

CONTROLE BIOLÓGICO

Efeitos Sinérgicos de Combinações entre Nematóides Entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e Inseticidas Químicos na Mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae)

FERNANDO M. TAVARES^{1,*†}, ANTONIO BATISTA FILHO¹, LUIS G. LEITE¹, LUIZ C. DE ALMEIDA², THAÍS MARCHI GOULART¹

* Parte da Dissertação do primeiro autor, para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas pela Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

¹ Instituto Biológico, Laboratório de Controle Biológico, Rodovia Heitor Pentecado, km 3, Jardim das Palmeiras, Caixa Postal 70, CEP 13001-970, Campinas, SP. E-mail: steinerfer@hotmail.com

² Centro de Tecnologia Canaveira, Fazenda Santo Antônio s/n, Bairro Santo Antônio, Caixa Postal 162, CEP 13400-970, Piracicaba, SP

[†] Bolsista Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola.

BioAssay 4:7 (2009)

Synergistic Effects of Combinations between Entomopathogenic Nematodes (Nemata: Rhabditida) and Chemical Insecticides on Mortality of *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae)

ABSTRACT – The effect of combinations of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David, 1992 (strain IBCB-n5) and *Steinernema* sp. (strain IBCB-n6) at doses of 2.4;12 and 60 IJ/cm², with sub-doses of the chemical insecticides fipronil, thiamethoxam and imidacloprid were tested in laboratory conditions against adults and larvae of the sugarcane billbug, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978. Firstly, the effect of fipronil (200 g A.I./ha), thiamethoxam (250 g A.I./ha) and imidacloprid (700 g A.I./ha) were evaluated on the nematode viability. The insecticides were compatible with the nematodes, not affecting the viability of the infective juvenile after 24 hours. For the experiments with adults, the treatments containing nematodes and insecticides tested separately showed mortality below 25%, except for the two highest doses of *Steinernema* sp. (at 12 and 60 IJ/cm²), with mortality levels of 33.3% and 50% respectively. For the mixtures of the nematodes with sub-doses of thiamethoxam (62.5 g A.I./ha), the mortality levels increased significantly, reaching up to 66.7%, with the mixture of *H. indica* at 60 IJ/cm², and 70% to 83.3% at all doses of *Steinernema* sp., showing synergistic effect at these combinations. The combination of *H. indica* and *Steinernema* sp. (12 IJ/cm²) with thiamethoxam (62.5 g A.I./ha) against larva, the nematodes tested alone or in mixture with the insecticides showed mortality levels between 75% and 87.5%, indicating no advantage of the mixture for improving the insect mortality.

KEYWORDS – integrated pest management, *Heterorhabditis indica*, *Steinernema* sp., sugarcane billbug, microbial control.

RESUMO – Foi testado em laboratório, o efeito de combinações dos nematóides entomopatogênicos *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David, 1992 (isolado IBCB-n5), e *Steinernema* sp. (isolado IBCB-n6) nas doses de 2,4;12 e 60 IJ/cm², com subdose dos inseticidas químicos fipronil, tiametoxam e imidacloprido, contra adultos e larvas de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978. Inicialmente avaliou-se o efeito do fipronil (200 g I.A./ha), tiametoxam (250 g I.A./ha) e imidacloprido (700 g I.A./ha) sobre a viabilidade dos nematóides. Os produtos químicos foram compatíveis com os agentes, não afetando a viabilidade dos juvenis infectivos após um período de exposição de 24 horas. Nos testes realizados contra adultos, os tratamentos contendo nematóides e inseticidas testados isoladamente proporcionaram mortalidade do inseto inferior a 25%, exceto as duas maiores doses de *Steinernema* sp. (12 e 60 IJ/cm²) com níveis de mortalidade de 33,3% e 50% respectivamente. Nas misturas dos nematóides com tiametoxam (62,5 g I.A./ha), os níveis de mortalidade aumentaram significativamente, alcançando 66,7% na mistura envolvendo *H. indica* 60 IJ/cm², e 70% a 83,3% com *Steinernema* sp., demonstrando efeito sinérgico dessas combinações. Na

avaliação da combinação de *H. indica* e *Steinernema* sp (12 JI/cm²) com tiametoxam (62,5 g I.A./ha) contra larvas, os nematóides testados isoladamente ou em mistura com o inseticida proporcionaram níveis de mortalidade entre 75% e 87,5%, indicando não haver contribuição das misturas para o incremento na mortalidade do inseto.

PALAVRAS-CHAVE – manejo integrado de pragas, *Heterorhabditis indica*, *Steinernema* sp., bicudo da cana-de-açúcar, controle microbiano.

O gênero *Sphenophorus* (Coleoptera: Curculionidae) compreende um complexo de espécies de insetos que danificam gramíneas de importância econômica, em diversas regiões do globo. Só nos EUA ocorrem mais de 64 espécies desse gênero, sendo que 20 foram registradas na Flórida (Woodruff 1966).

No Brasil, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 é uma das principais pragas da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo, podendo causar perdas de até 30% na produção (Almeida 2005). Esse curculionídeo vem assumindo grande importância, principalmente por estar se disseminando em áreas do estado onde sua incidência ainda não havia sido registrada (Almeida 2005).

O dano na planta ocorre no rizoma abaixo do nível do solo, local onde a larva se alimenta e se abriga, abrindo galerias circulares e longitudinais na base da brotação. Esse ataque resulta no amarelecimento da folha e morte do perfilho, conseqüentemente ocasionando em falhas nas rebrotas das soqueiras. Os adultos, também se abrigam abaixo do nível do solo e raramente são encontrados voando. As fêmeas colocam entre 60 e 70 ovos ao longo de sua existência na base das touceiras de cana (Precetti & Arigoni 1990, Degaspari *et al.* 1987).

Estudos de controle do bicudo têm avaliado principalmente o uso de produtos químicos, não havendo até o momento nenhum inseticida registrado contra esse inseto no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA 2008). O inseticida fipronil (Regent 800 WG) tem sido o produto mais testado, sendo avaliado na dose de 250 g p.c. (p.c. = produto comercial)/ha (Dinardo-Miranda 2005). Outros produtos que vêm sendo considerados nos testes de controle são o imidacloprido (Confidor 700 WG) na dose de 1.000 g p.c./ha, e o tiametoxam (Actara 250 WG), geralmente na dose de até 1.000 g p.c./ha.

