiusi* (HARRIS *et al.*, 1995).

De acordo com GOUGE & HAGUE (1994), *S. feltiae* penetra nas larvas do inseto através da boca e anus, e uma vez dentro, mata o inseto em um período máximo de 20 horas. Estes autores e TOMALAK (1994) notaram que, devido ao pequeno tamanho das larvas de *B. mabiusi*, os nematoides completam apenas uma geração dentro do cadáver e produzem cerca de 1000 Juvenis Infectivos/cadáver dentro de 6-7 dias da infecção. Atualmente, o uso comercial de nematoides tem se tornado uma prática comum no controle do inseto em cultivo protegido, especialmente pelo uso de *S. feltiae* na Europa e EUA.

Nos EUA, os nematoides *H. bacteriophora* (isolado GPS 11), *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis zealandica* e *S. carpocapsae* foram comparados com o *S. feltiae* na mortalidade de *Bradysia mabiusi*, dentro de uma câmara com temperatura oscilando na faixa de 22°C a 29°C, procurando assim selecionar um nematoide mais adequado para o controle do inseto em condições mais quentes, em casa de vegetação (TAVARES, 2010; TOMALAK *et al.* 1994). Os NEPs *H. bacteriophora* (GPS 11) e *H. indica* foram significativamente mais eficientes, contra a espécie *B. mabiusi* em cultivo de poinsetia.

3.6. Potencial de uso das bactérias

Os micro-organismos entomopatogênicos que mais chamam a atenção de pesquisadores e industriais em todo mundo, devido principalmente ao seu modo de ação e a sua especificidade, são as bactérias. Já foram identificadas bactérias patogênicas de diferentes espécies de insetos das ordens Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, e, também, de outros grupos de organismos como nematoides e protozoários (FEITELSON *et al.*, 1992).

As principais bactérias entomopatogênicas pertencem às famílias *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae*, *Streptococaceae* e *Achromobacteriaceae* (ARONSON *et al.* 1986).

Dentre elas destacam-se aquelas pertencentes à ordem *Bacillales*, mais 9 especificamente ao gênero *Bacillus*. *Bacillus thuringiensis* (Bt), juntamente com *Bacillus sphaericus* (Bs), são os mais importantes entomopatógenos do ponto de vista científico e industrial devido a um conjunto de características desejáveis que ambos apresentam.

Até hoje a espécie mais estudada é *B. thuringiensis*, tendo sido isolados inúmeros sorotipos, em diferentes regiões do mundo. Destacam-se por sua

importância como biolarvicidas algumas sorovariedades como a *israelensis*, *tenebrionis* e *kurstaki* (POLANCZYK, 2004).

Devido ao seu modo de ação, *B. thuringiensis* apresenta uma maior potência biológica quando comparada aos inseticidas químicos, destacando-se sua especificidade a insetos-alvos, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e a ausência da toxicidade em plantas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986).

COSTA et al. (2010), aponta a utilização de 13.000 toneladas de bactérias do gênero *Bacillus* como bioinseticidas em todo o mundo, sobretudo para insetos da ordem Lepidoptera e Diptera.

Atualmente muitas estirpes de Bt com potencial entomopatogênico têm sido isoladas não só do solo como também do interior de vegetais, sendo estes denominados “micro-organismos endofíticos” ou “endófitos” (ARONSON et al. 1986; FIUSA, 2010; FRACHON & THIERY, 1997).

3.7. *Bacillus thuringiensis* - Caracterização biológica, ecológica e taxonômica

São bactérias esporulantes, taxonomicamente enquadradas na Divisão *Firmicutes* (Gram positivas), pertencentes à família *Bacillaceae*, formadoras de endósporos e com duas fases principais durante o seu ciclo de vida: Fase de Crescimento vegetativo e Fase de esporulação (FAVARETTO et al. 2007; HENDRIKSEN et al. 2005; COSTA et al. 2010).

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria em forma de bastonete que apresenta motilidade, um esporo ovalado, inserido em um esporângio sem inchaço e cuja largura ultrapassa os 0,9µm (FRACHON & THIERY, 1997; LACEY, 1996). São muito utilizadas como princípio ativo de bioinseticidas graças a sua capacidade de formar cristais proteicos (corpos paraesporais) ricos em endotoxinas de ação entomopatogênica (POLANCZYK, 2004).

O Bt pode ser encontrado em diferentes substratos, tais como solo, água, insetos mortos, no interior dos vegetais (endofítico) bem como na interface solo-raiz (rizosférico), conforme sugerem ARONSON et al. (1986); FEITELSON et al. (1992); FIUZA, (2010). Além disso, a bactéria não é considerada um entomopatógeno agressivo, visto que dificilmente é encontrada causando epizootias naturais em insetos.

Segundo GLARE & O'CALLAGHAN et al. (2000), a produção de toxinas tão específicas e eficientes é justificada pela estreita relação simbiótica do micro-organismo com a planta e com o inseto.

A ação inseticida do Bt ocorre pela presença de proteínas (delta-endotoxinas) contidas em uma estrutura denominada corpo paraesporal. As delta-endotoxinas Cry são produzidas sob forma de pro-toxinas que no interior do inseto são transformadas em peptídeos tóxicos pela ação do pH alcalino intestinal de suas proteases. Quando a proteína é ativada causa lise das células epiteliais e a morte das larvas (SHAMSELDEAN, 1997; SIA, 2006; WHITELEY & SCHNEPF, 1986).

3.8. Os micro-organismos endofíticos como agentes de controle biológico

Os micro-organismos endofíticos, também conhecidos como endófitos, foram definidos como os que habitam tecidos internos da planta sem causar qualquer efeito negativo imediato (BRUM, 2008).

Embora descritos pela primeira vez na segunda metade do século XIX, tais micro-organismos não foram devidamente pesquisados até os anos 70 do século XX, quando ainda eram considerados inócuos às plantas e desde sua descoberta, vários autores procuraram defini-los (BETTIOL, 2010; SHAMSELDEAN, 1997; SIA, 2006; WHITELEY & SCHNEPF, 1986).

Devido a sua ação contra os patógenos e pragas de plantas, os micro-organismos endofíticos podem ser utilizados em Programas de Controle Biológico, em consonância com as concepções de um ambiente mais harmonioso, saudável e equilibrado, tanto para o homem quanto para as demais espécies. Idealizadas a partir da década de 1970, atualmente muito valorizada e cujos principais objetivos são o de melhorar a qualidade de vida das populações, reduzir os impactos ambientais causados pelos agroquímicos e manter os organismos-pragas abaixo do nível de dano econômico (ARONSON et al. 1986; FEITELSON et al. 1992).

Estudos recentes têm mostrado que bactérias e fungos endofíticos também podem atuar diretamente sobre o patógeno, parasitando suas células e impedindo o surgimento dos sintomas da doença vegetal ou ainda produzindo compostos com ação antibiótica contra o patógeno alvo. Alguns destes micro-organismos apresentaram propriedades entomopatogênicas, parasitando os insetos pragas e provocando sua morte (GLARE & O'CALLAGHAN et al. 2000).

Sabe-se também que esta capacidade de controlar pragas e patógenos da planta foi adquirida pelos microrganismos endofíticos ao longo de sua evolução com o seu hospedeiro, resultando numa estreita relação mutualística entre eles e o vegetal (FRACHON & THIERY, 1997; LACEY, 1996).

Dentre os benefícios conferidos à planta hospedeira pode-se citar: maior resistência em ambientes com estresse; maior proteção contra o ataque dos

herbívoros (graças à produção de compostos tóxicos que reduzem a atratividade da planta); maior proteção contra o ataque de fitopatógenos (devido à produção de antibióticos e metabólitos inibidores do seu desenvolvimento) bem como promoção do crescimento vegetal. Já os benefícios conferidos aos micro-organismos endofíticos estão relacionados à obtenção de nutrientes e abrigo que lhes garantem maior sobrevivência (FAVARETTO et al. 2007; HENDRIKSEN et al. 2005; COSTA et al. 2010).

