

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Entomologia



Dissertação

**Potencial de nematoides entomopatogênicos no controle de
Drosophila suzukii e compatibilidade com inseticidas**

Sérgio da Costa Dias

Pelotas, 2020

Sérgio da Costa Dias

Potencial de nematoides entomopatogênicos no controle de *Drosophila suzukii* e compatibilidade com inseticidas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Entomologia).

Orientador: Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

Coorientadora: Dr^a. Andressa Lima de Brida

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

D541p Dias, Sérgio da Costa

Potencial de nematóides entomopatogênicos no controle de *Drosophila suzukii* e compatibilidade com inseticidas / Sérgio da Costa Dias ; Flávio Roberto Mello Garcia, orientador ; Andressa Lima de Brida, coorientadora. — Pelotas, 2020.

57 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Controle biológico. 2. Patogenicidade. 3. Virulência. I. Garcia, Flávio Roberto Mello, orient. II. Brida, Andressa Lima de, coorient. III. Título.

CDD : 595.77

Sérgio da Costa Dias

Potencial de nematoides entomopatogênicos no controle de *Drosophila suzukii* e compatibilidade com inseticidas

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Área de Concentração em Entomologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 11 de Fevereiro de 2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Flávio Roberto Mello Garcia (Orientador)

Doutor em Biociências (Zoologia) pela Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

Profa. Dra. Andressa Lima de Brida (Co-Orientadora)

Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil.

Prof. Dr. Edison Zefa

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Brasil.

Profa. Dra. Patrícia Braga Lovatto

Doutora em Sistema de Produção Agrícola Familiar pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

*A todos que confiaram na minha
capacidade e que me apoiaram em todos
momentos em que precisei.*

DEDICO E OFEREÇO

Agradecimentos

Em primeiro lugar à Deus, pela saúde e por tudo que tem me permitido alcançar.

Um agradecimento especial ao meu orientador Dr. Flávio Roberto Mello Garcia, pela ajuda sempre oportuna e necessária. O meu muito obrigado!

A minha coorientadora Dr^a. Andressa Lima de Brida, pela criteriosa orientação neste trabalho, confiança, preocupação, paciência infundável e pelo auxílio no desenvolvimento de todas as fases dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Aos professores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa.

Ao Dr. Luís Leite, pela disponibilização dos nematoides e doutorando Juliano Pazine, pela disponibilização dos inseticidas químicos.

A todos os meus colegas de mestrado e do laboratório de Ecologia de Insetos que me apoiaram e acompanharam ao longo deste caminho, pela ajuda, companheirismo e força para atingir esse grande objetivo.

Um agradecimento muito especial ao meu amigo Carlos, pela amizade, todo o apoio que tem me proporcionado e incentivo no prosseguimento dos estudos.

Agradecer eternamente à minha família por uma vida de ensinamentos, carinho, amor, compreensão, dedicação e apoio.

Bem assim a todos que aqui não foram mencionados e que direta ou indiretamente contribuíram para a materialização desse trabalho.

A todos os meus sinceros agradecimentos!

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

Resumo

DIAS, Sérgio da Costa. **Potencial de nematoides entomopatogênicos no controle de *Drosophila suzukii* e compatibilidade com inseticidas**. 2020. 57f. Dissertação (mestrado) Programa de Pós-graduação em Entomologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS, Brasil.

Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) foi recentemente registrada no Brasil e constitui uma ameaça à fruticultura, principalmente para as pequenas frutas. No contexto de busca de medidas para o controle de *D. suzukii*, o objetivo do trabalho foi avaliar a patogenicidade e virulência de nematoides entomopatogênicos a pupas de *D. suzukii*, a viabilidade e infectividade de nematoides entomopatogênicos combinados com inseticidas em pupas de *D. suzukii* e o efeito da associação de inseticida e nematoides entomopatogênicos em pupas e na longevidade dos adultos. Foi avaliada a patogenicidade e virulência de *Steinernema brazilense* IBCBn 24, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Heterorhabditis bacteriophora* HB e *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 nas concentrações de 0 (testemunha), 200, 400, 600, 800, 1000, 1800, 3600 e 5400 juvenis infectantes a pupas de *D. suzukii*. Em seguida foi avaliada a viabilidade e infectividade de nematoides entomopatogênicos com inseticidas químicos. Para tal, foram utilizados 10 tipos de inseticidas (abamectina, acetamiprida, thiamethoxam, malationa, fosmete, deltametrina, espinetoram, azadiractina, novalurom e lambda-cialotrina), formulados na concentração recomendada pelo fabricante. A viabilidade dos nematoides entomopatogênicos foi avaliada 48 horas após a exposição ao produto e, para tanto, pequenas alíquotas foram retiradas da suspensão, sendo observadas 100 juvenis infectantes de cada repetição em microscópio para determinar a mortalidade. Para verificar a infectividade, os nematoides entomopatogênicos foram lavados com água destilada e uma alíquota de 0,2 mL foi pipetada em 10 pupas de *D. suzukii* individualizadas em copos plásticos. A fim de avaliar o efeito de associação de isolados de nematoides entomopatogênicos e inseticidas no controle de *D. suzukii*, foram utilizados os nematoides *H. bacteriophora* HB e *H. amazonensis* IBCBn 24 associadas aos inseticidas espinetoram, malationa, azadiractina, fosmete e novalurom na dosagem 1/4 e, após seis dias foi feita a avaliação. Os nematoides do gênero *Heterorhabditis* foram mais eficientes causando mortalidade máxima de 80,0% para *H. bacteriophora* HB na contração de 5400 juvenis infectantes/mL e 86,25% para *H. amazonensis* IBCBn 24 na concentração de 1800 juvenis/mL, também houve alta virulência. As menores concentrações letais de juvenis foram obtidas em pupas, com *H. bacteriophora* HB (CL50) com 771,63 juvenis infectantes/mL e *H. amazonensis* IBCBn 24 (CL50) com 1115,49 juvenis/mL. Apenas os inseticidas espinetoram, malationa, abamectina, azadiractina e lambda-cialotrina afetaram a viabilidade do isolado *S. carpocapsae* IBCBn 02. A redução da infecção após contato com inseticidas foi inferior a 30% para todos nematoides, sendo que lambda-cialotrina foi o inseticida que mais reduziu a infectividade diminuindo em 20%, 24% 10% e 20% para *H. bacteriophora* HB, *H. amazonensis* IBCBn 24, *S. carpocapsae* IBCBn 02 e *S. brazilense* IBCBn 24, respectivamente. Quando associado os dois métodos de controle observou-se uma ação sinérgica, exceto para o inseticida novalurom que afetou negativamente a ação de nematoides entomopatogênicos.

Palavras-chave: Controle Biológico. Patogenicidade. Virulência.

Abstract

DIAS, Sérgio da Costa. **Potential of entomopathogenic nematodes in the control of *Drosophila suzukii* and their compatibility with insecticides.** 2020. 57f. Dissertation (master's degree) Post Graduation Program in Entomology. Federal University of Pelotas. Pelotas - RS, Brazil.

Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) was recently registered in Brazil and constitutes a threat to fruit culture, mainly for small fruits. In the context of the search for measures for the control of *D. suzukii*, the objective of the work was to evaluate the pathogenicity and virulence of entomopathogenic nematodes to pupae of *D. suzukii*, the viability and infectivity entomopathogenic nematodes combined with insecticides in pupae of *D. suzukii* and the effect of the association of insecticide on pupae and adult longevity. The pathogenicity and virulence of *Steinernema brazilense* IBCBn 24, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Heterorhabditis bacteriophora* HB and *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 in the concentrations of 0 (control), 200, 400, 600, 800, 1000, 1800, 3600 and 5400 juveniles were evaluated to pupae of *D. suzukii*. Then, the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes with chemical insecticides were evaluated. For this purpose, 10 types of insecticides were used (abamectin, acetamipride, thiamethoxam, malationa, fosmete, deltamethrin, espinetoram, azadiractin, novaluron and lambda-cyhalothrin), formulated in the concentration recommended by the manufacturer. The viability of the entomopathogenic nematodes was evaluated 48 hours after exposure to the product and, for that, small aliquots were removed from the suspension, with 100 JIs of each repetition under a microscope being observed to determine mortality. To check for infectivity, the entomopathogenic nematodes were washed with distilled water and a 0.2 mL aliquot was pipetted into 10 *D. suzukii* pupae individualized in plastic cups. In order to evaluate the effect of the association of NEPs and insecticides in the control of *D. suzukii*, the nematodes *H. bacteriophora* HB and *H. amazonensis* IBCBn 24 associated with the insecticides espinetoram, malationa, azadiractin, fosmete and novaluron at the dosage were used 1 / 4 and, after six days, the evaluation was made. Nematodes of the genus *Heterorhabditis* were more efficient causing a maximum mortality of 80,00% for *H. bacteriophora* HB in the contraction of 5400 juveniles/mL and 86,25% for *H. amazonensis* IBCBn 24 in the concentration of 1800 juveniles/mL, there was also a high virulence. The lowest lethal concentrations of JIs were obtained in pupae, with *H. bacteriophora* HB (CL50) with 771.63 juveniles/mL and *H. amazonensis* IBCBn 24 (CL50) with 1.115,49 juveniles/mL. Only the insecticides spinin, malathion, abamectin, azadiractin and lambda-cyhalothrin affected the viability of the isolate *S. carpocapsae* IBCBn 02. The reduction of infection after contact with insecticides was less than 30% for all nematodes, with lambda-cyhalothrin being the insecticide which further reduced infectivity, decreasing by 20%, 24% 10% and 20% for *H. bacteriophora* HB, *H. amazonensis* IBCBn 24, *S. carpocapsae* IBCBn 02 and *S. brazilense* IBCBn 24, respectively. When combined with the two control methods, a synergistic action was observed, except for the insecticide novaluron, which negatively affected the action of entomopathogenic nematodes.

Key words: Biological Control.Pathogenicity. Virulence.

Lista de figuras

- Figura 1 Percentagem de mortalidade de *Drosophila suzukii* sob combinação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos.....42
- Figura 2 Longevidade de adultos de *Drosophila suzukii* sob combinação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos.....44

Lista de tabelas

Tabela 1	Mortalidade e virulência de juvenis infectantes (JIs) de <i>S. brazilense</i> IBCBn 06, <i>S. carpocapsae</i> IBCBn 02, <i>H. bacteriophora</i> HB e <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24 a pupas de <i>Drosophila suzukii</i> em diferentes concentrações.....	24
Tabela 2	Concentração letal (CL50) de <i>H. bacteriophora</i> HB, <i>S. brazilense</i> IBCBn 06, <i>S. carpocapsae</i> IBCBn 02 e <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24 a pupas de <i>Drosophila suzukii</i>	28
Tabela 3	Inseticidas químicos registradas para controle de pragas na cultura de morango utilizados nos experimentos.....	31
Tabela 4	Percentagem de viabilidade (Médias \pm Erro Padrão) dos JIs de <i>S. brazilense</i> IBCBn 24, <i>S. carpocapsae</i> IBCBn 02, <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24 e <i>H. bacteriophora</i> HB após a exposição por 48 horas a inseticidas químicos.....	36
Tabela 5	Infectividade (Médias \pm Erro Padrão) dos JIs de nematoides entomopatogênicos após a exposição por 48 horas aos 10 inseticidas químicos.....	38
Tabela 6	Número médio de JIs de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> IBCBn 24 e <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> HB (Médias \pm Erro Padrão) em pupas <i>Drosophila suzukii</i> sob combinação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos.....	43

Sumário

1	Introdução geral.....	10
2.	Capítulo I. Controle da mosca-da-asa-machada <i>Drosophila suzukii</i> por nematoides entomopatogênicos.....	19
2.1	Introdução.....	19
2.2	Material e métodos.....	21
2.2.1	Manutenção de <i>Drosophila suzukii</i>	21
2.2.2	Obtenção e multiplicação das espécies de NEPs.....	21
2.2.3	Condução dos experimentos.....	22
2.2.4	Análise de dados.....	23
2.3	Resultados e discussão.....	23
2.4	Conclusões.....	28
3	Capítulo II. Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com inseticidas químicos no controle de <i>Drosophila suzukii</i>.....	29
3.1	Introdução.....	29
3.2	Material e métodos.....	30
3.2.1	Inseticidas químicos	31
3.2.2	Teste de viabilidade e efectividade	31
3.2.3	Teste de associação de inseticidas químicos e NEPs a pupas <i>Drosophila suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae) e longevidade dos adultos	32
3.2.4	Análise de dados	34
3.3	Resultados e discussão	34
3.3.1	Viabilidade e infectividade	34
3.3.2	Resultado de associação de inseticidas e nematoides a pupas <i>Drosophila suzukii</i> (Diptera: Drosophilidae) e longevidade dos adultos.....	40
3.4	Conclusões.....	44
4.	Referências.....	45

1 Introdução geral

O Brasil ocupa a terceira posição mundial na produção de frutas, com uma colheita anual que ultrapassa 40 milhões de toneladas, gerando aproximadamente cinco milhões de empregos diretos e indiretos (KIST *et al.*, 2018). Na produção de pequenas frutas, destacam-se a cerejas (*Prunus avium* L), morangos (*Fragaria vesca* L.), uvas (*Vitis vinifera* L.) e maçãs (*Malus domestica* L.) entre as mais produzidas (SEAB, 2012; ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018).

Estima-se aproximadamente 1,9 milhões de hectares cultivada com frutíferas no país e, grande parte da produção de frutas é destinada ao consumo interno (FACHINELLO *et al.*, 2011).

A exportação de frutas é muito inferior em relação a produção, isto é, apenas 9% da produção é exportada. Esse índice reduzido deve-se, principalmente, a presença das pragas que limitam o livre trânsito de frutas frescas pelas restrições impostas por medidas quarentenárias dos países importadores (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018; ESTATÍSTICAS DE EXPORTAÇÕES DE FRUTAS, 2017).