Para outras espécies de *Sphenophorus* que ocorrem nos EUA e Japão têm-se adotado também o controle biológico com o uso de nematóides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Steinernematidae/Heterorhabditidae) (Smith 1994). Nematóides entomopatogênicos vêm sendo utilizados contra diversas espécies de curculionídeos, apresentando alta eficiência contra a forma larval e adulta (Shapiro-Ilan *et al.* 2002). Esses nematóides possuem a capacidade de buscar seu hospedeiro no solo e em ambientes crípticos, invadindo-o e matando-o no prazo de 24 a 72 horas após liberarem uma bactéria altamente patogênica ao inseto, que se

encontra localizada no trato digestivo do agente (Ferraz 1998)

Nematóides entomopatogênicos são compatíveis com a maioria dos defensivos químicos e fertilizantes inorgânicos quando expostos a eles por curtos períodos (Ishibashi 1993; Koppenhöfer & Grewal 2005), apresentando-se, portanto, como importantes ferramentas para uso no manejo integrado de pragas. Alguns inseticidas químicos, usados em subdoses, atuam sinergicamente com nematóides entomopatogênicos, aumentando a eficácia desses organismos em aplicações conjuntas (Koppenhöfer & Kaya 1998; Nishimatsu & Jackson 1998). A combinação de *Heterorhabditis* spp. e *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) Wouts, Mráček, Gerdin & Bedding 1982 com o inseticida imidacloprido vem sendo avaliada contra larvas de escarabeídeos, proporcionando bons resultados de controle e, em muitos casos, apresentando efeito sinérgico na mortalidade dos insetos, sem afetar a capacidade reprodutiva do nematóide no hospedeiro (Koppenhöfer *et al.* 2000b).

Por esses motivos, foi realizado esse estudo com o objetivo de avaliar o efeito de *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David, 1992 (isolado IBCB n-5) e *Steinernema* sp. (isolado IBCB n-6), combinados com os inseticidas químicos fipronil, tiametoxam e imidacloprido, sobre larvas e adultos do bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, em laboratório, partindo-se do princípio que esses produtos são compatíveis com esses nematóides.

Material e Métodos

No estudo foram utilizados os nematóides *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp., os quais se encontram depositados na Coleção de Nematóides Entomopatogênicos, do Banco de Entomopatógenos “Oldemar Cardim Abreu”, pertencente ao Instituto Biológico, identificados como IBCB n-5 e IBCB n-6, respectivamente. Os experimentos foram realizados nas dependências do laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, Campinas, SP.

Heterorhabditis indica IBCB n-5 foi isolado de amostra de solo coletada em área de cultivo de citros, no município de Itapetininga, SP. *Steinernema* sp. IBCB n-6 foi isolado de amostra de solo coletada em área de mata nativa, no município de Porto Murtinho, MS, sendo possivelmente uma nova espécie ainda não descrita.

Os nematóides foram multiplicados em larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), criadas conforme metodologia adaptada de Machado (1988). Os nematóides foram armazenados à 15°C, no escuro, por um período de 10 dias, antes de serem usados em cada experimento.

Os adultos de *S. levis* foram obtidos a partir de coletas em cultura de cana-de-açúcar situada em Piracicaba, SP, sendo fornecidos pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). Para a coleta foram utilizadas armadilhas atrativas formadas por toletes de cana crua de 30 cm cada, agrupadas entre as linhas da cultura (Precetti & Terán 1983). As larvas foram obtidas da criação em laboratório, mantidas em dieta artificial (Degaspari *et al.* 1987), sendo fornecidas também pelo CTC.

Viabilidade de *Heterorhabditis indica* IBCB n-5 e *Steinernema* sp. IBCB n-6 Expostos aos Inseticidas Fipronil, Tiametoxam e Imidacloprido. Foi avaliado o efeito dos inseticidas químicos fipronil (Regent 800 WG), imidacloprido (Confidor 700 WG) e tiametoxam (Actara 250 WG), os quais estão sendo avaliados contra o bicudo da cana-de-açúcar, na viabilidade dos nematóides *H. indica* IBCB n-5 e *Steinernema* sp. IBCB n-6. Para isso, foi utilizada uma metodologia modificada do protocolo de Vainio (1992), seguindo-se o mesmo princípio que é manter os nematóides em solução dos inseticidas por pelo menos 24 horas antes de serem avaliados quanto a viabilidade.

Foram considerados 6 tratamentos: 1) *H. indica* em água destilada (testemunha); 2) *H. indica* + solução de fipronil; 3) *H. indica* + solução de tiametoxam; 4) *H. indica* + solução de imidacloprido; 5) *Steinernema* sp. em água destilada (testemunha); 6) *Steinernema* sp. + solução de fipronil; 7) *Steinernema* sp. + solução de tiametoxam e 8) *Steinernema* sp. + solução de imidacloprido. As soluções de fipronil, tiametoxam e imidacloprido foram preparadas nas proporções de 250, 1000 e 1000g p.c. (p.c.=produto comercial), respectivamente, para 400 litros de água (doses e vazão para um hectare).

Os tratamentos foram representados por 5 repetições formadas cada uma por uma placa de Petri (9 cm de diâmetro), a qual recebeu 20 mL da calda dos produtos e 500 JIs (JI= Juvenil Infectivo) dos respectivos nematóides. Para colocar os nematóides nas placas, os agentes foram previamente filtrados em papel de filtro (4 cm de diâmetro) com auxílio de funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo, sendo o papel filtro transferido com os nematóides para o interior das placas. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada, a 25°C, no escuro.

A avaliação foi realizada 24 horas após a mistura dos nematóides com os produtos, tendo-se considerado a viabilidade dos JIs. Os nematóides vivos e mortos foram contados com auxílio de microscópio estereoscópico, considerando-se um aumento de 5 vezes, contabilizando 100 nematóides ao acaso.

Avaliação de *Heterorhabditis indica* IBCB n-5 e *Steinernema* sp. IBCB n-6 em Combinações com Tiametoxam, Imidacloprido e Fipronil, contra Adultos de *Sphenophorus levis*. Foram realizados três experimentos visando avaliar o efeito de combinações dos nematóides com os inseticidas tiametoxam (Actara 250 WG), fipronil (Regente 800 WG) e imidacloprido (Confidor 700 WG), na mortalidade de adultos de *S. levis*. Os inseticidas foram avaliados na dose de ¼ daquelas que vêm sendo avaliadas em campo para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, exceto no primeiro experimento em que o inseticida fipronil foi avaliado na dose equivalente a ½ daquela avaliada em campo visando conhecer, inicialmente, o efeito de uma sub-dose mais elevada para o produto mais testado contra esse inseto. A escolha da sub-dose de ¼ daquela que vem sendo avaliada tem por objetivo proporcionar menor impacto ambiental decorrente dos efeitos dos inseticidas, além de ocasionar baixa mortalidade dos insetos (< 20%) e, conseqüentemente, permitir um efeito sinérgico das combinações com os nematóides.