3.9. A utilização do Bt como agente de controle biológico

Os produtos a base de Bt são comercializáveis há mais de 50 anos e segundo POLANCZYK et al. (2004) e ALVES (1998), seu mercado consumidor vem crescendo no Brasil e no mundo. Cerca de duzentos produtos a base de Bt são utilizados, tanto na área agrícola, quanto na área de saúde pública. Tais bioprodutos são responsáveis por 53% do mercado mundial de bioinseticidas. Na América Latina, África e Oriente Médio, as estimativas de venda giram em torno de 36 milhões de dólares ao ano. Embora tenha ocorrido declínio das proporções de venda dos bioinseticidas Bt quando comparadas às estimativas feitas nos anos de 1990 (90% do mercado mundial) e nos anos 2004/5 (60% do mercado mundial) isso não traduz diminuição da importância deste bioproduto para o controle dos insetos-praga e vetores de doenças (CPL – BUSINESS CONSULTANTS, 2010).

Até a década de 1970, a maior potência dos bioinseticidas formulados com Bt era baseada no número de esporos. Entretanto, hoje em dia novas formulações passaram a levar em consideração a presença dos cristais que contêm as delta-endotoxinas (ARONSON et al. 1986; FEITELSON et al. 1992).

LACEY (1996) aponta a alta susceptibilidade de algumas ordens de insetos às toxinas do Bt: mais de mil espécies de insetos são susceptíveis a elas, sendo que dentre as diversas ordens dotadas de susceptibilidade, três delas destacam-se, sendo a lepidoptera, diptera e coleoptera (TABELA 1).

TABELA 1: Principais ordens de insetos susceptíveis às toxinas de *Bacillus thuringiensis*

Principais ordens de insetos susceptíveis às toxinas do <i>Bt</i>	Número de espécies susceptíveis
Diptera	266
Hemiptera	48
Hymenoptera	62
Isoptera	5
Coleoptera	106
Lepidoptera	572
Neuroptera	4
Orthoptera	6
Siphonoptera	7
Thysanoptera	3

Fonte: POLANCKZYK (2004)

Atualmente, o produto a base de Bt com maior alcance no mercado mundial é o Dipel, que apesar de apresentar pouca toxicidade contra ácaros, coleopteros, dipteros e hemipteros, apresentam alta toxicidade contra 170 espécies de Lepidópteros (POLANCKZYK et al. 2004).

No Brasil a utilização de produtos a base de Bt Kurstaki/Aizawai está por volta de 275 toneladas (CPL – BUSINESS CONSULTANTS, 2010).

Entretanto, BETTIOL (2010) acredita que em um país como o Brasil que apresenta enorme potencial agrícola, justificado pelo seu privilegiado clima, abundância de recursos hídricos e pela sua rica biodiversidade, o potencial de utilização dos produtos a base de Bt poderá ser estendido.

3.9.1 Características dos cristais proteicos e seu mecanismo de ação

O *Bacillus thuringiensis* é um micro-organismo esporulante capaz de produzir toxinas que são patogênicas a diversos organismos vivos. Tais toxinas são codificadas por genes denominados “Genes *cry*”, localizados tanto no material cromossômico quanto nos plasmídeos. As delta-endotoxinas, comumente chamadas de proteínas CRY, são apenas alguns dos constituintes do cristal proteico presentes no Bt, cujo peso molecular varia entre 14 a 152 kda. O cristal também pode ser constituído de endotoxinas citolíticas (Cyt) de menor peso molecular (de 25 a 28 kda). Entretanto, os genes que as codificam estão contidos somente em grandes plasmídeos (SHAMSELDEAN, 1997; SIA, 2006; WHITELEY & SCHNEPF, 1986).

Cada célula precisa sintetizar de 10^6 a 2×10^6 moléculas de endotoxinas para formar o cristal proteico (POLANCKZYK et al. 2004; PRAÇA, 2004;), sendo que a forma do cristal é determinada pelo número de endotoxinas produzidas bem como pela sua composição e estrutura molecular (FIGURA 3).

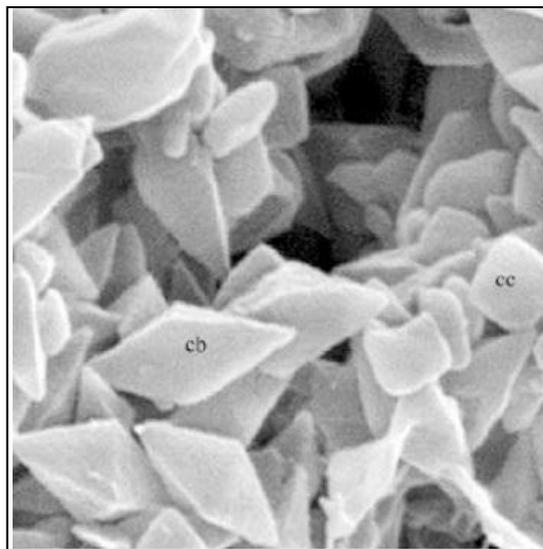


Figura 3: Micrografia eletrônica de varredura mostrando os diferentes tipos de cristais de *Bacillus thuringiensis*: cb: cristal bipiramidal; cc: cristal cubóide
Fonte: Google imagens

A formação do esporo ocorre quando as condições do meio encontram-se adversas. O **primeiro estágio** corresponde à esporulação, onde a célula bacteriana para seu crescimento. Ao iniciar o **segundo estágio**, há duplicação do material genético, seguida pela espiralização da cromatina e pelo aparecimento de uma estrutura condensada, de natureza proteica, que dará origem ao cristal proteico. O **terceiro estágio** caracteriza-se pela formação do pré-esporo, que cresce concomitantemente à aglutinação das proteínas Cry, responsáveis pela formação do cristal proteico (**quarto estágio**). No **quinto estágio** do ciclo biológico do *Bacillus thuringiensis*, há a formação do envelope esporal em torno do esporo, deixando o cristal proteico, ainda em crescimento, fora do corpo esporal. É no **sexto estágio** que ocorre a maturação do esporo, sendo que nesta fase o cristal proteico atinge seu tamanho máximo. E finalmente, no **sétimo estágio** da esporulação ocorre a lise celular e a expulsão, tanto do cristal proteico, quanto do esporo, altamente resistente às adversidades ambientais (FAVARETTO et al. 2007; COSTA et al. 2010; HENDRIKSEN et al. 2005) (FIGURA 4).

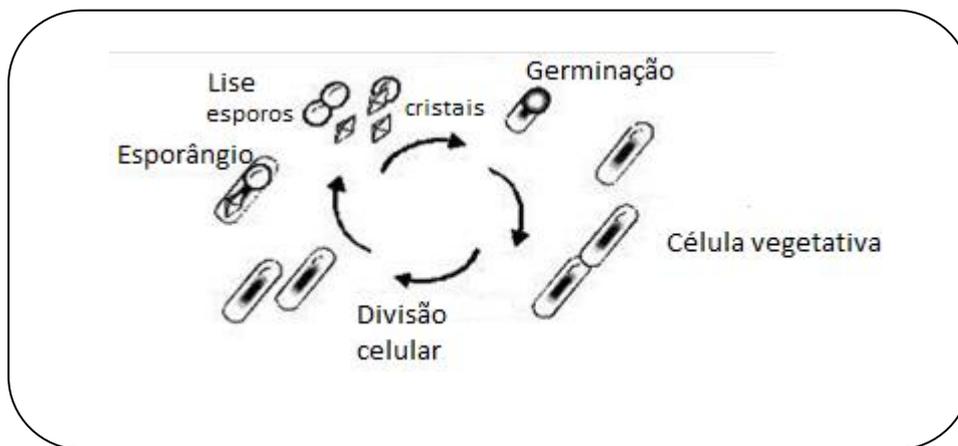


Figura 4: Ciclo de vida do *Bacillus thuringiensis*.

Fonte: Google imagens

O mecanismo de ação das toxinas do Bt está ligado à ingestão dos cristais proteicos pelo inseto suscetível, que ocorre após a lise bacteriana. A morte do inseto é resultado de um processo que pode durar de um a três dias após a ingestão dos cristais e dos esporos (POLANCZYK et al 2004).