Os problemas fitossanitários podem comprometer a produção de frutas, e as pragas destacam por causar elevados danos e reduzir de forma significativa à produtividade. Dentre estas, destacam-se as mosca-das-frutas Tephritidae, que causam danos em consequência da oviposição realizada pelas fêmeas no interior das frutas, tornando-as inviáveis para o consumo. No entanto, medidas de controle visando conter os prejuízos estão sendo desenvolvidas, sendo possível encontrar várias estratégias para reduzir os danos causados pelas moscas (ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2018).

Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae) também conhecida como a drosófila-da-asa-manchada é uma mosca recentemente registrada no Brasil, e constitui uma ameaça à fruticultura, principalmente para as pequenas frutas, apresentando comportamento semelhante às moscas-das-frutas, sendo que as primeiras ocorrências da espécie foram relatadas em 2013 (DEPRÁ *et al.*, 2014).

A drosófila-da-asa-manchada é uma praga originária do sudoeste asiático, descrita em 1931 por Shounen Matsumura, que tem invadido diversos países da Europa e América (BAKER *et al.*, 2010; SCHLESENER *et al.*, 2017). No Brasil, as

primeiras ocorrências foram registradas a partir de coletas de morangos (*Fragaria* spp.) no litoral de Santa Catarina, município de Botuverá e no Estado do Rio Grande do Sul nos municípios de Osório, Vila Maria, Erechim, Canguçu, Pelotas, Morro Redondo, Capão do Leão e Vacaria (DEPRÁ *et al.*, 2014).

Esta mosca é o inseto-praga de maior relevância econômica desde sua detecção, sendo as pequenas frutas do gênero *Rubus* as mais atacadas por serem mais sensíveis (BAKER *et al.*, 2010; FISCHER *et al.*, 2011; MARÍN, 2015), podendo alimentar-se das frutas verdes, frutas em fase de maturação e maduras ainda na planta mãe ou já colhidas. Os danos são causados pela fêmea através do seu ovipositor endurecido (DREVES *et al.*, 2009).

Os frutos atacados não apresentam sinais evidentes de dano logo após a infecção, apenas uma observação detalhada permite visualizar a perfuração causada pelo ovipositor (DEPRÁ *et al.*, 2014; ARNÓ, 2015). Esse fator é considerado como uma das hipóteses da sua rápida distribuição pelo mundo através da importação e exportação de frutas *in natura* contaminadas com ovos (ANFORA *et al.*, 2012).

Os danos evoluem quando as larvas eclodem e começam a alimentar-se da polpa do fruto, levando aproximadamente dois dias após a eclosão das larvas que se pode observar através de exsudações do fruto (DREVES *et al.*, 2009). Em seguida aparecem os danos secundários causados por fungos e bactérias fitopatogênicas que se desenvolvem a partir dos orifícios de oviposição, e aceleram a decomposição do fruto (DREVES *et al.*, 2009; MONTEYS; ROYO, 2011).

Os prejuízos podem atingir até 100% da produção. Por exemplo, há relatos que framboesiras (*Rubus idaeus* L.) e amoreiras (*Morus* sp.) sofrem danos significativos pelo ataque de *D. suzukii* em ordem dos 20% nos EUA (BOLDA *et al.*, 2010). Na China, o inseto reduziu em 40% a produção de mirtilheiro (*Vaccinium* spp.) (BOLDA *et al.*, 2010). Na cultura do morangueiro (*Fragaria*), *D. suzukii* causou danos estimados entre 60 e 100% da colheita no Japão (BURRACK, 2015). No Brasil, prejuízos que são verificados em cultivos de morango variam de 30 a 80% da produção (SANTOS *et al.*, 2018).

Um dos principais entraves encontrado no manejo de *D. suzukii* deve-se ao fato da espécie apresentar muitos hospedeiros, o ciclo de vida rápido, com duração de uma a três semanas, ocorrência em grandes populações e elevado

potencial biótico. Isso proporciona condições de sobrevivência durante todo ano e a ocorrência de muitas gerações (até 15 gerações por ano), tornando a espécie dominante na área, dificultando assim estabelecer um programa de controle eficiente e por sua vez conciso (WALSH *et al.*, 2011; CINI *et al.*, 2012; BREWER *et al.*, 2012).

Diante dos métodos de controle que podem contribuir para o manejo desta praga, o uso de inseticidas químicos por meio de pulverizações e iscas tóxicas é a forma mais utilizada no manejo da *D. suzukii*. Trata-se de um método de ação rápida (FRANCO, 2013; NARGANES *et al.*, 2015), entretanto os custos ao ambiente são bem elevados, visto que os produtos utilizados são baseados nas formulações de organofosforados, tetranortriterpenóides spinosinas, piretróides e neonicotinóides, os quais precisam ser aplicados com frequência (PROFAIZER *et al.*, 2012; GRASSI; ZALOM, 2015).

Sabendo que a maioria dos inseticidas não é seletiva, a utilização destes produtos pode afetar outros organismos não-alvo, interferindo no controle natural das pragas e podendo eliminar um número elevado de polinizadores, e provocar efeitos negativos à saúde humana contribuindo de forma negativa para contaminação do ambiente e no surgimento de organismos resistentes (CERDEIRA; DUKE, 2006; WALSH *et al.*, 2011).

Diante disso, a busca de medidas de controle menos agressivas aos organismos não alvo e ao ambiente têm sido estudadas intensamente, visando encontrar estratégias que possam reduzir a aplicação de pesticidas sintéticos. Nesse contexto insere-se o controle biológico, uma das melhores estratégias de diminuir as populações de pragas utilizando outros organismos vivos como, por exemplo, os microrganismos entomopatogênicos (fungos, vírus, bactérias e nematoides), também conhecido como controle microbiano (SILVA; BRITO, 2015).

Esta alternativa de controle pode ser usada isoladamente ou integradamente aos diferentes métodos de controle biológicos ou ainda com outro tipo de controle (químico, genético, físico e cultural) (GEORGIS, 1990; NARGANES *et al.*, 2015).

O controle microbiano de insetos com Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) torna-se uma alternativa, pois possui características que os tornam vantajosos em relação a outros agentes de controle biológico, visto que estes

microrganismos dentre outros atributos, apresentam formas de resistência que aumentam sua persistência no campo para além da sua capacidade de matar o inseto hospedeiro num período relativamente curto (24 a 48 horas) (KOPPENHÖFER *et al.*, 2007; GIOMETTI *et al.*, 2010).

A utilização de NEPs no controle de pragas já é realizado nos países da Europa, América do Norte, Ásia e Austrália. Nesses países, em meados dos anos 90, cerca de 20 produtos encontravam-se disponíveis no mercado. Sendo que nos últimos 15 anos, nessas regiões, o controle biológico de insetos à base de NEPs tem sido um dos métodos utilizado seja em gramados, plantas ornamentais, na agricultura em geral, na silvicultura e até na saúde animal e, atualmente, há empresas especializadas na produção de formulações contendo NEPs, ainda com utilização restrita a culturas de elevado valor agregado, dado o elevado custo financeiro da aplicação e tecnologias de aplicação. Entretanto os resultados obtidos são positivos, reduzindo gradativamente a quantidade de pesticidas sintéticos aplicados (GEORGIS; HOM, 1992; GREWAL *et al.*, 2001; DOLINSKI, 2006; BORTOLUZZI, 2009). Por exemplo, na Flórida, Estados Unidos, os NEPs são utilizados há muitos anos especialmente para o controle de curculionídeos, sendo possível afirmar, neste caso, a existência de uma relação positiva de custo/benefício da inserção destes agentes no manejo de pragas (DOLINSKI, 2006).

Nas últimas duas décadas percebeu-se o grande potencial para serem utilizados na América do Sul, especialmente no Brasil, para o controle de diversas pragas agrícolas relacionadas a várias culturas, tais como frutíferas em geral incluindo os pequenos frutos, milho, cana-de-açúcar e café. No entanto, a primeira descrição de um nematoide entomófago no Brasil foi realizada por Travassos (1927), que criou o gênero *Steinernema* (HUNT, 2007; SABINO *et al.*, 2014). E, em 1937 registrou-se o gênero *Heterorhabditis*, sendo a primeira espécie brasileira classificada como *Rhabditis humbletoni* descrita por Pereira (ALMENARA *et al.*, 2012).

Os NEPs já foram coletados em todos os continentes exceto na Antártida e ilhas, e certas espécies são consideradas cosmopolitas, como o caso de *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955), *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934),

Heterorhabditis bacteriophora (Poinar, 1976) e *Heterorhabditis indica* (Poinar; Karunakar; David, 1992) (GRIFFIN *et al.*, 2005).

Esses agentes entomopatogênicos são obtidos por meio de isolamentos realizados a partir de insetos infectados ou amostras de solo e, após o isolamento, é possível identificar isolados ou novas espécies. No Brasil, a busca por novos isolados com potencial para o controle de pragas cresce a cada ano, e algumas espécies como *Heterorhabditis amazonensis* (Andaló, 2006) e *Steinernema brazilense* (Nguyen, 2010) são nativas do Brasil e *H. indica* e *Heterorhabditis baujardi* (Phan; Subbotin; Nguyen; Moens, 2003) foram relatados em Rondônia, já as espécies *H. brazilense*, *H. Baujardi* e *H. indica* foram coletados em Minas Gerais, Brasil e *S. brazilense*, *Steinernema rarum* (DE DOUCET, 1986) em áreas de vegetação em diferentes regiões brasileiras (BRIDA *et al.*, 2019).

Os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* tornam-se patogênicos no solo, uma característica ambiental que impacta o potencial de biocontrole, pois a maioria dos insetos passa pelo menos um estágio do seu desenvolvimento no solo (GREWAL *et al.*, 2000; GRIFFIN *et al.*, 2005). *Drosophila suzukii* abandona o fruto e vai para o solo para o desenvolvimento da pupa, permitindo assim a ação do nematoide, e alguns estudos mostram-se promissores no controle deste inseto-praga (CARVALHO *et al.*, 2000; GREWAL *et al.*, 2000; GRIFFIN *et al.*, 2005; BRIDA *et al.*, 2019).

Em estudos visando o uso de NEPs na mortalidade de *D. suzukii*, diferentes espécies de nematoides foram avaliados. Os NEPs *S. feltiae* e *H. bacteriophora* causam taxa de mortalidade a pupas de *D. suzukii* em torno de 40 e 46%, respectivamente, em condições de laboratório (CUTHBERTSON; AUDSLEY, 2016). Avaliando o efeito de NEPs em diferentes estágios de desenvolvimento de *D. suzukii*, isolados de *S. feltiae* e *S. carpocapsae* causaram taxas de mortalidade em torno de 97 e 63%, e reduziram a emergência dos adultos em 90 e 72% (HÜBNER *et al.*, 2017). O isolado *H. bacteriophora* reduziu a população da *D. suzukii* na cultura de morango e morango em 81 e 60%, respectivamente, e mostrou-se compatível com os predadores *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae) e *Dalotia coriaria* Kraatz (Coleoptera: Staphylinidae) (RENKEMA; CUTHBERTSON, 2018). Em laboratório, os nematoides *H. indica*, *H. amazonensis*, *S. carpocapsae*

e *S. feltiae*, infectaram e tornaram inviáveis 35,0, 16,0, 13,0 e 43,0% em pupas e 47,0, 80,0, 84,0 e 57,0% em adultos contra *D. suzukii* (BRIDA *et al.*, 2019).

Os NEPs habitam no solo e podem ser encontrados em quase todos os ecossistemas, seja em áreas agrícolas, florestas, gramados, desertos e praias compondo assim parte considerável da biomassa e da diversidade de organismos (GREWAL, 2000). Atualmente, destacam-se no controle biológicos de vários insetos que são considerados pragas agrícolas, sendo as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae as mais estudadas e utilizadas por serem consideradas as mais eficientes (FERRAZ *et al.*, 1998; BURNELL; STOCK, 2000; ALMENARA *et al.*, 2012).

Os NEPs provocam a morte de insetos com o auxílio das bactérias simbiotes que carregam no seu intestino. Bactérias do gênero *Xenorhabdus* spp. (Thomas & Poinar) e *Photorhabdus* spp. (Boemare, Louis & Kuhl) são associadas as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente. Essas bactérias não sobrevivem no meio ambiente, por isso precisam dos nematoides como proteção e meio de transporte (GREWAL, 2000). Por sua vez, os nematoides beneficiam-se do alimento provido por elas (GREWAL, 2000; ALMENARA *et al.*, 2012).

A infecção dos NEPs no inseto hospedeiro é iniciada com os juvenis infectantes (JIs) do terceiro estágio (J3), os quais carregam consigo as bactérias mutualísticas no intestino, que são altamente patogênicas a insetos (GREWAL, 2012). Os JIs penetram no corpo do inseto pelas aberturas naturais como boca, ânus e espiráculos, ou também através da cutícula no caso dos heterorhabditídeos, que utilizam uma projeção quitinosa para penetrá-la. Em seguida, passam à hemocele onde liberam a bactérias que se multiplicam e produzem toxinas que após curto período de vida matam o inseto. Os JIs se alimentam dos tecidos decompostos pelas bactérias e passam para o último estágio juvenil (J4) formando, em seguida, adultos da primeira geração (machos e fêmeas) (ADAMS; NGUYEN, 2002; ALMENARA *et al.*, 2012).

Os NEPs podem permanecer duas ou três gerações dentro do hospedeiro. Quando o hospedeiro não oferece alimento suficiente, os JIs produzidos na primeira geração emergem do cadáver completando o ciclo de vida curto. Após a

reprodução e multiplicação dentro dos insetos, produzem um novo inóculo que pode infectar outros insetos-praga (ADAMS; NGUYEN, 2002).

Quanto ao ciclo biológico, os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* diferem em pontos importantes. Após a infecção, os JIs de *Steinernema* se desenvolvem em fêmeas anfimícticas (dotadas apenas do aparelho genital feminino) ou machos, sendo o ciclo de vida dióico até o fim. No gênero *Heterorhabditis*, após a infecção cada juvenil infectante se desenvolve numa fêmea hermafrodita protândrica (nascem com o indivíduos do sexo masculino, que em algum momento de sua vida sofrem uma mudança para o sexo feminino), mas nunca em fêmea ou macho. No entanto, a segunda geração é composta de fêmeas e machos em ambos os gêneros (POINAR JR., 1990).