1º Experimento. Foram considerados 9 tratamentos: 1) *H. indica* (60 JI/cm²); 2) *Steinernema* sp. (60 JI/cm²); 3) tiametoxam (250 g p.c./ha); 4) fipronil (125 g p.c./ha); 5) tiametoxam (250 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²); 6) tiametoxam (250 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²); 7) fipronil (125 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²); 8) fipronil (125 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²) e 9) testemunha (água destilada).

Cada tratamento foi representado por 5 repetições e cada repetição foi formada com 5 adultos agrupados em um recipiente plástico (9 cm de diâmetro por 4 cm de altura), alimentados com um pedaço de colmo de cana-de-açúcar (3,5 m de comprimento). Os recipientes foram preenchidos com 287 mL de solo arenoso com umidade a 10% (massa/massa), sendo os insetos colocados posteriormente. Os nematóides foram suspensos em 100 mL das soluções dos tratamentos, dentro de erlenmeyers de 250 mL, os quais foram acondicionados em agitador orbital ajustado para 200 rpm e mantidos sob agitação por 1 hora, procurando aumentar a exposição dos agentes aos produtos químicos e mantê-los em condições mais próximas daquelas encontradas dentro do tanque de pulverização, onde estariam em circulação pelo circuito hidráulico durante o período da aplicação no campo.

Os tratamentos foram aplicados na superfície do solo, com auxílio de pipeta plástica, no volume de 0,3 mL por recipiente, considerando-se uma calda de 400 litros por hectare. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas em 5 pontos, para permitir aeração, e acondicionados em câmara climatizada com temperatura, umidade relativa e luminosidade controlada (T= 25 ± 1°C, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas).

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

2° *Experimento*. Foram considerados os tratamentos: 1) *H. indica* (60 JI/cm²); 2) *Steinernema* sp. (60 JI/cm²); 3) imidacloprido (250 g p.c./ha); 4) fipronil (65,2 g p.c./ha); 5) imidacloprido (250 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²); 6) imidacloprido (250 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²); 7) fipronil (65,2 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (60 JI/cm²); 8) fipronil (65,2 g p.c./ha) + *H. indica* (60 JI/cm²) e 9) testemunha (água destilada).

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

3° *Experimento*. Foi avaliado o efeito de combinações dos nematóides em diferentes doses, com subdoses dos inseticidas que proporcionaram melhores resultados nos dois primeiros testes, tiametoxam e fipronil, na mortalidade de adultos do inseto.

O ensaio foi composto por 21 tratamentos: 1) *H. indica* (2,4 JI/cm²); 2) *H. indica* (12 JI/cm²); 3) *H. indica* (60 JI/cm²); 4) *Steinernema* sp. (2,4 JI/cm²); 5) *Steinernema* sp. (12 JI/cm²); 6) *Steinernema* sp. (60 JI/cm²); 7) tiametoxam (250 g p.c./ha); 8) fipronil (65,2 g p.c./ha); 9) *H. indica* (2,4 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha); 10) *H. indica* (12 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha); 11) *H. indica* (60 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha); 12) *Steinernema* sp. (2,4 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha); 13) *Steinernema* sp. (12 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha); 14) *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha); 15) *H. indica* (2,4 JI/cm²) + fipronil (65,2 g p.c./ha); 16) *H. indica* (12 JI/cm²) + fipronil (65,2 g p.c./ha); 17) *H. indica* (60 JI/cm²) + fipronil (65,2 g p.c./ha); 18) *Steinernema* sp. (2,4 JI/cm²) + fipronil (65,2 g p.c./ha); 19) *Steinernema* sp. (12 JI/cm²) + fipronil (65,2 g p.c./ha); 20) *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) + fipronil (65,2 g p.c./ha) e 21) testemunha (água destilada).

A metodologia foi a mesma utilizada no primeiro experimento com adultos. Os adultos mortos pelos nematóides foram utilizados para a determinação do número de nematóides produzidos por cadáver do inseto. Para isso, os adultos mortos foram esterilizados superficialmente em solução de hipoclorito à 2%, durante 10 minutos, sendo posteriormente enxaguados e transferidos individualmente para armadilha modificadas de White (White 1927).

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

Avaliação de *Heterorhabditis indica* IBCB n-5 e *Steinernema* sp. IBCB n-6 em Combinação com Tiametoxam, contra Larvas de *Sphenophorus levis*. Foi avaliado o efeito de combinações dos nematóides *H. indica* e *Steinernema* sp., com subdose do inseticida tiametoxam, o qual proporcionou melhor resultado no último teste contra adultos, contra larvas de 3°- 4° instar de *S. levis*. Foram considerados 6 tratamentos: 1) *H.*

indica (12 JI/cm²); 2) *Steinernema* sp. (12 JI/cm²); 3) tiametoxam (250 g p.c./ha); 4) tiametoxam (250 g p.c./ha) + *Steinernema* sp. (12 JI/cm²); 5) tiametoxam (250 g p.c./ha) + *H. indica* (12 JI/cm²) e 6) testemunha (água destilada).

Os tratamentos foram constituídos por 5 repetições, sendo cada uma formada por 5 larvas agrupadas em um recipiente plástico (9 cm de diâmetro por 5 cm de altura), alimentadas com um pedaço de colmo de cana-de-açúcar (3,5 cm de comprimento). Para permitir a alimentação das larvas, o pedaço de colmo foi previamente perfurado em 5 regiões com auxílio de um vazador (0,5 cm de diâmetro por 0,5 cm de profundidade), sendo que em cada perfuração foi introduzida uma larva do inseto. Os pedaços de colmo foram colocados dentro dos recipientes e posteriormente, cobertos com 287 mL de solo arenoso com umidade 10% (m/m).

Os tratamentos foram aplicados com auxílio de pipeta plástica na superfície do solo, utilizando-se um volume de 0,3 ml por recipiente. As doses dos nematóides e do inseticida foram calculadas com base na área do recipiente considerando-se uma vazão de 400L por hectare. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas em 5 pontos, para permitir aeração, e acondicionados em câmara climatizada com temperatura, umidade relativa e luminosidade controlada (T= 25 ± 1°C, UR= 70 ± 10% e fotofase de 12 horas). A avaliação foi feita 9 dias após a aplicação, considerando-se o número de insetos mortos.