Segundo FIUZA (2010) o processo de intoxicação do inseto-alvo passa por vários estágios e está relacionado à ingestão e solubilização dos cristais proteicos; liberação e ativação das pro-toxinas; reconhecimento dos receptores específicos das delta-endotoxinas e formação de poros nas células do epitélio intestinal do inseto, resultando na lise celular, seps e morte do inseto.

O pH alcalino presente no intestino médio dos insetos suscetíveis leva à solubilização dos cristais proteicos, ingeridos juntamente com os esporos, e à liberação das pro-toxinas. A alcalinidade do sistema digestório do inseto e a capacidade de decomposição dos cristais do Bt são dois fatores que determinam o nível de especificidade da toxina frente ao inseto-alvo. As pró-toxinas são ativadas pela ação das enzimas digestivas, originando quatro ou mais polipeptídeos tóxicos, que constituem as delta-endotoxinas. A composição proteolítica e a estrutura proteica do cristal são fatores importantes na determinação da eficiência das delta-endotoxinas como biopesticida (FAVARETTO et al. 2007; HENDRIKSEN et al. 2005; COSTA et al. 2010).

As delta-endotoxinas são hidrolisadas e atravessam a membrana celular ligando-se aos receptores específicos presentes na membrana apical das células colunares do intestino médio do inseto. A ligação de forte afinidade entre a toxina e o receptor é considerada um importante fator de determinação do espectro inseticida das proteínas Cry, embora não seja o único determinante. O reconhecimento do receptor pela delta-endotoxina induz a formação de poros na membrana celular do epitélio intestinal, o que gera interferência no gradiente iônico e balanço osmótico

celular, levando a um aumento da permeabilidade e absorção de água pela célula, hipertrofia celular, vacuolização do citoplasma e lise celular. Assim, a parede do intestino é destruída, gerando a paralisia intestinal do inseto. Os esporos alcançam a hemocele e a diminuição do pH, provocada pela mistura do conteúdo intestinal, leva à germinação dos esporos. A morte do inseto ocorre pela cessação da alimentação ou pela sepse, o qual serve como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria (ARONSON et al. 1986; FEITELSON et al. 1992).

4. MATERIAL E MÉTODOS

No estudo foram utilizados os nematoides entomopatogênicos da coleção “Oldemar Cardim Abreu”, depositados no Instituto Biológico. Os experimentos foram realizados nas dependências do laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, sediado em Campinas, São Paulo.

4.1 Obtenção e manutenção dos insetos

As larvas de *B. mabiusi* foram obtidas de criação em laboratório. Os adultos coletados foram transportados ao laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, onde foram liberados dentro de gaiolas plásticas contendo 40 potes de plástico (350 mL) preenchidos com o substrato orgânico comercial Vivatto Pro® (Technes Agrícola Ltda), para criação do inseto. As larvas do inseto foram alimentadas com feijão preto cozido, que foi adicionado na superfície do substrato ou levemente enterrado no mesmo. Dentro das gaiolas foram liberados cerca de 50 adultos, e o substrato foi irrigado diariamente, mantendo-se levemente umedecido.

4.2. Virulência de nematoides entomopatogênicos à larvas de *Bradysia mabiusi*

Foram avaliados 14 isolados de nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* (IBCB n° 02, n° 06 e n° 47; AM n° 39 e n° 132; CER n° 17 e n° 125; PAM n° 10, n° 29 e n° 42) e *Heterorhabditis* (IBCB n° 05 e n° 24; AM n° 71 e n° 124) provenientes de diversos hospedeiros e diferentes regiões geográficas, escolhidos quanto à origem relacionada à praga ou disponibilidade de material biológico na Coleção de Entomopatogênicos “Odemar Cadim de Abreu”, Instituto Biológico (TABELA 2).

TABELA 2: Isolados de nematoides entomopatogênicos com suas respectivas procedências, depositados na Coleção de Entomopatogênicos “Odemar Cadim de Abreu”, Instituto Biológico

ISOLADOS	ESPECIES	ORIGEM	PROCEDÊNCIA
IBCB n° 02	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Solo	Florida (EUA)
IBCB n° 05	<i>Heterorhabditis indica</i>	Solo – Citrus	Itapetininga (SP)
IBCB n° 06	<i>Steinernema brazilense</i>	Solo – Mata	Porto Murinho (MG)
IBCB n° 24	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Larva <i>Sphenophrus levis</i>	Piracicaba (SP)
IBCB n° 47	<i>Steinernema feltiae</i>	-----	-----
AM n° 39	<i>Steinernema diaprepesi</i>	Solo – Plantação milho	Sinop (MT)
AM n° 71	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Solo – Plantação banana	Sinop (MT)
AM n° 124	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Solo – Plantação milho	Sinop (MT)
AM n° 132	<i>Steinernema diaprepesi</i>	Solo – Plantação milho	Sinop (MT)
CER n° 17	<i>Steinernema costaricense</i>	Solo	Rio Verde (GO)
CER n° 125	<i>Steinernema puertoricense</i>	Solo	Rio Verde (GO)
PAM n° 10	<i>Steinernema rarum</i>	Solo - Mata	Aceguá (RS)
PAM n° 29	<i>Steinernema rarum</i>	Solo – Mata	Aceguá (RS)
PAM n° 42	<i>Steinernema rarum</i>	Solo - Mata	Aceguá (RS)

Os nematoides foram multiplicados em lagartas de 3º e 4º instar *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas conforme metodologia adaptada descrita por Machado (1988). Utilizando-se placas de Petri, contendo papel filtro no fundo, no qual se adicionou 1,5 mL de suspensão com aproximadamente 500 JI (juvenis infectivos). Logo em seguida, em cada placa foram colocados 5 insetos e após 10 dias os insetos mortos foram transferidos para armadilhas modificadas de

White (FIGURA 5). Os nematoides, antes de serem usados em cada experimento, foram armazenados à 15°C, no escuro, por um período de 10 dias, para garantir que todos alcançassem a fase de juvenis infectivos sem que a viabilidade fosse reduzida para menos de 90%.

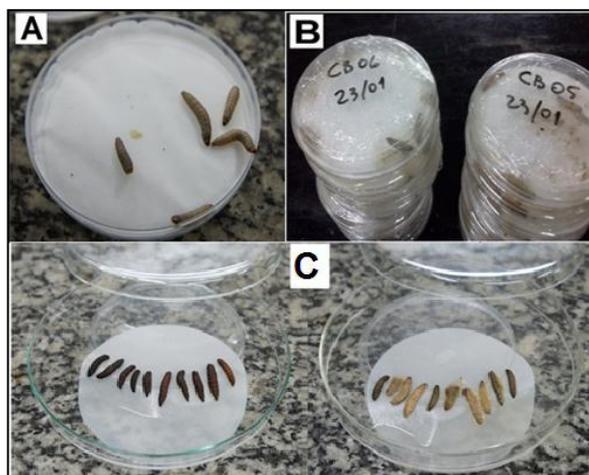


Figura 5: Multiplicação de Nematoides entomopatogênicos - (A e B) Placas de Petri contendo lagartas de *Galleria mellonella* de 3º e 4º inoculadas com nematoide; (C) Armadilha de White contendo lagartas de *Galleria mellonella* mortas por nematoides entomopatogênicos.

Fonte: Advaldo Francisco Barreto

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado constituído de 15 tratamentos. Estes representados pelos 14 nematoides e 1 testemunha inoculada com água destilada, onde cada tratamento era constituído de 8 repetições sendo estes copos plásticos de 200 mL (9 cm de diâmetro na abertura) contendo 50 g de substrato (Vivatto Pro®) umedecido a 10%, mais 2 grãos de ração de coelho, agrupados na superfície do substrato, no centro do pote. Os nematoides foram testados na dosagem de 883JI/pote.