Apesar das inúmeras vantagens, o controle de pragas utilizando NEPs é mais eficiente quando é associada a um conjunto de medidas que, atuando em harmonia entre si e com o meio ambiente, seja capaz de reduzir a população de insetos-praga a níveis que não causem danos econômicos (ALVES, 1998; KOPPENHÖFER, 2007), e a utilização conjunta de NEPs com inseticidas químicos pode aumentar a eficiência no controle de pragas, podendo ainda reduzir consideravelmente o número de aplicações de inseticidas e/ou ainda a dosagem a aplicar (KOPPENHÖFER *et al.*, 2007).

No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entidade responsável pelo registro de e agrotóxicos utilizados para controle de insetos, doenças e plantas daninhas no Brasil, não há ainda inseticidas químicos homologados para o controle de *D. suzukii*. No entanto, estudos realizados no país apontam para os piretróides, tetranortriterpenóides, espinosinas e organosfosforados como os inseticidas a serem utilizados para o controle da mosca principalmente em morangueiro (AGROFIT, 2019) e, alguns inseticidas destes grupos citados apresentam compatibilidade com NEPs.

Ao avaliarem a compatibilidade de *H. indica*, *S. carpocapsae* e *S. glaseri* em 18 inseticidas registrados para controle de lagarta desfloradora *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) e moscas-das-frutas [*Ceratitis capitata* (Wied., 1824) e *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830)], a maioria dos produtos fitossanitários não alterou a infectividade de JIs em *G. mellonella*, após 48 horas

de exposição aos produtos em laboratório (NEGRISOLI JÚNIOR; GARCIA; NEGRISOLI, 2010).

Em outro trabalho com o objetivo de avaliar a influência dos inseticidas abamectina, lufenurom; pimeprozina; azadiractina; fosmete; lambda- cialotrina; pirimicarbe na viabilidade de NEPs (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) sob condições de laboratório, todos os nematoides foram compatíveis aos inseticidas, exceto *S. carpocapsae* e *S. krausseii*, e *H. bacteriophora* que foram sensíveis apenas a abamectina (LAZNIK; TRDAN, 2013).

Na utilização conjunta de nematoides com produtos fitossanitários em subdosagens, a combinação de *Steinernema* sp. mais tiametoxam 250WG em adultos de *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) mostrou mortalidade acima de 70%, ou seja, com adição do inseticida a mortalidade causado por nematoide aumentou em 30% (LEITE *et al.*, 2006).

Avaliando a viabilidade e infectividade de JIs de *S. carpocapsae*, *Steinernema urarium* (Artyukhovsky) (Rhabditida: Steinernematidae) e *H. Bacteriophora* após exposição a diferentes concentrações (250, 500, 1000 e 2000 ppm) de fipronil, um inseticida que atua nos receptores GABA para bloquear o canal de cloreto, verificou-se que os nematoides foram tolerantes a todas as concentrações de fipronil, com a maior mortalidade de 17% observada em 2000 ppm de fipronil após 72 horas de exposição (PINO; JOVÉ, 2005).

Houve também compatibilidade de *S. feltiae* com 17 produtos fitossanitários utilizados em casa de vegetação, observando-se a viabilidade de mais de 80% dos JIs expostos por 72 horas, sendo possível a mistura de tanque de todos os produtos testados, exceto o inseticida terrazole pois inviabiliza os NEPs (AGUILLERA; NARDO, GREWAL, 2003).

Com base nos resultados das pesquisas citadas acima, a maioria dos NEPs é compatível aos inseticidas, pois indica uma interação sinérgica significando um melhor controle de pragas e gestão das próprias medidas. (LEITE *et al.*, 2006; LAZNIK; TRDAN, 2013).

O principal fator responsável pela interação sinérgica entre as duas formas de controle surge de uma disfunção generalizada do sistema nervoso, devido à ação do inseticida em receptores colinérgicos nas membranas pós- sinápticas do inseto, facilitando o ataque e a infecção do JIs ao hospedeiro, sendo que a

eficiência do controle deve-se ao somatório dos efeitos isolados de cada método (LAZNIK; TRDAN, 2013).

Porém, estudos sobre a compatibilidade de nematoides com inseticidas utilizados contra *D. suzukii* são escassos na literatura, tornando-se indispensáveis pesquisas que tragam mais subsídios referentes a compatibilidade destes dois métodos de controle a fim de desenvolver uma estratégia de controle menos prejudicial do consumidor, do meio ambiente e o ser humano. Assim os objetivos do presente trabalho foram:

- a) Avaliar a patogenicidade e virulência de nematoides entomopatogênicos em pupas de *D. suzukii*;
- b) Avaliar a viabilidade e infectividade dos nematoides entomopatogênicos combinados com inseticidas químicos em pupas de *D. suzukii*;
- c) Avaliar o efeito de combinação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos em pupas de *D. suzukii* e os efeitos na longevidade dos adultos.

2 Capítulo I. Controle da mosca-da-asa-machada *Drosophila suzukii* por nematoides entomopatogênicos

2.1 Introdução

A Drosófila-da-asa-machada, *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera, Drosophilidae), é uma praga quarentenária polífaga oriunda do Japão e, atualmente tem se alastrado rapidamente em diversos países ocasionando danos econômicos expressivos em diversas frutíferas, sobre tudo os pequenos frutos (GOODHUE *et al.*, 2011; SANTOS, 2014). No Brasil, as primeiras ocorrências foram registradas a partir de coletas de frutas de morango (*Fragaria vesca* L.) no ano de 2013 e, atualmente alastrou-se em quase todo país (DEPRÁ *et al.*, 2014).

Os danos são ocasionados diretamente pela fêmea por meio de seu ovipositor endurecido que deposita ovos no interior de frutas maduras íntegras (FISCHER *et al.*, 2011; MARÍN, 2015). As larvas quando eclodem, alimentam-se da polpa das frutas tornando-as inviáveis para o consumo (DEPRÁ *et al.*, 2014; ARNÓ, 2015). As puncturas geradas permitem a entrada de microrganismos como bactérias e fungos, que aceleram a decomposição dos frutos ampliando assim as perdas da colheita (BOLDA *et al.*, 2010).

As cerejeiras (*Prunus avium* L), morangueiros, framboeseiras (*Rubus idaeus* L.) e amoreiras são os frutos mais danificados pela *D. suzukii*. Os danos dependem da espécie, podendo chegar a 100% da produção quando não são adotadas medidas de controle e, a preferência desta mosca por pequenos frutos deve-se sobre tudo ao tegumento frágil destes e o teor de açúcar elevado (MALGUASHCA *et al.*, 2010; SANTOS, 2014; SCHLESENER *et al.*, 2017).

Nesse leque de hospedeiros, na região Sul do Brasil o morangueiro é o mais atacado pela mosca, embora, até o momento não haja cálculos das perdas econômicas geradas pelo ataque (SANTOS, 2014; SCHLESENER *et al.*, 2017).

Por apresentar hábito polífago, associada também a sua alta capacidade de dispersão e a presença de hospedeiros alternativos nas proximidades agrícolas, podem dar suporte à permanência de populações na área, dificultando-se assim seu controle (SCHLESENER *et al.*, 2017).

Em países onde a praga ocorre já há vários anos, o uso de inseticidas químicos é o método mais utilizado por ser mais eficiente em relação a mortalidade

causada no inseto. Quanto as alternativas de controle, o uso de bactéria *Wolbachia* sp. pode ser eficiente pois, estudos recentes revelaram que *D. suzukii* é um hospedeiro da bactéria (KAUR *et al.*, 2013; SIOZIOS *et al.*, 2013). O uso de parasitoides e predadores tem sido também uma das táticas utilizadas, sendo que já foram identificados como tendo capacidade de parasitar *D. suzukii*, as espécies *Pachycrepoideus vindemiae* (Rondani) (Hymenoptera: Pteromalidae) e *Trichopria drosophilae* (Perkins) (Hymenoptera: Diapriidae) parasitoides pupais de *Drosophila* sp. na Europa (CHABERT *et al.*, 2013), e os predadores *Orius laevigatus* (Fieber) (Hemiptera: Anthocoridae) (ninfa e adulto) e *Coenosia attenuata* (Stein) (Diptera: Muscidae) (adulto) (FRANCO, 2013).

Ainda não há métodos consolidados para combater a *D. suzukii* no Brasil, provavelmente por ser uma praga recente na região. Portanto, tornam-se necessárias pesquisas por métodos de controle, visando promover um manejo eficaz e sustentável de *D. suzukii* (SANTOS, 2014). No contexto de busca de alternativas, além dos inseticidas químicos, a utilização de nematoides entomopatogênicos (NEPs) possui potencial para ser adotada em programas de manejo integrado de pragas (GREWAL *et al.*, 2000).

A associação simbiótica com bactérias torna os NEPs capazes de invadir e matar um grande número de espécies de insetos, originando o hábito entomopatogênico, ou seja, capacidade de gerar patogênese nos insetos (GAUGLER; KAYA, 1990; NGUYEN; HUNT, 2007). A septicemia decorrente ocasiona a morte do inseto num período de 24 a 48 horas podendo em certos casos durar 72 horas ou um pouco mais (GAUGLER; KAYA, 1990). Os gêneros *Heterorhabditis* Poinar, 1976, associado a bactéria *Xenorhabdus* spp. Thomas & Poinar, 1979 e *Steinernema* Travassos, 1927 a bactéria *Photorhabdus* spp. Louis & Kuhl, 1983, são mais utilizados no controle de insetos pragas por serem consideradas mais eficazes (HUNT, 2007).

Além de causar a morte em um período curto, os NEPs podem ser produzidos artificialmente em grande escala, podendo ser armazenados por longos períodos e aplicados pelos métodos convencionais (WESTERMAN, 1992; KAYA; GAUGLER, 1993), têm habilidade buscar seu hospedeiro, são compatíveis com inseticidas (KAYA; GAUGLER, 1993), persistem por longos períodos no ambiente

natural e não afetam o homem nem outros animais assim como as plantas (MILLER; BEDDING, 1982; FERRAZ, 1986; KAYA; GAUGLER, 1993).

Estudos avaliam a possibilidade de uso de NEPs no controle de *D. suzukii*, e em alguns trabalhos demonstraram a patogenicidade de nematoides contra pupas de insetos com mortalidade que pode chegar a 80% (CUTHBERTSON; AUDSLEY, 2016; HÜBNER *et al.*, 2017) podendo ainda, comprometer a longevidade dos adultos, porém são necessários mais estudos avaliando esses agentes entomopatogênicos, sobretudo novos isolados e as suas respectivas concentrações.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a patogenicidade e virulência de *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Heterorhabditis bacteriophora* HB e *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 em diferentes concentrações, às pupas de *D. suzukii*.

2.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia de Insetos (LAEI) do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética pertencente ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Rio Grande Sul, Brasil.

2.2.1 Manutenção de *Drosophila suzukii*

Os indivíduos foram criados em potes de vidro semitransparentes (45,7cm x 28,0cm x 32,6cm) e alimentados com dieta artificial composta por 1000 mL de água, Ágar (8g), levedura (40g), farinha de milho (80g), açúcar (100g), Ácido propiônico (3mL), Metilparabeno (10%) (8mL), conforme a metodologia de Schlesener *et al.* (2017); a criação foi mantida em BOD a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$.

2.2.2 Obtenção e multiplicação das espécies de NEPs

Os NEPs foram obtidos da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco de Nematoides Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do Instituto Biológico (GOULART *et al.*, 2003), incluindo as seguintes

espécies: *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB.

Cada espécie de nematoide foi multiplicada separadamente em lagartas de quarto a quinto instar de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Utilizou-se cinco lagartas por placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, com duas folhas de papel filtro umedecidas com 1,5mL de suspensão com 500 juvenis/placa, disponibilizando 100 juvenis/lagarta para cada espécie separadamente. Essas placas foram lacradas com filme PVC e acondicionadas em BOD a 25°C (WOODRING; KAYA, 1988). Após três dias, as lagartas mortas foram transferidas para armadilhas de White (WHITE, 1927) e armazenadas em BOD a 25°C por um período de três a 15 dias. Os JIs que abandonaram os cadáveres foram recolhidos em água destilada, filtrados e decantados para a retirada dos corpos gordurosos dos insetos e quantificados em placas de contagem. Os JIs foram utilizados para os experimentos no máximo seis dias após a emergência.

2.2.3 Condução dos experimentos

Foi avaliada a patogenicidade e virulência de duas espécies de NEPs do gênero *Steinernema* (*Steinernema brazilense* IBCBn 24 e *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02) e duas do gênero *Heterorhabditis* (*Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB) em nove concentrações em pupas de *D. sukuzii*.

O experimento foi realizado seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de quatro isolados de NEPs (*S. brazilense* IBCBn 24, *S. carpocapsae* IBCBn 02, *H. bacteriophora* HB e *H. amazonensis* IBCBn 24) em nove concentrações, 0 (testemunha), 200, 400, 600, 800, 1000, 18000, 3600 e 5400 JIs/ml. Cada isolado foi constituído por 80 pupas de *D. sukuzii* dispostas em oito repetições com 10 indivíduos cada. Foram utilizadas no experimento pupas de 24h de idade. As pupas de *D. sukuzii* foram colocadas em recipientes plásticos (200 mL) contendo 50 gramas de areia fina esterilizada, com 10% de umidade. Após as pupas serem enterradas na areia, foram realizadas as inoculações das suspensões dos NEPs nas respectivas concentrações, com auxílio de pipeta; na testemunha foi aplicado 1 mL de água destilada por recipiente (sem nematoide).

