



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ**

**CAMPUS LUIZ MENEGHEL**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**ANDRÉIA DE OLIVEIRA GIANNASI**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Agrotis ipsilon* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) (Hufnagel, 1767) E TESTES COM NEMATÓIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE  
E HETERORHABDITIDAE) VISANDO O SEU CONTROLE**

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL  
2014**

**ANDRÉIA DE OLIVEIRA GIANNASI**

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Agrotis ipsilon* (LEPIDOPTERA:  
NOCTUIDAE) (Hufnagel, 1767) E TESTES COM NEMATÓIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE  
E HETERORHABDITIDAE) VISANDO O SEU CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Agronomia, da Universidade  
Estadual do Norte do Paraná, *Campus*  
Luiz Meneghel.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Sandra  
Alves

BANDEIRANTES, PR, BRASIL  
2014

Giannasi, Andréia de Oliveira

G37a Aspectos biológicos de *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hufnagel, 1767) e testes com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) visando o seu controle / Andréia de Oliveira Giannasi. – Bandeirantes, 2014.  
66f. ilustr.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup>. Viviane Sandra Alves.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, 2014.

Banca: Dr. Rudiney Ringenberg, Dr<sup>a</sup>. Laila Herta Mihsfeldt, Dr<sup>a</sup>. Viviane Sandra Alves.

1. Lagarta-rosca. 2. Controle microbiano. 3. Noctuidae. I. Universidade Estadual do Norte do Paraná. III. Título.

CDD – 632.9

**ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Agrotis ipsilon* (LEPIDOPETERA:  
NOCTUIDAE) (Hufnagel, 1767) E TESTES COM NEMATOIDES  
ENTOMOPATOGÊNICOS (RHABDITIDA: STEINERNEMATIDAE  
E HETERORHABDITIDAE) VISANDO O SEU CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Mestrado em Agronomia, da Universidade  
Estadual do Norte do Paraná, *Campus*  
Luiz Meneghel.

Aprovada em: 16/04/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Rudiney Ringenberg

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laila Herta Mihsfeldt

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Viviane Sandra Alves

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Viviane Sandra Alves  
Orientadora  
Universidade Estadual do Norte do  
Paraná,  
*Campus* Luiz Meneghel

Dedico este trabalho à minha avó  
Aldevina de Jesus Giannasi (in memoriam)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por sempre apoiar meus estudos;

Aos novos amigos conquistados nas aulas, principalmente a Flaviane Medeiros pelas caronas e conversas até Bandeirantes, pelas explicações em estatística que me ajudou a passar com louvor, e também foi praticamente uma professora de agronomia para as perguntas que só eu não sabia; a Luana Rentschler querida amiga que me deu pouso todo domingo durante o semestre, por me mostrar os bons lanches da cidade e pela alegria transmitida;

Aos professores pelos ótimos ensinamentos e conversas que poderei levar para a vida toda;

As eficientes secretárias do mestrado, Solange Gonçalves e Sonia R. pela ajuda sempre que necessário, e a coordenadora Terezinha Reis;

Ao Marcelo Zart pela excelente ajuda tanto nos ensaios como na escrita da dissertação, pelos pães de mel que animavam meus dias, os almoços todos os dias, inclusive aos longos sábados e domingos passados no laboratório;

Ao pessoal da longa jornada de criação da linda *Agrotis ipsilon*, Camila Brambila, Fran Furlan, Renatinha Novaes, Renan Pimentel, Jéssica Meschini, Carola Apolinário e Rê Alfredo por ficar trocando a dieta com todo cuidado;

As meninas da cozinha da UENP-CP, pelas conversas jogadas fora para acalmar;

A professora Viviane Alves por me orientar mais uma vez, pela paciência na dificuldade do trabalho, e por ser uma pessoa tão querida sempre;

Ao Fabrício Docema que passou alguns sábados me ajudando a pesar folhas de milho para alimentar as lagartas, pela paciência quando eu tinha que escrever e não dar atenção para ele;

Aos doutores, Jael Rando, Laila Mihsfeldt e Rudiney Ringenberg pela idéias na qualificação e defesa para enriquecer minha dissertação;

A minha prima Aline Leme e a tia Verô Oliveira por acordar de madrugada no sábado para me ajudar a imprimir a dissertação;

E principalmente a Deus por me ajudar nessa longa caminhada; Obrigada!

Trust thyself only, and another shall not  
betray thee!  
Thomas Fuller

GIANNASI, Andréia de Oliveira. **Aspectos biológicos de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae) e testes com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) visando o seu controle.** Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2014.

## RESUMO

A lagarta-rosca, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de importância econômica em várias culturas, inclusive milho (*Zea mays*) podendo chegar à perda potencial de 20%. A ausência de informações sobre seu impacto em milho motivou a comparação de sua biologia, nas fases larval e pupal com dieta artificial e natural (folha de milho). Nematoides entomopatogênicos (NEPs) apresentam juntamente com bactérias uma associação simbiótica que consegue controlar insetos. Os juvenis infectivos de nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* buscam seus hospedeiros no solo e, quando os encontram, penetram em suas aberturas naturais ou perfuram sua cutícula matando o inseto em até 48 horas. Em laboratório, lagartas foram individualizadas e alimentadas com dieta artificial e folha de milho diariamente, para avaliar os parâmetros biológicos de duração e viabilidade dos instares larvais, duração total e individual de cada instar larval e pupa, razão sexual, deformação, massa de lagartas e pupas, consumo e utilização do alimento. Foi feito também a seleção em laboratório de isolados de NEPs utilizando nove isolados, sendo eles: *Heterorhabditis amazonensis* (RSC05); *Heterorhabditis indica* (IBCB-n05); *H. sp.* (JPM4), *H. sp.* (IBCB-n40); *H. sp.* (NEPET 11); *H. sp.* (IBCB-n44); *H. sp.* (Alho); *Steinernema carpocapsae* (IBCB-n02) e *S. sp.* (CH3). Também foi realizado teste com diferentes estágios nas fases larvais e pupa, teste de diferentes concentrações (0 – testemunha, 50 JIs/cm<sup>2</sup>, 100 JIs/cm<sup>2</sup>, 150 JIs/cm<sup>2</sup> e 200 JIs/cm<sup>2</sup>) de NEPs e produção *in vivo* em lagartas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) com isolados IBCB-n02, IBCB-n05 e Alho, onde no teste de seleção e concentração foram utilizadas lagartas de 3º instar de *A. ipsilon* e teste em casa de vegetação. Na biologia de vida, as lagartas que foram alimentadas com folha de milho tiveram uma maior duração larval e maior deformidade em pupas e adultos, e as lagartas alimentadas com dieta artificial tiveram maior viabilidade de lagartas e pupas e menor duração larval, lagartas alimentadas com dieta artificial ingeriram mais alimento, produziram mais fezes, tiveram maior ganho de peso e metabolizaram mais alimento. Na seleção somente o isolado NEPET 11 não alcançou mortalidade eficiente (10%), o que diferiu do restante que foi superior a 80%, chegando a 100% com o isolado CH3. No teste com diferentes estágios nas fases larvais e fase de pupa nenhum isolado alcançou maior mortalidade quando comparadas com lagartas do 3º instar, nas diferentes concentrações de NEPs, o isolado Alho alcançou 10% de mortalidade para a concentração de 50 JIs/cm<sup>2</sup> e o isolado IBCB-n05 alcançou 100% de mortalidade na concentração de 200 JIs/cm<sup>2</sup>. No teste de produção *in vivo* o isolado Alho apresentou a maior produção que foi de 112.138 JIs/lagarta de *G. mellonella*. Na casa de vegetação o isolado IBCB-n02 causou maior mortalidade diferindo da testemunha. Os resultados observados neste trabalho mostram que diferentes isolados de NEPs possuem infectividade eficiente em laboratório

(maior que 80%) para a utilização em programas de controle biológico de *A. ipsilon*.

Palavras-chave: Lagarta-rosca. Milho. Controle microbiano. Noctuidae

GIANNASI, Andréia de Oliveira. **Biological aspects of *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae) and tests with entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) aiming at your control.** Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*, Bandeirantes, 2014.

## ABSTRACT

The black-cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) is a pest of economic importance in many cultures, including corn (*Zea mays*) reaching the potential loss of 20%, the lack of information about its impact on corn motivated a comparison of their biology, in the larval and pupal stages with artificial and natural diet (corn leaf). Entomopathogenic nematodes (NEPs) present along with one bacterial symbiont association that manages to control insects. The infective juvenile nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* seek their hosts in the soil and, when they find them in their natural openings penetrate or pierce their cuticle killing the insect within 48 hours. In the laboratory, larvae were individually and fed with artificial diet and corn leaf daily to assess the biological parameters of duration and viability of larval instars, and total duration of each individual instar larval and pupal sex ratio, deformation, mass of caterpillars and pupae, consumption and utilization of food. Was also made in the selection of isolates of NEPs laboratory using nine isolates, namely: *Heterorhabditis amazonensis* (RSC05); *Heterorhabditis indica* (IBCB-n05); *H. sp.* (JPM4), *H. sp.* (IBCB-n40); *H. sp.* (NEPET 11); *H. sp.* (IBCB-n44); *H. sp.* (Alho); *Steinernema carpocapsae* (IBCB-n02) and *S. sp.* (CH3). Test was also performed with different stages in the larval and pupal stages, various concentrations of test (0 – witness, 50 JIs/cm<sup>2</sup>, 100 JIs/cm<sup>2</sup>, 150 JIs/cm<sup>2</sup> and 200 JIs/cm<sup>2</sup>) of NEPs and in vivo production in *Galleria mellonella* L. caterpillars (Lepidoptera: Pyralidae) with isolated IBCB-n02, IBCB-n05 and Alho, where the concentration of selection test and 3<sup>o</sup> instar larvae of *A. ipsilon* and test at home a greenhouse were used. The biology of life, the caterpillars that were fed corn leaf had higher larval duration and greater deformity in adults and pupae, and larvae fed on artificial diet had greater viability of larvae and pupae and shorter larval duration, caterpillars fed with diet artificial ate more food, produced more feces, gained more weight and metabolized more food. In selecting only isolated NEPET 11 did not reach efficient mortality (10%), which differed from the rest that was above 80% to 100% with the isolated CH3. In the test with different stages in the larval stage and pupal stage no single reached higher mortality when compared with the 3<sup>o</sup> instar larvae in different concentrations of NEPs, isolated Alho reached 10% mortality for the concentration of 50 JIs/cm<sup>2</sup> and isolated IBCB-n05 reached 100% mortality at a concentration of 200 JIs/cm<sup>2</sup>. In production test in vivo isolated Alho showed the highest production was 112 138 IJs / larva of *G. mellonella*. In-house-vegetation isolated IBCB-n02 caused higher mortality differed from the control. The results of this study show that different isolates NEPs have infectivity in the laboratory efficient (greater than 80%) for use in biological control programs for *A. ipsilon*.

Key-words: Black cutworm. Corn. Microbial control. Noctuidae

## Lista de Tabelas

- Tabela 2.1** Ingredientes para a dieta de *Agrotis ipsilon* de acordo com metodologia adaptada de Greene et al. (1976).....24
- Tabela 2.2** Duração (T) e Porcentagem de Mortalidade (Mort.) dos diferentes instares de lagartas (n = número observado) de *Agrotis ipsilon* alimentadas com folha de milho e dieta artificial. Cornélio Procópio - PR, 2014.....31
- Tabela 2.3** Médias da duração (dias  $\pm$  EP) das fases de lagarta, pupa e do estágio de pré-pupa; percentual (%) de adultos (AD) e pupas (PD) deformadas; e razão sexual (total de fêmeas/machos + fêmeas) de *Agrotis ipsilon* alimentada com folha de milho e dieta artificial (adaptada de Greene et al., 1976). Cornélio Procópio - PR, 2014.....33
- Tabela 2.4** Médias em gramas ( $\pm$ EP) dos parâmetros: peso do alimento ingerido durante o período de alimentação (I); peso das fezes produzidas durante o período de alimentação (F); ganho de peso pelas lagartas durante o período de alimentação (B); alimento assimilado durante o período de alimentação (I-F); alimento metabolizado durante o período de alimentação (M); massa de lagarta (ML); e massa de pupa (MP) de *Agrotis ipsilon* alimentadas com folha de milho e dieta artificial em condições de laboratório. Cornélio Procópio – PR, 2014.....35
- Tabela 2.5** Índices de conversão alimentar de *Agrotis ipsilon*, alimentada com dieta natural (folha de milho) e dieta artificial em condições de laboratório. Temperatura de 25°C, UR de 70  $\pm$  10% e fotofase de 14h. Cornélio Procópio - PR, 2014.....37
- Tabela 3.1** Lista dos isolados (gêneros/espécies) e local de origem dos nematoides utilizados para a seleção quanto a patogenicidade sobre *Agrotis ipsilon* em condições de laboratório.....43
- Tabela 3.2** Porcentagem de mortalidade de diferentes instares de *Agrotis ipsilon* após a aplicação dos isolados IBCB-n05, Alho e IBCB-n02 na concentração de 100JIs/cm<sup>2</sup> em condições de laboratório. Temperatura de 25 $\pm$ 2°C, UR de 70 $\pm$ 10 e fotofase de 12 horas.....49
- Tabela 3.3** Número médio ( $\pm$ EP) de nematoides dos isolados *Steinernema carpocapse*, Alho e *Heterorhabditis indica* produzidos por lagarta de *G. mellonella* em laboratório. Cornélio Procópio, PR – 2014.....53

## Lista de Figuras

**Figura 2.1** Potes plásticos contendo lagartas de *Agrotis ipsilon* e dieta artificial para alimentação das lagartas (A), placa de Petri com dieta artificial e lagarta individualizada (B), gaiola de adultos em tubos de pvc de 25cm de altura e 150mm de largura com recipiente contendo mel a 10% para alimentação dos adultos (C) e interior da gaiola de adultos mostrando voil utilizado para oviposição (D).....25

**Figura 3.1** A - Pote plástico contendo vermiculita, dieta artificial e uma lagarta de *Agrotis ipsilon*; B - Potes plásticos utilizados para a montagem do ensaio com as diferentes concentrações de cada isolado de nematoide.....45

**Figura 3.2** Porcentagem de mortalidade total de lagartas de *Agrotis ipsilon* causada por diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos em diferentes dosagens (JIs/cm<sup>2</sup>), em condições de laboratório (T= 25 ± 1°, UR 90 ± 10% e fotofase de 12 horas).....51

**Figura 3.3** Produção total diária de Juvenis Infectivos (JIs) de nematoides entomopatogênicos durante o período total de produção em lagartas de *Galleria mellonella*.....53

**Figura 3.4** Porcentagem média de mortalidade de lagartas de terceiro instar de *Agrotis ipsilon* com os diferentes isolados IBCB-n02, IBCB-n05, Alho e Testemunha (água) por tratamento, em condições de casa de vegetação. Cornélio Procópio, PR – 2014.....55

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
Lista de tabelas .....	iv
Lista de figuras .....	v
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	3
<b>CAPITULO 01</b> .....	5
<b>1. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
1.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO .....	5
1.2 <i>Agrotis ipsilon</i> – UMA PRAGA POLÍFAGA .....	6
1.3 <i>Agrotis ipsilon</i> - BIOLOGIA.....	8
1.4 CONTROLE DE <i>Agrotis ipsilon</i> .....	11
1.4.1 CONTROLE QUÍMICO .....	14
1.4.2 CONTROLE ALTERNATIVO .....	11
1.4.2.1 RESISTÊNCIA DE PLANTAS .....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.</b>
1.4.2.2 PARASITOIDES E PREDADORES.....	12
1.5 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS .....	15
1.6 REFERENCIAL BIBLIOGRAFICO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>CAPITULO 02</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>AGROTIS IPSILON</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ALIMENTADAS COM DIETA ARTIFICIAL E FOLHAS DE MILHO</b> .....	<b>19</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	21
2.2 METODOLOGIA .....	22
2.2.1 CRIAÇÃO DE <i>AGROTIS IPSILON</i> EM LABORATÓRIO.....	22
2.2.2. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>AGROTIS IPSILON</i> EM DIFERENTES DIETAS .....	24
2.2.3 PARÂMETROS BIOLÓGICOS.....	27
2.2.4. ESTUDO DO CONSUMO E UTILIZAÇÃO DO ALIMENTO.....	28
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
2.3.1. Aspectos biológicos.....	30

2.3.2. Estudo do Consumo e utilização do alimento de <i>Agrotis ipsilon</i> em diferentes dietas.....	33
2.4. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>CAPITULO 3</b> .....	<b>37</b>
<b>PATOGENICIDADE DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE <i>AGROTIS IPSILON</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO</b> .....	<b>38</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	40
3.2 METODOLOGIA.....	41
3.2.1 Criação de <i>Galleria mellonella</i> e Multiplicação dos Isolados de Nematoides entomopatogênicos .....	41
3.2.2 Seleção de Isolados de Nematoides Entomopatogênicos para <i>Agrotis ipsilon</i> .....	42
3.2.3 Teste com diferentes estágios larvais de <i>Agrotis ipsilon</i> .....	43
3.2.4 Efeito de diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos sobre lagartas de <i>Agrotis ipsilon</i> .....	44
3.2.5 Produção in vivo dos isolados IBCB -n02, IBCB-n05 e ALHO ....	45
3.2.6 Testes em casa de vegetação .....	46
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
3.3.1 Seleção de Isolados de Nematoides Entomopatogênicos para <i>Agrotis ipsilon</i> .....	47
3.3.2 Teste com diferentes estágios nas fases larvais de <i>Agrotis ipsilon</i> e fase de pupa .....	47
3.3.3 Efeito de diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos sobre lagartas de <i>Agrotis ipsilon</i> .....	49
3.3.4. Produção in vivo dos isolados em lagartas de <i>Galleria mellonella</i> .....	51
3.3.5. CASA DE VEGETAÇÃO .....	53
3.4 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A lagarta-rosca, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto polífago (ataca mais de 15 famílias botânicas), possivelmente nativo da América do Norte, porém com relato de ocorrência em cinco continentes e mais de 19 países ao redor do mundo (Rings et al., 1975; Capinera, 2006). Já foi identificada ocasionando danos em mais de 30 espécies de plantas cultivadas, com destaque em algodão, amendoim, batata, feijão, milho, soja, fumo, abóbora, melão, melancia, tomate, couve e repolho (Silva et al., 1968; Link e Pedrolo, 1987; Gallo et al., 2002).