Os copos foram levados à gaiola de infestação (2 x 1,5 x 0,5 cm) para oviposição dos adultos de *Bradysia mabiusi* por 24 horas. Os nematoides foram suspensos em água e aplicados com auxílio de pipeta plástica, 14 dias após a infestação para atingir larvas de 3º e 4º instares. A testemunha foi inoculada com água destilada no mesmo volume dos tratamentos com NEPs. Os nematoides foram aplicados no substrato. Cada pote foi fechado e acondicionado em câmara de crescimento com temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas ($T=25 \pm 1^\circ\text{C}$, $UR=70 \pm 10\%$, fotofase de 12 horas). Para avaliação do experimento foi colocado na parte superior dos recipientes uma fita adesiva amarela (10 x 15 cm), o que permitiu a captura dos insetos adultos emergentes. A avaliação foi realizada 14 dias após a aplicação dos tratamentos, contando-se o número de insetos adultos emergentes aderidos na placa adesiva (FIGURA 7 e 8). Os dados de população de

adultos por placa adesiva foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das 8 repetições comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade com auxílio do programa computacional Assistat.

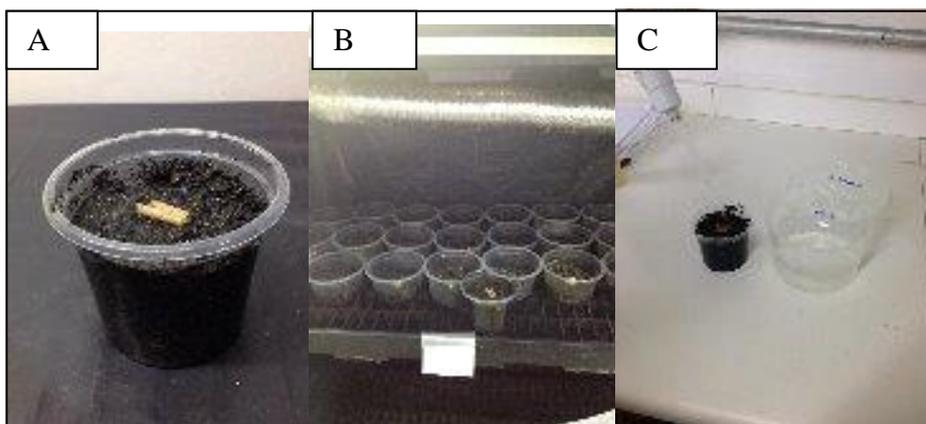


Figura 6: Inoculação de Nematoides entomopatogênicos - (A) Copos plásticos contendo substrato orgânico Vivatto Pro[®] umedecido a 10% contendo 2 grãos de ração de coelho no centro do copo; (B) Copos plásticos na gaiola de infestação; (C) Copos prontos para inoculação.

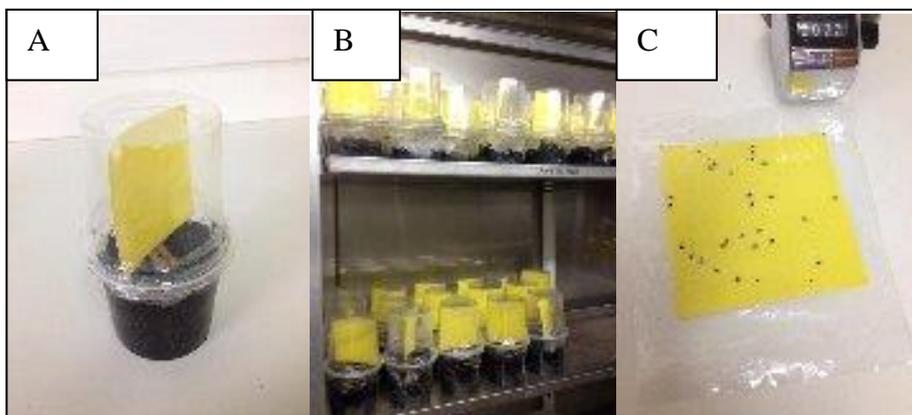


Figura 7: Montagem de experimento - (A) Gaiola utilizada no experimento com placa adesiva amarela para captura de adultos emergentes; (B) Experimento em $T=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}=70 \pm 10\%$, fotofase de 12 horas; (C) Contagem de adultos emergentes aderidos na fita adesiva amarela.

4.3. Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação de *Steinernema feltiae*, no controle de *Bradysia mabiusi*

Foram considerados 16 tratamentos representados pelo nematoide testado em 3 doses, 173JI/pote (dose baixa), 883JI/pote (dose média) e 4417 JI/pote (dose alta) (63,6 cm²), onde cada tratamento era constituído de 8 repetições sendo estes copos plásticos de 200 mL (9 cm de diâmetro na abertura) contendo 50 g de substrato (Vivatto Pro®) umedecido a 10%, mais 2 grãos de ração de coelho, agrupados na superfície do substrato, no centro do pote. O nematoide foi aplicado logo após a infestação do substrato com adultos do inseto, aos 7 dias, 14 e 21 dias após, mais as respectivas testemunhas inoculadas com água destilada..

Todos os potes foram transferidos para uma gaiola de (2 x 1,5 x 0,5 cm) contendo uma criação do inseto e expostos a população de adultos para oviposição. Os potes foram mantidos dentro da gaiola por 2 horas. Cada pote foi fechado e acondicionado em câmara de crescimento com temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas ($T=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $UR=70 \pm 10\%$, fotofase de 12 horas). Para avaliação do experimento foi colocado na parte superior dos recipientes uma fita adesiva amarela (10 x 15 cm), o que permitiu a captura dos insetos adultos emergentes.

Para cada período pós-infestação, o nematoide foi aplicado em suspensão aquosa com auxílio de uma pipeta plástica, distribuindo-se em cada pote menor, sobre o substrato, 0,04 a 1 mL dependendo da dose.

A avaliação foi realizada aos 31 dias da infestação dos potes com adultos do inseto, contando-se o número de adultos emergentes fixados nas placas adesivas. Os dados de população de adultos por placa adesiva foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das 8 repetições comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade com auxílio do programa computacional Assistat.

4.4. Efeito da combinação de *Steinernema feltiae* com produto comercial a base de *Bacillus thuringiensis*, Vectobac® sobre as larvas de *Bradysia mabiusi*

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado constituído de 15 tratamentos, sendo *S. feltiae* testado em 5 doses separadamente (883JI/pote; 533JI/pote; 265JI/pote; 132JI/pote e 62JI/pote) o produto comercial a base de *Bacillus thuringiensis*, Vectobac® testado nas 5 doses (2,5g/10L; 1,5g/10L; 0,75g/10L 0,37g/10L e 0,17g/10L) a testemunha inoculada com água e as combinações como menor dose (62 Juvenis Infectivos/pote; 0,17g/10L), dose intermediária (265 Juvenis Infectivos/pote; 0,75g/10L) e maior dose (533 Juvenis Infectivos/pote; 1,5g/10L). Foram considerados 8 repetições por tratamento, representadas por copos plásticos de 200 mL (9 cm de diâmetro na abertura) contendo 50 g de substrato (Vivatto Pro®) umedecido a 10%, mais 2 grãos de ração de coelho, agrupados na superfície do substrato, no centro do pote.

Os copos foram levados à gaiola de infestação (2 x 1,5 x 0,5 cm) para oviposição dos adultos por 24 horas. Os tratamentos foram aplicados com auxílio de pipeta plástica, logo após a infestação. Cada pote foi fechado e acondicionado em câmara com temperatura, umidade relativa e luminosidade controlada ($T=25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $UR=70 \pm 10\%$, fotofase de 12 horas). Para avaliação do experimento foi colocado na parte superior dos recipientes uma fita adesiva amarela (10 x 15 cm), o que permitiu a captura dos insetos adultos emergentes. A avaliação foi feita 28 dias após a aplicação dos tratamentos, contando-se o número de insetos adultos emergentes aderidos na placa adesiva. Os dados de população de adultos por placa adesiva foram submetidos à análise de variância, sendo as médias das 8 repetições comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade com auxílio do programa computacional Assistat.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Virulência de nematoides entomopatogênicos à larvas de *Bradysia mabiusi*

Todos os nematoides foram patogênicos, causando reduções na população acima de 70%. Os nematoides que causaram reduções de população acima de 90% foram *H. indica* IBCB n° 5, *H. amazonensis* IBCB n° 24, *S. rarum*, isolados PAM n° 10, PAM n° 29 e PAM n° 42, *H. amazonensis* AM n° 124, *S. carpocapsae* IBCB n° 2 e *S. feltiae* IBCB n° 47. Dentre esses, os mais virulentos foram *S. feltiae* IBCB n° 47, *S. carpocapsae* IBCB n° 02 e *H. amazonensis* AM n° 124, com 100% de redução da população do inseto, diferindo significativamente dos demais (TABELA 3).