Após a inoculação dos JIs de cada espécie de NEP na respectiva concentração, os potes foram mantidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sem luz, com umidade relativa de $70 \pm 10\%$; as avaliações foram feitas após 72 horas e até a emergência completa de *D. suzukii*, contando o número de pupas mortas. As pupas mortas foram retiradas e transferidas para placas de Petri (de 9 cm de diâmetro), e posteriormente dissecadas com auxílio de um alfinete entomológico, para a confirmação da mortalidade por agente entomopatogênico.

Foi utilizada a mortalidade das pupas para obter a patogenicidade (mortalidade de pupas em percentagem) de cada isolado bem como sua virulência (através de contagem de JIs presentes em cada pupa) em diferentes concentrações.

2.2.4 Análise de dados

Os dados foram submetidos a análise de variância mediante a aceitação dos pressupostos da variância (teste de normalidade e homogeneidade) e, comparada as medias pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico R (R DEVELOPMENTCORE TEAM, 2010) em um nível de significância de 5%. Foi utilizado um modelo binomial com função complementar log-log (modelo gompit) para estimar a concentração letal (LC50), por meio do Procedimento Probit no software SAS versão 9.2 (SAS Institute, 2011).

2.3 Resultados e discussão

Todos as espécies avaliadas são patogênicas às pupas de *D. suzukii*, com mortalidade de pupa de até 86,25% em *H. amazonensis* IBCBn 24, 80,0% em *H. bacteriophora* HB, 71,25% em *S. brasilense* IBCBn 06 e 63,75% em *S. carpocapsae* IBCBn 02. Esses NEPs também se mostraram altamente virulentos, atingindo em *H. amazonensis* IBCBn 24 549,75 JIs/pupa, *S. brasilense* IBCBn 06 519,25 JIs/pupa e *H. bacteriophora* HB 260,25 JIs/pupa, mostrando assim a suscetibilidade das pupas aos nematoides utilizados (Tabela 1).

Tabela 1 - Mortalidade e virulência de pupas de *Drosophila suzukii* em diferentes concentrações de *S. brazilense* IBCBn 06, *S. carpocapsae* IBCBn 02, *H. bacteriophora* HB e *H. amazonensis* IBCBn 24 no período de 72 horas e até a emergência do imago.

Mortalidade				
Tratamento	<i>H. bacteriophora</i> HB	<i>S. brazilense</i> IBCBn 06	<i>S. carpocapsae</i> IBCBn 02	<i>H. amazonensis</i> IBCBn 24
0	0,00 + 0,00 f	0,00 + 0,00 f	0,00 + 0,00 e	0,00 + 0,00 g
200	25,00 + 1,22 e	20,00 + 2,96 e	12,50 ± 2,91 d	15,00 ± 2,37 f
400	38,75 + 2,33 de	25,00 + 2,10 de	36,25 ± 1,90 c	26,25 ± 2,75 e
600	50,00 + 2,10 cd	36,25 + 4,91 d	37,50 ± 2,71 c	36,25 ± 4,21 de
800	61,25 + 1,72 bc	56,25 + 3,22 bc	53,75 ± 4,14 b	40,00 ± 3,94 d
1000	53,75 + 1,40 bc	50,00 + 4,10 c	63,75 ± 2,12 a	66,25 ± 3,45 ab
1800	57,5 + 4,11 bc	62,50 + 4,11 ab	57,50 ± 3,15 ab	86,25 ± 2,83 a
3600	67,5 + 3,00 ab	71,25 + 2,00 a	55,00 ± 1,74 b	65,00 ± 4,16 b
5400	80,00 + 2,05 a	67,50 + 3,00 ab	43,75 ± 4,05 c	52,50 ± 3,44 c
<i>F</i>	62,50	79,54	165,37	138,91
<i>gl</i>	8	8	8	8
<i>P</i>	> 0,0001	> 0,0001	> 0,0001	> 0,0001
Virulência				
0	-	-	-	-
200	23,50 ± 0,89 d	32,38 ± 0,82 d	41,123 ± 0,91 d	27,13 ± 0,97 d
400	50,50 ± 2,24 cd	51,38 ± 1,16 d	86,50 ± 1,98 cd	61,63 ± 0,75 d
600	165,00 ± 9,68 bc	168,13 ± 5,79 cd	167,75 ± 8,71 bcd	159,13 ± 6,21 cd
800	252,25 ± 14,64 b	519,25 ± 18,24 ab	275,88 ± 4,84 abc	379,36 ± 9,92 abc
1000	260,25 ± 12,57 b	202,25 ± 7,65 cd	418,13 ± 6,12 a	466,25 ± 13,75 ab
1800	157,62 ± 14,32 bcd	280,13 ± 4,38 c	237,13 ± 4,15 abc	549,75 ± 19,81 a
3600	210,37 ± 4,82b	312,25 ± 3,76b c	314,38 ± 1,75 ab	231,63 ± 8,86 bcd
5400	787,75 ± 17,76 a	612,63 ± 29,86 a	226,88 ± 6,05 bcd	226,00 ± 10,17bcd
<i>F</i>	11,26	85,32	15,78	4,57
<i>gl</i>	8	8	8	8
<i>P</i>	> 0,0001	> 0,0001	> 0,0001	0,04

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

De acordo com os resultados obtidos, o isolado *H. amazonensis* IBCBn 24 apresentou maior mortalidade (86,25%) e virulência (549,75 JIs/pupa) em menores concentrações, 1800 JIs. Em seguida, o *H. bacteriophora* HB causou 80,00% de mortalidade e virulência de 787,75 JIs/pupa, quando aplicado em maior concentração, ou seja, numa concentração de 5400 JIs. Os isolados *S. brazilense* IBCBn 06 e *S. carpocapsae* IBCBn 02 causaram mortalidade de 71,25% e 63,75%

na concentração de 3600 e 1000 JIs respectivamente, com uma virulência de 312,25 e 418,13 JIs.

Nesse sentido, o isolado *H. amazonensis* IBCBn 24 mostrou ser o mais adequado para ser utilizado no controle de *D. suzukii*, devido a sua mortalidade e virulência em menor concentração. Enquanto *S. carpocapsae* IBCBn 02 foi o isolado que menos causou mortalidade.

Foi também possível observar que os heterorhadídeos foram ligeiramente mais eficientes quando comparados com sternematídeos. Este fato provavelmente deve-se as diferenças morfológicas entre estas duas famílias, pois os heterorhadídeos geralmente são muito mais pequenos que os sternematídeos. Por exemplo, *H. amazonensis* tem comprimento corporal que varia de 567 a 612 micrometros, enquanto *S. brazilense* varia de 1023 a 2484 micrometros o que auxilia a explicação da diferença entre as espécies (ALMENARA *et al.*, 2011).

O menor tamanho de JI pode facilitar a penetração, e tendo em conta o tamanho reduzido da *D. suzukii* que pode variar de 2,90 x 0,90mm a 3,18 x 1,06mm (WALSH *et al.*, 2011; DAFF, 2013), provavelmente quanto menor for o JI maior será a taxa de mortalidade e virulência.

Além disso, a penetração dos juvenis de Heterorhabditidae é favorecida pela presença de um dente quitinoso na extremidade anterior do nematoide, com o qual pode raspar a cutícula que facilita a entrada na hemocele de certos hospedeiros (GREWAL *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos mostram uma grande variação em relação a capacidade de NEPs infectar *D. suzukii*. Cuthbertson; Audsley (2016), verificaram que utilizando altas doses de Jis de *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) e *H. bacteriophora*, uma concentração de 10.000 Jis/mL causa taxa de mortalidade da pupas de *D. suzukii* em torno de 40 e 46%, respectivamente, em laboratório. Apesar da alta dose de JIs, a mortalidade foi abaixo de 50%, o que pode ter ocasionado pela competição entre os JIs em infectar a pupa, e comparando estes resultados com os obtidos no presente trabalho pode-se afirmar que ao utilizar uma concentração de JIs acima de 5.000 JIs pode tornar-se inviável. Não só, pensando em uma produção em larga escala destes JIs pode demandar altos custos e ser insustentável.

Numa outra pesquisa, *H. bacteriophora* utilizado na concentração de 2000 JIs/m² reduziu a população da *D. suzukii* na cultura de morango e mirtilo em 81 e 60%, respetivamente (RENKEMA; CUTHBERTSON, 2018).

Avaliando ainda a capacidade dos NEPs da família Steinernematidae em pupas de *D. suzukii*, o nematoide *Steinernema kraussei* (Steiner, Travassos), *S. carpocapsae* e *S. feltiae* causaram mortalidade inferior a 60%, ou seja, 57 %, 52% e 43% respetivamente, utilizados numa concentração de 10.000 JIs/mL (CUTHBERTSON *et al.*, 2014; CUTHBERTSON; AUDSLEY, 2016).

Apesar de haver esta grande variabilidade no nível da suscetibilidade à pupas de *D. suzukii* a maioria dos trabalhos mostra o potencial de NEPs contra o inseto, destacando-se portanto em muitos casos, os nematoides Heterorhabditidae como os mais eficientes na infecção e multiplicação, sendo assim semelhante com resultados obtidos no presente trabalho.

No entanto, não se descarta a possibilidade dos nematoides Steinernematidae serem eficientes contra pupas *D. suzukii*, visto que no presente trabalho, apesar dos NEPs desta família terem causado uma mortalidade pouco inferior a Heterorhabditidae, os JIs penetraram e mataram as pupas conseguindo também multiplicar um número relativamente grande de indivíduos (BRIDA *et al.*, 2019).

Um cenário semelhante pode ser observado em *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera; Drosophilidae), espécie pertencente ao mesmo gênero de *D. suzukii*. Os JIs de *H. bacteriophora* em concentrações de 10 e 1000 JIs/larva causaram mortalidade de 50,00% e 74,00% após 48 horas.

Já em outros dípteros, *Steinernema riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994) (Rhabditida: Steinernematidae) e *H. bacteriophora* RS88 na dose 250 JIs/cm² propiciaram aproximadamente 60% e 70% de mortalidade de pupas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), respetivamente. Na dose de 50, 100 e 200 JIs/pupa, *H. indica* IBCB n5 proporcionou os melhores resultados para *C. capitata* em fase de pupa (59%, 84% e 87% de mortalidade) (SILVA *et al.*, 2010) e a alta patogenicidade de *H. amazonensis* CB 24 contra *A. fraterculus* controlando 70% da população de moscas em laboratório e 67% em campo, em pomar de citros (CANESIN, 2011). Utilizando 4000 JIs/cm² de *Heterorhabditis* sp. por larva de *Anastrepha ludens* observou-se uma mortalidade de 82% (LEZAMA

et al., 1996). A espécie *S. carpocapsae* causou 50% de mortalidade utilizando 58 JIs por larva de *C. capitata* (TAYLOR *et al.*, 1998). Em casa de vegetação, na dose de 50, 100 e 200 JIs/pupa, *H. indica* IBCB n5 proporcionou os melhores resultados para *C. capitata* em fase de pupa (59%, 84% e 87% de mortalidade) (SILVA *et al.*, 2010).

Segundo Grewal *et al.* (2000), os NEPs têm capacidade de causar a mortalidade em 48 horas. Porém, os autores verificaram que o período de mortalidade pode ocorrer por mais dias, semelhante aos resultados obtidos por Souza *et al.* (2012), que verificaram mortalidade até cinco dias em lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), bem como pela mortalidade de *D. suzukii* durante oito dias, observada por Brida *et al.* (2019). Somado a isso pode existir alta taxa de mortalidade do hospedeiro quando o tempo de contato com os nematoides for maior. No entanto, é muito provável que em oito dias de exposição, por exemplo, haja um percentual de mortalidade bastante superior em relação ao tempo de 24 horas (TOLEDO *et al.*, 1999).

Em testes prévios realizados anteriormente ao trabalho, observou-se que em pré-pupas a patogenicidade e virulência causadas pelos NEPs são maiores quando comparados com as pupas. Deste modo, pode-se dizer que quanto mais novo for o hospedeiro, maior será a taxa de mortalidade e a virulência dos mesmos.

Geden *et al.* (1999), também relataram que o percentual de patogenicidade do nematoide a pupas de *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae) foi maior quando as pupas estavam em estágio mais jovem e sem esclerotização do tecido que as reveste. Em lepidópteros, Souza *et al.* (2012), observaram que dentre os NEPs *H. amazonensis* RSC05, *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *H. bacteriophora* HP88, *Steinernema brazilense* IBCB n-06, *Steinernema carpocapsae* All e *Steinernema* sp. CB n-27, os Heterorhabditidae demonstraram penetração mais rápida no corpo do hospedeiro, causando sua morte por septicemia e uma elevada virulência, sendo *H. amazonensis* RSC05 o mais eficiente.

Quanto a concentração Letal média (CL50) de NEPs para controle *D. suzukii*, os resultados demonstraram que após seis dias, período de avaliação, a menor concentração necessária para matar 50% de indivíduos de *D. suzukii* foi observada para o isolado *H. bacteriophora* HB com uma média de 771,63 JIs/mL e *H. amazonensis* IBCBn 24 com uma média de 1.115,49 JIs/mL. Os isolados *S.*

brazilense IBCBn 06 e *S. carpocapsae* IBCBn 02 apresentaram 1.135,30 JIs/mL e 1.145,32 JIs/mL respectivamente (Tabela 2). Esses dados demonstram que maior número de JIs é necessário para atingir pelo menos 50% de mortalidade das pupas de *D. suzukii* como também relatado por Brida *et al.* (2019), que encontraram 1.436,4 JIs/mL para *S. rarum* PAM 25.

Tabela 2 - Concentração letal (CL50) de *H. bacteriophora* HB, *S. brazilense* IBCBn 06, *S. carpocapsae* IBCBn 02 e *H. amazonensis* IBCBn 24 a pupas de *Drosophila suzukii*. IC=intervalo de confiança.