Análise Estatística. Os dados obtidos de viabilidade de nematóides e mortalidade de insetos foram transformados em $\sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância, comparando-se as médias pelo teste de Tukey (P<0,05). Para o teste referente à produção de juvenis infectivos por adultos de *S. levis*, os dados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis (P<0,05).

Resultados e Discussão

Viabilidade de *Heterorhabditis indica* IBCB n-5 e *Steinernema* sp. IBCB n-6 Expostos aos Inseticidas Fipronil, Tiametoxam e Imidacloprido. No teste de compatibilidade de *H. indica* e *Steinernema* sp. com fipronil (Regent 800WG), tiametoxam (Actara 250WG) e imidacloprido (Confidor 700 WG) nas doses avaliadas (250, 1000 e 1000 g p.c., respectivamente), os nematóides apresentaram viabilidade acima de 90%, após 24 horas de exposição aos inseticidas, não diferindo significativamente das testemunhas para os tratamentos com *H. indica* e *Steinernema* sp. (F=1,835; gl=7; P=0,126) (Tabela 1). Esses resultados confirmam a compatibilidade desses agentes a esses inseticidas.

Os nematóides *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 e *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) Wouts, Mráček, Gerdin & Bedding, 1982 também

apresentaram alta tolerância ao inseticida fipronil, com apenas 17% e 11,2% de mortalidade dos juvenis infectivos após 72 horas submersos em solução contendo 2000 ppm do produto. Já *Steinernema arenarium* (Arty., 1967) Wouts, Mrácek, Gerdin & Bedding, 1982 apresentou-se suscetível com mais de 94,6% e 100% de mortalidade após 24 e 72 horas, respectivamente (Pinto & Jové 2005).

Os inseticidas imidacloprido e tiametoxam estão entre os mais testados quanto a compatibilidade para nematóides entomopatogênicos, tendo o primeiro produto apresentado compatibilidade para os nematóides

H. bacteriophora e *S. carpocapsae*, e o segundo para esses mesmos nematóides, além de *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson & Klein, 1987, *S. glaseri* e *Steinernerma feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mrácek, Gerdin & Bedding, 1982 (Koppenhöfer & Kaya 1998; Koppenhöfer *et al.* 2003; Alumai & Grewal 2004). Andaló *et al.* (2004) avaliaram a compatibilidade de tiametoxam com nematóides entomopatogênicos e constataram que o produto além de não afetar a viabilidade, também não interferiu na infectividade dos nematóides quando inoculados em larvas de *G. mellonella*.

Tabela 1. Viabilidade (\pm Erro Padrão) dos juvenis infectivos de *Steinernema* sp. IBCB n-6 e *Heterorhabditis indica* (IBCB n-5) após exposição por 24 horas aos inseticidas fipronil, tiametoxam e imidacloprido (T=25 \pm 1°C, UR=70 \pm 10%)

Tratamentos	Viabilidade (%) \pm Erro Padrão			
	<i>Steinernema</i> sp. IBCB n-6		<i>Heterorhabditis indica</i>	
Testemunha	96,7 \pm 1,44	A	91 \pm 2,12	A
Fipronil	96 \pm 1,00	A	90,2 \pm 2,36	A
Tiametoxam	95 \pm 2,20	A	92,5 \pm 1,66	A
Imidacloprido	95,7 \pm 1,70	A	93,2 \pm 1,44	A

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

Avaliação de *Heterorhabditis indica* IBCB n-5 e *Steinernema* sp. IBCB n-6 em Combinações com Tiametoxam, Imidacloprido e Fipronil, contra Adultos de *Sphenophorus levis*. No primeiro ensaio com adultos de *S. levis*, avaliando a associação do *H. indica* e *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) com fipronil e tiametoxam nas subdoses de 125 g p.c./ha e 250 g p.c./ha, respectivamente, os nematóides e os inseticidas testados isoladamente proporcionaram níveis de mortalidade do inseto de apenas 16%, 44%, 40% e 12%, respectivamente, tendo todos os tratamentos diferidos significativamente da testemunha (F=67,306; gl=8; P<0,001), exceto tiametoxam (F=67,306; gl=8; P=0,189) (Figura 1). Já nas misturas dos nematóides

com os produtos químicos, os níveis de mortalidade aumentaram expressivamente, variando de 84 a 100%, com todas essas misturas diferindo significativamente dos demais tratamentos (F=67,306; gl=8; P<0,001), mas não entre si (F=67,306; gl=8; P=0,189).

No segundo ensaio, avaliando a associação do *H. indica* e *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) com fipronil e imidacloprido nas subdoses de 62,5 g p.c./ha e 250 g p.c./ha, respectivamente, os nematóides e os inseticidas testados isoladamente proporcionaram níveis de mortalidade das formas adultas de apenas 10,2%, 36,6%, 10,2% e 6,8%, respectivamente, tendo apenas o *Steinernema* sp. diferido significativamente da testemunha (F=15,856; gl=8; P<0,001) (Figura 2).

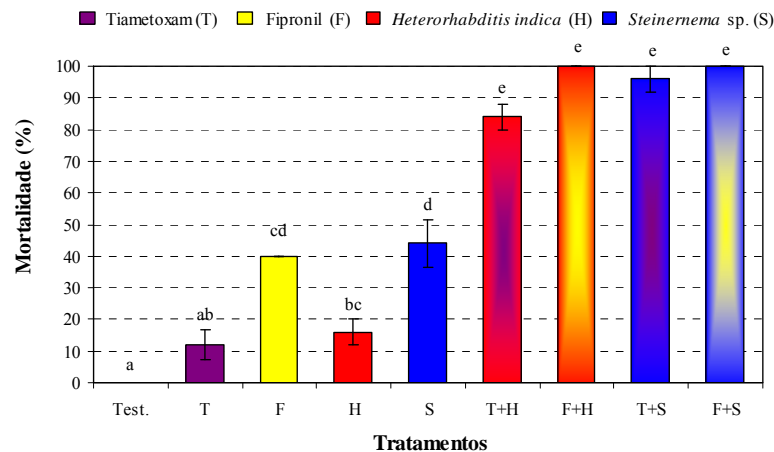


Figura 1. Mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* expostos às combinações dos nematóides *Heterorhabditis indica* (IBCB-n5) e *Steinernema* sp. (IBCB-n6), na dose de 60 JI/cm², com os inseticidas thiametoxam (250 g p.c./ha) e fipronil (125 g p.c./ha.), em laboratório (T=25 \pm 1°C, UR=70 \pm 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P \leq 0,05).