Os nematoides *S. feltiae* e *S. carpocapsae* já vem sendo recomendados e usados no controle de *Bradysia mabiusi* em países de clima temperado com temperatura amena, proporcionando níveis de controle variando de 51 a 94%. JAGDALE et al (2004) observaram que uma única aplicação de *S. feltiae* ($2,5 \times 10^6$ JIs/m²) em larvas de segundo, terceiro e quarto instar, em temperaturas abaixo de 25 °C, produziu alto nível de controle. Uma provável explicação para o sucesso no uso do *S. feltiae* nessas regiões deve a sua maior adaptação a climas amenos, sendo um nematoide mais encontrado em regiões de clima temperado (HOMINICK, 2002; GOUGE & HAGUE, 1995).

O nematoide *H. amazonensis* AM n° 124 foi originado do Amazonas e portanto, seria uma opção para uso em países de clima tropical, com temperaturas mais quentes. Da mesma forma, o nematoide *H. indica* é um organismo mais encontrado em regiões tropicais e subtropicais, tendo sido recomendado por JAGDALE et al (2004) para o controle da mosca dos fungos em regiões de climas mais quentes. Em estudo comparando *S. feltiae* com *H. indica* foi obtido melhores resultados com o primeiro nematoide na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, e melhores com o segundo na temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$.

Os nematoides menos virulentos, com reduções de população abaixo de 90%, foram 5 do gênero *Steinernema* (*S. diaprepesi* AM n° 132, *S. costaricense* CER n° 17, *S. puertoricense* CER n° 125, *S. brazilense* IBCB n° 06, *S. diaprepesi* AM n° 39) e apenas 1 do gênero *Heterorabditis* (*H. amazonensis* AM n° 71). Entre as razões para a menor virulência desses nematoides, pode ser o maior tamanho comparados aos mais virulentos, com as espécies *S. brazilense*, *S. portoricense* e *S. costaricense* apresentando os maiores tamanhos.

TABELA 3: População de adultos de *Bradysia mabiusi*, originados de larvas de inseto expostas a diferentes isolados de nematóides entomopatogênicos, em laboratório (T = 25 ± 1°C, UR = 70 ± 10% e fotofase de 12 horas).

ESPÉCIES	POPULAÇÃO	ERRO PADRÃO (+/-)	REDUÇÃO DE POPULAÇÃO (%)
TESTEMUNHA	181 a *	0,54	0
<i>Steinernema diaprepesi</i>	53,5 b	0,48	70,5
<i>Steinernema brazilense</i>	44,5 c	1,13	75,5
<i>Heterorhabditis amazonenses</i>	34 d	0,70	81,3
<i>Steinernema puertoricense</i>	25 e	0,76	86,2
<i>Steinernema costaricense</i>	24,5 e	0,75	86,5
<i>Steinernema diaprepesi</i>	19,5 f	1,52	89,3
<i>Heterorhabditis indica</i>	12,5 g	0,84	93,1
<i>Heterorhabditis</i> sp	8 h	0,74	95,6
<i>Steinernema rarum</i>	4 i	0,70	97,8
<i>Steinernema rarum</i>	4 i	0,43	97,8
<i>Steinernema rarum</i>	3,5 i	0,66	98,1
<i>Steinernema carpocapsae</i>	0 j	0	100
<i>Steinernema feltiae</i>	0 j	0	100
<i>Heterorhabditis amazonense</i>	0 j	0	100
C. V (%)	5,49		

(*) Médias de 8 repetições seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (P ≤ 0,05).

Os nematoides *S. feltiae* e *S. carpocapsae* já vem sendo recomendados e usados no controle de *Bradysia mabiusi* em países de clima temperado com temperatura amena, proporcionando níveis de controle variando de 51 a 94%. JAGDALE et al (2004) observaram que uma única aplicação de *S. feltiae* ($2,5 \times 10^6$ JIs/m²) em larvas de segundo, terceiro e quarto instar, em temperaturas abaixo de 25 °C, produziu alto nível de controle. Uma provável explicação para o sucesso no uso do *S. feltiae* nessas regiões deve a sua maior adaptação a climas amenos, sendo um nematoide mais encontrado em regiões de clima temperado (HOMINICK, 2002; GOUGE & HAGUE, 1995).

O nematoide *H. amazonensis* AM n^o 124 foi originado do Amazonas e portanto, seria uma opção para uso em países de clima tropical, com temperaturas mais quentes. Da mesma forma, o nematoide *H. indica* é um organismo mais encontrado em regiões tropicais e subtropicais, tendo sido recomendado por JAGDALE et al (2004) para o controle da mosca dos fungos em regiões de climas mais quentes. Em estudo comparando *S. feltiae* com *H. indica* foi obtido melhores resultados com o primeiro nematoide na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, e melhores com o segundo na temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$.

Os nematoides menos virulentos, com reduções de população abaixo de 90%, foram 5 do gênero *Steinernema* (*S. diaprepesi* AM n^o 132, *S. costaricense* CER n^o 17, *S. puertoricense* CER n^o 125, *S. brazilense* IBCB n^o 06, *S. diaprepesi* AM n^o 39) e apenas 1 do gênero *Heterorhabditis* (*H. amazonensis* AM n^o 71). Entre as razões para a menor virulência desses nematoides, pode ser o maior tamanho comparados aos mais virulentos, com as espécies *S. brazilense*, *S. portoricense* e *S. costaricense* apresentando os maiores tamanhos.

Esses nematoides tem tamanho superior a 1284 µm, o que pode gerar maior dificuldade para penetração nas larvas do inseto. Em contrapartida, o nematoide *S. feltiae* tem se apresentado virulento para *Bradysia* spp. e vem sendo utilizado com sucesso no controle desse inseto em diversos países (HARRIS et al. 1995; GOUGE & HAGUE, 1995; JAGDALE et al. 2004; BECKER UNDERWOOD, 2009), sendo um dos motivos para isso o seu tamanho relativamente pequeno (880 µm) para os padrões desse gênero. SCHEEPMAKER et al (1998) também ressaltaram que o tamanho dos nematoides pode interferir na sua capacidade de penetração no hospedeiro, tendo justificado resultados insatisfatórios na mortalidade de larvas de *Magaselia halterata* (Wood) (Diptera: Phoridae) inoculadas com o nematoide *S. feltiae*, pelo fato dele ser maior que os esperiláculos e outras aberturas naturais do inseto.

5.2. Efeito de diferentes doses e épocas de aplicação de *Steinernema feltiae*, no controle de *Bradysia mabiusi*

O nematoide *S. feltiae* não reduziu a população de *Bradysia mabiusi* quando aplicado no dia da infestação e 7 dias após a infestação com o inseto devido provavelmente a presença do inseto somente na fase de ovo e larva de primeiro instar na primeira (no dia da infestação) e segunda aplicação (7 dias após), respectivamente.

O nematoide começa a reduzir a população do inseto quando aplicado duas semanas após a infestação para as doses de 173 e 883 Juvenis Infectivos/cm², porém gerando níveis de controle (de 40 e 60%, respectivamente) ainda baixos para as doses relativamente elevadas (FIGURA 8).

Somente quando aplicado três semanas após a infestação é que o nematoide começa a apresentar viabilidade de uso, proporcionando reduções significativas na população do inseto a partir da menor dose, de 4 Juvenis Infectivos/cm², com nível de controle de 60%, considerado elevado para uma dose relativamente baixa. Da mesma forma, JAGDALE et al (2004) obtiveram melhor resultado de controle da *Bradysia mabiusi* com *S. feltiae* em cultura protegida de poinsettia comumente conhecida como, bico de papagaio, quando o nematoide foi aplicado 16 dias após o transplante das mudas, no momento em que as larvas do inseto encontravam-se no 4^o instar e, portanto, suscetíveis ao nematoide (FIGURA 8).