NEPs	CL ₅₀	95% IC
<i>H. bacteriophora</i> HB	771,63	553,72-1026,50
<i>S. brazilense</i> IBCBn 06	1135,30	827,93-1581,14
<i>S. carpocapsae</i> IBCBn 02	1145,32	773,46-1738,79
<i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	1115,49	934,20-1338,32

Concentração letal de JIs (CL50) obtidas através de análise Probit, com um intervalo de confiança (IC) de 95%.

2.4 Conclusões

Os nematoides *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB foram eficientes no controle de *D. suzukii*, causando maior taxa de mortalidade de 86,25% e 80,0%, tendo apresentando também maior virulência de 549,75 JIs/pupa e 787,75 JIs/pupa nas dosagens de 1800 JIs e 5400 JIs respectivamente.

A disponibilização destes resultados auxiliam na busca de alternativas de controle de *D. suzukii*. Porém mais estudos são necessários para dar continuidade na avaliação criteriosa, principalmente em campo, visando encontrar métodos efetivos na luta contra este inseto-praga.

3 Capítulo II. Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com inseticidas químicos no controle de *Drosophila suzukii*

3.1 Introdução

A *Drosophila*-da-asa-manchada, *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) é encontrada na Ásia, Europa e Américas, com potencial de se estabelecer na África e Oceania (dos SANTOS *et al.*, 2017). É uma praga quarentenária polífaga de elevada importância econômica e capacidade de dispersão em cultivos hospedeiros, infestando grande diversidade de frutos (WOLMANN *et al.*, 2017).

Diferente dos demais drosofilídeos que geralmente ovipositam em frutos anteriormente danificados ou em decomposição, *D. suzukii* é capaz de ovipositar no interior de frutos sadios. A abertura durante a oviposição, além de danificar a fruta, permite a entrada de microrganismos fitopatogênicos que causam danos secundários (HAMBY; BECHER, 2016). Entretanto, o dano principal é causado pelas larvas que se alimentam da polpa do fruto, tornando essa espécie uma das principais ameaças fitossanitárias (SCHLESENER *et al.*, 2017).

Os métodos de controle mais comuns aplicados a este tipo de praga é através de pulverização de inseticidas químicos (CINI *et al.*, 2012; WALSH *et al.*, 2011). Porém, estes não possuem especificidade de ação, causando a morte de outras espécies, além de fazer seleção artificial de organismos resistentes, poluírem o ambiente e serem nocivos à saúde humana, sendo necessário reduzir o seu emprego (WALSH, 2011; CAPRILE *et al.*, 2014).

A partir desse contexto, as técnicas de controle biológico se apresentam como uma alternativa promissora (PRATES JÚNIOR *et al.*, 2011). Os nematoides entomopatogênicos (NEPs), p.e, vem se destacando por sua grande eficiência, capacidade adaptativa e fácil aplicação, além da sua compatibilidade com outras medidas de controle (GARCIA *et al.*, 2017; BRIDA *et al.*, 2019). Além disso, apresentam comportamento de busca em solo através de mecanismos quimiorreceptores, e são seletivos a determinadas espécies de insetos (GREWAL *et al.*, 2000).

Os NEPs são frequentemente aplicados em diferentes países em conjunto com outros produtos fitossanitários químicos, naturais e biológicos, fertilizantes e

corretivos de solo, podendo ser misturados em tanques (KRISHNAYYA; GREWAL, 2002). A ação dos agrotóxicos sobre os organismos entomopatogênicos pode variar de acordo com a espécie e linhagem dos patógenos, da natureza química e concentrações dos produtos utilizados (ALVES; MOINO JR; ALMEIDA, 1998). As interações entre produtos químicos e biológicos podem ser positivas (ação sinérgica, aditiva) ou negativas (ação supressiva, antagonista).

Os efeitos de agrotóxicos sobre NEPs podem ser avaliados de forma direta, observando a viabilidade e o comportamento dos juvenis infectantes (JIs) expostos a determinadas concentrações e períodos de exposição a determinado produto químico e, indireta, quando constatando a capacidade dos JIs infectarem determinados insetos hospedeiros (NEGRISOLI JÚNIOR et al., 2008).

A compatibilidade de NEPs com a maioria dos inseticidas químicos quando expostos a eles por curtos períodos, apresenta, portanto, como importantes ferramentas para uso no manejo integrado de pragas (PINTO; JOVÉ, 2005; LAZNIK; TRDAN, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação dos NEPs *Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB associados aos inseticidas químicos, sobre a taxa de mortalidade de pupas de *D. suzukii*.

3.2 Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Ecologia de Insetos pertencente à Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande Sul, Brasil. Os indivíduos de *Drosophila suzukii* foi criada foram criados em potes de vidro semitransparentes e alimentados com dieta artificial conforme a metodologia de SCHLESENER et al. (2017). Os NEPs foram obtidos do banco de Nematoides Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu” do Instituto Biológico, São Paulo.

Os NEPs (*Steinernema brazilense* IBCBn 06, *Steinernema carpocapsae* IBCBn 02, *Heterorhabditis amazonensis* IBCBn 24 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB) foram multiplicadas separadamente em lagartas de quarto a quinto instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (WOODRING; KAYA, 1988). Os JIs foram utilizados para os experimentos no máximo seis dias após a emergência (BRIDA et al., 2019).

3.2.1 Inseticidas químicos

Foram utilizados 10 tipos de inseticidas químicos, preparados na concentração recomendada em caso de alta infestação da praga que atacam a cultura de morango (cultura mais atacada pela praga no Brasil) (Tabela 3). A partir desta proporção foi preparado 350 ml de calda para cada produto. A escolha destes inseticidas foi de acordo com a sua disponibilidade no mercado, e com base em trabalhos científicos realizados para o controle de *D. suzukii* (SCHLESENER *et al.*, 2017; SCHLESENER *et al.*, 2019).

Tabela 3 - Inseticidas químicos registrados para o controle de pragas nas culturas de morangos utilizados nos experimentos.

Ingrediente ativo	Inseticida	Dosagem registrada
abamectina	Vertimec® 18 EC	70 mL / 100 L-1
acetamiprida	Mospilan® WG	40 g / 100 L-1
thiamethoxam	Actara® 250 WG	10 g / 100 L-1
malationa	Malathion® 500 EC	350 mL / 100 L-1
fosmete	Imidan® 500 WP	200 g / 100 L-1
deltametrina	Decis® 25 EC	40 mL / 100 L-1
espinetoram	Delegate® WG	20 mL / 100 L-1
azadiractina	Azamax® EC	300 mL / 100 L-1
novalurom	Rimon 100 EC	50 mL / 100 L-1
lambda-cialotrina	Karate zeon® 50 CS	4g / 100 L-1

3.2.2 Teste de viabilidade e efetividade

A viabilidade e efetividade dos NEPs *S. brazilense* IBCBn 06, *S. carpocapsae* IBCBn 02, *H. bacteriophora* HB e *H. amazonensis* IBCBn 24, com os inseticidas químicos foi estudada com base na metodologia sugerida por Negrisoli Júnior *et al.* (2008), com modificações.

Da solução do inseticida, foi retirada uma alíquota de 1 mL e colocada em cinco tubos de vidro por tratamento, aos quais foram adicionados 2.500 JIs em 1 mL de água destilada, e agitados. O experimento foi mantido em BOD a 22 ± 1 °C e UR de 70 ± 10 %.

A viabilidade dos nematoides foi avaliada 48 horas após a exposição aos produtos. Assim, uma alíquota de 0,1 mL da suspensão foi retirada, sendo observados 100 JIs sob estereoscópio, para a determinação da mortalidade.

Foram considerados mortos aqueles que não responderam ao estímulo com estilete.

A infectividade dos nematoides foi testada no mesmo período que a viabilidade. Os tubos foram completados com água destilada (3 mL) e deixados para decantar por 30 minutos na geladeira. O sobrenadante (cerca de 3 mL) foi descartado e a lavagem repetida por três vezes. Após a última lavagem, 0,2 mL (cerca de 100 JIs) foram retirados do fundo de cada tubo e pipetados em cinco placas de Petri (9 cm de diâmetro) com um papel filtro por tratamento. Cada placa recebeu dez pupas de *D. suzukii* com 24 horas de idade, as quais foram mantidas em BOD a 22 ± 1 °C e UR de 70 ± 10 %, durante cinco dias.

Os valores de mortalidade de nematoides e pupas foram submetidos à análise de variância. As diferenças na viabilidade e infectividade das espécies de NEPs foram analisadas usando-se o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

A eficiência da infectividade dos nematoides a pupas de *D. suzukii* após a sua exposição aos inseticidas foi calculada utilizando a fórmula: $E\% = (1 - mt/mc) \times 100$, em que mt - mortalidade do tratamento e mc - mortalidade do controle (PETERS; POULLOT, 2004), baseado na International Organisation for Biological and Integrated Control Noxious. Os valores de eficiência foram classificadas utilizando o protocolo da IOBC / WPRS (VAINIO, 1992) que sugere classificação 1 - (não – tóxico) para inseticidas que resultem em uma eficiência de mortalidade abaixo de 30%; 2- levemente tóxico (30% a 79%); 3 - moderadamente tóxico (80 a 99%) e 4 - tóxico (>99%).

3.2.3 Teste de associação de inseticidas químicos e NEPs a pupas *Drosophila suzukii* e longevidade dos adultos

Foi realizado um experimento com intuito de avaliar o efeito de associação dos nematoides *H. amazonensis* IBCBn 24 e *H. bacteriophora* HB com os inseticidas espinetoram, azadiractina, malationa, fosmete e novalurom na mortalidade de pupas de *D. suzukii*. Os inseticidas foram avaliados na dose de $\frac{1}{4}$ da recomendada na cultura de morango. A escolha da sub-dose de $\frac{1}{4}$ tem por objetivo proporcionar menor impacto ambiental decorrente dos efeitos dos inseticidas, além de ocasionar baixa mortalidade dos insetos e, consequentemente, permitir um efeito das combinações com os nematoides.

Foram considerados 18 tratamentos (*H. amazonensis* IBCBn 24, *H. bacteriophora* HB, espinetoram, azadiractina, malationa, fosmete, novalurom, *H. amazonensis* IBCBn 24 + espinetoram, *H. amazonensis* IBCBn 24 + azadiractina, *H. amazonensis* IBCBn 24 + malationa, *H. amazonensis* IBCBn 24 + fosmete, *H. amazonensis* IBCBn 24 + novalurom, *H. bacteriophora* HB + espinetoram, *H. bacteriophora* HB + azadiractina, *H. bacteriophora* HB + malationa, *H. bacteriophora* HB + fosmete, *H. bacteriophora* HB + novalurom e testemunha), sendo que cada tratamento foi representado por oito repetições, cada uma formada por 10 pupas agrupadas em um recipiente plástico (de 50 mL), preenchidos com 50 gramas de areia esterilizada, com umidade a 10%.

As concentrações dos juvenis de NEPs foram de 5400 JIs para *H. bacteriophora* e 1800 para *H. amazonensis* IBCBn 24 suspensos em 3 mL. Trata-se de concentrações que proporcionaram maior mortalidade de *D. sukii* no teste de patogenicidade.

Os nematoides foram misturados com inseticidas e agitados, em seguida foram pipetados nos potes plásticos contendo pupas, numa quantidade de 5 mL, sendo 1 mL de calda e 4 mL de JIs. Para tratamentos contendo apenas nematoides pipetou-se 4 mL de JIs. Nos tratamentos onde se aplicou apenas inseticidas utilizou-se 1 mL de calda. Na testemunha pipetou-se 5 mL de água destilada. Os potes foram mantidos em BOD a 22 ± 1 °C e UR de 70 ± 10 % durante seis dias, e após esse período foi avaliada a mortalidade de pupas de *D. sukii*, registrando o número de pupas mortas. Nos tratamentos com nematoides, as pupas mortas foram dissecadas e os JIs contabilizados.

Os adultos que emergiram foram individualizados em gaiolas confeccionadas com copos plásticos de 300 mL para o estudo da longevidade dos espécimes. As gaiolas apresentavam uma abertura de 5 cm de diâmetro na parte superior e foram vedadas com tecido 'voile' no topo para permitir trocas gasosas e evitar o excesso de umidade. Os adultos foram alimentados com 10 gramas de dieta artificial e 1 mL de água destilada oferecida via capilaridade em algodão hidrofílico. Foram mantidas em BOD a 22 ± 1 °C e UR de 70 ± 10 % até a mortalidade dos indivíduos.

3.2.4 Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as diferenças na viabilidade e infectividade das espécies de NEPs foram analisadas usando-se o teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Sendo que para classificar os inseticidas quanto a sua toxicidade foi utilizado o protocolo de da IOBC / WPRS (VAINIO, 1992). Para verificar a incompatibilidade ou compatibilidade da associação dos NEPs e inseticidas, foi primeiro realizado o teste F para todas variáveis estudadas (mortalidade pupas e longevidade dos adultos de *D. suzukii* e número de JIs) e, as diferenças entre medias foram analisadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05\%$). Todas as análises foram feitas por meio de Software estatístico R (R DEVELOPMENTCORE TEAM, 2010).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Viabilidade e infectividade

Poucos inseticidas químicos alteraram a viabilidade dos nematoides após 48 horas de exposição (Tabela 4). Esses resultados confirmam a compatibilidade desses agentes entomopatogênicos com alguns produtos químicos.

A metodologia utilizada neste trabalho para avaliar o efeito de produtos fitossanitários aos nematoides (protocolo de IOBC) considera o produto não tóxico aquele que resultar em eficiência de mortalidade abaixo de 30% quando se tratar de teste de infectividade, não havendo a sua aplicação para o teste de viabilidade. Porém, esta classificação pode nos auxiliar na tomada de decisão sobre a toxicidade dos produtos no teste de viabilidade de JIs. Nesse raciocínio, pode-se considerar que os produtos espinetoram, malationa, abamectina, azadiractina e lambda-cialotrina foram levemente tóxicos ou tóxicos ao isolado *S. carpocapsae* IBCBn 02 pois reduziram a viabilidade dos NEPs em 35,52%, 54,09%, 77,30%, 53,26% e 40,60%, respectivamente.