Os danos são causados pelas lagartas, que do primeiro ao terceiro instar raspam o tecido das folhas jovens e, a partir do quarto instar, seccionam rente ao solo as plântulas recém-emergidas (com até 10cm de altura), ocasionando a morte destas (Gallo et al., 2002). As lagartas de *Agrotis ipsilon* possuem hábito alimentar noturno, ficando durante o dia refugiadas no solo e a noite sobem nas plantas para alimentarem-se. A lagarta-rosca, em geral, é encontrada em lugares úmidos e apresenta grande capacidade de multiplicação, pois a fêmea pode colocar aproximadamente mil ovos durante seu ciclo. As posturas geralmente são feitas no solo ou nas folhas mais altas, que logo servirão de alimento às lagartas recém-eclodidas (Santos e Nakano, 1982).

Os danos observados podem ser quantificados pela diminuição do “stand” e pelo perfilhamento das plantas atacadas, que rebrotam de maneira improdutiva. Quando os ataques ocorrem na cultura do milho (*Zea mays* L.), podem ocasionar danos consideráveis, pois o uso de semente híbrida pode representar 1/4 do custo de uma lavoura (Richetti, 2012).

É uma praga de difícil controle devido ao seu hábito alimentar ser noturno e também pelo fato de refugiar-se no solo ao longo do dia. Entre as técnicas mais utilizadas, destaca-se o controle através de aplicações de inseticidas químicos, que embora registrados para as culturas, nem sempre são específicos para a lagarta e, portanto, podem não alcançar resultados satisfatórios. Além disso, o uso excessivo de produtos químicos pode causar

sérios danos ao ambiente, como a poluição do solo e da água, ou mesmo o desequilíbrio da comunidade de insetos não alvos (inimigos naturais).

Outro fator impactante no controle químico da lagarta-rosca é o restrito grupo de inseticidas registrados para uso nas culturas em que ocorre, o que pode levar a indução de resistência na população de praga no campo devido a pressão de seleção exagerada (Menezes et al., 2010).

Por outro lado, a sociedade tem criado uma demanda constante de produção eficiente de matérias primas utilizadas na indústria, principalmente alimentícia, e isso tem feito com que cada vez mais o uso de técnicas de cultivo promissoras e econômicas estejam presentes para a produção efetiva de plantas. Assim, a busca por técnicas alternativas de manejo de pragas nos meios de cultivo, utilizando métodos menos impactantes ao meio ambiente, tem se tornado uma demanda ainda maior.

Neste sentido, o uso do Controle Biológico pode ser uma alternativa tão eficiente quanto o controle químico, com inúmeras vantagens no que se refere a conservação ambiental.

Entre os Inimigos Naturais que tem sido estudados para uso em programas de manejo integrado de pragas, os Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) tem recebido destaque nos últimos anos no Brasil e no mundo para o controle de pragas que vivem no solo, ou que passam parte de sua vida neste ambiente. Os NEPs ordem Rhabditida, vivem naturalmente no solo, o que possibilita a sua eficiência para o controle de pragas que habitam o mesmo ambiente ou, como no caso da lagarta-rosca, passam pelo menos uma fase do seu ciclo no solo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos biológicos da lagarta-rosca e a eficiência do uso de NEPs para o controle da lagarta-rosca em condições de laboratório e casa de vegetação.

## CAPITULO 01

### 1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1 IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo e, devido a sua alta produtividade, figura como a cultura de maior rendimento produtivo, com aproximadamente 844 milhões de toneladas na safra 2009/2010. Sua principal importância econômica é devido a utilização na indústria de alimentação animal e humana, mas também com crescente destaque na indústria de alta tecnologia, como a produção de etanol (FAO, 2013).

Apesar do milho ser uma planta nativa das Américas, atualmente ele é cultivado em todos os continentes, havendo destaque para países como os Estados Unidos da América, China e Brasil que, respectivamente, são os três maiores produtores mundiais (FAO, 2013).

No Brasil, em 2012, foram produzidas 71.072.810 toneladas de milho em grão, com área colhida de 14.198.496 hectares (IBGE, 2013), sendo o estado do Paraná, o maior produtor da Federação, onde foram colhidas 16.555.300 toneladas de milho na safra 2012 (considerando as safras de verão e inverno). O Paraná também se destaca como um dos maiores consumidores, sendo o principal uso para a fabricação de ração animal e, atualmente, é um dos maiores exportadores entre os estados brasileiros (SEAB, 2013).

Entre os maiores problemas encontrados no setor produtivo do milho estão os de ordem fitossanitária, com destaque para os causados por insetos-praga. A cultura do milho sofre danos em todas as suas fases, desde o plantio (com pragas que atacam as sementes antes da germinação), até na fase de amadurecimento dos grãos na espiga. As principais pragas que podem ser citadas são: a larva alfinete, *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera:

Crysmelidae), a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e a da espiga, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae). Porém, entre as pragas ocasionais ou secundárias que danificam a cultura do milho, muitas outras espécies podem danificar de maneira considerável a cultura, observações no campo tem evidenciado a lagarta-rosca, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), como uma praga de elevada importância devido a dificuldade de controle por métodos convencionais (controle químico) e por danificar as plântulas no início vegetativo destas.

## **1.2 *Agrotis ipsilon* – A lagarta-rosca**

A lagarta-rosca é uma praga generalista, com uma grande gama de hospedeiros, entre plantas nativas e exóticas, e que ataca culturas importantes de diferentes famílias, como Solanaceae, Cucurbitaceae, Cruciferae, Asteraceae, Poaceae e Fabaceae (Link e Pedrolo, 1987).

Entre as solanáceas, a cultura da batata (*Solanum tuberosum* L.) sofre danos causados pela lagarta-rosca, que cortam as plantas rente ao solo causando grandes perdas, pois uma única lagarta pode destruir em torno de quatro plantas com até 10 cm de altura. Em infestações muito severas o dano pode ser de forma direta, pois a praga começa a danificar os tubérculos no interior do solo (Gallo et al., 2002). Já na cultura de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a lagarta-rosca tem pouca importância econômica no sistema de produção devido às altas dosagens e pela frequência de pulverização com inseticidas para o controle de outras pragas, mas em áreas com ausência de controle químico podem causar até 80% de danos aos frutos. Os danos de *A. ipsilon* em tomate são facilmente distinguidos pela presença de grandes orifícios nos frutos (Azeredo et al., 2002; EMBRAPA, 2013).

Em plantações de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), a lagarta-rosca aparece cortando plântulas ainda na fase inicial de desenvolvimento, havendo recomendação das empresas fumageiras para que os fumicultores apliquem

inseticidas no tratamento de sementeiras e mudas logo após o transplante para reduzir o ataque nesta fase crítica (Chiaradia, 2007).

Na cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.), as lagartas podem atacar as raízes das plantas novas e cortar o caule próximo ao solo (Tonet et al., 2000), com ocorrência em 25% da área e chegando a perda potencial de 10% (Salvadori et al., 2007).

Na cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), foi observado na safra de 2006/2007 no estado de São Paulo uma redução de 8,5% na área cultivada, comparado a safra anterior, devido ao ataque de *A. ipsilon* que aparece com frequência nestas lavouras, cortando as plantas ainda jovens e reduzindo o stand das lavouras (Bento, 2007).

Em plântulas de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] as lagartas de *A. ipsilon* nos primeiros instares consomem o limbo foliar e o pecíolo, sem cortar o caule, e a partir do quarto instar a lagarta, além de cortar a haste de plântulas na região do colo, pode seccioná-la pouco abaixo da superfície do solo, causando morte das plantas jovens enquanto que em plantas mais desenvolvidas o dano é parcial, com morte apenas quando a lesão é grande (Tonet et al., 2000). Em trabalho realizado por Bento (2007), no estado de São Paulo, durante a safra 2006/2007 a soja apresentou perda de 28% em relação a safra anterior e o principal causador desse dano foi a lagarta-rosca.

Além dessas culturas, existem relatos da ocorrência da lagarta-rosca atacando abobrinha, agrião, aipo, algodão, alho-poró, beterraba, cebola, cenoura, chicória, espinafre, morango, mostarda, nabo, pastagens, pepino, pimenta, rabanete e salsa, demonstrando seu grande potencial polífago (Vieira, 2013).

As lagartas do gênero *Agrotis* causam prejuízos também em mudas de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, podendo levar a perda de muitas mudas por morte ou mesmo por deformação, além de proporcionar uma menor resistência a doenças. Como as lagartas ocorrem durante todo o ano e seu pico populacional coincide com os períodos de maior disponibilidade de mudas com poucos dias de vida, uma única lagarta pode cortar dezenas de mudas em uma noite, causando danos significativos na cultura, em função das inúmeras falhas que ficam na plantação (Anjos et al., 1986; Zanuncio et al., 2001).

Na cultura do milho as lagartas dos primeiros instares começam a danificar o limbo das folhas e, quando atingem o terceiro e quarto instares, já podem perfurar a base do colmo, provocando sintomas de estrias nas folhas das plantas e de “coração morto”. O sintoma de dano mais comum é o aparecimento de plântulas cortadas na base do colmo, quando as plântulas recém germinaram. Quando a planta atinge os 40 cm fica totalmente improdutiva, com sucessiva morte. Os prejuízos podem chegar a 7% tanto por “coração morto”, diminuição da produtividade, ou perfilhamento, sendo esse em menor parte (Gallo et al., 2002; Nakano, 2011). De acordo com Salvadori (2007) a lagarta-rosca pode atacar 27% das áreas plantadas com milho no estado de Rio Grande do Sul, com uma perda potencial de 20%. Para o estado do Paraná no entanto, não existem dados sobre porcentagens de dano.

De maneira geral, quando a população de lagarta-rosca de maior tamanho é muito alta (proveniente de plantas hospedeiras circunvizinhas à plantação) e os danos são maiores, podem levar a perdas significativas. Segundo Souza (2005), esta situação é mais comum em sistemas de plantio direto, quando as lagartas ficam abrigadas na palhada das plantas usadas como cobertura, sendo as culturas de milho, soja e trigo comumente as mais atacadas.

### **1.3 *Agrotis ipsilon* - BIOLOGIA**

*Agrotis ipsilon* é um inseto de hábito noturno, cujas lagartas durante o dia permanecem enroladas no formato de uma “rosca” (motivo do nome popular) enterradas no solo, tornando muito difícil sua visualização em campo, e também aumentando a dificuldade para o seu controle (Bento et al., 2007).

Sua origem ainda é incerta, porém são encontradas em várias regiões do planeta, estando ausente apenas em áreas muito frias e algumas regiões tropicais. As mariposas apresentam um padrão migratório para o norte do globo na primavera e para o sul no outono, podendo se deslocar na faixa de 1000 km em até quatro dias (Capinera, 2006).

Os insetos adultos de *A. ipsilon* são mariposas com envergadura média de asa de aproximadamente 35 mm, sendo estas de coloração marrom e manchas pretas. Os adultos apresentam dimorfismo sexual, pois as fêmeas tem as asas escuras da base até a faixa pós-mediana, e o restante mais claro, enquanto que os machos possuem asas de coloração mais uniforme (Cook et al., 2003).

As fêmeas põem ovos isolados de coloração branca, dos quais após aproximadamente quatro dias eclodem as lagartas, que possuem variação de coloração de cinza claro a escuro.

De acordo com estudos realizados por Bento et al. (2007), em dieta artificial e temperatura de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , a duração da fase embrionária de *A. ipsilon* tem média de quatro dias, podendo chegar a seis dias, com aproximadamente 81% de viabilidade. O ovo no início tem coloração branca e com o passar do tempo tende a escurecer tornando-se marrom. O ovo tem altura variando de 0,43 a 0,50 mm e de largura 0,51 a 0,58, apresentam nervuras que irradiam do ápice (Capinera, 2006).

A fase de desenvolvimento larval de *A. ipsilon* dura em torno de 25 dias com temperatura de  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 93% de viabilidade e apresentam seis instares normalmente (Link e Pedrolo, 1987; Bento et al., 2007), podendo variar de cinco a nove instares conforme o alimento e ambiente (Capinera, 2006).

A largura da cápsula cefálica da lagarta nos primeiros quatro instares é bem semelhante e, posteriormente, observa-se com mais facilidade a diferença de tamanhos da muda. Essa largura pode variar de 0,26 mm para o primeiro instar a 4,1 mm para o oitavo instar (Capinera, 2006).

O tamanho da lagarta-rosca varia de 3,5 mm no primeiro instar até 45 mm no sexto instar, sendo o desenvolvimento larval fortemente influenciado pela temperatura, que é ótima em torno de  $27^{\circ}\text{C}$ , e por teores de umidade mais alta no alimento como no ambiente (Schmidt e Reese, 1988). Apresentam coloração uniforme, variando de cinza, marrom a quase preto, e apresentam grânulos escuros na maior parte do corpo, que geralmente são mais claros ventralmente que dorsalmente. As lagartas são agressivas em ambientes reduzidos, apresentando hábito canibal a partir do terceiro instar (Capinera, 2006).

A fase pupal ocorre no solo, com profundidade variando de 3 a 12 cm e duração variando conforme temperatura, mas em média de 12 dias em condições de laboratório, com aproximadamente 96% de viabilidade. Normalmente ocorre variação nas massas das pupas de fêmeas e machos, apresentando em média 484 mg e 387 mg, respectivamente (Link e Pedrolo, 1987; Capinera, 2006; Bento et al., 2007).

O período de pré-oviposição do adulto dura até 10 dias, realizando suas posturas isoladas em folhas de plantas hospedeiras, mas também ovipositam em material seco, como palhada, e raramente no solo (Capinera, 2006).

A duração do ciclo total (ovo-adulto) varia muito conforme a dieta empregada às lagartas, sendo de 41 dias quando criada em dieta artificial e ambiente controlado, com razão sexual de 1:1. As longevidades de machos e fêmeas de *A. ipsilon* são semelhantes, durando em média 13 dias para ambos os sexos, com variação de 10 a 17 dias (Bento et al., 2007).

As posturas são realizadas durante toda a fase adulta, com uma média de 1.806,5 ovos/fêmea em dieta artificial em laboratório, o que indica que a população de *A. ipsilon* pode aumentar em média 616 vezes a cada geração, com o ápice de taxa máxima do aumento populacional alcançada no 50º dia, quando cruzam-se os valores máximos de fertilidade específica e taxa de sobrevivência (Bento et al., 2007).

Existem dados que mostram que a espécie pode hibernar na fase larval em regiões de clima temperado, como por exemplo, na região norte-central dos Estados Unidos, onde foi observado que lagartas que passaram os meses de inverno na fase de lagarta entraram em hibernação. Porém, originaram adultos com baixa fertilidade de ovos, com somente 14% dos ovos viáveis, e que este percentual tende a diminuir conforme o aumento do tempo de hibernação (Story e Keaster, 1982).

## 1.4 CONTROLE DE *Agrotis ipsilon*

### 1.4.1 Resistência de plantas

Todas as plantas possuem meios químicos e físicos para resistir a herbívoros, que geralmente é específica devido a coevolução entre planta-herbívoro. Por isso é comum espécies herbívoras associarem-se a um pequeno grupo de plantas (geralmente dentro de um gênero ou família). Entretanto, espécies polípagas evoluíram para contornar tais dificuldades químicas, associando-se com outros organismos simbiotes, que se responsabilizam em degradar os compostos químicos das plantas que podem ser tóxicos para o indivíduo herbívoro (Lara, 1991; Gatehouse, 2002).

Entre os diversos meios que as plantas possuem para resistir ao ataque de insetos herbívoros, destacam-se os que atuam por meio de tolerância (capacidade de tolerar o ataque de algum inseto), antibiose (efeito adverso da planta sobre o inseto) e não preferência (tanto para alimentação, oviposição e/ou abrigo dos insetos). Essas resistências podem ser causadas por ações físicas, químicas, morfológicas, estruturais entre outras, que também podem ser influenciadas por fatores da planta, do inseto e ambientais (Lara, 1991; Gatehouse, 2002). Não existe programa de melhoramento de milho para o controle de *A. ipsilon*, porém recomenda-se a antecipação do controle das plantas daninhas em áreas de plantio direto, pela hipótese de diminuir a reprodução da população remanescente no campo que, por ser polífaga, alimenta-se de plantas que nascem na resteva da cultura antecessora (Viana et al., 2013).

Lagartas de *A. ipsilon* são submetidas a uma ampla variedade de aleloquímicos por serem polípagas, logo alguns compostos aleloquímicos podem exercer efeitos crônicos no crescimento, diminuindo assim a ingestão de alimentos, o que pode alterar o crescimento até a fase de pupa. Entre esses aleloquímicos, foi estudado o p-benzoquinona, que isolado e ofertado em dieta artificial inibe o crescimento pela redução da ingestão de alimentos (Reese e

Beck, 1976). Concluindo que p-benzoquinona pode alterar o equilíbrio de enzimas digestivas importantes ou proteínas da membrana das microvilosidades do intestino médio.

#### **1.4.2. Parasitóides e predadores**

Não existe programa para controle biológico da lagarta-rosca no campo, porém sabe-se que o percentual de parasitismo natural pode oscilar entre 10 e 20% (Gallo et al., 2002). Em trabalho realizado no Rio Grande do Sul, lagartas coletadas no campo apresentavam-se parasitadas por larvas de *Patelloa similis* (Townsend, 1927), *Gonia pallens* (Wiedemann, 1830) e *G. crassicornis* (Fabricius, 1794) (Diptera:Tachinidae); *Ophion* sp. e *Carinodes* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Apanteles bourquini* (Blanchard, 1936) (Hymenoptera, Braconidae); sendo este último o principal parasitoide observado da lagarta-rosca neste estudo (Link e Costa 1984).