A aplicação dentro do período, a partir do transplante até após 8 dias, não resultou em nenhum efeito no controle do inseto, uma vez que o hospedeiro encontrava-se no estágio de ovo e larvas de primeiros instares, portanto mais resistente ao nematoide. Conseqüentemente, não ocorreu a persistência do nematoide no ambiente e sua população foi reduzida para níveis insuficientes para promover o controle da praga, após o surgimento de altas populações de larvas em estágios mais avançados. A presença do inseto hospedeiro é um dos principais fatores responsáveis pela manutenção de altas populações de nematóides entomopatogênicos no ambiente (KAYA, 1990).

TAVARES et al (2010) testaram o nematoide *Heterorhabditis indica* contra *Bradysia mabiusi* em potes mantidos por 14 dias expostos a infestação espontânea do inseto e obtiveram pouco mais de 50% de controle na dose de 10 Juvenis Infectivos/cm². Esse teste de infestação espontânea apresentou níveis de mortalidade do inseto nas dosagens de 10 e 25 Juvenis Infectivos/cm² inferiores àqueles sob infestação artificial, pela aplicação desse nematoide nas mesmas dosagens. A menor mortalidade do inseto na infestação espontânea deveu-se provavelmente a maior variação nas fases do inseto e a presença em maior número de fases mais resistentes

ao nematoide (1^o e 2^o instar larval e pupa) nos potes tratados com o agente, sendo esse fato já verificado por Harris *et al.* (1995). Possivelmente, pode estar relacionado ao menor manuseio dos insetos na infestação espontânea, resultando em menor estresse ao inseto e menor predisposição ao ataque do nematóide (SCHEEPMAKER *et al.* 1998).

No presente estudo, o teste de infestação espontânea pode apresentar condições semelhantes ao de cultivos comerciais e, conseqüentemente, gerar resultados mais próximos da realidade encontrada pelo agricultor. Dessa forma, o nível de mortalidade do inseto de 61%, obtido para a dose de 4 Juvenis Infectivos/cm², pode ser considerado bastante satisfatório já que foi utilizado uma dose bastante baixa comparada a dose utilizada em outros países (25 x 10⁸ Juvenis Infectivo/cm²).

Ressalta-se que os resultados em condições de campo dependerão também de temperatura favorável para atuação do *S. feltiae*. A atuação de nematoides entomopatogênicos é fortemente influenciada pela temperatura (GREWAL *et al.* 1994; MOLYNEUX, 1986). *S. feltiae* é uma espécie adaptadas ao frio, com a infecção ocorrendo entre 8 e 30°C e a reprodução entre 10 e 25°C. A baixa persistência e falta de reprodução de *S. feltiae* em temperaturas quentes representa uma séria restrição para a utilização da espécie nas estufas onde muitas vezes as temperaturas passam de 30°C durante o verão. De acordo com GOUGE & HAGUE (1995), se a temperatura do solo permanecer acima de 25°C por um período de tempo prolongado, a eficácia de *S. feltiae* contra *Bradysia mabiusi* é reduzida.

O nematoide *S. feltiae* aplicado na concentração de 5 x 10⁵ Juvenis/m², levou apenas 17-18 dias para reduzir mais de 70% da população de *Bradysia* em câmara de crescimento (22 °C), mas levou 42-45 dias para para reduzir 41% da população em 25°C (JAGDALE *et al.* 2004).

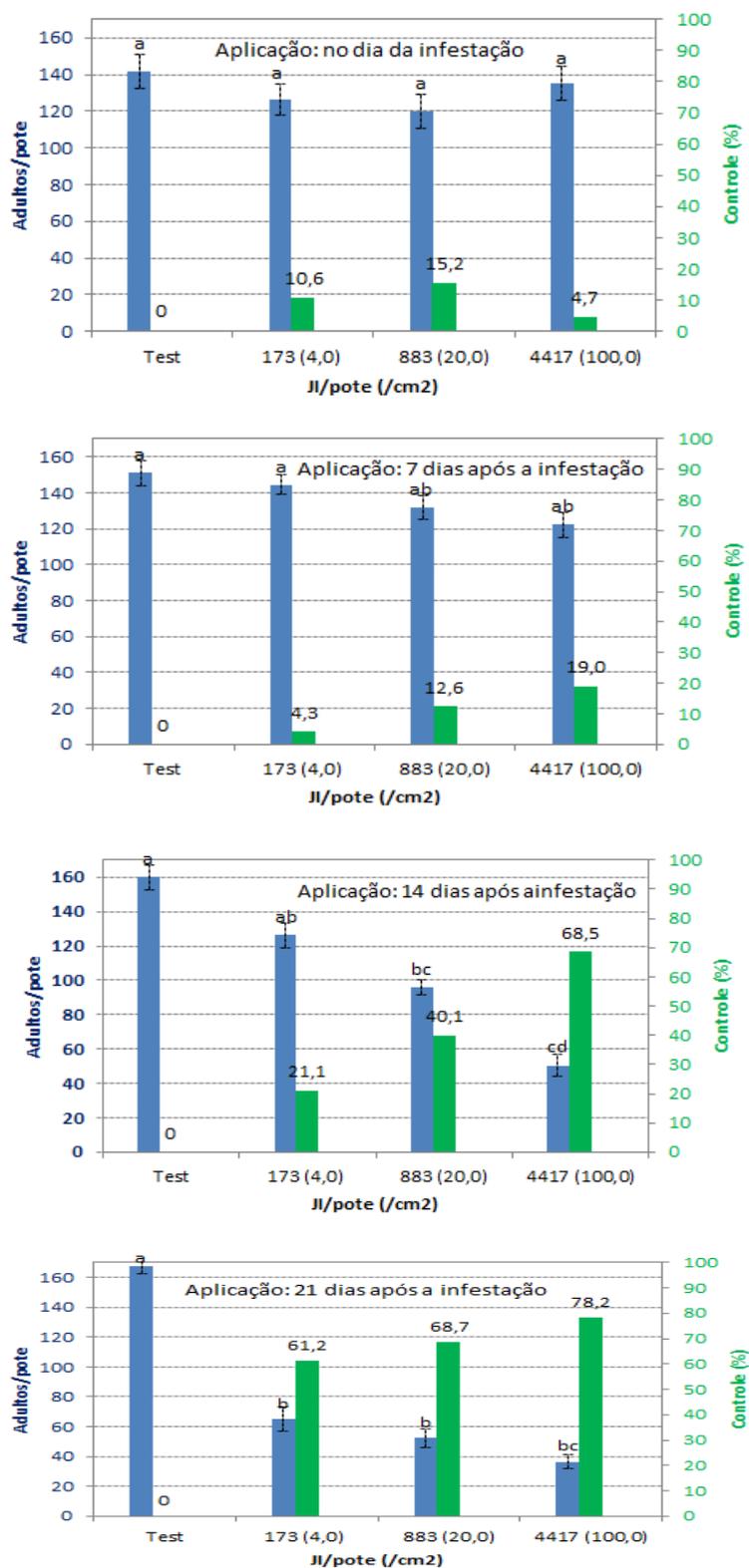


Figura 8: Densidade de *Bradysia mabiusi* emergidos de potes submetidos a infestação prévia com o inseto e inoculados com o nematoide *Steinernema feltiae* em três doses e em diferentes períodos após a infestação. Médias de 8 repetições seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. JI (Juvenis Infectivos). C.V. (%) = 3,64 e C.V.(%) = 3,78 e C.V. (%) = 4,85 e C.V. (%) = 8,92

5.3 Efeito da combinação de *Steinernema feltiae* com o produto a base de *Bacillus thuringiensis*, Vectobac® sobre as larvas de *Bradysia mabiusi*

Os tratamentos de Nematoides entomopatogênicos (NEPs) e *Bacillus thuringiensis* (Bt) testados isoladamente em cada nível de dose proporcionaram níveis de mortalidade do inseto semelhantes entre si, respectivamente de 8,98% e 10,35% na menor dose (62 Juvenis Infectivos/pote; 0,17g/10L), de 14,81% e 27,73% na dose intermediária (265 Juvenis Infectivos/pote; 0,75g/10L) e de 28,33% e 29,53% na maior dose (533 Juvenis Infectivos/pote; 1,5g/10L). Quando misturados, esses agentes proporcionaram níveis de mortalidade significativamente maior em cada nível de dose, de 57,87% na menor dose (62 Juvenis Infectivos/pote + 0,17g/10L), 60,87% na intermediária (265 Juvenis Infectivos/pote + 0,75g/10L), e 80,99% na maior (533 Juvenis Infectivos/pote + 1,5g/10L) (TABELA 4). Isso sugere um efeito aditivo decorrente das misturas desses agentes, com a melhor mistura aquela que apresentar o melhor custo e benefício.