O nematoide *S. carpocapsae* IBCBn 02 apresentou variação na sensibilidade a determinados tipos de inseticidas químicos, sendo que thiamethoxam, fosmete, acetamiprida e novalurom reduziram ligeiramente sua viabilidade em 8,00%, 15,80%, 13,17% e 12,00%, respectivamente, mostrando a

incompatibilidade com esses produtos. Wouts *et al.* (1982), encontraram alta tolerância do nematoide, com apenas 11,2% de mortalidade dos juvenis infectivos após 72 horas submersos em solução contendo 2000 ppm do inseticida fosmete.

Tabela 4 - Percentagem de viabilidade (Médias \pm Erro Padrão) dos JIs de *S. brazilense* IBCBn 24, *S. carpocapsae* IBCBn 02, *H. amazonensis* IBCBn 24 e *H. bacteriophora* HB após a exposição por 48 horas a inseticidas químicos.

Tratamento	Viabilidade (%)			
	<i>S. brazilense</i> IBCBn 24	<i>S. carpocapsae</i> IBCBn 02	<i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	<i>H. bacteriophora</i> HB
Testemunha	100,00 \pm 0, 00 A	100,00 \pm 0, 00 A	100,00 \pm 0, 00 A	100,00 \pm 0, 00 A
Deltametrina	93,99 \pm 0,55 A	44,920 \pm 0,68 B	93,10 \pm 0,46 A	97,34 \pm 0,67 A
Espinetoram	96,69 \pm 0,48 A	64,48 \pm 0,96 B	98,24 \pm 0,40 A	96,18 \pm 1,35 A
Malationa	96,69 \pm 0,48 A	45,92 \pm 2,77 B	90,72 \pm 2,56 A	87,36 \pm 2,62 A
abamectina	95,71 \pm 0,48 A	22,70 \pm 0,53 B	84,50 \pm 0,54 B	88,29 \pm 3,67 A
azadiractina	95,30 \pm 1,28 A	46,74 \pm 8,86 B	98,89 \pm 0,23 A	91,69 \pm 3,30 A
thiamethoxam	97,34 \pm 0,63 A	92,00 \pm 1,09 A	93,48 \pm 0,85 A	97,04 \pm 0,31 A
Fosmete	94,36 \pm 1,06 A	84, 20 \pm 1,35 B	97,64 \pm 1,26 A	94,92 \pm 0,87 A
acetamiprida	96,84 \pm 0,67 A	86,83 \pm 0,88 B	97,46 \pm 0,69 A	94,27 \pm 0,66 A
Novalurom	96,24 \pm 0,39 A	88,00 \pm 2,64 A	97,76 \pm 0,34 A	95,26 \pm 0,75 A
lambda-cialotrina	87,84 \pm 0,75 B	59,84 \pm 1,46 B	94,20 \pm 1,65 A	90,600 \pm 0,51 A

Médias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$)

Para *S. brazilense* IBCBn 24 e *H. amazonensis* IBCBn 24, apesar de ter havido diferenças significativas de teste de viabilidade em alguns inseticidas quando comparado a testemunha, como o caso de lambda-cialotrina que reduziu 12,16% em *S. brazilense* e abamectina que diminuiu 15,50% em *H. amazonensis* IBCBn 24, estes permitiriam classificar como produtos não tóxicos, pois a diferença foi menor a 30%, se levar em conta a mesma classificação utilizada para efetividade.

Para os demais tratamentos houve compatibilidade na viabilidade de JIs com os inseticidas químicos, sendo que a maior diminuição foi de 12,64%. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Andaló *et al.* (2004), onde em contato com o produto fosmete não houve o efeito negativo a *Steinernema arenarium* Arty., 1967 (Rhabditida: Steinernematidae) com menos de mortalidade de 5,4% de mortalidade.

Em outro estudo realizado por Tavares *et al.* (2009), os inseticidas fosmete, fipronil e tiametoxan não afetaram a viabilidade do isolado *Steinernema* sp. IBCB n-6. Nestes dados também se verifica que o inseticida lambda-cialotrina afetou muito a viabilidade do *S. carpocapsae* IBCBn 02. O mesmo foi observado por Negrisoli Jr.; Garcia; Negrisoli (2010), na qual o inseticida lambda-cialotrina reduziu a viabilidade de *S. carpocapsae* e *Steinernema glaseri* (Steiner) (Rhabditida: Steinernematidae).

Outros produtos como fungicidas e herbicidas também tem sido estudados no que se refere a compatibilidade com NEPs. Avaliando a compatibilidade dos herbicidas simazina + ametrina utilizados na cultura do café, combinado com a espécie *S. carpocapsae*, verificou-se redução da viabilidade do nematoide em 20,57% (CARVALHO, 2003).

Rovesti *et al.* (1988) e Rovesti; Deseö (1990) estudaram a compatibilidade de vários produtos fitossanitários com *H. bacteriophora*, *S. carpocapsae* e *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), verificando baixa viabilidade de *H. bacteriophora* e alta infectividade em lagartas de *G. mellonella* quando expostos aos fungicidas mancozeb e metalaxil + folpet (Rovesti *et al.*, 1988; Rovesti; Deseö, 1990).

Para a avaliação da infectividade, alguns inseticidas químicos afetaram ligeiramente a infectividade dos NEPs (Tabela 5).

Tabela 5 - Infectividade (Médias \pm Erro Padrão) dos JIs de nematoides entomopatogênicos após a exposição por 48 horas aos 10 inseticidas químicos.

Tratamento	Infectividade					
	<i>H. bacteriophora</i> HB			<i>H. amazonensis</i> IBCBn 24		
	Mortalidade (%)	E% ¹	C ²	Mortalidade (%)	E% ¹	C ²
Testemunha	38,00 \pm 3,74 A	—	—	40,00 \pm 5,48 A	—	—
deltametrina	34,00 \pm 2,45 A	10,52	1	14,00 \pm 2,44 B	65,00	2
espinetoram	26,00 \pm 4,00 B	31,58	2	20,00 \pm 4,47 B	50,00	2
malationa	36,00 \pm 2,44 A	5,26	1	20,00 \pm 5,48 B	50,00	2
abamectina	24,00 \pm 2,45 B	36,84	2	16,00 \pm 2,45 B	60,00	2
azadiractina	20,00 \pm 3,16 B	47,37	2	24,00 \pm 6,00 B	40,00	2
thiamethoxam	36,00 \pm 2,44 A	5,26	1	10,00 \pm 3,16 B	75,00	2
fosmete	38,00 \pm 2,00 A	0,00	1	40,00 \pm 0,00 A	0,00	1
acetamiprida	36,00 \pm 2,44 A	5,26	1	14,00 \pm 2,44 B	65,00	2
novalurom	18,00 \pm 3,74 B	52,63	2	14,00 \pm 2,44 B	65,00	2
lambda-cialotrina	18,00 \pm 3,74 B	52,63	2	10,00 \pm 3,16 B	75,00	2

Tratamento	Infectividade					
	<i>S. carpocapsae</i> IBCBn 02			<i>S. brazilense</i> IBCBn 24		
	Mortalidade (%)	E% ¹	C ²	Mortalidade (%)	E% ¹	C ²
Testemunha	42,00 \pm 5,83 A	—	—	16,00 \pm 2,45 A	—	—
deltamethrin	26,00 \pm 2,45 B	38,10	2	14,00 \pm 2,45 A	12,50	1
espinetoram	32,00 \pm 5,83 B	23,81	1	14,00 \pm 5,10 A	12,50	1
malationa	26,10 \pm 5,11 B	38,10	2	12,00 \pm 5,83 A	25,00	1
abamectina	36,00 \pm 8,12 B	14,29	1	14,00 \pm 2,45 A	12,50	1
azadiractina	28,00 \pm 3,74 B	33,33	2	16,00 \pm 2,45 A	0,00	1
thiamethoxam	26,00 \pm 6,78 B	38,10	2	10,00 \pm 3,16 B	37,50	2
fosmete	40,00 \pm 3,47 A	4,76	1	14,00 \pm 2,45 A	12,50	1
acetamiprida	40,00 \pm 4,47 A	4,76	1	6,00 \pm 2,45 B	62,50	2
novalurom	38,00 \pm 4,89 A	9,52	1	14,00 \pm 2,45 A	12,50	1
lambda-cialotrina	18,00 \pm 4,89 B	57,14	2	6,00 \pm 2,45 B	62,50	2

Medias seguidas por letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹ Eficiência de mortalidade calculada pela formula: $E\% = 100 - (1 - mt/mc) \times 100$; ²Classificação toxicológica dos inseticidas: 1- não toxica ($E\% < 30$); 2- levemente tóxico ($E\% = 30\%$ a 79%); 3 - moderadamente tóxico ($E\% = 80$ a 99%) e 4 - tóxico ($E\% > 99\%$).

A infectividade foi menor em *S. brazilense* IBCBn 24 em comparação aos demais isolados. Entretanto, este isolado não sofreu quase nenhum efeito negativo quando associado aos inseticidas químicos, exceto para os inseticidas lambda-cialotrina, thiamethoxam e acetamiprida que foram ligeiramente tóxicos aos nematoides, isto é, uma redução de 10,00%, 6,00% e 10,00%, respectivamente. O

isolado *H. amazonensis* IBCBn 24 foi o mais afetado pelos inseticidas, aliás apenas fosmete (0,00% de redução) não afetou a infectividade do nematoide.

Destaca-se nesse conjunto de inseticidas utilizados, o fosmete como um dos produtos que quase não reduziu a infectividade de nenhum isolado de nematoides. Resultado semelhante foi observado por Koppenhöfer *et al.* (2002), que evidenciaram que a combinação entre os nematoides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae e inseticida neonicotinoides não influencia na infectividade, mesmo se for misturado em taques com inseticidas considerando assim o produto compatível com NEPs. Tavares *et al.* (2009), observaram em laboratório que os inseticidas fosmete, fipronil e tiametoxan não afetaram a infectividade do nematoide *Steinernema* sp. IBCB n-6. Em outro estudo, Koppenhöfer; Kaya (1998) observaram a compatibilidade do inseticida fosmete com NEPs com uma redução abaixo de 3%, considerando o produto compatível com os agentes entomopatogênicos.

A compatibilidade do inseticida fosmete com quase todos NEPs provavelmente deve-se ao facto de ser um inseticida pertencente ao grupo de neonicotinoide, com baixo efeito negativo aos invertebrados benéficos incluindo NEPs (KUNKEL *et al.*, 2001).

Entretanto, o inseticida lambda-cialotrina foi produto que mais afetou a infectividade dos nematoides diminuindo em 20%, 24% 10% e 20% para *H. bacteriophora* HB, *H. amazonensis* IBCBn 24, *S. carpocapsae* IBCBn 02 e *S. brazilense* IBCBn 24 respectivamente. Negrisoni Jr.; Garcia; Negrisoni (2010), também obtiveram resultados negativos para os nematoides entomopatogênicos após ser expostas ao inseticida lambda-cialotrina.

No entanto, tendo como base o protocolo de IOBC, os inseticidas utilizados podem ser aplicados em conjunto com os nematoides, com a possibilidade de um efeito sinérgico.

3.3.2 Resultado de associação de inseticidas e nematoides a pupas *Drosophila suzukii* e longevidade dos adultos

A combinação de inseticidas químicos com NEPs resultaram em sinergia tanto em percentagem de mortalidade de pupas de *D. suzukii* (Figura 1) e reduziu também a longevidade dos espécimes, embora de forma não significativa (Figura 2), entretanto houve diminuição de número de JIs (Tabela 6).

O produto espinetoram associado com nematoide *H. amazonensis* IBCBn 24 resultou em maior mortalidade de pupas de *D. suzukii* (95,00%), apresentando aumento de 17,50% em relação a sua utilização de forma isolada, e menor longevidade de adultos (3,76 dias), ou seja, uma diminuição de 3,36 dias na longevidade quando é utilizada de forma isolada. Quanto ao JIs, quando associado houve uma diminuição de 113,25 JIs.

No isolado *H. bacteriophora* HB houve também maior mortalidade de pupas de *D. suzukii* quando associado com espinetoram, variando de 78,75% quando utilizado isoladamente para 88,75% quando associado com inseticida espinetoram, ou seja, aumento de 10%. No entanto, quanto a longevidade não houve quase nenhuma alteração, menos de um dia (0,63 dias). O número de JIs variou de 262,61 quando utilizada isoladamente para 182,00 quando misturado com o inseticida. Quanto ao número de JIs, os inseticidas diminuíram de forma drástica, onde o inseticida novalurom afetou os JIs, sendo no isolado *H. amazonensis* IBCBn 24 houve uma diminuição de 269,62 JIs e no *H. bacteriophora* HB 217,73 JIs. Este inseticida, novalurom, não resultou em ações sinérgicas para todas variáveis estudadas, porém não afetou negativamente a ação dos NEPs.

De forma geral estes resultados reforçam estudos que indicam que os inseticidas químicos são compatíveis com NEPs, ou seja, a associação dos dois métodos de controle resulta num nível aditivo de proteção, o que oferece um grande potencial para integrar ambas as formas de proteção de plantas em práticas agronômicas. Por exemplo, em trabalho realizado por Nishimatsu; Jackson (1998), a combinação de inseticidas terbufós e fonofós com nematoide *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* para o controle de *Diabrotica virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) mostrou uma ação sinérgica aumentando a mortalidade de larvas

do inseto em diferentes concentrações do inseticida com um incremento de 24,00%.

Em estudo realizado por Koppenhofer *et al.* (2002), comprovaram que os inseticidas dos grupo dos neonicotinóides possui efeito sinérgico contra larvas de besouro-japonês *Popillia japonica* Newman (Coleoptera: Scarabaeidae), escaravelho *Cyclocephala hirta* (Coleoptera: Scarabaeidae) e escaravelho *Cyclocephala pasadanae* Casey (Coleoptera: Scarabaeidae), sendo que em todas combinações a mortalidade larval foi significativamente elevada em relação a testemunha.