Em trabalhos sobre flutuação de inimigos naturais em áreas de milho é comum observar a grande distribuição de predadores generalistas, como *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forficulidae), *Chrysoperla* sp. (Neuroptera: Chrysopidae), *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Calosoma* sp. (Coleoptera: Carabidae). Estes predadores podem atuar no controle de ovos e lagartas de diferentes instares de *A. ipsilon* no campo, necessitando de maiores estudos para descrever a importância destes agentes no equilíbrio da praga (Link e Costa, 1984).

#### **1.4.3 Controle microbiano**

No que se refere ao controle microbiano, trabalhos utilizando bactérias, vírus e nematoides entomopatogênicos foram realizados com relativo sucesso em condições de laboratório.

Entre as alternativas para o manejo de *A. ipsilon* com o controle microbiano, está o uso de produtos formulados a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que é uma bactéria da família *Bacillaceae*, caracterizada pela produção de cristais proteicos que se tornam nocivos quando ingeridos pelas lagartas (Schnepf et al., 1998). Esses cristais de Bt contêm proteínas chamadas proteínas Cry, que apresentam uma ampla diversidade de membros, com mais de 400 populações (Menezes et al., 2010). A atividade tóxica dessas proteínas contra insetos possibilita o desenvolvimento de bioinseticidas, como também na seleção de genes utilizados na produção de plantas transgênicas resistentes a insetos (Menezes et al., 2010). O modo de ação das proteínas Cry acontece após a ingestão, quando as proteínas são solubilizadas no interior dos insetos, devido ao pH alcalino intestinal destes (Charles et al., 2000) e que são ativadas por proteinases intestinais. Após ser ativada, a proteína reconhece e se liga aos receptores de membrana levando o inseto à paralisia e morte por inanição e septicemia (Silva-Werneck e Monnerat, 2001).

Menezes et al. (2010) testaram 100 diferentes sorotipos de *Bacillus thuringiensis*, dos quais somente seis conseguiram atingir 100% de mortalidade para lagartas de segundo instar de *A. ipsilon*. Apesar de mostrar resultados promissores em laboratório, Kullik et al. (2011) avaliaram a campo uma cultivar de milho híbrido da estirpe Bt Cry 1F e observaram que sob alta infestação de *A. ipsilon*, a tecnologia não inibiu o desenvolvimento larval da praga, causando danos consideráveis em duas áreas de milho cultivadas no Canadá.

Também produtos a base de Baculovírus, especialmente nucleopoliedrovírus, parecem promissores como bioinseticidas para a lagarta-rosca, em função da sua especificidade da ação, alta virulência e capacidade de replicar ao máximo, em produção massal (Moscardi, 1999).

Prater et al. (2006) avaliaram o isolado do nucleopoliedrovírus, AgipMNPV, amplificado de lagartas infectadas naturalmente em campos de golfe, do estado de Kentucky, região sudeste dos Estados Unidos. Em condições de laboratório, AgipMNPV se mostrou altamente ativo contra os primeiros estágios da lagarta-rosca. Em estádios mais avançados doses maiores foram necessárias e, mesmo assim, as lagartas continuaram a alimentação durante vários dias até consumir uma dose letal.

Outra alternativa para o controle microbiano que vem sendo testado no controle de *A. ipsilon* é o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs). Estes agentes possuem uma relação de simbiose com bactérias, que são abrigadas em seu intestino durante a fase que o nematoide não se alimenta, e que são liberadas no interior do inseto parasitado e matam o hospedeiro em até 48 horas (Clarke, 2008).

Entre as vantagens apresentadas por este grupo de entomopatógenos, deve-se considerar o baixo custo de produção e a possibilidade de ação sobre pragas que possuem pelo menos uma fase do seu ciclo de vida no solo, podendo ultrapassar 90% de eficiência. Tais destaques tem aumentado nos últimos 15 anos o número de estudos desenvolvidos com estes agentes, resultando na descoberta de novas espécies das quais, muitas já estão disponibilizadas como produtos comerciais (Ebssa e Koppenhöfer, 2012).

#### **1.4.4 Controle Químico**

O controle químico da lagarta-rosca é o mais utilizado nas culturas onde o inseto é considerado praga, porém possui baixa eficiência devido aos hábitos noturnos e subterrâneos, que a tornam uma praga de difícil controle. A escassez de dados sobre sua biologia no campo, comportamento e interações com os hospedeiros e meio ambiente também dificultam o controle. Durante a noite, quando sobem para alimentar-se nas plantas hospedeiras, o uso de máquinas pulverizadores não é recomendado, havendo a indicação para o tratamento de sementes com inseticidas sistêmicos do grupo dos neonicotinóides (Souza, 2005).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento existem produtos registrados que podem ser usados no controle da lagarta-rosca, principalmente produtos dos grupos dos piretróides e organofosforados, que são inseticidas químicos altamente tóxicos e pouco seletivos para insetos úteis (AGROFIT, 2013). Trabalhos sobre controle químico de lagarta-rosca, principalmente no campo, são escassos, o que diminui a possibilidade de uma recomendação detalhada quanto aos aspectos mais eficazes do controle da praga.

## 1.5 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) pertencem à ordem Rhabditida, na qual estão incluídas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen & Smart, 1994, enquanto a família Heterorhabditidae possui apenas o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976.

Os NEPs tem origem provável na era pré-Paleozóica, com cerca de 375 milhões de anos (Poinar, 1983), sendo que o gênero *Heterorhabditis* surgiu a partir de um ancestral marinho e o gênero *Steinernema* tinha provavelmente um ancestral terrestre (Poinar, 1983). Estudos filogenéticos baseados em seqüências de genes ribossômicos confirmaram que *Steinernema* e *Heterorhabditis* não possuem um ancestral comum (Elsworth et al., 2011).

Em relação a distribuição geográfica, os dois gêneros são cosmopolitas encontrados em solos de diferentes biomas do mundo, como Neotropical, Neoártico, Paleoártico, Etíope, Oriental e Australiano (Lawrence et al., 2006).

No que se refere a associação com insetos, apenas algumas espécies conseguem provocar a morte de seus hospedeiros, e entre estes, os que conseguem parasitar insetos e são utilizados com êxito no controle biológico estão nos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*. Tal sucesso se deve ao fato destes nematoides serem portadores de bactérias simbióticas que são agentes auxiliares responsáveis pela morte do hospedeiro (Gaugler e Kaya, 1990).

Essas bactérias entomopatogênicas são dos gêneros *Xenorhabdus* Thomas & Poinar, 1979 e *Photorhabdus* Boemare, Louis & Kuhl, 1983, com associação nas espécies dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, respectivamente. A relação simbiótica entre bactéria e nematoide tem papel importante, pois a bactéria auxilia a matar o inseto e proporciona um ambiente favorável para o nematoide se alimentar do cadáver do inseto em questão, reproduzindo-se com êxito. O nematóide por sua vez, garante abrigo e dispersão da bactéria, transportando-a de um hospedeiro para outro (Clarke,

2008). As bactérias do gênero *Photorhabdus* apresentam síntese de estilbenos, que são moléculas normalmente sintetizadas por plantas, e que possuem ação antibiótica (Willians et al., 2005), antiinflamatória (Kim et al., 2008), antitumorais (Cao et al., 2008) e também neuroprotetores (Orhan et al., 2008). Estas substâncias, mantêm o cadáver do hospedeiro livre de bactérias e de outros organismos saprofiticos e propicia a reprodução e multiplicação do nematóide no interior do inseto morto.

Ao serem introduzidas no interior da hemocele do inseto pelo nematoide, as células bacterianas são liberadas na hemolinfa, onde excretam as toxinas que matam o inseto por toxidez e septicemia em um período de 24 a 48 horas, multiplicando-se até o patamar máximo que o volume do hospedeiro permite. O nematoide por sua vez, digere as substâncias do inseto já decomposto, além de se alimentar das próprias bactérias que se multiplicaram (Forst e Clarke, 2002; Voss et al., 2009).

Os nematoides entomopatogênicos apresentam quatro estágios larvais (juvenis), uma fase adulta e a fase de ovo. O ciclo de vida começa quando juvenis de terceiro estágio (J3), também chamados infectantes (JIs), saem do hospedeiro morto, em busca de um novo hospedeiro. Na fase de J3, os juvenis possuem duas cutículas (do segundo e terceiro estágios), de maneira que seus orifícios como boca e ânus estão fechados, impedindo-os de alimentar-se, mas por outro lado, garantindo maior proteção contra a dessecação, o que possibilita a sobrevivência fora de um hospedeiro. Os J3 carregam células das bactérias em uma vesícula localizada na região anterior do intestino, e ao penetrar no corpo de um novo hospedeiro através de suas aberturas naturais (boca, ânus, espiráculos ou pela parede corpórea em alguns casos), migram para a hemocele, onde perdem a cutícula extra e defecam, liberando as bactérias simbióticas (Poinar, 1966), que pode levar cerca de 30 minutos no caso de infecções por *Heterorhabditis* e cerca de 6 horas após a infecção por *Steinernema* (Li et al., 2009).

No ciclo do gênero *Steinernema* os juvenis infectantes se tornam adultos após penetrar no hospedeiro, originam machos e fêmeas que copulam, reiniciando o ciclo dentro do cadáver. Os juvenis do estágio um (J1) também irão se alimentar do hospedeiro cadáver e continuar o ciclo até os recursos alimentares se esgotarem. Este é o indicativo para os juvenis infectantes (J3)

migrarem para fora do inseto a procura de outro hospedeiro, recomeçando o ciclo (Almenara et al., 2012).

No ciclo de *Heterorhabditis* os adultos de primeira geração dão origem apenas a formas hermafroditas, tendo esse gênero de nematoide mais sucesso quando penetram em um inseto, pois mesmo com a penetração de um único indivíduo JI ocorre a multiplicação dos nematoides. Outra vantagem apresentada pelo gênero *Heterorhabditis* é que estes não precisam penetrar apenas por orifícios naturais dos insetos, pois possuem uma estrutura chamada dente córneo que os permitem perfurar a cutícula do inseto (Forst e Clarke, 2002).

Diversos insetos podem ser usados para a multiplicação de NEPs, porém o mais usado nos laboratórios de patologia de insetos são as lagartas de traçados-favos, *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), por sua ampla suscetibilidade aos NEPs e alta multiplicação de JIs. Uma lagarta de *G. mellonella* pode sustentar a produção de mais de 10.000 JIs, podendo ultrapassar 100.000 Jis (Voss et al., 2009).

Nematoides entomopatogênicos são agentes de controle seletivos, pois possuem uma pequena faixa de hospedeiros para cada espécie, não causando mortalidade em outros seres, sendo necessária a escolha do nematoide específico para o controle de uma determinada praga, pois em alguns casos, eles podem até causar patogenicidade, mas sem haver reprodução efetiva. A literatura apresenta exemplos de espécies de nematoides com alta especificidade parasitária por hospedeiros, como por exemplo, *Steinernema kushidai* (Mamiya, 1988), *S. scarabaei* (Koppenhöfer e Fuzy, 2004) e *Neosteinernema longicurvicauda* (Nguyen, 1994). De acordo com Nguyen e Smart (1994), *N. longicurvicauda* foi encontrado parasitando naturalmente uma espécie de cupim na Flórida, Estados Unidos, sendo este, seu único hospedeiro.

Assim, é possível que alguns isolados encontrados, e ainda não descobertos, tenham características de alta especificidade (Acevedo et al., 2005). Outras espécies, no entanto, podem ser menos específicas, mas de maneira geral, estão restritas a ocorrência em hospedeiros que vivem no solo, garantindo a segurança de inimigos naturais como predadores e parasitoides que vivem abrigados em partes aéreas das culturas.

Outra característica interessante dos nematoides entomopatogênicos é que estes também apresentam uma estratégia de busca pelo hospedeiro através de sua movimentação, sendo assim classificados como “ambusher” quando promovem movimentação própria chamada de nictação, deixando a parte anterior do nematoide livre para esperar a passagem do hospedeiro num tipo de emboscada e os “cruiser” que não esperam o hospedeiro passar, buscando-o ativamente no solo, deslocando-se até localizá-los. Também podem existir nematoides de tipo intermediários, que apresentam os dois comportamentos, como o caso da espécie *S. arenarium* (Grewal et al., 1994 *apud* Dolinski e Moino Jr. 2006).

De acordo com Almenara et al. (2012) juvenis infectivos (JIs) de *Heterorhabditis* em geral, tem comportamento do tipo “cruiser”, procurando sempre por insetos hospedeiros, e em JIs do gênero *Steinernema* é comum o comportamento de emboscada (“ambusher”), porém, podem existir exceções em ambos os grupos.

No Brasil existem trabalhos com o uso de NEPs controlando insetos-praga de diferentes culturas, principalmente os que têm uma de suas fases no solo. Alguns estudos, já tem resultados avançados, como em trabalhos de Silva (2011), sobre a cigarra-da-raiz do cafeeiro, *Quesada gigas* (Olivier, 1790) (Hemiptera: Cicadidae); Leite et al. (2002) com cigarrinha-das-raizes em cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae); Bellini (2011) em broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae); Giometti (2009) com a broca-do-rizoma-da-cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae); para cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) Alves et al. (2009b) e para a cochonilha-da-raiz-da-mandioca *Dysmicoccus* sp. (dados não publicados de Alves, V.S.), indicando o alto potencial destes agentes no controle de insetos das mais variadas ordens.

## **2. ARTIGO A. ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Agrotis ipsilon* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) ALIMENTADAS COM DIETAS ARTIFICIAL E NATURAL (FOLHAS DE MILHO)**

### **RESUMO**

Foram avaliadas duas diferentes dietas, para o desenvolvimento das lagartas de *Agrotis ipsilon* em laboratório: dieta natural (folha de milho) e dieta artificial modificada de Greene et al. (1976). As dietas foram fornecidas para as lagartas que foram individualizadas e alimentadas com dieta artificial e folha de milho diariamente, para avaliar os parâmetros biológicos de duração e viabilidade dos instares larvais, duração total e individual de cada instar larval e pupa, razão sexual, deformação, massa de lagartas e pupas, consumo e utilização do alimento. As lagartas que foram alimentadas com folha de milho tiveram uma maior duração larval e maior deformidade em pupas e adultos, e as lagartas alimentadas com dieta artificial tiveram maior viabilidade de lagartas e pupas e menor duração larval, lagartas alimentadas com dieta artificial ingeriram mais alimento, produziram mais fezes, tiveram maior ganho de peso e metabolizaram mais alimento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biologia, lagarta-rosca, nutrição de insetos

## **ABSTRACT**

Natural diet (corn leaf) and modified artificial diet Greene: two different diets on development of *Agrotis ipsilon* larvae was evaluated in the laboratory Greene et al. (1976). The diets were fed to larvae that were individualized and fed with artificial diet and corn leaf daily to assess the biological parameters of duration and viability of larval instars, total and individual duration of each instar larval and pupal sex ratio, deformation, weight of larvae and pupae, consumption and utilization of food. The caterpillars that were fed corn leaf had higher larval duration and greater deformity in adults and pupae, and larvae fed on artificial diet had greater viability of larvae and pupae and shorter larval duration, fed caterpillars with artificial diet ate more food, produced more feces, gained more weight and metabolized more food.

**Key-Words:** Biology, black-cutworm, insect nutrition

## 2.1 INTRODUÇÃO

*Agrotis ipsilon* é uma praga polífaga, e por isso apresenta uma grande importância agrícola pelos danos causados às plantas, com a lagarta cortando as hastes rente ao solo, além da dificuldade de seu controle (Link e Pedrolo, 1987).

A lagarta-rosca é um inseto de hábito noturno, cujas lagartas durante o dia permanecem enroladas no formato de uma “rosca” (motivo do nome popular) enterradas no solo, tornando muito difícil sua visualização em campo, e também aumentando a dificuldade para o seu controle (Link e Pedrolo, 1987).

Na cultura do milho os danos começam com a raspagem do limbo das folhas até a secção total da base do colmo quando as plântulas recém germinaram, resultando em falhas na plantação (Nakano et al., 1981; Gallo et al., 2002). Quando não levam a planta a morte pela secção total da haste, os danos foliares causam perfilhamento e “coração morto”, com prejuízos de até 7% (Nakano et al., 1981; Gallo et al., 2002). De acordo com Salvadori (2007) a lagarta-rosca pode atacar 27% das áreas plantadas com milho no estado do Rio Grande do Sul, com uma perda potencial de 20%. Para o estado do Paraná, no entanto, não existem dados sobre porcentagens de dano.

A fisiologia, comportamento, ecologia e evolução das espécies dos insetos são afetadas por fatores nutricionais, como a quantidade e qualidade da alimentação durante a fase larval, pois tais fatores podem influenciar a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, o peso do corpo, a sobrevivência e influência na longevidade e fecundidade dos adultos (Slansky-Jr e Scriber, 1985). Além disso, se a qualidade do alimento interfere no ciclo de vida da praga, interfere também na quantidade de danos que a mesma vai causar, pois alimentos menos nutritivos podem estender o ciclo, levando o inseto a comer mais e por mais tempo, causando mais desfolhamento e, conseqüentemente, maior dano.

Dados referentes ao consumo de alimento de *A. ipsilon* e o efeito desse consumo sobre seu ciclo de vida são bastante escassos. Diante da ausência de informações sobre o impacto desses insetos na cultura de

milho, o presente trabalho objetivou a comparação entre as fases larval e pupal em dois alimentos, dieta artificial e dieta natural (folha de milho).

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano - LECOM e na casa de vegetação da Unidade Centro da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Campus de Cornélio Procopio, PR, (Latitude 23° 10' 52" S, Longitude 50° 38' 48" W e Altitude 676m).

### **2.2.1 Criação de *Agrotis ipsilon* em Laboratório**

Para início da criação do inseto praga, ovos de *Agrotis ipsilon* foram adquiridos da empresa BUG – Agentes Biológicos sendo utilizada a metodologia modificada de Ávila e Milanez (2004), onde os ovos foram mantidos em caixas de acrílico (tipo gerbox) forradas com papel umedecido e contendo pequenos pedaços da dieta artificial, modificada de Greene et al. (1976) (Tabela 2.1), estabelecida pela Fundação ABC de Castro – PR. (Comunicação pessoal).