Uma forma de incrementar a eficácia de entomopatógenos é utilizá-los em conjunto com inseticidas ou outros agentes de controle biológico. A interação entre inseticidas convencionais e produtos formulados com *Bacillus thuringiensis* (Bt) foi amplamente estudada e em alguns casos, foram obtidos resultados satisfatórios (BENZ, 1971).

TABELA 4: População de adultos de *Bradysia mabiusi* originadas de larvas alimentadas com combinação de Vectobac e *S.feltiae* em laboratório (T = 25 ± 1°C, UR = 70 ± 10% e fotofase de 12 horas).

ISOLADOS	POPULAÇÃO	REDUÇÃO DE POPULAÇÃO (%)
TESTEMUNHA	73,25 a *	0
<i>Steinernema feltiae</i> (62JI/pote)	66,43 b	8,98
VECTOBAC (0,17g/10L)	65,43 b	10,35
<i>Steinernema feltiae</i> (132JI/pote)	62,81 c	13,95
VECTOBAC (0,37g/10L)	62,68 c	14,12
<i>Steinernema feltiae</i> (265JI/pote)	62,18 c	14,81
VECTOBAC (0,75g/10L)	52,75 d	27,73
<i>Steinernema feltiae</i> (533JI/pote)	52,31 d	28,33
VECTOBAC (1,5g/10L)	51,43 d	29,53
<i>Steinernema feltiae</i> (62 JI/pote) + VECTOBAC (0,17g/10L)	30,75 e	57,87
<i>Steinernema feltiae</i> (132 JI/pote) + VECTOBAC (0,37g/10L)	29,75 e	59,24
<i>Steinernema feltiae</i> (265 JI/pote) + VECTOBAC (0,75g/10L)	28,56 e	60,87
<i>Steinernema feltiae</i> (533 JI/pote) + VECTOBAC (1,5g/10L)	13,87 f	80,99
C.V. (%)	1,95	

(*) Médias de 8 repetições seguidas de mesma letra, na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott (P ≤ 0,05). JI (Juvenis Infectivos).

Esta interação baseia-se no princípio de que o inseticida convencional atua como agente estressante do inseto, levando-o a adquirir ou ativar doenças infecciosas, tornando-o mais suscetível às toxinas do Bt. Mais recentemente, o estudo da interação de bioinseticidas à base Bt e outros entomopatógenos ganhou maior ênfase (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). A compatibilidade com outros bioinseticidas ou com agentes naturais de controle é importante no desenvolvimento de estratégias que utilizam entomopatógenos em programas de Manejo Integrado de Pragas (GARDNER et al., 1984). É essencial, nestes casos estudar as interações potenciais, principalmente para viabilizá-los economicamente e também para avaliar seu impacto sobre o ambiente. Porém, o estudo destas interações tem um elevado grau de complexidade e as respostas aditivas são raras, mesmo em laboratório (KOPPERNHOFER & KAYA, 1999). As mesmas dificuldades, até em maior grau, são observadas em campo. Apesar destas dificuldades, alguns estudos de laboratório foram feitos para avaliar o efeito aditivo de Bt com outros entomopatógenos SHAMSELDEAN & ISMAIL (1997) estudam o efeito da interação dos nematoides entomopatogênicos *H. bacteriophora* e *Steinernema glaseri* com Bt, e observaram efeito aditivo para *Cyclocephala hirta*, *C. pasadenae* e *Agrotisipsilon*, respectivamente.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com as observações feitas por BENZ (1971). Este autor afirma que não é apropriado fazer generalizações sobre a interação entre entomopatógenos, pois muitas vezes o resultado da interação depende mais das concentrações utilizadas do que do patógeno em si.

No entanto, deve-se verificar se esta interação ocorre em condições de campo, onde fatores bióticos e abióticos podem afetar significativamente a ação dos agentes de controle. Devido à complexidade de fatores no ambiente natural, a definição dos parâmetros a serem avaliados a campo é importante para evitar desperdício de material, tempo e trabalho. Em sistemas agrícolas com uso constante de bioinseticidas e cujas pragas são reguladas por outros patógenos, que atuam como agentes do controle biológico natural, os estudos de suas interações devem ser considerados com maior ênfase.

6. CONCLUSÕES

Os isolados de nematoide que apresentaram maior virulência contra larvas do *Bradysia mabiusi* foram IBCB n° 2 (*S. carpocapsae*), IBCB n° 47 (*S. feltiae*) e AM n° 124 (*H. amazonensis*).

Para o teste de diferentes dias de aplicação concluiu-se que o 21º dia após a infestação do inseto proporcionou uma melhor redução na população de *Bradysia mabiusi* na dose 4417 Juvenis Infectivos/pote.

Para o teste de combinação entre *S. feltiae* e o produto comercial a base de *Bacillus thuringiensis*, Vectobac[®] observou-se um efeito aditivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, J. P. M. **Patogenicidade, multiplicação e biologia de insetos nativos de nematóides entomopatogênicos**. Lavras: Minas Gerais, 2005.

AGUILLERA, M. M.; VOSS, M.; PARON, M. J. F. O; SALVADORI, J.R. **Controle biológico de *Diloboderus abderus* (Coleoptera: Melonlothidae): estudos preliminares com nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Steinernematidae e Heterorhabditidae)**. In: Reunião sul – brasileira de pragas de solo. Londrina: Paraná-Embrapa Soja Documentos, v.172, p. 202 – 207, 2001.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: São Paulo, 100p,1998.

AMORIM, D. S. **A catalogue of the family Sciaridae (Diptera) in the Americas South of the United States**. Revista Brasileira de Entomologia, v.36, p. 55-77, 1992.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUM, P. ***Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 50, p. 1-24,1986.

BECKER UNDERWOOD. Nemasys®. Disponível em: <http://www.beckerunderwood.com/en/products/nemasys_BN> Acesso em: 15 nov. 2009.

BEDDING, R. A. & MILLER, L. A. **Use of a nematode, *Heterorhabditis heliothidis*, to control Black vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*, in potted plants**. Annals of Applied Biology, v. 99, p. 211-216, 1981.

BENZ, G. **Synergism of micro-organisms and chemical insecticides**. In Burges, HD; HUSSEY, NW. (Ed.) Microbial control of insects and mites. Londres: Academic Press, cap. 14, p.327-356. 1971.

BETTIOL, R. M. **Controle Biológico**. 3ª ed. São Paulo,51p, 2010.

BRUM, M. C. P. **Fungos endofíticos de *Vitis labrusca L. var. Niagara Rosada* e o seu potencial biotecnológico**. Mogi das Cruzes: São Paulo. Tese (Doutorado) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes: São Paulo, 2008.

COSTA, L. N. E. et al. **Artrópodes e Bactérias Entomopatogênicas**. Distrito Federal: Brasília, 58p, 2010.

CPL BUSINESS CONSULTANTS. Disponível em: <<http://www.cplsis.com/index.php?reportid=335&category=76>> Acesso em: 10 set. 2014.

CROFT, B. A. **Developing a philosophy and program of pesticide resistance management**. New York: Chapman and Hail, p. 277-296, 1990.

DELL ACQUA, R. **Identificação Molecular e Morfométrica de nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditia) e eficiência de *Heterorhabditis spp*, no controle de *Bradysia spp* (Diptera: Sciaridae) em cultivo protegido de crisântemo**. Dissertação (Mestrato) - Instituto Biológico, Campinas: São Paulo, 2011.