Já Polavarapu *et al.* (2007) conduziram ensaios em campo e casa-de-vegetação e, nesses experimentos os NEPs, *Steinernema scarabaei* (Rhabditida: Steinernematidae) e *H. Bacteriophora*, associados aos inseticidas tiametoxam e fosmete para controle de besouro Oriental *Anomala orientalis* Waterhouse (Coleoptera: Scarabaeidae), não havendo sinergia na associação destes agentes de controle. E, apesar de não se verificar o efeito aditivo, os inseticidas não afetaram negativamente a ação dos NEPs.

De acordo com Cui *et al.* (1993); Wang *et al.* (1994), o efeito de sinergismo obtidos nas combinações de NEPs e inseticida pode ser provocado 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 nematoides. Já Ishibashi; Takii (1993) relataram que o aumento na eficácia da combinação de NEPs e inseticida também pode ser devido ao aumento na movimentação e na atividade de nictação do nematoide.

Em trabalho realizado por Gaugler *et al.* (1994), verificaram que o sinergismo obtido com a mistura de *H. bacteriophora* + fosmete na mortalidade de larvas do escarabeídeo *Cyclocephala* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) 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 nematoides e outros inimigos naturais.

Por sua vez, a redução na longevidade dos adultos diminuiu o período de vida das moscas, conseqüentemente reduzindo os danos que podem causar nos frutos.

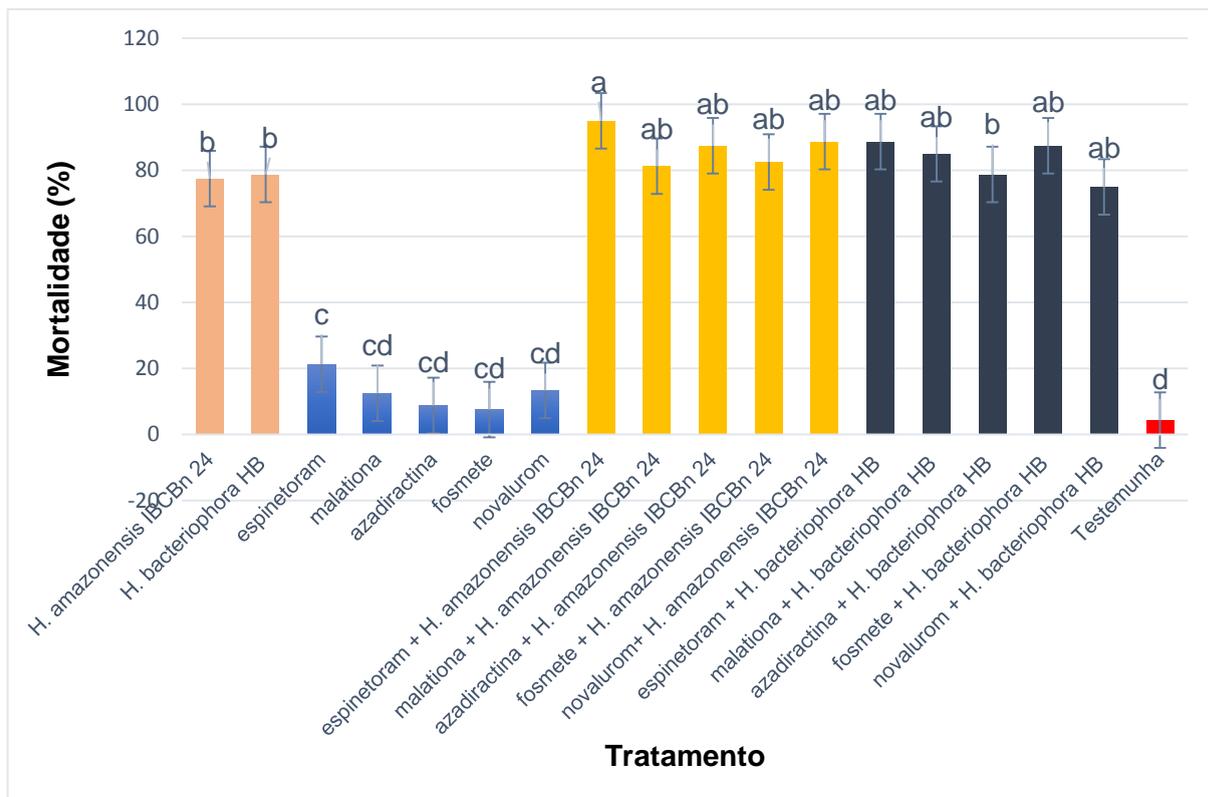


Figura 1 - Percentagem de mortalidade de *Drosophila suzukii* sob combinação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos.

Tabela 6 - Número médio de JIs de *Heterohabditis amazonensis* IBCBn 24 e *Heterorhabditis bacteriophora* HB (Médias \pm Erro Padrão) em pupas *Drosophila suzukii* sob combinação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos.

Tratamentos	JIs
<i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	297,250 \pm 16,36 a
<i>H. bacteriophora</i> HB	262,61 \pm 14,30 a
espinetoram + <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	184,00 \pm 7,19 b
malationa + <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	87,63 \pm 3,21 c
azadiractina + <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	124,00 \pm 7,60 c
fosmete + <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	183,38 \pm 4,98 b
novalurom + <i>H. amazonensis</i> IBCBn 24	27,63 \pm 4,04 d
espinetoram + <i>H. bacteriophora</i> HB	182,00 \pm 16,04 b
malationa + <i>H. bacteriophora</i> HB	90,38 \pm 2,29 c
azadiractina + <i>H. bacteriophora</i> HB	120,88 \pm 5,86 c
fosmete + <i>H. bacteriophora</i> HB	215,13 \pm 4,50 b
novalurom + <i>H. bacteriophora</i> HB	44,88 \pm 0,91 d
<i>F</i>	88,82
<i>Gl</i>	11
<i>P</i>	> 0,0001

Médias seguidas por letras distintas nas colunas difere entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

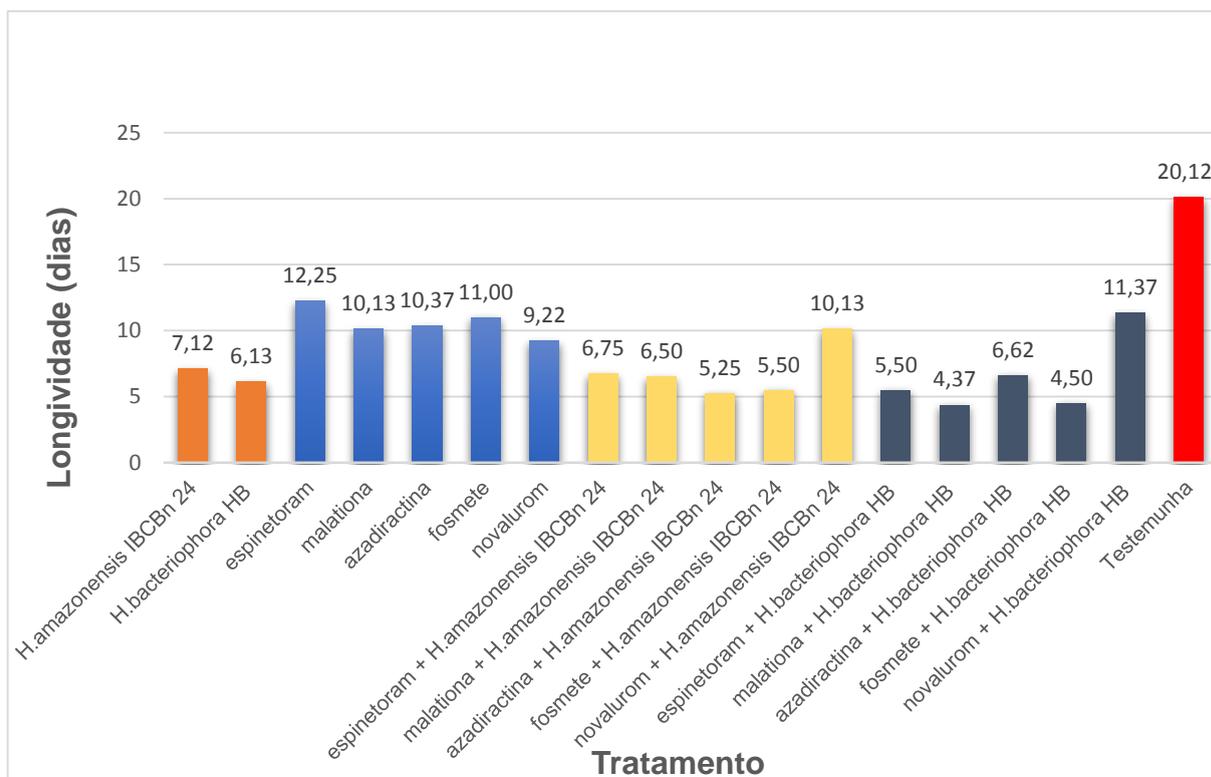


Figura 2 - Longevidade de adultos de *Drosophila suzukii* sob combinação de inseticidas e nematoides entomopatogênicos.

3.4 Conclusões

A associação de inseticidas e NEPs resultaram em sinergia no controle da *D. suzukii*, sendo a combinação do inseticida espinetoram com o nematoide *H. amazonensis* IBCBn 24 permitiu a maior taxa de mortalidade (95,00%).

A interação entre NEPs e controle químico resultou na redução do uso de inseticidas sintéticos.

4 Referências

ADAMS, B.J., NGUYEN, K.B. Taxonomy and systematics. *In*: Gaugler, R. (org). **Entomopathogenic nematology**. New York, p. 1-33, 2002.

ALMERARA, D. P.; NEVES, M. R. C.; KAMITANI, F.L.; WINTER, C. E. Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**. v.6, p. 1-6, 2011.

ALMENARA, D. P.; ROSSI, C.; NEVES, M. R. C.; WINTER, C. E. Nematoides Entomopatogênicos. *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*. 1ed.: v. 12, p. 1, 2012.

ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba. FEALQ. 1998.

ALVES, S. B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. *In*: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**, 2. ed. Piracicaba: FEALQ, p. 217-238, 1998.

ANDALÓ, V.; MOINO JR., A.; SANTA-CECÍLIA, L. V. C. Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**. v. 28, p. 149-158, 2004.

ANFORA, G.; GRASSI, A.; REVARDI, S.; GRAIFF, M. *Drosophila suzukii*: a new invasive species threatening European fruit production. **EnviroChange**, p. 1-7. 2012.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 88p, 2017.

ARNÓ, J., RIUDAVETS, J.; GABARRA, R. Herramientas para el control de *drosophila suzukii*. *Control biológico de Drosophila suzukii: parasitoides y predadores*. **PHYTOMA**, n. 269. 40-41, 2015.

BAKER, R., BAUFLED, P., GRASSI, A., GUITIÁN, J. M., HAUSER, M., HUEPPELSHEUSER, T., KNIGHT, J., REYNAUD, P., SUNLEY, R., PETTER, F.

Drosophila suzukii (Diptera: Drosophilidae). **Spotted Wing Drosophila**. A pest from the EPPO Alert List. 2010.

BERTI FILHO, E. O controle biológico dos insetos-praga. In: CROCOMO, W.B. (Ed.). **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: UNESP, p.87- 104, 1990.

BOLDA, M. P.; GOODHUE, R. E.; ZALOM, F. G. Spotted wing drosophila: potential economic impact of a newly established pest. **Giannini Foundation Agricultural Economics**, v. 13, p. 5-8, 2010.

BREWER, L. J., WALTON, V., DREVES, A., SHEARER, P., ZALOM, F., WALSH, D. Biology and management of spotted wing drosophila on small and stone fruits: Year 2 reporting cycle. Department of Horticulture, Oregon State University. 2012. Disponível em: <[http://horticulture.oregonstate.edu/system/files/SW_D_ResearchReviewYear%](http://horticulture.oregonstate.edu/system/files/SW_D_ResearchReviewYear%>)>. Acesso em: 23 Ago. 2018.

BRIDA, A. L.; WILCKEN, S. R. S.; LEITE, L. G.; GARCIA, F. R. M. Virulence of entomopathogenic nematode to pupae and adults of *Drosophila suzukii* in laboratory. **Revista Científica Rural**, v. 21, p. 126-138, 2019.

BURNELL, A.M., STOCK, S.P. *Heterorhabdits, Steinernema* and their bacterial symbionts - lethal pathogens of insect. **Nematology**, v. 2, p.31-42, 2000.

BURRACK, H. J.; ASPLEN, M.; BAHDER, L. Multistate comparison of attractants for monitoring *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in blueberries and caneberries. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 9, p. 1–9, 2015.

CARVALHO, S. R.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle Biológico. In: Malavasi, A.; Zucchi, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**. São Paulo: Holos,. n.327, p. 47-53. 2000.

CAPRILE, J.; FLINT, M. L.; BOLDA, M. P.; GRANT, J. A.; VAN STEENWYK, R. Spotted wing Drosophila (*Drosophila suzukii*). University of California-IPM. 2013. Disponível em: <<http://www.ipm.ucdavis.edu/EXOTIC/drosophila.html>>. Acesso em: 11 Jul. 2019

CERDEIRA, A.L., & DUKE, S.O. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: A review. **Journal Environmental Quality**, v. 35, p. 1633–1658, 2006.

CHABERT, S. R.; ALLEMAND, M.; POYET, P.; ESLIN, P.; GIBERT. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. **Biological Control**, v. 63, p. 40–47, 2012.

CINI, A.; IORIATTI, C.; ANFORA, G. A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. **Bulletin of Insectology**, v.65, n. 1, p. 149-160, 2012.

CUI, L.; GAUGLER, R.; WANG, Y. Penetration of steinernematid nematodes (Nematoda: Steinernematidae) into Japanese beetle larvae, *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, p. 73-78, 1993.