Para o preparo da dieta artificial, o feijão foi cozido e transferido para o liquidificador com a água do cozimento e a água destilada para homogeneização. Acrescentou-se então, o germe de trigo, a levedura, a proteína de soja e a caseína. Nova homogeneização foi feita. Em uma panela o Agar foi dissolvido em água e, então, acrescentou-se a mistura do liquidificador. Esperou-se pela fervura e o posterior resfriamento a aproximadamente 60°C para então incorporar ao meio a solução vitamínica e

os anticontaminantes (ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin, tetraciclina e formol). Após a mistura foi despejada em bandejas plásticas. Borrifou-se sobre a dieta uma solução de fungicida (Cercobin 700 WP, na dose de 70 g/100 L de água), as bandejas foram colocadas em câmara de fluxo laminar para resfriamento e solidificação sob luz ultravioleta. Para melhor conservação da dieta, esta foi mantida em geladeira após o completo resfriamento.

**Tabela 2.1** Composição da dieta modificada de Greene et al. (1976), usada para criação de *Agrotis ipsilon*.

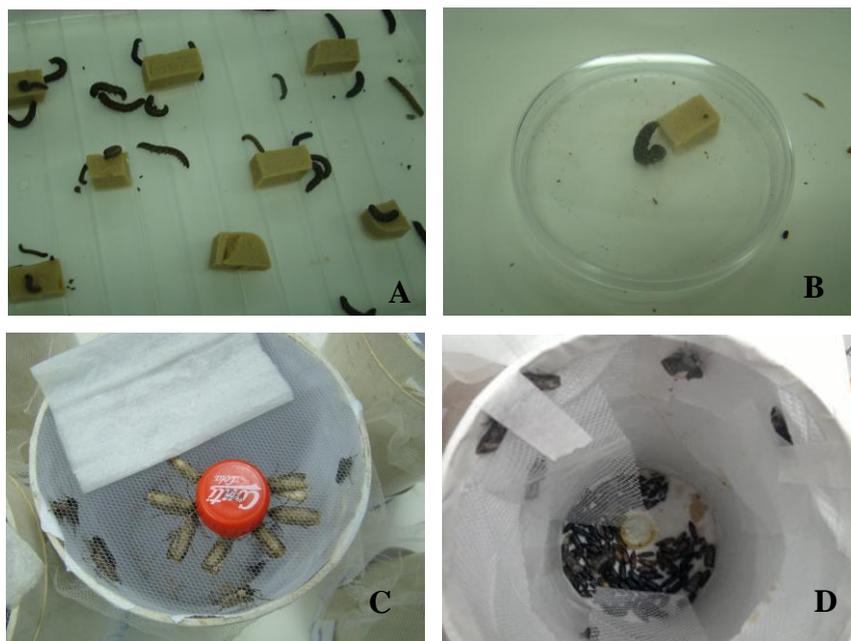
<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade</b>
Feijão carioca	125g
Germe de trigo	100g
Proteína de soja	65g
Caseína	50g
Levedura de cerveja	62,4g
Solução vitamínica Vanderzant	15 mL
Ac. Ascórbico	6g
Ac. Sórbico	3g
Nipagin	5g
Tetraciclina	0,25g
Formol 40%	6,2 mL
Ágar	40g
Água destilada	2.000 mL

As lagartas recém eclodidas foram mantidas em caixas acrílicas do tipo gerbox contendo dieta, em câmara climatizada ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR de  $70 \pm 10$  e fotofase de 12 horas) até o terceiro instar, quando foram colocadas em potes plásticos com capacidade de 10 litros, contendo pedaços de dieta artificial e papel craft para diminuir a umidade, em número de 20 lagartas por pote, onde permaneceram até atingirem o quinto instar.

Após o 5<sup>o</sup> instar, as lagartas foram individualizadas, devido o comportamento canibal, em placas de Petri (9 cm de diâmetro), contendo dieta artificial onde permaneceram até a fase de pupa. As pupas foram retiradas das placas de Petri e transferidas para caixas tipo “gerbox”, com papel toalha umedecido no fundo, onde esperou-se a emergência dos adultos. Os adultos foram então transferidos para gaiolas de acasalamento confeccionadas com tubo de PVC (25cm de altura x 15cm de largura, forradas com papel toalha nas laterais e na base), em número de 15 casais por gaiola. No interior e na parte

superior das gaiolas colocou-se tecido tipo tule, que era utilizado pelas fêmeas para oviposição. Na parte superior colocou-se papel filtro umedecido e um recipiente contendo dieta para os adultos (mel 10% mais solução vitamínica, diluída em água).

Parte das lagartas (2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> instares) foram usadas na condução dos ensaios, e parte foram mantidas para a continuidade da criação.



**Figura 2.1** Potes plásticos contendo lagartas de *Agrotis ipsilon* e dieta artificial para alimentação das lagartas (A), placa de Petri com dieta artificial e lagarta individualizada (B), gaiola de adultos em tubos de PVC de 25cm de altura e 15cm de largura com recipiente contendo mel a 10% para alimentação dos adultos (C) e interior da gaiola de adultos mostrando voil utilizado para oviposição (D).

### 2.2.2. Aspectos Biológicos de *Agrotis ipsilon* em Diferentes Dietas

Para avaliação dos aspectos biológicos de *A. ipsilon*, lagartas recém eclodidas e mantidas em dieta artificial por quatro gerações (conforme metodologia descrita no item 2.2.1), foram individualizadas em tubos de vidro de fundo chato e separadas em dois grupos, com duas fontes distintas de alimento: 100 tubos com dieta artificial adaptada de Greene et al. (1976) e 100

tubos com folhas de milho do híbrido DKB 250 YG Dekalb, que foram usadas como alimento natural.

### **2.2.2.1 Tratamento com dieta artificial**

Para o tratamento com dieta artificial, esta foi fracionada em cubos e pesada em balança analítica e inserida em tubos de vidro de fundo chato (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura). Foram utilizadas 100 tubos de fundo chato, totalizando 100 lagartas.

Depois de eclodidas, as lagartas foram passadas individualmente com auxílio de pincel de pelo macio (Marta 0 – 308, Tigre®), os tubos que foram fechados com papel filme transparente, para permitir a troca gasosa com o ambiente. Paralelamente, outros dez tubos receberam apenas dieta (alíquota), que foram mantidos de maneira idêntica ao tratamento com a intenção de mensurar a perda de água durante o desenvolvimento larval. Após a transformação da lagarta em pupa a dieta que sobrou no tubo foi separada do material restante (fezes e ecdises) e foi seca em estufa até que apresentasse peso constante, juntamente com as alíquotas.

### **2.2.2.2 Tratamento com dieta natural**

Para o tratamento com alimento natural utilizou-se folhas de milho da cultivar híbrida DKB 250 YG Dekalb, com as sementes previamente tratadas com fungicida Maxim XL (fludioxonil 2,5% + metalaxyl-M 0,1%). O milho foi semeado em vasos de plástico com capacidade de oito litros (quatro sementes/vaso) que continham uma mistura de solo (latossolo vermelho) + substrato (Plantmax®) + vermiculita, na proporção de 4:1:0,5, respectivamente, totalizando 6 litros da mistura por vaso. Após a semeadura os vasos foram mantidos em casa de vegetação, localizada na Unidade Centro da UENP, Campus de Cornélio Procópio e foram irrigados diariamente com

aproximadamente 500 mL de água/vaso. No momento da semeadura foi adicionado 5 g de adubo comercial 5-10-20 (N-P-K), com suplementação de nitrogênio (ureia) em duas aplicações, aos 15 e 30 dias após a emergência das plantas.

As folhas ofertadas às lagartas foram retiradas de plantas que estavam com sete a dez folhas estendidas (estádio V7 a V10), sendo coletadas a partir da 3<sup>o</sup> folha, lavadas com sulfato de cobre (0,65%) e água destilada e deixadas para secar sobre papel absorvente. Para alimentação das lagartas foi usada a parte mediana, descartando-se a nervura principal.

No tratamento com folhas de milho, foram utilizadas duas metodologias de condução ao longo do experimento: inicialmente, devido ao alto percentual de água deste material, cuja perda pode se transformar em erro durante o período inicial do desenvolvimento das lagartas em 1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> instares (Crócomo e Parra, 1985). As lagartas recém eclodidas foram agrupadas em 10 placas de vidro de 12cm de diâmetro (dez lagartas/placa), totalizando 100 lagartas, contendo papel filtro umedecido na parte inferior, para manter a turgescência das folhas, e as folhas cortadas em retângulos. Diariamente as folhas ofertadas eram pesadas e sua massa registrada como massa fresca. Paralelamente, outras 20 repetições foram mantidas individualizadas em tubos de vidro de fundo chato (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura), sob as mesmas condições de alimentação, para acompanhamento da duração dos estádios larvais (descrito a seguir no item 2.2.3.1).

As lagartas permaneceram nas placas até a realização da 3<sup>a</sup> ecdise, quando foram individualizadas em tubos iguais aos utilizados com dieta artificial, contendo papel filtro umedecido e alimento (retângulo da folha) e fechados com papel filme transparente.

Diariamente foi medida a massa da sobra das folhas e oferecido novo alimento, previamente pesado (massa fresca). O material restante da excreção da lagarta (fezes e exúvia) também foi coletado diariamente e transferido para recipientes para a realização da secagem em estufa (60°C), até massa constante, medindo-se a massa deste material ao final do experimento.

### **2.2.3 Parâmetros Biológicos**

Foram avaliados os parâmetros biológicos: duração e viabilidade dos instares larvais, duração total da fase larval e pupa, razão sexual, porcentagem de deformação em pupas e em adultos, massa das lagartas em máximo desenvolvimento e massa das pupas (com 24h de idade).

#### **2.2.3.1 Duração dos instares larvais**

Para avaliação dos instares larvais, foram selecionadas ao acaso 30 repetições (30 lagartas), por dieta ofertada, que foram acompanhadas durante todo o seu desenvolvimento, anotando-se a data da troca de cada instar pela presença de ecdise e cápsula cefálica.

Ambos os ensaios foram mantidos em câmara climatizada controlada com temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ , umidade relativa  $70\pm 10\%$  e fotofase de 12 horas.

#### **2.2.3.2 Duração total e viabilidade das fases larval, pupal, deformação em pupas e adultos e razão sexual**

A duração e a viabilidade das fases de lagarta e pupa foram feitas nas 200 lagartas das duas dietas ofertadas, através de observações diárias e, quando as lagartas atingiram o último instar, considerado máximo desenvolvimento, foi feita a medição da massa das lagartas para cada dieta.

As pupas foram separadas por sexo de acordo com a metodologia de Butt e Cantu (1962) e pesadas com 24h de idade. Foi também anotado o número de pupas que apresentavam algum tipo de deformação como alongamento dos urômeros, falhas na quitinização do 3º e 4º urômeros, retenção dos caracteres morfológicos larvais e tumores na asa.

Para os adultos, foram considerados deformados aqueles com asas defeituosas e sem capacidade de se desprender da pupa (Ng et al., 1985).

#### 2.2.4. Estudo do Consumo e Utilização do Alimento

Durante a condução do ensaio com as duas diferentes dietas, foram avaliados também os seguintes parâmetros:

T = duração do período de alimentação (dias);

Af = peso do alimento fornecido ao inseto (g);

Ar = peso da sobra do alimento fornecido ao inseto (g), após T;

F = peso das fezes produzidas (g) durante T;

B = ganho de peso pelas lagartas (g) durante T;

$\bar{B}$  = peso médio das lagartas (g) durante T;

I = peso do alimento ingerido (g) durante T;

I - F = alimento assimilado (g) durante T;

M = (I - F) - B = alimento metabolizado durante o período de alimentação.

Em seguida, usando-se estes parâmetros, foram calculados os seguintes índices:

- Taxa de consumo relativo (g/g/dia) - RCR =  $I/(\bar{B} \cdot T)$

- Taxa de crescimento relativo (g/g/dia) - RGR =  $B/(\bar{B} \cdot T)$

- Taxa metabólica relativa (g/g/dia) - RMR =  $M/(\bar{B} \cdot T)$

- Digestibilidade aproximada (%) - AD =  $[(I - F)/I] \cdot 100$

- Eficiência de conversão do alimento ingerido (%) - ECI =  $(B/I) \cdot 100$

- Eficiência de conversão do alimento digerido (%) - ECD =  $[B/(I-F)] \cdot 100$

- Custo metabólico (%) - CM =  $100 - ECD$

Onde:

- RCR – Taxa de consumo relativo, é representada pela quantidade de alimento que a lagarta ingeriu por miligrama de peso corpóreo por dia;

- RGR – Taxa de crescimento relativo, serve para indicar o ganho da biomassa pelo inseto em relação ao seu peso;

- RMR – Taxa metabólica relativa, indica a quantidade de alimento gasto no metabolismo do inseto;

- AD – Digestibilidade aproximada, representa a porcentagem de alimento que foi ingerido pelo inseto que é efetivamente assimilado pelas paredes do intestino;

- ECI – Eficiência de conversão do alimento ingerido, indica a porcentagem de alimento que foi ingerido pelo inseto e transformado em biomassa;

- ECD – Eficiência de conversão do alimento digerido, representa a porcentagem do alimento digerido que é convertido em biomassa pelo sistema biológico;

- CM – Custo metabólico, indica a porcentagem de alimento que foi metabolizado em energia e foi utilizado para manutenção da vida.

O peso do máximo desenvolvimento foi realizado com 12 lagartas de cada alimento, após a pesagem estas foram mortas em freezer.

O peso inicial do inseto foi considerado zero, medindo apenas o peso do inseto no final do período de alimentação (T) para determinação do ganho de peso (B).

Para a determinação dos índices de nutrição quantitativa da fase larval, adotou-se a metodologia modificada por Scriber e Slansky Jr. (1981).

As alíquotas, a sobra das dietas e as fezes no final do experimento foram secas em estufa (60° C) até peso constante, juntamente com as lagartas que foram mortas no freezer.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo cada lagarta considerada uma repetição. As variáveis: fezes produzidas, alimento assimilado, alimento metabolizado, taxa metabólica relativa, eficiência de conversão do alimento digerido e custo metabólico foram transformadas para  $\sqrt{x + 0,5}$  e as médias foram comparadas pelo teste 'T'. Para o cálculo da razão sexual foi usado o teste do Chi quadrado ( $X^2$ ), com expectativa de 0,5 para machos e fêmeas.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Aspectos Biológicos

#### 2.3.1.1. Ínstares larvais

Foi observada uma maior duração do ciclo larval e também um maior número de ínstaes nas lagartas alimentadas com folhas de milho (ocorrência de até 9 ínstaes), quando comparadas com as lagartas alimentadas com dieta artificial (até 6 ínstaes).

A mortalidade observada nas lagartas ao longo do período de alimentação foi similar nos quatro primeiros ínstaes em ambas as dietas. No entanto, a partir do 5º instar, houve diferença entre as duas dietas: nos últimos ínstaes das lagartas alimentadas com dieta artificial (5º e 6º) não houve mortalidade, enquanto que para as lagartas alimentadas com folhas de milho a mortalidade nos últimos ínstaes (5º, 6º, 7º, 8º e 9º) foi de até 16% (Tabela 2.2). Em hipótese, a mortalidade observada em lagartas, alimentadas com folhas de milho, nos últimos ínstaes, mostra a baixa eficiência nutricional do alimento ingerido.

**Tabela 2.2** Duração média (T) e Porcentagem de Mortalidade (Mort.) dos diferentes ínstaes de lagartas (n = número observado) de *Agrotis ipsilon* alimentadas com folha de milho e dieta artificial adaptada de Greene et al. 1976 Cornélio Procópio - PR, 2014.

Alimento	Parâmetros	Ínstares									
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	Total
Milho (n=24)	T (dias)	3,9	2,6	3,3	3,4	3,9	4,5	8,5	8,4	12,3	50,8
	Mort. (%)	16,7	4,2	4,2	4,2	0	4,2	0	0	16,7	50,2
Dieta (n=28)	T (dias)	3,0	2,4	2,4	4,13	7,0	4,8	-	-	-	23,7
	Mort. (%)	14,3	3,6	0	3,6	0	0	-	-	-	21,5

Bento et al. (2007) desenvolvendo trabalho com *A. ipsilon* com dieta artificial diferente da dieta utilizada nesse presente trabalho, e em condições semelhantes de umidade e temperatura aos usados neste trabalho, obtiveram 100% das lagartas, alcançando o 6º instar, corroborando com os resultados aqui observados.

Em revisão sobre a variação no número de ínstaes de diferentes espécies de insetos Esperk et al. (2007) observaram que para *A. ipsilon* o aumento do número de ínstaes é desfavorável para a espécie.

A questão nutricional do alimento impera como o principal fator no aumento do número de ínstaes para insetos de maneira geral, como também em *A. ipsilon* (Scriber e Slansky, 1981; Santos e Shields, 1998). Dietas artificiais apresentam elevado teor nutricional (carboidratos, lipídios e proteínas), quando comparada com folhas de plantas (Whitman et al., 1994), o que explica o maior número de ínstaes para as lagartas alimentadas com folhas de milho, pois como o alimento é mais pobre nutricionalmente, o inseto precisa comer uma maior quantidade, para alcançar a fase adulta, e isso só possível, com o prolongamento do ciclo.

Kidd e Orr (2001) desenvolveram trabalho com *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) que eram alimentadas com dieta artificial e depois eram transferidas para dieta natural, e observaram que a alimentação com dieta natural aumenta o tempo de desenvolvimento e o número de ecdises.

### **2.3.1.2 Duração total da fase larval e pupa, percentual de pupas e adultos deformados e razão sexual**

Nos aspectos biológicos avaliados em *A. ipsilon* alimentadas com duas diferentes dietas (folhas de milho e dieta artificial) foi observada uma maior duração da fase de lagarta quando alimentadas com folhas de milho ( $36,89 \pm 0,62$  dias), do que nas lagartas que receberam dieta artificial ( $19,73 \pm 0,14$  dias) (Tabela 2.3). Para a fase de pupa não houve contraste na duração nos diferentes alimentos ofertados, apresentando em média 11,43 e 12,70 dias para milho e dieta artificial, respectivamente (Tabela 2.3).