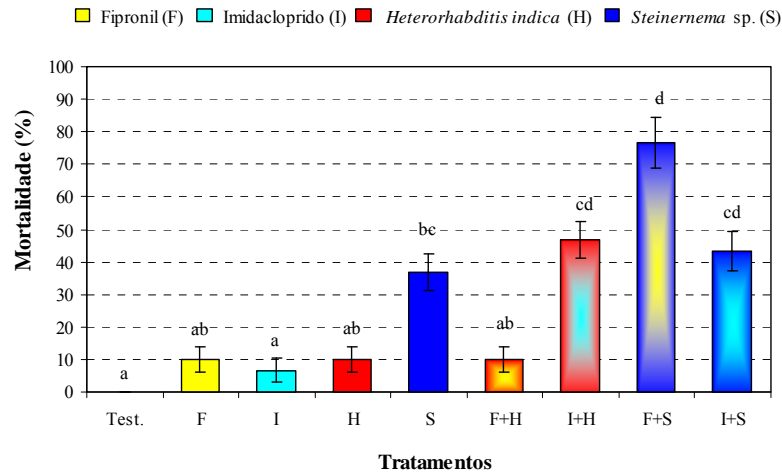


Figura 2. Mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* expostos a combinações dos nematóides *Heterorhabditis indica* (IBCB-n5) e *Steinernema* sp. (IBCB-n6), na dose de 60 JI/cm², com os inseticidas imidacloprid (250 g p.c./ha) e fipronil (62,5 g p.c./ha), em laboratório (T^o=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

Nas misturas *H. indica* + imidacloprido e *Steinernema* sp. + fipronil, os níveis de mortalidade aumentaram para 46,60% e 76,60%, respectivamente, tendo esses tratamentos diferidos significativamente dos respectivos nematóides e produtos testados isoladamente ($F=15,856$; $gl=8$; $P<0,001$), mas não entre si ($F=15,856$; $gl=8$; $P=0,069$).

No terceiro ensaio, envolvendo a associação do *H. indica* e *Steinernema* sp. em três doses cada, com

fipronil e tiametoxam nas subdoses de 62,5 g p.c./ha e 250 g p.c./ha, respectivamente, todos os tratamentos com nematóides e inseticidas testados isoladamente proporcionaram mortalidade do inseto abaixo de 25%, exceto o nematóide *Steinernema* sp. nas doses de 12 e 60 JI/cm², com níveis de mortalidade de 33% a 50%, diferindo significativamente da testemunha ($F=18,471$; $gl=20$; $P<0,001$), porém não entre si ($F=18,471$; $gl=20$; $P=0,083$) (Fig. 3).

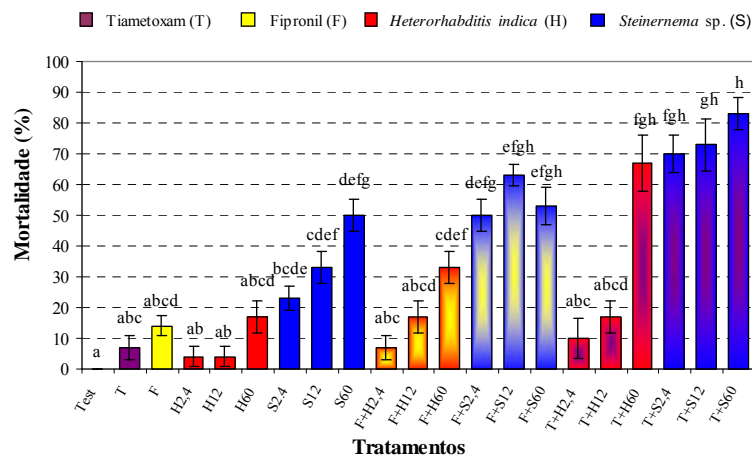


Figura 3. Mortalidade de adultos de *Sphenophorus levis* expostos à combinações dos nematóides *Heterorhabditis indica* (IBCB-n5) e *Steinernema* sp. (IBCB-n6) nas doses de 2,4, 12 e 60 JI/cm², com os inseticidas fipronil (62,5 g p.c./ha) e tiametoxam (250 g p.c./ha), em laboratório (T=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

Nas misturas dos nematóides com fipronil, ocorreu um aumento nos níveis de mortalidade do inseto, não havendo, entretanto, diferença significativa entre esses tratamentos e aqueles com os respectivos nematóides, nas respectivas doses, sem a mistura com produto

químico ($F=18,471$; $gl=20$; $P=0,083$). Nas misturas dos nematóides com tiametoxam, os níveis de mortalidade aumentaram ainda mais, alcançando 66,67% na mistura envolvendo *H. indica* 60 JI/cm², e 70% a 83,33% naquelas envolvendo as três doses de *Steinernema* sp.,

com todos esses tratamentos diferindo significativamente daqueles com os respectivos nematóides, nas respectivas doses, sem a mistura com produto químico ($F=18,471$; $gl=20$; $P<0,001$).

Nos três ensaios, o nematóide *Steinernema* sp. proporcionou maiores percentuais de mortalidade de adultos, apresentando-se mais virulento comparado ao *H. indica*. Segundo Smith (1994), as fases imaturas de diversas espécies de curculionídeos incluindo *Otiorhynchus sulcatus* (Fabricius), *Diaprepes abbreviatus* (Linnaeus), *Pachnaeus litus* (Germar), *Cylas formicarius* (Fabricius) e *Sphenophorus* spp., são susceptíveis a nematóides entomopatogênicos, sendo que os adultos da espécie *Sphenophorus venatus* (Say) são suscetíveis ao nematóide *S. carpocapsae*. Em teste contra adultos do curculionídeo *Sitona hispidulus* Fabricius, 1777, o nematóide *H. bacteriophora* proporcionou até 48% de mortalidade do inseto na dose de 100 JI/inseto (Loya & Hower Jr. 2003).

Ainda para *Steinernema* sp., no terceiro ensaio (Fig. 3) houve uma pequena resposta na mortalidade do inseto em função do aumento da dose do nematóide misturado aos produtos químicos, com níveis de 50% a 63,33% na mistura com fipronil, e de 70% a 83,33% na mistura com tiametoxam. Essa pequena resposta na mortalidade foi verificada também para esse nematóide contra larvas de *S. levis* em estudos realizados em laboratório e casa de vegetação, por Tavares *et al.* (2007), sendo comumente observada em testes com nematóides para o controle de outras espécies de insetos (Rosales & Suárez 1998; Ferrer *et al.* 2004; Leite *et al.* 2005). A razão para essa pequena resposta na mortalidade do inseto ainda não é bem conhecida, porém pode estar relacionada ao fato do nematóide ser mais atraído para insetos previamente infectados pela mesma espécie. O pouco conhecimento da interação entre JIs e o hospedeiro dificulta a interpretação da dinâmica de infecção causada pelos nematóides entomopatogênicos (Lewis *et al.* 2002).