DENHOLM, I. & ROLLAND, M. W. **Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice.** Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 37, p.91-112, 1992.

DOLINSKI, C. & MOINO, A. **Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos e exóticos: o perigo das introduções.** Lavras: Minas Gerais, 2006.

FAVARETTO, C. et al. **Associação de Bioensaios e Caracterização Molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda*.** Jaboticabal: São Paulo, 2007.

FERRAZ, L. C. C. B. **Nematóides Entomopatogênicos.** p. 541-569, 1998.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. ***Bacillus thuringiensis*: insect and beyond.** Biotechnology, v. 10, p. 271-275, 1992.

FIUZA, L. M. **Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento. Brasília: Distrito Federal, v. 38, p. 32-35, 2010.

FRACHON, E. & THIERY, I. **Identification, isolation, culture and preservation of entomopathogenic bacteria,** 1997.

FORST, S.; DOWDS, B.; BOEMARE, N.; STACKEBRANDT, E. ***Xenorhabdus* and *Photobacterium* spp.: bugs that kill bugs.** Annual Review of Microbiology, v. 51, p. 47 – 72, 2002.

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

GARDNER, W. A.; NOBLET, R.; SCHWEHR, R. **The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae).** Florida Entomologist, v.67, p.325-332, 1984.

GOUGE, D. H. & HAGUE, N. G. M. **Glasshouse control of fungus gnats, *Bradysia paupera*, on fuchsias by *Steinernema feltiae*.** Fund. Appl. Nemat., v. 18, p.77-80, 1994.

GLARE, TR & O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety.** Chichester: John Wiley & Sons, 350 p, 2000.

GRAHAM, C. L. & MCNEILL, M. J. **Soybean Crow and root damage by *Bradysia coprophila*.** Jour. Econ. Entomol, v. 65, p.597-599, 1972.

GREWAL, P. S. et al. **Thermal adaption of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction.** Journal of Thermal Biology, v.19, p. 35-42, 1994.

HARRIS, M. A. et al. **Use of entomopathogenic nematodes and a new monitoring technique for control fungus gnats, *Bradysia coprophila* (Diptera: Sciaridae), in floriculture.** Biol. Contr., v. 5, p. 412-418, 1995.

HAWTHORNE, D. **Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop.** Journal of Economic Entomology, Lanham, v. 91, p. 565-571, 1998.

HEMINGWAY, J. & RANSON, H. **Insecticide resistance in insect vectors of human disease.** Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 45, p. 371-391, 2000.

HENDRIKSEN, N. B. et al. **Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam.** Department of Environmental Chemistry and Microbiology, 2005.

HOMINICK, W.M. **Entomopathogenic nematology.** New York: CABI, p.115-144, 2002.

JAGDALE, G.B.; CASEY, M.L.; GREWAL, P.S.; LINDQUIST, R.K. **Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Steinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture.** Biological Control, v. 29, p. 296-305, 2004.

KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control.** Florida: Boca Raton, CRC Press, p. 93-115, 1990.

LACEY, L. A. et al. **Insect pathogens as biological control agentes: do they have a future.** Biocontrol, v. 24, p. 85-110, 1996.

KOPPENHOFER, A. M; CHOO, H. Y; KAYA, H. K; LEE, D. W. **Increased field and greenhouse efficacy against scarab groups with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*.** Biological Control, v.14, p.37-44, 1999.

LEATH, K. T. & NEWTON, R. C. **Interaction of a fungus gnat, *Bradysia* sp. (Sciaridae) with *Fusarium* spp.** Phitopath, v. 59, p. 257-258, 1969.

LEITE, L. G. et al. **Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nemata: Rhabdita) contra larvas da mosca-dos-fungos *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) e persistência de *Heterorhabditis indica* Poinar et al. 1992, em substratos orgânicos.** Arquivos Instituto Biológico, v.74, p. 337-342, 2007.

LINDQUIST, R. K. et al. **Effect of various soilless root media and insecticides on fungus gnats.** Hortsciencie, v. 20, n. 3, 1985.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** Disponível em: <www.agricultura.gov.br>, Acesso em: 08 set. 2014.

MILSTEAD, J.E. ***Heterorhabditis bacteriophora* as a vector for introducing its associated bacterium into the hemocoel of *Galleria mellonella* larvae.** J. Inv. Pathol, v. 33, p. 324-327, 1979.

MOLYNEUX, A.S. **Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and the subsequent infectivity for insects.** Revue Nematol., v. 8, p. 165-170. 1986.

NEDSTAM, B. & BURMAN, M. **The use of nematodes against sciarids in Swedish greenhouses.** SPOR/WPRS Bulletin, v. 13, p. 147-148, 1990

NGUYEN, K. B. **Entomology & Nematology Department University of Florida.** 1992. Disponível em: < <http://entnem.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/kbnstein.htm> > Acesso em: 08 set. 2010.

OLSON, D. L. et al. **Effect of soilless potting media and water management on development of fungus gnats (Diptera: Sciaridae) and plant growth.** Hortscience, v. 37, n. 6, 2002.

PAIVA, P. E. B. **Mosca dos fungos: praga potencial de mudas cítricas em São Paulo.** Citricultura Atual, v. 40, p. 18-19, 2004

PRAÇA, L. B. et al. **Estipes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra as ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília: Distrito Federal, v. 39, n. 1, 2004.

POINAR JR., G. O. **Biology and Taxonomy of *Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*.** Biological Control. Boca Raton, CRC Press, v. 365, p. 23-61. 1990.

POLANCZYK, R. A. et al. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba: São Paulo, 2004.

RADIN, B. et al. **Mosquito do fungo: Uma nova praga no morango cultivado em estufa.** Série Técnica Fepagro, n. 2, 2006.

RUTHERFORD, T. A. et al. **Monitoring fungus gnat (Diptera: Sciaridae) in cucumber greenhouses.** The Canadian Entomologist, v.117, 1985.

SHAMSELDEAN, M. M. M. **Effect of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and the bacterium *Bacillus thuringiensis* as integrated biocontrol agents og the black cutworm.** Anzeiger fuer Schaedlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz, v.70, p.77-99, 1997.

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

SMITH, P. H. & EHLERS, R.U. **Identification of *Heterorhabditis* spp. by morphometric characters and RFLP and or their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. by species specific DNA probes.** Bull SROP/WPRS, v.14, p. 195-201, 1991.

SPRINGER, T.L. **Fungus gnat (Diptera: Sciaridae) feeding damage to legume seedlings.** Journal of the Kansas Entomological Society, v. 68, n. 2, p. 240-242, 1995.

SIA, E. F. **Isolados endofíticos e entomopatogênicos de *Beauveria* spp: Caracterização e importância Biotecnológica.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes: São Paulo, 2006.

STUART, R. J. et al. **Virulence of new and mixed strains of entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* to larvae of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus***. Biol. Contr., v. 30, p. 339-445, 2004.

TAVARES, M. F. **Avaliação de nematóides entomopatogênicos no controle de *Bradysia mabiusi***. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu: São Paulo, 2010.

TAVEIRA, J. A. M. **Fungus Gnat (*Bradysia spp*)**. Boletim Técnico: Horticultura Piracicaba: São Paulo, p.1-5, 1995.

TOMALAK, M. **Selective breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) for improved efficacy in control of a mushroom fly, *Lycoriella solani* Winnertz (Diptera: Sciaridae)**. Biocontrol Science and Technology, v. 4, p. 187-198, 1994.

WHITELEY, W. R. & SCHNEPF, H. E. **The molecular biology of parasporal crystal bodyformation in *Bacillus thuringiensis***. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v. 40, p.549-576, 1986.

ZANETTI, M. & LEITE, L. G. **Fungus gnat: disseminador de doenças fúngicas**. Informativo Vivecitrus, v. 14, 5 p, 2004.

ZANUNCIO, J.C. **Ciclo biológico de *Bradysia coprophila* (Litner) (Diptera, Sciaridae) em estacas de *Eucalyptus grandis* (Myrtaceae)**. Revista Brasileira de Entomologia, v. 40, p. 197-199, 1996.