**Tabela 2.3** Médias da duração e viabilidade (dias  $\pm$  EP) das fases de lagarta, pupa e do estágio de pré-pupa; percentual (%) de adultos (AD) e pupas (PD) deformadas; e razão sexual (total de fêmeas/machos + fêmeas) de *Agrotis ipsilon* alimentada com folha de milho e dieta artificial (adaptada de Greene et al., 1976). Cornélio Procópio - PR, 2014.

Dieta	Lagarta		Pré-Pupa		Pupa		PD+ AD (%)	Razão Sexual
	Duração (dias)	Viab. (%)	Duração (dias)	Viab. (%)	Duração (dias)	Viab. (%)		
Milho (n=100)	36,89 $\pm$ 0,62	53,9	1,33 $\pm$ 0,09	91,7	11,43 $\pm$ 0,30	45,5	18,2	0,37
Artificial (n=100)	19,73 $\pm$ 0,14	79,22	1,67 $\pm$ 0,10	98,36	12,70 $\pm$ 0,23	76,67	16,7	0,53

As viabilidades observadas para as fases de lagarta e pupa foram menores nos insetos alimentados com folha de milho, quando comparados com os alimentados com dieta artificial (Tabela 2.3). Em trabalho realizado no Egito, Amin e Abdin (1997) avaliaram os aspectos biológicos de *A. ipsilon* alimentadas com nove diferentes plantas (quatro espécies cultivadas e cinco daninhas) e concluíram que o milho é uma planta de preferência intermediária para esta espécie de praga, com mortalidades de 12,6% e 76% para as fases de lagarta e pupa, respectivamente.

Quando o inseto praga se alimenta de uma dieta com baixa qualidade nutricional, como a folha de milho (comparada a dieta artificial), o seu ciclo larval é ampliado (Bavaresco et al., 2003). Em condições de campo, isto pode ter várias implicações, pois significa que um maior dano na cultura atacada irá ocorrer (Lopes et al., 2008).

Hirai (1976) sugere que períodos larvais muito longos, refletem uma alimentação inadequada, o que explica a diferença de duração do período larval quando comparamos o tempo do ciclo das lagartas alimentadas com dieta natural (folhas de milho) com dieta artificial. Este fato também é discutido por Nealis (1987), que observou maior número de instares em lagartas desenvolvidas com alimentos menos nutritivos.

De maneira semelhante ao observado neste trabalho, Santos e Shields (1998) também trabalhando com *A. ipsilon*, observaram uma maior duração na fase de lagarta quando alimentada com folha de milho, comparado com dieta artificial, corroborando com os resultados aqui observados.

De acordo com Slansky Junior e Scriber (1985), não existe correlação direta entre duração do período de desenvolvimento de lagarta e aumento do

número de instares, no entanto, nos dados aqui apresentados, quando comparados os dados entre dieta artificial e natural (folha de milho) foi observado um aumento no número de instares, o que automaticamente, aumentou o tempo da fase larval.

O aumento do número de instares pode ser explicado pela diferença física entre os alimentos, que podem implicar em alterações nos parâmetros biológicos das lagartas, principalmente em resposta ao maior percentual de fibra da folha de milho do que na dieta artificial. A presença de maior teor de fibras leva possivelmente a um maior desgaste das mandíbulas, evidenciando por parte do inseto um maior número de ecdises durante o tempo de alimentação (Slanski Junior e Rodriguez, 1987). Além do teor de fibras, a presença de outros nutrientes, como o silício em folhas de milho, confere uma maior resistência às lagartas, também indicando um maior gasto das mandíbulas e o aumento de ecdises (Goussain et al., 2002).

O percentual de pupas e adultos deformados em ambos os alimentos foi similar, apresentando 18,2% e 16,7% para folha de milho e dieta artificial, respectivamente (Tabela 2.3). Já para a razão sexual, o valor observado de fêmeas nos insetos alimentados com folha de milho foi menor (37%) do que na dieta artificial (53%). Porém, estes resultados não diferem pela probabilidade calculada pelo teste de Chi quadrado, para uma proporção esperada de 50%.

### **2.3.2 ESTUDO DO CONSUMO E UTILIZAÇÃO DO ALIMENTO DE *AGROTIS IPSILON* EM DIFERENTES DIETAS**

As lagartas alimentadas com dieta artificial alcançaram os maiores valores nos parâmetro avaliados, quando comparados com as lagartas alimentadas com folha de milho (Tabela 2.4). Scriber e Slansky (1981) observaram que a umidade da dieta é um fator preponderante para uma maior ingestão de alimento pelo inseto, o que justificaria a maior ingestão da dieta artificial, e conseqüentemente, os maiores índices observados. No entanto, neste trabalho o percentual de água observado nos alimentos avaliados foi similar, com 78,4% e 78,5% para folha de milho e dieta artificial,

respectivamente, e portanto, este fator não alterou o comportamento de ingestão do alimento, que foi superior na dieta artificial (Tabela 2.4). Esta observação evidencia que o tempo de consumo (duração da fase de lagarta) foi inversamente proporcional a massa ingerida.

Nos parâmetros fezes produzidas (F), ganho de peso (B) e alimento assimilado (I-F), foi observado uma mesma tendência de maiores valores nas lagartas alimentadas com dieta artificial do que aquelas alimentadas com folhas de milho. O que não se repetiu no parâmetro alimento metabolizado (M), que foi similar em ambas as dietas (Tabela 2.4).

É importante destacar que as lagartas alimentadas com dieta artificial, consumiram maior quantidade de alimento, produziram maior quantidade de fezes e assimilaram maior quantidade de alimento, o que é justificado pela maior massa apresentada pelas lagartas neste tratamento. Por outro lado, para as lagartas alimentadas com dieta natural, embora a quantidade de alimento consumido tenha sido menor, o percentual de alimento metabolizado foi similar ao outro tratamento, indicando que devido a maior duração da fase larval e do maior número de ínstaes das lagartas alimentadas com folha de milho, estas apresentaram metabolismo mais eficiente (M).

**Tabela 2.4** Médias em gramas ( $\pm$ EP) dos parâmetros: peso do alimento ingerido durante o período de alimentação (I); peso das fezes produzidas durante o período de alimentação (F); ganho de peso pelas lagartas durante o período de alimentação (B); alimento assimilado durante o período de alimentação (I-F); alimento metabolizado durante o período de alimentação (M); peso da lagarta (ML) e peso de pupa (MP) de *Agrotis ipsilon* alimentadas com folha de milho e dieta artificial em condições de laboratório. Cornélio Procópio – PR, 2014.

Parâmetros avaliados	Alimento Utilizado	
	Folha de milho	Dieta Artificial
I (g)	0,49 $\pm$ 0,02	1,24 $\pm$ 0,03
F (g)	0,32 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,02
B (g)	0,04 $\pm$ 0,002	0,17 $\pm$ 0,005
I-F (g)	0,17 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,02
M (g)	0,12 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02
ML (g)	0,33 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,02
MP (g)	0,20 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,02

Como dito anteriormente, lagartas e pupas que foram alimentadas com dieta artificial apresentaram massas maiores, com valores médios de 0,88g e 0,48g respectivamente, quando comparadas com lagartas (0,33g) e pupas (0,20g) alimentadas com folhas de milho (Tabela 2.4).

Com relação a taxa de consumo relativo (RCR) e a taxa de crescimento relativo (RGR), pode-se observar que o alimento artificial apresentou maiores valores para ambas (Tabela 2.5), demonstrando que o inseto consumiu maior quantidade de dieta artificial, comparadas aos valores das lagartas alimentadas com folha de milho. Relacionado a esta observação, as lagartas alimentadas com dieta artificial também apresentaram maiores massas em lagarta e pupa quando comparadas com os dados em folha de milho.

No que se refere a taxa metabólica relativa (RMR), que indica a quantidade de alimento gasto no metabolismo do inseto, observou-se que o tratamento com dieta natural (folha de milho) apresentou maior valor (Tabela 2.5), o que indica que o inseto utilizou maior quantidade de alimento para seu metabolismo, isso é, utilizou mais energia para se desenvolver o que prejudicou o ganho de peso. Esse dado evidencia que o inseto precisou compensar algum aspecto negativo do alimento da dieta natural e por isso teve valor elevado quando comparado a dieta artificial (Bhat e Bhattacharya 1978).

Os dados de digestibilidade aparente (AD), que indicam a porcentagem de alimento ingerido pelo inseto que é assimilado pelas paredes do intestino, apresentaram valores maiores para a dieta natural (folha de milho) (Tabela 2.5), indicando que o inseto digeriu a maior parte do alimento natural consumido. Tal dado é confirmado pela maior produção de fezes dos insetos alimentados com dieta artificial, que evidenciam que nem todo alimento consumido desta dieta foi assimilado.

A deficiência em digerir a dieta artificial pode ser pela falta de água, fibras ou desequilíbrio nutricional, ao contrário do apresentado no presente trabalho, pois a quantidade de água presente no alimento dieta artificial apresentou valor similar no teor de água ao alimento natural (Meneguim et al. 2010).

**Tabela 2.5** Índices de conversão alimentar de *Agrotis ipsilon*, alimentada com dieta natural (folha de milho) e dieta artificial em condições de laboratório. Temperatura de 25°C, UR de 70 ± 10% e fotofase de 14h. Cornélio Procópio - PR, 2014.

Índices Nutricionais	Alimento Utilizado	
	Folha de milho	Dieta Artificial
RCR (g/g/dia)	0,285±0,010	0,367±0,009
RGR (g/g/dia)	0,026±0,002	0,051±0,002
RMR (g/g/dia)	0,071±0,007	0,032±0,005
AD (%)	34,16±1,61	22,62±1,54
ECI (%)	9,24±0,69	13,82±0,47
ECD (%)	27,04±3,11	61,08±2,29
CM (%)	72,96±3,11	38,92±2,29

Taxa de consumo relativo (RCR), taxa de crescimento relativo (RGR), taxa metabólica relativa (RMR), digestibilidade aproximada (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) e custo metabólico (CM).

A eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) mostra o que foi ingerido pelo inseto e transformado em biomassa, sendo maior na dieta artificial, onde ocorreram lagartas de tamanho maior (ML) (Tabela 2.5).

A eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) representa o alimento que foi digerido e convertido em biomassa, sendo maior para lagartas alimentadas com dieta artificial. Esse valor não depende somente da digestibilidade, mas também do valor nutricional que o alimento apresenta e de acordo com Meneguín et al. (2010) quanto maior a taxa metabólica relativa (RMR) menor a eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), o que pode ser observado no presente estudo, onde a RMR foi maior para as lagartas alimentadas com folha de milho e menor o ECD, indicando que o alimento natural tem piores valores nutricionais quando comparado a dieta artificial.

Quando o alimento apresenta maior AD, no caso de lagartas alimentadas com dieta natural, apresentam baixos ECI e ECD, e segundo Reese (1979) esse fato pode ser apresentado pela presença de substâncias que podem bloquear a utilização de nutrientes, corroborando com os dados aqui obtidos, e mais uma vez demonstrando que a dieta natural é mais pobre nutricionalmente.

O custo metabólico indica a porcentagem de alimento que foi metabolizado em energia e foi utilizado para manutenção da vida. Observou-se que as lagartas alimentadas com dieta natural utilizaram mais alimento para produzir energia metabólica, gasta na manutenção da vida durante o ciclo aumentado. Além disso, o maior número de instares apresentado pelas lagartas alimentadas com dieta natural, demandaram grande gasto metabólico, justificando os resultados. De acordo com Scriber e Slansky (1981) esse custo pode ser atribuído à presença de substâncias que podem afetar a fisiologia do inseto.

## 2.4 CONCLUSÕES

Os resultados observados neste trabalho mostraram que:

- lagartas de *A. ipsilon* alimentadas com folhas de milho apresentam um maior período de lagarta e maior número de instares larvais, em comparação as lagartas alimentadas com dieta artificial;

- com os dados observados dos índices nutricionais foi observado que as lagartas alimentadas com folhas de milho alimentaram-se menos, metabolizaram mais e, conseqüentemente, apresentaram menores massas (de lagarta e pupa), quando comparadas com lagartas alimentadas com dieta artificial.

### 3. ARTIGO B. PATOGENICIDADE DE NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS SOBRE *Agrotis ipsilon* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E CASA DE VEGETAÇÃO

#### RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) apresentam uma associação simbiote com bactérias e assim conseguem controlar insetos. Os juvenis infectivos de nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* buscam seus hospedeiros no solo e, quando os encontram, penetram em suas aberturas naturais ou perfuram sua cutícula matando o inseto em até 48 horas. A lagarta-rosca, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga de importância econômica em várias culturas, inclusive milho (*Zea mays*) podendo chegar à perda potencial de 20%. Esse trabalho tem como objetivo a utilização de isolados de NEPs contra *A. ipsilon* podendo ser uma alternativa promissora para a diminuição do uso de inseticidas químicos em plantações de milho. Foi feito a seleção em laboratório de isolados de NEPs utilizando nove isolados, sendo eles: *Heterorhabditis amazonensis* (RSC05); *Heterorhabditis indica* (IBCB-n05); *H. sp.* (JPM4), *H. sp.* (IBCB-n40); *H. sp.* (NEPET 11); *H. sp.* (IBCB-n44); *H. sp.* (Alho); *Steinernema carpocapsae* (IBCB-n02) e *S. sp.* (CH3). Também foi realizado teste de diferentes concentrações (0 – testemunha, 50 JIs/cm<sup>2</sup>, 100 JIs/cm<sup>2</sup>, 150 JIs/cm<sup>2</sup> e 200 JIs/cm<sup>2</sup>) de NEPs e produção *in vivo* em lagartas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) com isolados IBCB-n02, IBCB-n05 e Alho, onde no teste de seleção e concentração foram utilizados lagartas de 3º instar de *A. ipsilon*. Na seleção somente o isolado NEPET 11 não alcançou mortalidade eficiente (10%), o que diferiu do restante que foi superior a 80%, chegando a 100% com o isolado CH3. No teste em diferentes concentrações de NEPs, o isolado Alho alcançou 10% de mortalidade para a concentração de 50 JIs/cm<sup>2</sup> e o isolado IBCB-n05 alcançou 100% de mortalidade na concentração de 200 JIs/cm<sup>2</sup>. No teste de produção *in vivo* o isolado Alho apresentou a maior produção que foi de 112.138 JIs/lagarta de *G. mellonella*. Os resultados observados neste trabalho mostram que diferentes isolados de NEPs possuem infectividade eficiente em laboratório (maior que 80%) para a utilização em programas de controle biológico de *A. ipsilon*.

**Palavras-Chave:** Lagarta-rosca. Milho. Controle microbiano. Noctuidae

## ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (NEPs) have an association with symbiotic bacteria that can control insects. The infective juvenile nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* seek their hosts in the soil, and when they find them in their natural openings penetrate or pierce their cuticle killing the insect within 48 hours. The black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) is an important pest in several crops, including corn (*Zea mays*) reaching potential loss of 20%. This paper aims to use NEPs isolates against *A. ipsilon* may be a promising alternative for the reduction of chemical insecticides in corn plantings. The selection was made in the laboratory isolates of NEPs using nine isolates, namely: *Heterorhabditis amazonensis* (RSC05); *Heterorhabditis indica* (IBCB-n05); *H. sp.* (JPM4), *H. sp.* (IBCB-n40); *H. sp.* (NEPET 11); *H. sp.* (IBCB-n44); *H. sp.* (Alho); *Steinernema carpocapsae* (IBCB-n02) and *S. sp.* (CH3). Was also conducted testing different concentrations (0, 50 Jls/cm<sup>2</sup>, 100 Jls/cm<sup>2</sup>, 150 Jls/cm<sup>2</sup> e 200 Jls/cm<sup>2</sup>) of NEPs and in vivo production in larvae of *Galleria mellonella* with isolated IBCB-n02, IBCB-n05 and Alho, where the test selection and concentration were used 3<sup>rd</sup> instar larvae of *A. ipsilon*. In selecting only isolated NEPET 11 mortality reached not efficient (10%), which differ from the remainder was greater than 80% to 100% with the isolated CH3. In the test at different concentrations NEPs the isolated Alho reached 10% mortality at the concentration of 50 Jls/cm<sup>2</sup> and isolated IBCB-n05 reached 100% mortality at the concentration of 200 Jls/cm<sup>2</sup>. In production test *in vivo* the isolated Alho showed the highest production which was 112.138 Jls/larvae of *G. mellonella*. The results of this work show that different isolates of NEPs have infectivity efficient laboratory (higher than 80%) for use in biological control programs of *A. ipsilon*.

Key-words: Black cutworm. Corn. Microbial control. Noctuidae

### 3.1 INTRODUÇÃO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são vermes capazes de matar insetos, cuja propriedade inseticida se deve ao fato de apresentarem simbiose com bactérias, que levam o hospedeiro a morte, sendo essa uma das razões para que tenham alcançado sucesso no controle microbiano. A associação de bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* se dá com juvenis infectivos (JIs) de *Steinernema* e *Heterorhabditis* respectivamente, ficando armazenadas no intestino dos nematóides (Almenara et al., 2010).

Os JIs invadem o corpo de seus hospedeiros e liberam suas bactérias na hemolinfa do mesmo, causando a rápida morte do inseto. Em seguida, os NEPs alimentam-se dos tecidos do inseto morto e também de algumas bactérias, e ali reproduzem-se em diversas gerações. Quando o alimento esgota-se os JIs saem do hospedeiro a procura de novos hospedeiros (Ferraz, 1998).

Dentre as espécies de entomopatógenos estudadas os fungos são os principais, porém nematoides entomopatogênicos possuem maior tolerância a variações ambientais, ao uso de outras técnicas de controle, inclusive ao controle químico, e são mais indicados para o controle de pragas associadas ao solo e com hábitos crípticos, pois ao contrário dos demais entomopatógenos, os nematoides podem deslocar-se em busca do hospedeiro (Ferraz, 1998; Toledo et al., 2010).