As elevadas taxas de mortalidade de adultos obtidas no primeiro ensaio com as misturas de *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha) ou fipronil (125 g p.c./ha), e de *H. indica* (60 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha) ou fipronil (125 g p.c./ha); no segundo ensaio com *H. indica* (60 JI/cm²) + imidacloprido (250 g p.c./ha) e com *Steinernema* sp. (60 JI/cm²) + fipronil (65,2 g p.c./ha); e também no terceiro ensaio com *H. indica* na dose de 60 JI/cm² + tiametoxam (250 g p.c./ha), e *Steinernema* sp. nas três doses (2,4; 12 e 60 JI/cm²) + tiametoxam (250 g p.c./ha), diferiram significativamente e superaram a somatória das mortalidades obtidas com os nematóides e inseticidas das respectivas misturas, testados isoladamente nos respectivos ensaios, o que demonstra um efeito sinérgico decorrente dessas misturas, seguindo critério adotado por Benz (1971).

Koppenhöfer *et al.* (2002) avaliaram misturas de *H. bacteriophora* e *S. glaseri* com tiametoxam, no controle

de larvas de *Exomala orientalis* (Waterhouse) (Coleoptera: Scarabaeidae), verificando efeitos também sinérgicos quando essas misturas foram comparadas aos nematóides e ao inseticida testados isoladamente. A associação de nematóides entomopatogênicos com o inseticida imidacloprido já vem sendo avaliada para o controle de larvas de escarabeídeos, proporcionando bons resultados de controle e, em muitos casos, apresentando efeitos sinérgicos na mortalidade dos insetos (Koppenhöfer & Kaya, 1998; Koppenhöfer *et al.*, 2000; Koppenhöfer *et al.*, 2003). Comentário

A mistura de *H. indica* com fipronil proporcionou um efeito sinérgico na mortalidade do inseto, porém esse efeito ocorreu somente no primeiro ensaio quando o inseticida foi avaliado na dose de 125 g p.c./ha, bastante acima da dose usada no segundo e terceiro ensaio (62,5 g p.c./ha). Isso sugere que a dose do inseticida pode interferir no efeito da combinação nematóide-inseticida. No segundo ensaio ocorreu um efeito sinérgico na mistura de *H. indica* com imidacloprido, mas não na mistura de *Steinernema* sp. com esse inseticida, sendo que no terceiro ensaio, ocorreu um efeito sinérgico resultante da mistura de *H. indica* com fipronil somente na dose de 60 JI/cm² do nematóide, e das misturas de *Steinernema* sp. nas três doses com tiametoxam. Portanto, esses ensaios sugerem que a espécie e dose do nematóide também podem interferir no efeito da combinação nematóide-inseticida.

Nishimatsu & Jackson (1998) também verificaram que a dose do inseticida, além da dose e espécie do nematóide, podem determinar o efeito da combinação nematóide-inseticida. Koppenhöfer *et al.* (2002) verificaram que o hospedeiro também determina o efeito da associação entre nematóides e inseticidas químicos quando constataram dois efeitos opostos da associação *H. bacteriophora* + tiametoxam contra larvas de duas espécies de insetos coleópteros: (1) efeito sinérgico contra *E. orientalis* e (2) efeito antagônico contra *Maladera castanea* (Arrow).

Diversos fatores ou combinações de fatores têm sido relatados como possíveis causas dos efeitos de sinergismo obtidos com misturas de nematóides mais inseticidas, estando estes fatores geralmente mais associados aos efeitos que os inseticidas causam no inseto, do que aqueles provocados pelo nematóide. Em teste com larvas do escarabeídeo *Cyclocephala* sp., o sinergismo obtido com a mistura de *H. bacteriophora* + imidacloprido foi causado por mudanças no comportamento do inseto quando afetado pelo inseticida, deixando de limpar a cutícula ou mandíbula, como geralmente faz para eliminar ou remover nematóides e outros inimigos naturais (Gaugler *et al.* 1994). Em teste com larvas do crisomelídeo *Diabrotica* sp., a maior eficácia da combinação nematóide-inseticida pode ser devido aos efeitos que o inseticida causa no inseto, como paralização e convulsão, tornando-o um alvo mais fácil e suscetível ao nematóide. Além disso, o aumento da atividade metabólica e a

redução nos movimentos direcionais do inseto resultam em um aumento na concentração de CO₂ ao seu redor, o qual é utilizado por nematóides entomopatogênicos para a localização do hospedeiro (Nishimatsu & Jackson 1998). Os efeitos de sinergismo obtidos nas combinações nematóide-inseticida também podem ser provocados pelos efeitos de estresse que o inseticida causa no inseto, afetando a sua fisiologia e seus mecanismos de defesa humoral, e conseqüentemente, tornando-o mais suscetível as infecções por nematóides (Cui et al. 1993; Wang et al. 1994). O aumento na eficácia da combinação nematóide-inseticida também pode ser devido a um aumento na movimentação e na atividade de nictação do nematóide, conforme tem sido

observado para o nematóide *S. carpocapsae* (Ishibashi & Takii 1993).

H. indica e *Steinernema* sp. se reproduziram dentro dos adultos de *S. levis* infectados no terceiro ensaio, sendo que os números de juvenis infectivos emergidos por adulto do inseto (VÍDEO 1) (Tabela 2) foram ligeiramente superiores nos tratamentos com os nematóides testados isoladamente, de 39.595 para o *H. indica* e 8.297 para o *Steinernema* sp., porém sem diferir significativamente comparados aos tratamentos envolvendo os mesmos nematóides misturados aos inseticidas fipronil (38.170 e 5.185, respectivamente) e tiametoxam ($H=25,774$; $gl=5$; $P=0,010$). Isso demonstra que os inseticidas testados não afetam a viabilidade e a reprodução dos nematóides.