Embora os estudos com nematoides entomopatogênicos sejam recentes no Brasil, nos últimos anos vários trabalhos tem demonstrado o potencial destes agentes para o controle de diversas pragas (Machado et al., 2005; Alves et al., 2009a; Alves et al., 2012; Bortoluzzi et al., 2013) entre elas, insetos da ordem Lepidoptera (Leite et al. 2005; Andaló et al., 2010; Andaló et al., 2012; Andaló, 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho, foi avaliar o potencial de nematoides entomopatogênicos através da seleção de isolados para *A. ipsilon*, bem como avaliar a suscetibilidade de diferentes instares do inseto, a produção destes isolados pelo método in vivo, além de realizar testes em casa de vegetação.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Criação de *Galleria mellonella* e Multiplicação dos Isolados de Nematoides entomopatogênicos

A traça dos favos, *Galleria mellonella*, é considerada um hospedeiro altamente susceptível a nematoides entomopatogênicos e, por esse motivo, é utilizada para multiplicação desses patógenos (Cardoso et al., 2007). Os isolados de NEPs utilizados nesse trabalho foram obtidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Embrapa Trigo-RS e do Instituto Biológico de Campinas e permaneceram armazenados em suspensão aquosa dentro de recipientes plásticos (500 mL), em câmaras climatizadas ( $17\pm 1^{\circ}\text{C}$  e escotofase). Quando necessário foram multiplicados em lagarta de último instar de *G. mellonella* conforme descrito por Molina e López (2001).

Para a multiplicação dos NEPs, foram utilizadas 10 lagartas de *G. mellonella* que foram colocadas em placas de Petri (9cm de diâmetro), contendo duas folhas de papel filtro e 2 mL de suspensão aquosa contendo em média 500 JIs/mL. As placas foram mantidas durante três dias em câmara climatizada à  $25^{\circ}\text{C}$ , quando as lagartas mortas e com sintomatologia característica da infecção por nematoides foram transferidas para câmara seca (placa de Petri com um papel filtro), e mantidas em câmara climatizada por mais cinco dias.

Após esse período, as lagartas foram transferidas para armadilha de White (White, 1927) que é constituída de placa de Petri de 9cm de diâmetro contendo um papel filtro suspenso por um suporte de plástico de 0,3 cm de altura, onde as lagartas foram acomodadas, em seguida, adicionou-se aproximadamente 5 mL de água destilada para estimular a saída dos nematoides do cadáver do hospedeiro, que ficou suspenso sobre o suporte. Essa suspensão foi recolhida diariamente e armazenada em becker contendo água destilada e bomba para aeração por no máximo uma semana antes do uso nos ensaios.

### 3.2.2 Seleção de Isolados de Nematoides Entomopatogênicos para *Agrotis ipsilon*

Foram utilizados nove isolados para o teste de seleção (Tabela 3.1), que foram mantidos e repicados conforme metodologia descrita no item 3.2.1.

Para condução do experimento, foram usados potes plásticos com capacidade de 100 mL com 7 g de vermiculita estéril, que receberam previamente duas sementes de milho e foram mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente uma semana, aguardando a germinação das sementes e crescimento das plantas, até alcançarem aproximadamente 10 cm, quando foram usadas no experimento.

**Tabela 3.1** Lista dos isolados (gêneros/espécies) e local de origem dos nematoides utilizados para a seleção quanto a patogenicidade sobre *Agrotis ipsilon* em condições de laboratório.

Isolados	Gênero/ Espécie	Localidade
ALHO	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Lavras – MG – Brasil
CH3	<i>Steinernema</i> sp.	-
JPM4	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Lavras – MG – Brasil
RSC05	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	Benjamin Constant – AM – Brasil
NEPET 11	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Palmeira das Missões – RS – Brasil
IBCB-n02	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Flórida – Estados Unidos
IBCB-n05	<i>Heterorhabditis indica</i>	Itapetininga – SP - Brasil
IBCB-n40	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Taboporã – SP – Brasil
IBCB-n44	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Santa Adélia – SP – Brasil

Quando os potes com as plantas estavam prontos, os isolados de nematoides, foram quantificados e aplicados sobre a vermiculita, na concentração de 100 JIs/cm<sup>2</sup> (a testemunha recebeu apenas água destilada), padronizando-se o percentual de umidade de 20%. Em seguida, uma lagarta

de *A. ipsilon* de terceiro instar foi colocada em cada pote, sendo que cada parcela era formada por 10 potes.

Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada a  $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ , UR de  $70\pm 10$  com fotofase de 12 horas por cinco dias, quando foi feita a avaliação, observando-se o número de insetos mortos. As lagartas mortas foram dissecadas em microscópio estereoscópio, para confirmação da mortalidade por nematoides e os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

### **3.2.3 Teste com Diferentes Estágios Larvais de *Agrotis ipsilon***

Para avaliação da suscetibilidade dos diferentes instares de *A. ipsilon* foram utilizados três isolados que apresentaram maior patogenicidade no teste de seleção de isolados (IBCB-n02, IBCB-n05 e ALHO), sendo um isolado do gênero *Steinernema*: IBCB-n02 e dois do gênero *Heterorhabditis*: IBCB-n05 e Alho, e foram utilizadas lagartas de 2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> instares, e pupas.

O ensaio foi conduzido utilizando copos plásticos com capacidade de 100 mL preenchidos com 7g de vermiculita estéril, onde uma lagarta de *A. ipsilon* foi colocada na superfície juntamente com um pedaço de dieta para alimentação e, para a fase de pupas, estas foram enterradas na vermiculita sem dieta. Em seguida, a suspensão de nematoide na concentração de 100 JIs/cm<sup>2</sup> foi aplicada na superfície (para o tratamento testemunha, utilizou-se apenas água destilada), padronizando-se o percentual de umidade de 20%.

Os copos foram mantidos em câmara climática a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR de  $70\pm 10$  e fotofase de 12 horas durante cinco dias, quando procedeu-se a avaliação através da contagem das lagartas mortas, que foram também dissecadas para confirmação da mortalidade por nematoides.

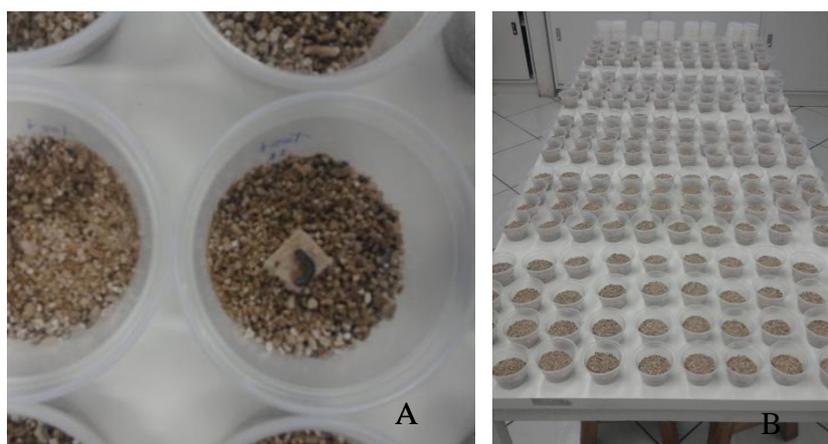
O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 4 x 5, considerando três isolados mais a testemunha (4) e quatro instares mais a fase de pupa (5), sendo que cada tratamento foi constituído de quatro repetições (10

copos/repetição), totalizando 40 insetos por tratamento e os dados foram submetidos a análise de variância e ao teste de média de Tukey a 5% de probabilidade, do programa estatístico Sisvar.

### 3.2.4 Efeito de Diferentes Concentrações de Nematoides Entomopatogênicos Sobre Lagartas de *Agrotis ipsilon*

Foram utilizados os três isolados que apresentaram maior patogenicidade no ensaio de seleção de isolados (IBCB -n02, IBCB-n05 e ALHO).

Foi utilizada a mesma metodologia do item 3.2.2, variando apenas as concentrações que foram de 0 (testemunha) 50, 100, 150 e 200 JIs/cm<sup>2</sup> (Figura 3.1).



**Figura 3.1** A - Pote plástico contendo vermiculita, dieta artificial e uma lagarta de *Agrotis ipsilon*; B - Potes plásticos utilizados para a montagem do ensaio com as diferentes concentrações de cada isolado de nematoide.

O ensaio foi conduzido em esquema fatorial 3 x 5, considerando três isolados mais e cinco concentrações dos mesmos, sendo que cada tratamento foi constituído de quatro repetições (10 copos/repetição), totalizando 40 insetos por tratamento e os dados foram submetidos a análise de variância e ao teste de média de Tukey a 5% de probabilidade, do programa estatístico Sisvar.

### 3.2.5 Produção *in vivo* dos Isolados IBCB -n02, IBCB-n05 e Alho

Os isolados IBCB-n02, IBCB-n05 e Alho foram avaliados também quanto a capacidade de multiplicação *in vivo*, usando lagartas de *G. mellonella*. Para isso os JIs destes nematoides foram multiplicados em lagartas de *G. mellonella* para reativar sua virulência, de acordo com a metodologia descrita por Molina e López (2001).

Em seguida, cada isolado foi aplicado na concentração de 100cm<sup>2</sup> JIs em placas de Petri de 9 cm contendo papel filtro duplo, onde foram colocadas dez lagartas de *G. mellonella*. As placas foram mantidas sob temperatura de 25±2°C, UR de 70±10 e no escuro constante durante 48h em câmara de germinação, de acordo com metodologia de Taylor e Shields (1990).

Após esse período, as lagartas infectadas foram colocadas em placas de Petri com papel filtro seco e limpo (câmara seca), a uma temperatura de 25±2°C, UR de 70% por cinco dias em câmara de germinação, tempo no qual se observou a sintomatologia típica de infecção por NEPs dos gêneros, os quais deixam as lagartas de cor amarela até cor café (*Steinernema*) e de coloração roxo a preto (*Heterorhabditis*) para as lagartas infectadas. As lagartas que não apresentaram essa sintomatologia foram descartadas.

Em seguida as lagartas foram transferidas para armadilhas de White, para facilitar a emergência e recuperação dos NEPs e uma vez observada a emergência de JIs, estes foram coletados diariamente até a observação do esgotamento da lagarta.

A suspensão de JIs coletada diariamente das armadilhas de White foi vertida em proveta graduada para estabelecimento do volume total diário e, em seguida, a suspensão foi quantificada e calculado o total de produção/dia por repetição.

Para tanto, cinco repetições de 50 µL, foram colocadas individualizadas em placas do tipo Eliza para quantificação do número de JIs produzidos. Esse procedimento foi realizado cinco vezes para cada repetição, e em seguida calculou-se a média ponderada para cada repetição. Conhecendo o volume total e o número total de nematoides em 50 µL, estabeleceu-se o número de

JIs por mL, possibilitando realizar o cálculo do número de juvenis emergidos do hospedeiro por dia.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos (diferentes isolados avaliados) e com quatro repetições por tratamento, totalizando 12 parcelas. As variáveis avaliadas foram produção diária (número total de JIs emergidos/dia) e produção acumulada (número total de JIs que emergiram até o esgotamento do hospedeiro). Para cada variável, foi elaborada uma curva de regressão para avaliar a produção ao longo do período de produtividade.

### **3.2.6 Testes em Casa de Vegetação**

Para o teste de suscetibilidade de *A. ipsilon* em condições de casa de vegetação, foram preparados previamente vasos com capacidade de oito litros, contendo solo preparado na proporção de 4:1:0,5 terra, substrato (Plantmax®) e vermiculita, totalizando em cada vaso 2 litros da mistura de substratos. Foram plantadas cinco sementes de milho híbrido DKB 250 YG Dekalb, com tratamento fungicida Maxim XL (fludioxonil 2,5% + metalaxyl-M 0,1%), em cada vaso, e foram irrigados com aproximadamente 200 mL de água por dia.

Após 10 dias da emergência do milho, cinco lagartas de *A. ipsilon* foram liberadas em cada vaso, e estes foram separados em agrupamentos de 15 vasos/tratamento para aplicação dos isolados IBCB-n02, IBCB-n05 e ALHO na concentração de 100JIs/cm<sup>2</sup> com auxílio de uma pipeta. O tratamento testemunha recebeu apenas água destilada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos (três isolados e testemunha), com 15 repetições cada. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A eficiência de controle dos tratamentos foi calculada pela fórmula de Abbott (1925) (Ferreira, 2011).

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.3.1 Seleção de Isolados de Nematoides Entomopatogênicos para *Agrotis ipsilon***

Dos nove isolados testados, somente o isolado NEPET 11 não causou mortalidade significativa (10% de mortalidade) e, portanto, não diferiu da testemunha. Os demais isolados, causaram entre 80% (IBCB-n40, JPM 4, RSC 05 e IBCB-n44) e 90% de mortalidade (IBCB-n02, IBCB-n05, ALHO).

O isolado que apresentou maior mortalidade no teste de seleção foi o CH3 (100%), porém, este isolado é de difícil multiplicação em laboratório, e embora infecte e mate as lagartas de *Galleria mellonella*, muitas vezes não ocorre multiplicação, dificultando o uso do mesmo nos ensaios. Por este motivo, este isolado não foi utilizado nos testes subsequentes.

Com relação a susceptibilidade, Ebssa e Koppenhöfer (2012) testaram os isolados *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis*, *Steinernema carpocapsae*, *S. feltiae*, *S. kraussei* e *S. riobrave* contra lagartas de *Agrotis ipsilon*, obtendo resultados com mortalidade acima de 90% exceto para *S. kraussei* que causou somente 60%.

Essa variação de suscetibilidade a diferentes isolados é esperada, porque diferentes isolados coevoluiram com diferentes espécies de hospedeiros, que convergiram para este nicho ecológico nos tempos atuais, e portanto, possuem especificidades, que os tornam mais ou menos virulentos sobre determinado hospedeiro (Almenara et al., 2012).

#### **3.3.2 Teste com diferentes estágios nas fases larvais de *Agrotis ipsilon* e fase de pupa**

Nenhum dos isolados avaliados (IBCB-n05, Alho e IBCB-n02) nos diferentes instares (2<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>, 5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>), apresentou maior mortalidade quando

comparado com o teste de seleção que foi realizado com 3º instar larval (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** Porcentagem de mortalidade de diferentes instares de *Agrotis ipsilon* após a aplicação dos isolados IBCB-n05, Alho e IBCB-n02 na concentração de 100JIs/cm<sup>2</sup> em condições de laboratório. Temperatura de 25±2°C, UR de 70±10 e fotofase de 12 horas.

NEPS	Mortalidade (%) em diferentes instares				Pupa
	2º	4º	5º	6º	
IBCB-n05	42,50±8,5 Ab	82,5±6,3 Aab	47,5±7,5 Ab	60,0±15,8 Aab	
Alho	47,5±2,50 Ac	80,0±5,8 Aab	60,0±10,8 Abc	75,0±2,9 Aabc	
IBCB-n02	15,0±2,9Bc	82,5±8,5Aa	50,0±4,1Ab	45,0±8,7Abc	
Test.	0,0±0,0B	0,0±0,0B	0,0±0,0B	0,0±0,0B	

Dados seguidos de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferiram entre si pelo Teste de Tukey com P≤0,05.

A baixa mortalidade em lagartas de 2º instar pode ser devido a baixa atividade metabólica apresentada pelas lagartas de menores instares e menor movimento nessa fase, pois os NEPs localizam seus hospedeiros pela concentração de CO<sub>2</sub> ao seu redor (Nishimatsu e Jackson 1998).

Trabalho realizado por Ebssa e Koppenhöfer (2012) corroboram com este resultado, onde realizando testes com diferentes instares de *A. ipsilon* para a espécie *Steinernema carpocapsae* observaram maior mortalidade para lagartas de 3º e 4º instares, quando comparadas com o 5º e 6º instares. De acordo com estes autores, em geral, lagartas dos primeiros instares são mais suscetíveis que lagartas mais velhas.

Neste mesmo trabalho, porém com isolados do gênero *Heterorhabditis*, Ebssa e Koppenhöfer (2012) alcançaram somente 60% de mortalidade em 4º e 5º instares da lagarta-rosca, corroborando mais uma vez com os resultados aqui obtidos.

No que se refere a suscetibilidade das pupas, a mortalidade observada não alcançou valor significativo para nenhum dos isolados avaliados.

De maneira semelhante, em trabalho desenvolvido por Chambers et al. (2010) para a espécie de lepidóptero *Cydia pomonella* (traça-da-maça) as pupas também foram menos suscetíveis que as lagartas (Lacey et al., 2005).

Ainda, Molina-Ochoa et al. (1996) demonstram em estudo que a suscetibilidade de algumas espécies de lepidópteros a nematoides entomopatogênicos, é altamente variável de acordo com a idade do inseto, podendo variar a mortalidade entre insetos mais jovens e mais velhos

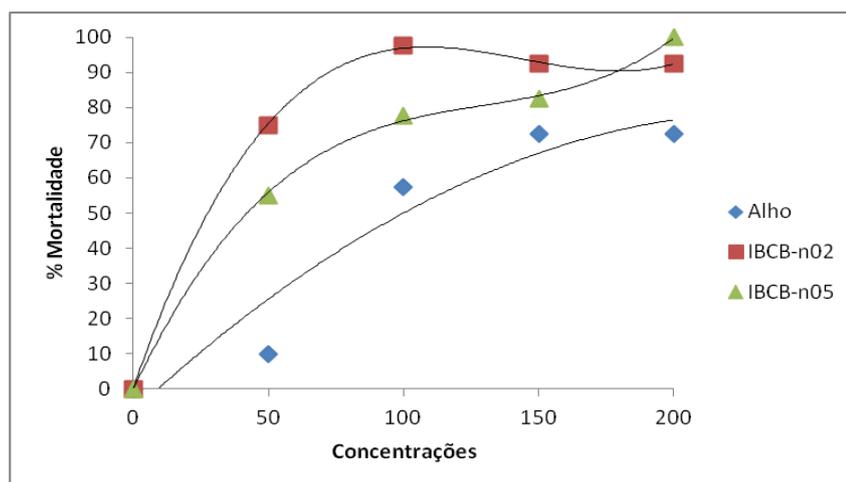
Entre as alternativas propostas para a baixa suscetibilidade das pupas de *A. ipsilon*, pode-se sugerir que devido a menor emissão de CO<sub>2</sub> nessa fase, diminui a atração, ou mesmo orientação do deslocamento do JI em direção ao inseto é afetado, pois o CO<sub>2</sub> é um atraente de JIs até o inseto (Ebssa e Koppenhöfer, 2012).

Um outro fator são as mudanças fisiológicas e morfológicas que ocorrem nesta fase, pois ocorre rompimento de alguns tecidos e formação de novos tecidos, devido ao crescimento e metamorfose. Além disso, a esclerotização da cutícula torna mais resistente (histogênese) podendo ser responsável pela dificuldade do nematoide em penetrar na cutícula mais dura do inseto (Leite, 2011).

### **3.3.3 Efeito de Diferentes Concentrações de Nematoides Entomopatogênicos Sobre Lagartas de *Agrotis ipsilon***

Todos os isolados foram patogênicos a lagarta-rosca em todas as concentrações avaliadas, apresentando mortalidade confirmada entre 10 e 100% (Figura 3.2).

Pode-se observar que para o isolado IBCB-n02 (*Steinernema carpocapsae*) houve um aumento progressivo da mortalidade das lagartas de acordo com o aumento da concentração utilizada, e a mortalidade máxima (90%) foi alcançada em uma concentração de aproximadamente 100 JIs/cm<sup>2</sup>. Já o isolado IBCB n05 (*Heterorhabditis indica*) alcançou 100% de mortalidade, porém apenas na maior concentração avaliada (200 JIs/cm<sup>2</sup>). Por sua vez, o isolado Alho (*Heterorhabditis* sp.), mesmo na maior concentração avaliada, atingiu apenas 70% de mortalidade confirmada.



**Figura 3.2** Porcentagem de mortalidade total de lagartas de *Agrotis ipsilon* causada por diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos em diferentes dosagens (JIs/cm<sup>2</sup>), em condições de laboratório (T= 25 ± 1°, UR 90 ± 10% e fotofase de 12 horas).

$$IB02 = y = 4E-05x^3 - 0,0166x^2 + 2,2435x - 0,1071; IB05 = y = 3E-05x^3 - 0,0116x^2 + 1,6286x - 0,2143$$

$$ALHO = y = -0,0015x^2 + 0,715x - 6,5$$

Segundo Souza (2011), este fato pode ser explicado quando o NEP infecta o hospedeiro, causa sua morte, mas não ocorre multiplicação, não apresentando nematoides em seu interior quando dessecados para confirmação da morte das lagartas. Porém não se descarta a possibilidade delas terem sido mortas pelos JIs, uma vez que no tratamento testemunha a ausência de mortalidade comprova que pode não ter sido causada por outro agente. Logo, é possível dizer que as lagartas de *A. ipsilon* apesar da alta infectividade não é um hospedeiro adequado para a multiplicação deste isolado (Alho). Além disso, observou-se que as lagartas mortas apresentaram sintomatologia característica da infecção por NEPs do gênero *Heterorhabditis*, o que fortalece a hipótese de infecção do nematoide, porém não a sua multiplicação na lagarta.

É importante destacar que o isolado IBCB n02 também foi o mais eficaz quando aplicado na menor concentração avaliada (50 JIS/cm<sup>2</sup>) proporcionando aproximadamente 75% de mortalidade das lagartas, indicando uma alta virulência sobre o hospedeiro. Além disso, a aplicação do nematoide em baixas concentrações, pode ser um indicativo de menores custos ao realizar o controle a campo.

Em diversos estudos com nematoides para controle biológico de lepidópteros, em especial *S. frugiperda*, observou-se um aumento na mortalidade acumulada para lagartas quando a concentração utilizada foi aumentada (Polanczyk & Alves, 2005).

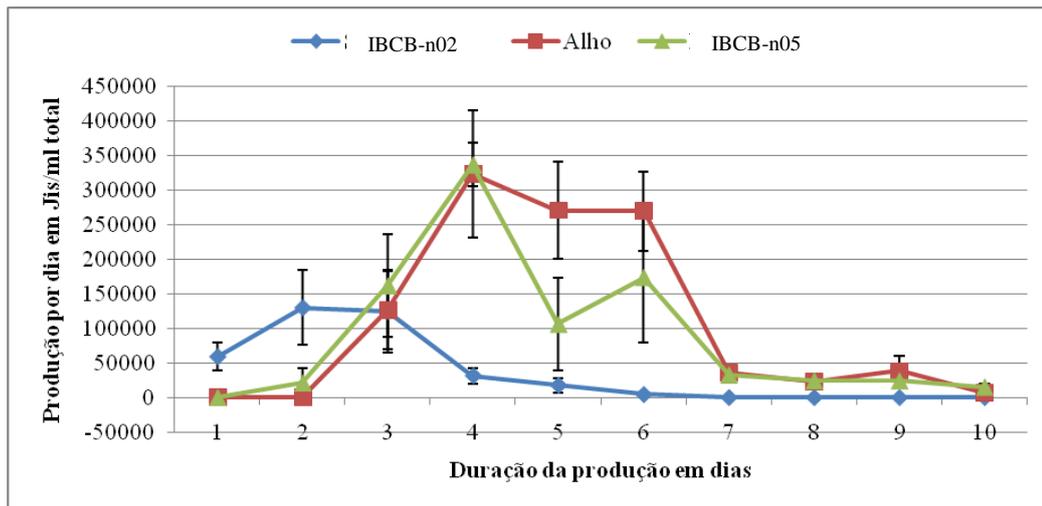
Por outro lado, Souza (2011) em trabalho com *S. frugiperda*, também observou que isolados do gênero *Heterorhabditis* são mais virulentos que os *Steinernema* para este inseto, e embora os isolados *Steinernema* tenham apresentado patogenicidade, a virulência foi baixa para todos os isolados avaliados e pertencentes a este gênero.

No entanto, no trabalho desenvolvido por Souza (2011) com *S. frugiperda*, o autor não descarta a possibilidade dos isolados do gênero *Steinernema* serem patogênicos e mais virulentos em outras condições ou outros instares do inseto, indicando que além da concentração, também é importante avaliar a suscetibilidade do hospedeiro em diferentes instares de desenvolvimento, como foi observado em ensaio descrito anteriormente neste trabalho.

#### **3.3.4. Produção *in vivo* dos Isolados em Lagartas de *Galleria mellonella***

Os três isolados avaliados quanto a produção foram IBCB n02 (*Steinernema carpocapsae*), IBCB-n05 (*Heterorhabditis indica*) e Alho (*Heterorhabditis* sp.).

Em armadilha de White observou-se que os isolados do gênero *Heterorhabditis* começaram a produzir somente a partir do segundo dia, enquanto o isolado do gênero *Steinernema* (IBCB-n02) apresentou produção no primeiro dia.



**Figura 3.3** Produção total diária de Juvenis Infectivos (JIs) de nematoides entomopatogênicos durante o período total de produção em lagartas de *Galleria mellonella*.

O isolado Alho (*Heterorhabditis* sp.) foi o que alcançou maior produção total ( $1,1 \times 10^5$  JIs/lagarta), seguido pelo isolado IBCB-n05 (*Heterorhabditis indica*) que, embora tenha demorado mais para começar a produzir, apresentou produção total, de  $9,4 \times 10^4$  JIs/lagarta. O isolado IBCB-n02 (*Steinernema carpocapsae*) teve a menor produção total, com  $4,2 \times 10^4$  JIs/lagarta.

Em trabalho desenvolvido por Barbosa (2005), usando também como hospedeiro lagartas de *G. mellonella* e o mesmo método de infecção, foi obtido uma produção total de  $7,9 \times 10^4$  JIs/lagarta para *Heterorhabditis bacteriophora*. O mesmo autor testou a produção do isolado *H. bacteriophora* em hospedeiros alternativos, usando lagartas de *A. ipsilon*, que apresentaram menor produção, quando comparado a produção em lagartas de *G. mellonella*, de JIs, devido a menor suscetibilidade ao isolado *H. bacteriophora*, com  $2,5 \times 10^4$  JIs por lagarta.

**Tabela 3.3** Número médio ( $\pm$ EP) de nematoides dos isolados *Steinernema carpocapse*, Alho e *Heterorhabditis indica* produzidos por lagarta de *G. mellonella* em laboratório. Cornélio Procópio, PR – 2014.

Isolados	Nematoides/lagarta de <i>G. mellonella</i>
IBCB-n02	$4,2 \times 10^4 \pm 13.884$ a
Alho	$1,1 \times 10^5 \pm 10.039$ b
IBCB-n05	$9,4 \times 10^4 \pm 5.516$ b

Dados seguidos de mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey com  $P \leq 0,05$ .

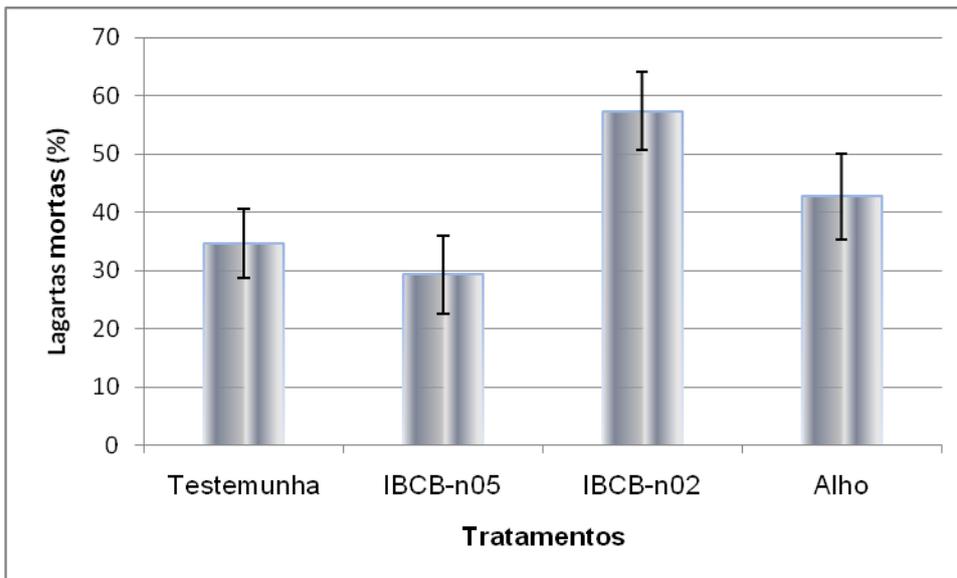
Adams e Nguyen (2002) afirmam que a produção de nematoides entomopatogênicos também depende do tamanho do hospedeiro e das reservas alimentares do mesmo, ao contrario do apresentando por Barbosa (2005), ao usar *A. ipsilon*, o maior hospedeiro avaliado obteve menor produção.

Por sua vez, Barreto (2013) fez produção *in vivo* de *Steinernema brazilense* usando lagartas de *G. mellonella*, porém mantidas em substrato areia, e obteve uma produção de  $3,3 \times 10^3$  JIs por lagarta enquanto que *Heterorhabditis indica* mostrou  $9,7 \times 10^3$  JIs por lagarta. Tais dados corroboram com os resultados obtidos nesse trabalho, onde a produção de heterorhabditídeos foi maior que as de steinernematídeos.

Segundo Stuart (2006) existem diferenças em relação a virulência de NEPs que podem ser atribuídas à especificidade, morfologia, origem e até mesmo a variabilidade genética desses isolados. O menor tamanho do JI de *Heterorhabditis* facilita a penetração e permite um maior acesso desses JIs produzindo por serem menores e o corpo do hospedeiro tolerar maior número de gerações, tendo mais indivíduos no final do ciclo.

### **3.3.5. Casa de Vegetação**

O isolado IBCB-n02 reduziu a sobrevivência das lagartas de terceiro instar de *A. ipsilon* no solo, quando comparadas com o tratamento testemunha, sendo que somente esse isolado diferiu da testemunha (Figura 3.4) em condições de casa de vegetação.



**Figura 3.4** Porcentagem média de mortalidade de lagartas de terceiro instar de *Agrotis ipsilon* com os diferentes isolados IBCB-n02, IBCB-n05, Alho e Testemunha (água) por tratamento, em condições de casa de vegetação. Cornélio Procópio, PR – 2014.

A não presença de mortalidade com os outros isolados testados evidencia que a concentração testada de 100 Jls\cm<sup>2</sup> não foi suficiente para causar a mortalidade esperada em casa de vegetação, visto que no teste anterior a concentração de 100 Jls\cm<sup>2</sup> para IBCB-n02 foi suficiente para alcançar 100% de mortalidade em laboratório.

As lagartas causaram dano informado por vários autores, seccionando as hastes da planta de milho, tanto nas testemunhas quanto nas repetições com nematoide.

Foi observado durante o ensaio que a temperatura dentro dos vasos aumentava durante as horas mais quentes do dia, talvez pelo fato do vaso ser de cor preta, e as lagartas para minimizar essa adversidade subiam nas plantas de milho, e se alimentavam das folhas, não ficando em contato com o solo, diminuindo também o tempo de contato com o nematoide.

Estes resultados podem ser comparados com Riga et al. (2001) que testou dois esteirernematídeos (*S. glaseri* e *S. feltiae*) contra quatro pragas de milho, sendo uma delas o noctuídeo *Spodoptera frugiperda* em condições de casa de vegetação, verificando que esses isolados diminuíram as injúrias

contra as plantas de milho quando comparadas com o tratamento testemunha (sem nematoide).

De acordo com Ebssa e Koppenhöfer (2012) o isolado *S. carpocapsae* (IBCB-n02) foi que causou maior mortalidade em *A. ipsilon* em condições de casa de vegetação.

Salvadori (2011) relata que o uso de nematoides para o controle biológico de pragas agrícolas depende não só da especificidade do isolado e do inseto hospedeiro, mas principalmente, dos fatores ambientais como as características do solo, que podem ter diminuído a ação do isolado IBCB-n02 em casa de vegetação quando comparado com os dados em laboratório.

Segundo Flanders et al. (1996), fatores como a temperatura, influenciam a infectividade dos nematoides entomopatogênicos, e existem diferenças entre as espécies, heterorhabditideos são mais sensíveis a temperatura do que os da família *Steinernematidae*, o que pode ter causado menor mortalidade no tratamento com *Heterorhabditis*.

### 3.4 CONCLUSÕES

Com os dados obtidos em laboratório e casa de vegetação vimos que:

- todos os isolados testados foram patogênicos a lagarta-rosca *Agrotis ipsilon*;
- os nematoides *Heterorhabditis* sp. (CH3), *Steinerna carpocapsae* (IBCB-n02), *Heterorhabditis* sp. (Alho) e *Heterorhabditis indica* (IBCB-n05) são os mais virulentos contra as lagartas de *A. ipsilon*;
- o isolado *S. carpocapsae* (IBCB-n02) apresentou maior mortalidade na concentração de 100 JIs/cm<sup>2</sup>;
- o isolado *H. indica* (IBCB-n05) apresenta maior mortalidade na maior concentração testada;
- o isolado que mais produziu em lagartas de *Galleria mellonella* foi *H.* sp. Alho.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

- Lagartas de *Agrotis ipsilon* quando alimentadas com dieta natural (folhas de milho) aumentam o número de ínstaes quando comparadas com lagartas alimentadas com dieta artificial;
- Lagartas de *Agrotis ipsilon* quando alimentadas com dieta artificial tem maior ganho de peso, e maior viabilidade;
- Todos os isolados testados foram patogênicos a lagarta-rosca *Agrotis ipsilon*;
- Os nematoides *Heterorhabditis* sp. (CH3), *Steinernema carpocapsae* (IBCB-n02), *Heterorhabditis* sp. (Alho) e *Heterorhabditis indica* (IBCB-n05) são os mais virulentos contra as lagartas de *A. ipsilon*;
- O isolado *H. indica* IBCB-n05 apresenta maior mortalidade na concentração de 100JIs/cm<sup>2</sup>;
- O isolado IBCB-n02 apresentou maior mortalidade na menor concentração testada;
- As lagartas de terceiro ínstar são mais suscetíveis a nematoides entomopatogêncios;
- Nematoides entomopatogenicos podem ser uma boa alternativa de controle biológico para lagartas de *A. ipsilon*.

## 5. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

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

ADMAS, B.J.; NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (ed.) **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI, 2002. p. 1-34.

AGROFIT – Disponível em: <http://www.embrapa.br/links/agrofit> Acesso em: 08, agosto, 2013.

ALMENARA, D.P.; NEVES, M.R.C.; KAMITANI, F.L.; WINTER, C.E. Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**, 6: 2010.

ALMENARA, D.P. ROSSI, C.; NEVES, M.R.C.; WINTER, E. Nematoides entomopatogênicos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. São Paulo: INCTEM, 2012. p. 01-40.

ALVES, V.S.; ALVES, L.F.A.; QUADROS, J. C.; LEITE, L.G. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cebrambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 76: 479-482, 2009a.

ALVES, V.S.; MOINO JUNIOR, A.; SANTA-CECILIA, L.V.C.; ROHDE, C.; SILVA, M.A.T. Testes em condições para o controle de *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemíptera, Pseudococcidae) em cafeeiro com nematóides entomopatogênicos do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida, Heterorhabditidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 53: 139-143, 2009b.

ALVES, V.S.; NEVES, P.M.J.O.; ALVES, L.F.A.; MOINO JUNIOR, A.; HOLZ. Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae) screening for lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) control. **Revista Colombiana de Entomologia**, 38: 76-80, 2012.

ANJOS, N.; SANTOS, G.P.; ZANUNCIO, J.C. Pragas do eucalipto e seu controle. **Informe Agropecuário**, 12: 50-58, 1986.