Tabela 2. Número de juvenis infectivos dos nematóides *Steinernema* sp. IBCB n-6 e *Heterorhabditis indica* IBCB n-5 produzidos por adulto de *Sphenophorus levis* ($T=25 \pm 1^\circ\text{C}$, $UR=70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Nematóide ou/Nematóide + combinação	Número de adultos utilizados	Média de JIs produzidos por adulto	Máx. ¹	Mín. ¹	
<i>Steinernema</i>	5	8297,4	AB	10556	4667
<i>Steinernema</i> +fipronil	3	5185,3	A	7336	2558
<i>Steinernema</i> +thiametoxam	7	6865,7	A	11236	1259
<i>H. indica</i>	7	39595,42	B	65695	17556
<i>H. indica</i> +fipronil	8	38170,5	B	58964	14566
<i>H. indica</i> +thiametoxam	6	32825,83	AB	61223	10287

(¹) Valor máximo e mínimo. Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$).

O nematóide *H. indica* gerou uma maior produção de juvenis infectivos por adulto do inseto, quando comparado ao *Steinernema* sp. A menor produção de juvenis infectivos para o *Steinernema* sp. deve-se ao maior tamanho desse nematóide comparado ao *H. indica* (médias de 1.049,9 μm e 578,9 μm , respectivamente), o que resulta em limitações de espaço e alimento no hospedeiro, acarretando na geração de um menor número de descendentes (Leite et al. 2003). A produção desses nematóides em adultos de *S. levis* pode ser considerada baixa se comparada à produção obtida em outros hospedeiros, podendo alcançar 200.000 JIs/inseto usando larvas de *G. mellonella* (Dutky et al. 1964), porém quando comparamos com a forma larval de *S. levis*, não há grande diferença na quantidade de nematóide produzido por inseto (média de 48.602 indivíduos de *H. indica* e 8.952 de *Steinernema* sp.) (Tavares et al. 2007). Em geral, os adultos demonstram ser uma importante fonte de inóculo, o que serviria de fonte para reciclagem e persistência desses agentes no campo (Kaya 1990).

Avaliação de *Heterorhabditis indica* IBCB n-5 e *Steinernema* sp. IBCB n-6 em Combinação com Tiametoxam, contra Larvas de *Sphenophorus levis*. No ensaio com larvas de *S. levis*, avaliando a combinação de *H. indica* e *Steinernema* sp. (dose de 12 JI/cm²) com thiametoxam em subdose (250 g p.c./ha), os nematóides testados isoladamente ou em mistura com o inseticida proporcionaram níveis de mortalidade do

inseto entre 75% a 87,5%, sem diferença significativa entre esses tratamentos ($F=7,837$; $gl=5$; $P=0,839$).

Portanto, esse estudo indica não haver nenhuma contribuição das misturas para o incremento na mortalidade de larvas do inseto (Fig. 4), sendo um dos motivos prováveis, o fato das larvas ficarem alojadas dentro dos canais construídos no rizoma da planta, onde apenas os nematóides podem alcançá-las, ficando protegidas da ação conjunta nematóide-inseticida.

Este estudo é o primeiro a avaliar o efeito da combinação dos nematóides *Steinernema* sp IBCB-n6 e *H. indica* IBCB n-5 com os inseticidas fipronil, tiametoxam e imidacloprido, na mortalidade de larvas e adultos do bicudo da cana-de-açúcar, *S. levis*. O estudo sugere que o nematóide *Steinernema* sp. (IBCB n-6) é o mais adequado para testes de campo no controle de larvas e adultos de *S. levis*, podendo ser avaliado em combinações com os inseticidas químicos fipronil e tiametoxam, na dose de 2,4 JI/cm², já que não houve diferença significativa entre as doses, sendo essa a mais econômica. Essa dose também apresentou bons resultados contra larvas do inseto, em testes realizados em laboratório e casa de vegetação (Tavares et al. 2007). Considerando-se que o nematóide deve ser aplicado na faixa de 30 cm de largura em cada lado da linha de plantio de cana-de-açúcar, e que o espaçamento entre linhas é de 150 cm, a dose de 2,4 JI/cm² pode equivaler a uma dose de 1×10^8 JI/ha. Essa dose equivalente por hectare é menor que a dose recomendada para o controle

dos gorgulhos da raiz do citros com *H. indica*, na Flórida, EUA (McCoy *et al.* 2002), sendo bastante inferior comparada às doses recomendadas para vários

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

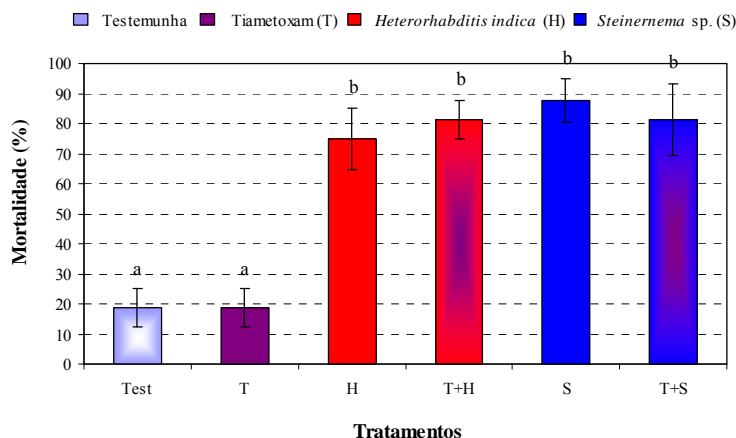


Figura 4. Mortalidade de larvas de *Sphenophorus levis* expostas à combinações dos nematóides *Heterorhabditis indica* (IBCB-n5) e *Steinernema* sp. (IBCB-n6), na dose de 12 JI/cm², com o inseticida thiamethoxam (250 g p.c./ha), em laboratório (T=25 ± 1°C, UR=70 ± 10% e fotofase de 12 horas). Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P ≤ 0,05).

Agradecimentos

Ao Centro de Tecnologia Canavieira – Piracicaba e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Literatura Citada

- Almeida, L.C. 2005. Bicudo da cana-de-açúcar. Bolet. Técn. do Centro de Tecnol. Canav. 1-3.
- Alumai, A. & P.S. Grewal. 2004. Tankmix-compatibility of the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*, with selected chemical pesticides used in turfgrass. *Bioc. Scien. and Techn.* 14: 725-730.
- Andaló, V., A. Moino Jr. & L.V.C. Santa-Cecília. 2004. Compatibilidade de nematóides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. *Nemat. Bras.* 28: 149-158.
- Benz, G. 1971. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: Burges, H.D. & N.W. Hussey (eds). *Microbial control of insects and mites*. Londres: Academic Press, 237-256. 861 p.
- Cui, L., R. Gaugler & Y. Wang. 1993. Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Invert. Pathol.* 62: 73-78.
- Degaspari, N., P.S.M. Botelho, L.C. Almeida & H.J. Castilho. 1987. *Biologia de Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. *Pesq. Agropec. Bras.* 22: 553-558.
- Dinardo-Miranda, L.L. 2005. Nematóides e pragas de solo em cana-de-açúcar. *Informações Agronômicas*. Piracicaba, Potafos, 110: 25-32.
- Dutky, S.R., S.W. Mac Coy & G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.* 6: 417-422.
- Ferraz, L.C.C.B. 1998. Nematóides Entomopatogênicos, p. 541-569. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Ferrer, F., M. Arias, A. Trilles, G. Palencia, J.M. Navarro & R. Colmenarez. 2004. Posibilidades del uso de nematodos entomopatogênicos para el control de *Aeneolamia varia* en caña de azúcar. *Man. Integr. de Plag. y Agroec.* 72: 39-43.
- Gaugler, R., Y. Wang & J.F. Campbell. 1994. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. *J. Invert. Pathol.* 64: 193-199.
- Georgis, R. 1990. Formulation and application technology, 173-191. In R. Gaugler & H.K. Kaya (eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Florida, Boca Raton, CRC Press, 384p.
- Ishibashi, N., & S. Takki. 1993. Effects of insecticides on movement, nictation, and infectivity of *Steinernema carpocapsae*. *J. Nematol.* 25: 204-213.
- Kaya, H.K. 1990. Soil ecology, 93-115. In R. Gaugler & H.K. Kaya (eds.), *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Florida, Boca Raton, CRC Press, 384p.
- Koppenhöfer, A.M. & H.K. Kaya. 1998. Sinergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: A novel approach to white grub (Coleoptera:

- Scarabaeidae) control in turfgrass. J. Econ. Entomol. 91: 618-623.
- Koppenhöfer, A.M., I.M. Brown, R. Gaugler, P.S. Grewal, H.K. Kaya & M.G. Klein. 2000a. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. Biol. Control. 19: 245-251.
- Koppenhöfer, A.M., P.S. Grewal & H.K. Kaya. 2000b. Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: the mechanism. Entom. Experim. Applic. 94: 283-293.
- Koppenhöfer, A.M., R.S. Cowles, E.A. Cowles, E.M. Fuzy & L. Baumgartner. 2002. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. Biol. Control. 24: 90-97.
- Koppenhöfer, A.M., R.S. Cowles, E.A. Cowles, E.M. Fuzy & H.K. Kaya. 2003. Effect of neonicotinoid synergists on entomopathogenic nematode fitness. Entomol. Experim. Applic. 106: 7-18.
- Koppenhöfer, A.M.; P.S. Grewal. 2005. Compatibility and interactions with agrochemicals and other biocontrol agents. In: Grewal, P.S.; Ehlers, R.U.; Shapiro-Ilan; D.I. (Ed.) Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, Cambridge, p. 363-382.
- Leite, L.G., L.A. Machado, M.M. Aguilera, R.C.D. Rodrigues & A.S. Negrisoli Jr. 2003. Patogenicidade de *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Rhabditida) à ninfas da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata*. Rev. Agric. 78:139-148.
- Leite, L.G., L.A. Machado, R.M. Goulart, F.M. Tavares & A. Batista Filho. 2005. Screening of entomopathogenic nematodes (Nemata: Rhabditida) and the efficiency of *Heterorhabditis* sp. against the sugarcane root splittlebug *Mahanarva fimbriolata* (Fabr.) (Hemiptera: Cercopidae). Neotr. Entom. 34:785-790.
- Lewis, E.E., B. Barbarosa & R. Gaugler. 2002. Mating and sexual communication of *Steinernema carpocapsae* (Nemata: Steinernematidae). Journ. of Nemat. 34:328-331.
- Loya, L.J. & A.A. Hower Jr. 2003. Infectivity and reproductive potencial of the Oswego strain of *Heterorhabditis bacteriophora* associated with life stages of the clover root curculio, *Sitona hispidulus*. J. Invert. Pathol. 83:63-72.
- Machado, L.A. 1988. Criação de insetos em laboratório para utilização em pesquisas de controle biológico, 8-35. In B.B. Cruz (ed.), Pragas das Culturas e Controle Biológico. Campinas, Fundação Cargill.
- McCoy, C.W., L.W. Duncan, R.J. Stuart, D.I. Shapiro-Ilan. 2002. Development of entomopathogenic nematodes as a management tactic for citrus root weevils in Florida. In: International Colloquium On Invertebrate Pathology And Microbial Control, 8, Foz do Iguaçu. Proceedings..., p. 312.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 8 jan. 2008.
- Nishimatsu, T. & J.J. Jackson. 1998. Interaction of insecticides, entomopathogenic nematodes, and larvae of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 91: 410-441.
- Pinto, F.G. & Jové, M. 2005. Compatibility of entomopathogenic nematodes with fipronil. Journ. of Helminth. 79: 333-337.
- Precetti, A.A.C. & F.O. Terán. 1983. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 e *Metamasius hemipterus* (L., 1765) (Col., Curculionidae). Reun. Técn. Agron. 32-37.
- Precetti, A.A.C. & E.A. Arigoni. 1990. Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. Bolet. Técn. da Cooper. de Prod. de Cana, Açúc. e Alc. do Est. de São Paulo. 3-15.
- Rosales, L.C. & Z. Suárez. 1998. Nematodos entomopatogênicos como posibles agentes de control del gorgojo negro del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar 1824) (Coleoptera: Curculionidae). Boletín Entomológico de Venezuela. 13:123-140.
- Shapiro-Ilan, D.I., D.H. Gouge & A.M. Koppenhöfer. 2002. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus, p. 333-355. In R. Gaugler (ed). Entomopathogenic Nematology. New Jersey, Rutgers University, 400p.
- Smith, K.A. 1994. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes. Disponível em: <http://www.ftc.agnet.org/tb/139/tb139a.pdf>. 10p. Acesso em: 21 set. 2005.
- Tavares, F.M., A. Batista Filho, L.G. Leite, L.C. Almeida, A. C. Silva & C.M.G. Ambrós. 2007. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetação. Nematol. Bras. 31: 12-19.
- Vainio, A. 1992. Guideline for laboratory testing of the side-effects of pesticides on entomophagous nematodes *Steinernema* spp. IOBC/WPRS Bulletin. 15: 145-147.
- Wang, Y., J.F. Campbell & R. Gaugler. 1994. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. J. Invert. Pathol. 66: 178-184.
- White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from culture. Science. 66: 302-303.
- Woodruff, R.E. 1996. The hunting billbug, *Sphenophorus venatus vestitus* Chittenden, in Florida (Coleoptera, Curculionidae). Entomol. Circ. 45: 1-2.