AZEREDO, E.H.; CASSINO, P.C.R.; LIMA, E. Avaliação da infestação de insetos-prega associados à batata (*Solanum tuberosum* L.) sob efeito de nutrientes nitrogenados e potássio e teores acumulados de aminoácidos livres nas cultivares Achat e Monalisa. **Revista Brasileira de Entomologia**, 46(1): 7-14, 2002.

BARBOSA, C.R.C. **Técnicas de produção *in vivo* de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernmatidae) em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) e hospedeiros alternativos.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 102p. Dissertação (Mestrado Agronomia/Entomologia).

BARRETO, A.F. **Preservação de *Steinernema brasiliense* e *Heterorhabditis indica* (Nemata: Rhabditida) em diferentes condições de temperatura e teores de umidade em solo.** São Paulo: Instituto Biológico, 2013. 47p. Dissertação (Mestrado Sanidade, Segurança alimentar e ambiental no agronegócio).

BAVARESCO, A. GARCIA, M. S. ; GRÜTZMACHER, A. D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk)(Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural**, 33: 6. 2003.

BELLINI, L.L. **Avaliação de nematóides entomopatogênicos (Rhabditida: *Steinernematidae* e *Heterorhabditidae*) para o controle de *Diatraea saccharalis* Fabr. E de fitonematoides em cana-deaçúcar.** Campo dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2011. 99p. Tese (Doutorado em produção vegetal).

BENTO, F.M.M.; MAGRO. S.R.; FORTES, P.; ZÉRIO, N.G.; PARRA, J.R.P.; Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Agrotis ipsilon* em dieta artificial. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, 42:1369-1372, 2007.

BENTO, J.M.S. Diagnóstico da situação de pragas de solo em São Paulo. In: 10ª REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO. Dourados, 2007. **Anais e Ata**. Dourados Embrapa Agropecuária Oeste, 2007. p. 26-28.

BHAT, N.S.; BHATTACHARYA, A.K. Consumption and utilization of soybean by *Spodoptera litura* (F.) at different temperatures. **Indian Journal Entomological**, 40: 16-25, 1978.

BORTOLUZZI, L.; ALVES, L.F.A.; ALVES, V.S.; HOLZ, N. Entomopathogenic nematodes and their interaction with chemical insecticide aiming at the control of banana weevil borer, *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 80: 183-192, 2013.

CAO, T.M.; DURRANTE, D.; TRIPATHI, A.; LIU, J.; TSAI, S.; KELLOG, G.E.; SIMONI, D.; LEE, R.M. Stilbene derivatives that are cochicine site microtubule inhibitors have antileukemic activity and minimal systemic toxicity. **American Journal of Hematology**, 83: 390-397, 2008.

CAPINERA, J.L. **Black Cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN70300.pdf> Acesso em: 14, agosto, 2013.

CARDOSO, A.C.; PRATA, M.C.A.; FURLONG, J.; PREZOTO, F. Exigências térmicas de estágios imaturos de *Galleria mellonella* L. (Lepdoptera: Pyralidae) **Neotropical Entomology**, 36(5): 657-661, 2007.

CHAMBERS, U.; BRUCK, D.J.; OLSEN, J.; WALTON, V.M. Control of overwintering fibertworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae with *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Economical Entomology**, 103: 416-422, 2010.

CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ilustrada, Springer, 2000. 524 p.

CHIARADIA, L.A. Diagnóstico da situação de pragas de solo no estado de Santa Catarina. In: 10ª REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO. Dourados, 2007. **Anais e Ata**. Dourados Embrapa Agropecuária Oeste, 2007. p. 36-45.

CLARKE, D.J. Photorhabdus: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cellular Microbiology**, 10: 2159-2167, 2008.

COOK, K.A.; RATCLIFFE, S.T.; GRAY, M.E.; STEFFEY, K.L. **Black Cutworm (*Agrotis ipsilon* Hufnagel)**. Disponível em: [http://ipm.illinois.edu/vegetables/insects/black\\_cutworm.pdf](http://ipm.illinois.edu/vegetables/insects/black_cutworm.pdf) Acesso em : 20, agosto, 2013.

CRÓCOMO, W.B.; PARRA, L.R.P. Consumo e utilização de milho, trigo e sorgo por *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 29: 225-260, 1985.

DOLINSKI C. & A. MOINO JR. Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos e exóticos: O perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**, 30: 139-149, 2006.

EBSSA, L.; KOPPENHÖFER, A.M. Entomopathogenic nematodes for the management of *Agrotis ipsilon*: effect of instar, nematode species and nematode production method. **Society of Chemical Industry**, 68: 947-957, 2012.

ELSWORTH, B.; WASNUTH, J.; BLAXTER, M. The nematode transcriptome resource. **International Journal for Parasitology**, 41: 881-894, 2011.

ESPERK, T.; TAMMARU, T.; NYLIN, S.; TEDER, T. Achieving high sexual size dimorphism in insects: females add instars. *Ecological Entomology*, v. 32, p. 243-256, 2007.

FAO. Production. Crops. Maize. 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>. Acesso em: 1 nov. 2013.

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

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35: 1039-1042, 2011.

FLANDERS, K.L.; MILLER, J.M. SHIELDS, E.J. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* Oswego (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. **Journal of Economic Entomology**, 89: 373-380, 1996.

FORST, S. e CLARKE, D. Bacteria-Nematode Symbiosis In: GAUGLER **Entomopathogenic Nematology**. Wallingford, CABI Publishing, 2002. p. 57-77.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI F., E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GAUGLER, R.; KAYA, H. K. Entomopathogenic nematodes in biological control. **CRC Press**, Boca Raton, USA.1990, 365p.

GIOMETTI, F.H.C. **Avaliação de nematóides entomopatogênicos para o controle de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae)**. São Paulo: Instituto Biológico, 2009. 41p. Dissertação (Sanidade Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio).

GOUSSAIN, M.M.; MORAES, J.C.; CARVALHO, N.L.; ROSSI, M.L. Efeito da aplicação de silício em plantas de milho no desenvolvimento biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology, Londrina**, 31: 305-310, 2002.

HIRAI, K. Asimple diet for mass rearing of the armyworm *Leucania separata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) **Applied Entomology and Zoology**. 11: 278-283, 1976.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Sistema IBGE de Recuperação Eletrônica (SIDRA)**. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/> Acesso em: 11, setembro, 2013.

KIDD, K.A.; ORR, D.B. Comparative feeding and development of *Pseudaletia includes* (Lepidoptera: Noctuidae) on kudzu and soybean foliage. **Journal of Economical Entomology**, 94: 219-225, 2001.

KIM, Y.H.; KWON, H-S.; KIM, D.H.; CHO, H.S.; JUN, J-G.; PARK, J.H.Y.; KIM, J-K. Piceatannol, a stilbene present in grapes, attenuates dextran sulfate sodium-induced colitin. **International Immunopharmacol**, 12: 1695-1702, 2008.

KOPPENHOFER, A.M.; FUZY, E.M. *Steinernema scarabaei* for the control of white grubs. **Biological Control**, 28: 47-59, 2003.

Kullik, S. G., M. K. Sears, and A. W. SCHAAF SMA. Sub-lethal effects of Cry1F Bt corn and clothianidin on black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development. **Journal of Economical Entomology**, 104: 484-493, 2011.

LACEY, L.A.; NEVEN, L.G.; HEADRICK, H.L.; FRITTS, J.R.; Factors affecting entomopathogenic nematodes (Steinernematidae) for control of overwintering codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in fruit bins. **Journal of Economical Entomology**, 98: 1863-1869, 2005.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991. 336 p.

LAWRENCE, J.L.; HOY, C.W.; GREWAL, P.S. Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. **Biological Control**, 37: 247-255, 2006.

LEITE, G.L.D. **Entomologia Básica**. Universidade Federal de Minas Gerais. 2011, 46p.

LEITE, L.G.; MACHADO L.A.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI JR. A.S. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Agrícola**, 78: 139-148, 2002.

LEITE, L.G., F.M. TAVARES, R.M. GOULART, A. BATISTA FILHO & J.R.P. PARRA. Patogenicidade de nematóides entomopatogênicos a lagartas de 6º instar do bicho-furão, *Ecdytolopha aurantiana* (Lepidoptera: Tortricidae), e avaliação de dosagens de *Heterorhabditis indica* na mortalidade do inseto. **Revista Agrícola**, 80: 316-330, 2005.

LI X-Y.; COWLES, E.A.; COWLES, R.S.; GAUGLER, R.; COX-FOSTER, D. L.; Characterization of immunosuppressive surface coat proteins from *Steinernema glaseri* that selectively kill blood cells in susceptible hosts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 165: 162-169, 2009.

LINK, D.; PEDROLO, S.S. Aspectos biológicos de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) em Santa Maria - RS. **Revista de Ciências Rurais**, 17: 309-317, 1987.

LINK, D.; COSTA, E.C. Comportamento larval da lagarta-rosca, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767), **Revista Centro de Ciências Rurais**, 14: 191-199, 1984.

LOPES, G. da S.; LEMO, R. N. S. de; MACHADO, K. K. G.; MACIEL, A.; SARMENTO, A.; OTTATI, Â. L. T. Biologia de *Spodoptera frugiperda* (J. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). **Revista Caatinga**, 21: 134-140, 2008.

MACHADO, L. A.; HABIB, M.; LEITE, L.G.; CALEGARI, L.C.; GOULART, R.M.; TAVARES, F.M. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a ovos e larvas de *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 72: 221-226, 2005.

MAMIYA, Y. *Steinernema kushidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. **Applied Entomology and Zoology**, 23: 313-320, 1988.

MENEGUIM, A. M. ; LUSTRI, C.; OLIVEIRA, D. D. ; YADA, I. F. U. ; PASINI, A. Caracterização bromatológica de cultivares de amoreira, *Morus* spp., e determinação dos índices nutricionais de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Neotropical Entomology**. 39: 506-512, 2010.

MENEZES, R.S.; DUMAS, V.F.; MARTINS, E.S.; PRAÇA, L.B.; MONNERAT, R.G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Agrotis ipsilon*. **Universitas: Ciências da Saúde**, 8: 1-13, 2010.

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

MOLINA-OCHOA, J.; HAMM, J.J.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; BOJALIL JABER, L.F.; ARENAS-VARGAS, M.; GONZÁLES-RAMÍREZ, M. Virulence of six entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Vedania**, 3: 25-29, 1996.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, 44, 257-289, 1999.

NAKANO, O.; S.S. NETO & R. A. ZUCCHI **Entomologia Econômica**. São Paulo, Ceres, 1981. 31 p.

NAKANO, O. **Entomologia Econômica**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2011. 464 p.

NEALIS, V.G. The number of instars in jack pine budworm, *Choristoneura pinus* pinus Free. (Lepidoptera: Tortricidae), and the effect of parasitism on head capsule width and development time. **The Canadian Entomologist**, 119:773–777, 1987.

NGUYEN, K.B. & SMART JR. G.C. *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). **Journal of Nematology**, 26: 162-174, 1994.

NISHIMATSU, T.; JACKSON, J. J. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, 91: 410-441, 1998.

ORHAN, I.; TOSUB, F.; SENER, B. Coumarin, anthraquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity. **Z Naturforsch**, 63: 366-370, 2008.

POINAR, G.O. The presence of *Achromobacter nematophilus* in the infective stage of a *Neoaplectana* sp. (Steinernematidae : Nematoda). **Nematologica**, 12: 105-108, 1966.

POINAR, Jr. G.O. The Natural History of Nematodes. New Jersey: Prentice Hall.1983, 323 p.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S.B. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado del Plagas y Agroecologia**, 74: 24-33, 2005.

PRATER, C.A.; REDMOND, C.T.; BARNEY, W.; BONNING, B.C.; POTTER, D.A. Microbial control of Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass using *Agrotis ipsilon* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of Economic Entomology**, 99: 1129-1137, 2006.

REESE J.C. Interactions of allelochemicals with nutrients in herbivore food, p.309-330. In Rosenthal G A, Janzen D H (eds) Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites. New York, Academic Press, 718p. 1979.

REESE, J.C.; BECK, S.D. Effects of allelochemicals on the black cutworm, *Agrotis ipsilon*; Effects of p-benzoquinone, hydroquinone and duroquinone on larval growth, development and utilization of food. **Annals of the entomological Society of America**, 69: 59-67, 1976.

RICHETTI, A. **Viabilidade econômica da cultura do milho safrinha, em Matogrosso do Sul**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2012. 11p. (Comunicado Técnico 182).

RIGA, E.; WHISTLECRAFT, J.; POTTER, J. Potential of controlling insect pests of corn using entomopathogenic nematodes. Canadian Journal of Plant Science. V. 81 p. 783-787, 2001.

RINGS, R.W.; ARNOLD, F.J.; JOHNSON, B.A. Host range of the black cutworm on vegetables: A bibliography. **Bulletin of the Entomological Society of América**, 21: 229-234, 1975.

SALVADORI, J.M. **Caracterização da atogenicidade de nematoides entomopatogênicos e de bactérias associadas para o controle biológico de *spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011. 140p. Tese (Biologia Celular e Molecular).

SALVADORI, J.R.; PEREIRA, P.R.; SILVA, M.T.B.; OLIVEIRA, J.V.; BOTTON, M.; NAVA, E.; COSTA, E.C. In: 10ª REUNIÃO SUL-BRASILEIRA SOBRE PRAGAS DE SOLO. Dourados, 2007. **Anais e Ata**. Dourados Embrapa Agropecuária Oeste, 2007. p. 46-52.

SANTOS, H.R.; NAKANO, O. Dados biológicos sobre a lagarta-roscas *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera, Noctuidae). **Anais da Sociedade Brasileira Entomológica do Brasil**, 11: 33-48, 1982.

SANTOS, L.; SHIELDS, E.J. Temperature and diet effect on black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development. **Journal of Economic Entomology**, 91: 267-273, 1998.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews**, 62: 775-806, 1998.

SCRIBER J.M. SLANSKY Jr F. The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology**, 26: 183-211, 1981.

SEAB- Secretaria da agricultura e do abastecimento do Paraná. **Análise da Conjuntura Agropecuária: Safra 2001/2012 - Milho**. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/milho\\_2011\\_12.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/milho_2011_12.pdf) Acesso em: 29, setembro, 2013.

SILVA, M.A.T. **Controle de *Quesada gigas* (Hemiptera: Cicadidae) pela aplicação de nematoides entomopatogênicos e compatibilidade com alguns produtos fitossanitários em cafeeiro**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, Doutorado 2011.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catalogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. 622p.

SILVA, J.B.C.; GIORDANO, L.B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L.S.; FRANÇA, F.H.; VILLAS BÔAS, G.L.; BRANCO, M.C.; MEDEIROS, M.A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W.L.C.; LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C.; NASCIMENTO, W.M.; PEREIRAI, W. Cultivo de tomate para industrialização. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Tomate/TomateIndustrial/autores.htm>, Acesso em: 13 de abril de 2013.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Brasília: **Circular técnica da Embrapa-Cenargen**, 10: 2001.

SLANSKY JUNIOR, F.; SCRIBER, J.M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (eds.). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Oxford: PERGAMON, 1985. p.87-163.

SLANSKY JUNIOR, F.; RODRIGUEZ, J.G. Nutricional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates: an overview. In: SLANSKY JUNIOR, F.; RODRIGUEZ, J.G. (eds.) **Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York: J. WILEY & SONS, 1987. p.1-69.

SOUZA, J. C. Principais aspectos sobre as pragas do milho em plantios direto e convencional. **Circular técnica da Epamig**, 180: 2005.

SOUZA, L.M. **Nematoides entomopatogênicos e sua compatibilidade com o neonicotinoide Imidaclopride visando o controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em viveiro florestal**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2011. 58p. Dissertação (Mestrado Entomologia agrícola).

STORY, R.N.; KEASTER, A.J. The overwintering biology of the black cutworm, *Agrotis ipsilon*, in field cages (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of the Kansas entomological society**, 55: 621-624, 1982.

STUART, R.J. Population biology of entomopathogenic nematodes: concepts, issues, and models. **Biological Control**, 38: 80-102, 2006.

TAYLOR, P.S.; SHIELDS, E.J.A. Microcomputer-controlled system of environmental chambers suitable for the study of thermoperiodic effects. **Environmental Entomology**, 19: 866-873, 1990.

TOLEDO, A.V.; REMES LENICOV, A.M; LOPEZ-LASTRA, C.C.. Histopathology cause by the entomopathogenic fungi, *Bauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the adult planthopper, *Peregrinus maidis*, a maize virus vector. **Journal of Insect Science**, 10, 2010.

TONET, G.L.; GASSEN, D.N.; SALVADORI, J.R. Estresses ocasionados por pragas. In: BONATO, E.R. **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. p. 201-253, 2000.

VIANA, P. A.; CRUZ, I.; WAQUIL, J. M. **Cultivo do milho – Pragas**. Disponível em: [http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_8\\_ed/prsementes.htm](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_8_ed/prsementes.htm)  
Acesso em: 28 de Nov. 2013.

VIEIRA, M.M. Pragas agrícolas, ornamentais e florestais para as quais se admite o uso de produtos fitofarmacêuticos em Portugal. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Entomologia**, 227: 213-256, 2013.

VOSS, M.; ANDALÓ, V.; NEGRISOLI JÚNIOR, A.S.; BARBOSA-NEGRISOLI, C.R. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematóides entomopatogênicos**. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/853176/1/pdo119.pdf>  
Acesso em: 23, setembro, 2013.

WHITMAN, D.W. Plant bodyguards: mutualistic interactions between plants and the third trophic level. In: ANANTHAKRISHNAN, T.N. **Functional dynamics of phytophagous insects**. New Delhi: Oxford and IBH, p. 133-159, 1994.

WILLIAMS, J.S.; THOMAS, M.; CLARKE, D.J. The gene *stIA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photobacterium luminescens* TT01. **Microbiology**, 151: 2543-2550, 2005.

ZANUNCIO, J.C.; SOSSAI, M.F.; ZANUNCIO, T.V.; TEIXEIRA, C.A.D.; Influência da idade da muda de *Eucalyptus grandis* no desenvolvimento da lagarta-rosca *Nomophila* sp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 36: 743-750, 2001.