CUTHBERTSON, A. G. S.; COLLINS, D. A.; BLACKBURN, L. S.; AUDSLEY, N.; BELL, H. A. Preliminary Screening of potential control products against *Drosophila suzukii*. **Insects**, v. 5, p. 488-498, 2014.

CUTHBERTSON, A. G. S; AUDSLEY, N. Further Screening of Entomopathogenic Fungi and Nematodes as Control Agents for *Drosophila suzukii*. Reino Unido, p .1-6, 2016.

DAFF. Verification visit to the USA: *Drosophila suzukii*. Trip Report. Canberra: Plant Division, Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, 2010.

DE DOUCET, M. M. A.; BERTOLOTTI, M. A.; GIAYETTO, A.L.; MIRANDA, M. B. Host range, specificity, and virulence of *Steinernema feltiae*, *Steinernema rarum*, and *Heterorhabditis bacteriophora* (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from Argentina. **Journal Invertebrate Pathology**, v.73, p. 237–242, 1999.

DEPRÁ, M.; POPPE, J. L.; SCHMITZ, H. J.; DE TONI, D. C.; VALENTE, V. L. S. The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in South American Continent. **Journal of Pest Science**, v. 87, p. 379-383, 2014.

DOLINSKI, C. Nematoides como agentes do controle biológico de insetos. In: OLIVEIRA FILHO, E.C.; MONNERAT, R.G. **Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília: EMBRAPA, p.1-10, 2006.

DOS SANTOS, L. A.; MENDES, M. F. ; KRÜGER, A. P. ; BLAETH, MONICA L. ; GOTTSCHALK, M. S.; GARCIA, F. R. M. Global potential distribution of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae). **Plos One**, v. 12, p.174-318, 2017.

DREVES A. J.; WALTON, V.; FISHER, G. A. A new pest attacking healthy ripening fruit in Oregon. Spotted Wing Drosophila: *Drosophila suzukii* (Matsumura). Oregon State University, Extension Service, 2009.

ESTATÍSTICAS DE EXPORTAÇÕES DE FRUTAS. Frutas do Brasil. 2017. Disponível em: <<http://www.frutasdobrasil.org/index.php/pt-br/sala-de-imprensa/clipping-de-noticias/217-estatisticas-de-exportacoes-de-frutas-2017>>. Acesso em: 09 Ago. 2018.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.S.; SCHMITZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.109-120, 2011.

FERRAZ, L. C. C. B. Métodos alternativos de controle de fitonematóides. **Informe Agropecuário**, v. 16, n. 172, p. 23-26, 1992.

FISCHER, S., BAROFFIO, C. A., HOHN, H., KEHRLI, P., LINDER, C. H. *Drosophila suzukii*: monitoring and first observations in Switzerland. **PowerPoint presentation to international meeting on *D. suzukii***, Trento. 2011.

FRANCO, A. M. *Drosophila suzukii* chegou a Portugal com ataque à framboesa. Sanidade. Pequenos frutos. **Voz do Campo**, v.158. 36p, 2013.

GARCIA, F. R. M.; WOLLMANN, J. ; KRUGER, A. P. ; SCHLESNER, D. C. ; TEIXEIRA, C. M. **Biological Control of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae): State of the Art and Prospects**. In: Lewis Davenport. (Org.).

Biological Control: Methods, Applications and Challenges. 1ed. Hauppauge: Nova Science Publishers. v. 1, p. 1-27, 2017.

GAUGLER, R.; KAYA, H.K. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 365p.1990.

GEDEN, C. J.; HOGSETTE, J.A.; JACOBS, R. D. Effect of airflow on house fly (Diptera: Muscidae) distribution in poultry houses. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 416-420, 1999.

GAUGLER, R.; WANG, Y.; CAMPBELL, J. F. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.64, p. 193-199, 1994.

GEORGIS, R. Formulation and application technology. In: *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, p. 173-214, 1990.

GEORGIS, R.; HOM, A. Introduction of entomopathogenic nematode products into Latin America and the Caribbean. **Nematropica**, v.22, p.81-98, 1992.

GIOMETTI, F. H. C.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; SCHMIT, F.S.; BATISTA FILHO, A.; DELL'ACQUA, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, v. 70, p. 81-86, 2011.

GRASSI, A., PALLAORO, M. *Drosophila suzukii*, a revolution for soft fruits in Trentino. Ecofruit. 15th International Conference on Organic Fruit-Growing. **Proceedings for the conference, Hohenheim, Germany**, v.22, p. 179-186. 2012.

GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long term storage of entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, v.30, n.9, p. 995-1000, 2000.

- GRIFFIN, C. T.; BOEMARE, N. E.; LEWIS, E. E. Biology and behavior. In: GREWALL, P. S.; EHLERS, R. U.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Ed.). **Nematodes as Biocontrol Agents**. Boston: Cabi Publishing. p. 47-64, 2005.
- GOODHUE, R. E.; BOLDA, M.; FARNSWORTH, D.; WILLIAMS, J. C.; ZALOM, F. G. Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. **Pest Management Science**, v. 67, n. 11, p. 1396-1402, 2011.
- HÜBNER, A.; ENGLERT, C.; HERZ, A. Effect of entomopathogenic nematodes on different developmental stages of *Drosophila suzukii* in and outside fruits. **Biocontrol**, Darmstadt, Germany. 2017.
- GOULART, R. M.; TAVARES, F. M.; LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M. Formação de um banco de nematoides entomopatogénicos no Instituto Biológico, SP. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8, 2003. São Pedro, **Livro de Resumos**. São Pedro: p. 83, 2003.
- HAMBY, K. A.; BECHER, P. G. Current knowledge of interactions between *Drosophila suzukii* and microbes, and their potential utility for pest management. **Journal of Pest Science**. v. 89, p. 621–630, 2016.
- HUNT, D.J. Introduction. In: *Entomopathogenic Nematodes: systematic, phylogeny and bacterial symbionts*. eds. K.B. Nyguen and D.J. Hunt. p. 1- 26, 2007.
- IEA- Instituto de Economia Agrícola (2018). Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=1902>. Acesso em: 12 Mai. 2018.
- ISHIBASHI, N.; TAKKI, S. Effects of insecticides on movement, nictation, and infectivity of *Steinernema carpocapsae*. **Journal of Nematology**, v 25. p. 204-213, 1993.
- FERRAZ, L.C.C.B. Nematoides entomopatogênicos. In: *Alves, S.B. (org) Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ-USP, p. 551-567. 1998.

KAUR, R.; SIOZOS, S.; ANFORA, G.; PERTOT, I.; ROTA-STABELLI, O. Insights into *Drosophila-Wolbachia* interactions: innovative strategies for insect pest management. Instituto Agrário Di San Michelle All'Adige, Fondazione Edmund Mach. Itália, p. 44-71, 2003.

KAWASE, S.; UCHINO, K.; TAKAHASHI, K. Control of cherry *Drosophila*, *Drosophila suzukii*, injurious to blueberry. **Plant Protection**, v.61, p. 205-209, 2007.

KOPPENHÖFER, A. M.; GREWAL, P. S. Compatibility and interaction with agrochemicals and biocontrol agents. In: GREWAL, P.S.; EHLERS, R.U.; SHAPIRO, D.I. *Nematodes as biocontrol agents*. CABI: Publishing Cambridge. p. 364-381, 2005.

KOPPENHÖFER, A. M.; KAYA, H. K. Sinergism of imidacloprid and an entomopathogenic nematode: A novel approach to white grub (Coleoptera: Scarabaeidae) control in turfgrass. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 618-623, 1998.

KOPPENHÖFFER, A. M.; GREWAL, P. S.; FUZY; E. M. Differences in penetration routes and establishment rates of four entomopathogenic nematode species into our white grub species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, p. 184-192, 2007.

KOPPENHÖFER, A. M.; COWLES, R.S.; COWLES, E. A.; FUZY, E. M.; BAUMGARTNER, L. Comparison of neonicotinoid insecticides as synergists for entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v. 24. p. 90-97, 2002.

KRISHNAYYA, P.V.; GREWAL, P. S. Effect of neem and selected fungicides on viability and virulence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.12. p. 259-266, 2002.

KUNKEL, B.A., D.W. HEALD, D. A. POTTER, A. Lethal and sublethal effects of bendiocarb, halofenozide, and imidaclopid on *Harpalus pennsylvanicus*

(Coleoptera: Carabidae) following different modes of exposure in turfgrass.

Journal of Economic Entomology, v.94 n.1, p. 60-67, 2001.

LAZNIK, Z.; TRDAN, S. The influence of insecticides on the viability of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) under laboratory conditions. **Pest Management Science**, v. 70, n. 5, p. 784-789, 2013.

LEZAMA, G. R.; ALATORRE, R. R.; BODAJIL, J. L. F. Virulência de cinco cepas de los hongos entomopatógenos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en huevos y larvas neonatas. **Revista Internacional de Controle Biológico**, v.3, n.1, p.35-39. 1996.

LEITE, L.G.; TAVARES, F.M.; GINARTE, C.M.A.; CARREGARI, L.C.; BATISTA FILHO, A. Nematóides entomopatogênicos no controle de pragas. In: PINTO, A.S.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M.; MALERBO-SOUZA, D.T. (Org.). **Controle Biológico de Pragas: na prática**. Piracicaba: CP 2. p.45-53, 2006.

PINO, F. G.; JOVE, M. Compatibility of entomopathogenic nematodes with fipronil. **Journal of Helminthology**, v. 79, p. 334-337, 2005.

MALGUASHCA, F.; FERGUSON, H.; BAHDER, B.; BROOKS, T.; O'NEAL, S.; WALSH, D. Spotted wing Drosophila, grape update: injured and ripening fruit may become more attractive: Monitoring strongly recommended. Pullman: Washington State University Extension, 2010.

MARÍN, C. Herramientas para el control de *Drosophila suzukii*. Captura de *Drosophila suzukii* com suzukii trap®: modo de acción y experiencias de campo. **PHYTOMA**, v.21, p. 18-19, 2015.

MILLER, L.A.; BEDDING, R.A. Field testing of the insect parasitic nematode *Neoaplectana bibionis* (Nematoda: Steiternematidae) against currant borer moth *Synanthedon tipuliformis* (Lepidoptera: Sesiidae) in blackcurrants. **Entomophaga**, v.27, p.109- 114, 1982.

MONTEYS, V. S.; ROYO, R. S. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), nueva amenaza para las producciones agrícolas. **PHYTOMA**. v.269, p.40-41.2011.

NARGANES, A. G., FIEL, R. A., ARGUELLES, M. B. Situación de *Drosophila suzukii* en España. Productos fitosanitarios ensayados en Asturias para el control de *Drosophila suzukii* durante 2014 en arándano. **PHYTOMA**, v.269, p. 64-65, 2015.

NEGRISOLI JUNIOR, A.S.; BARBOSA, C.R.C.; MOINO JUNIOR, A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/ WPRS. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.111-116, 2008.

NEGRISOLI JÚNIOR, A. S.; GARCIA, M. S.; NEGRISOLI, C. R. C. B. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with registered insecticides for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory conditions. **Crop Protection**, v. 29, n.6, p. 545-549, 2010.

NGUYEN, K. B.; HUNT, D. J. Entomopathogenic nematodes; Systematics, Phylogeny and bacterial symbionts. **Nematology Monographs and Perspectives**. v. 5, 816p, 2007.

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

PARANHOS, B.A.J. Moscas-das-frutas que oferecem riscos à fruticultura brasileira. In: *Simpósio Internacional de Vitivinicultura*, Anais. Petrolina, Embrapa Semi-Árido. 2008.

PINTO, F.G.; JOVÉ, M. Compatibility of entomopathogenic nematodes with fipronil. **Journal of Helminth**, v.79, p. 333-337, 2005.

PETERS, A.; POULLOT, D. Side effects of surfactants and pesticides on entomopathogenic nematodes assessed using advanced IOBC guidelines. **IOBC / WPRS Bulletin**, v.27, n.6, p. 67-72, 2004.

- POINAR, G. O. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler, R.; Kaya, H.K. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Florida. p. 23-60, 1990.
- POLAVARAPU, S.; KOPPENHÖFER, A. M.; BARRY, J. D.; HOLDCRAFT, R. J.; FUZY, E. M. Entomopathogenic nematodes and neonicotinoids for remedial control of oriental beetle, *Anomala orientalis* (Coleoptera: Scarabaeidae), in highbush blueberry. **Crop Protection**, v. 26, p. 1266–1271, 2007.
- PRATES JÚNIOR, P.; OLIVEIRA, M.Z.A; BARBOSA, C. J. Agroecologia: manejo de pragas e doenças de plantas. **Bahia Agrícola**, v.9, n.1, p.32-33, 2011.
- PROFAIZAER, D., ANGELI, G., TRAINOTTI, D., MARCHEL, L., ZADRA, E., SOFIA, M., LORIATTI, C. *Drosophila suzukii*: valutazione di agrofarmaci ed analisi sul corretto posizionamento in campo. **ATTI Giornate Fitopatologiche**, v.1, p. 229-235, 2012.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2010.
- SABINO, P. H. S.; MOINO, A. Jr.; ANDALÓ, V. Effects of some insecticides on the neutral lipid percentage, survival and infectivity of *Steinernema carpocapsae* ALL and *Heterorhabditis amazonensis* JPM 4. **Nematoda**, v. 1, n. 1, 2014.
- RENKEMA, J.M.; CUTHBERTSON A. G. S. () Impact of multiple natural enemies on immature *Drosophila suzukii* in strawberries and blueberries. **BioControl**, v.63, p. 719-728, 2018.
- ROVESTI, L.; HEINZPETER, E.W.; TAGLIENTE, F.; DESEÖ, K.V. Compatibility of pesticides with entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). **Nematology**, v.34, p.462-476, 1988.
- ROVESTI, L.; DESEO, K.V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematologica**, v.36, p.237-245, 1990.

SANTOS, R. S. S. dos. *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae) atacando frutos de morangueiro no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 4005-4011, 2014.

SANTOS, R. S. S. dos; KLESENER, D. F.; BIZOTTO, L. A.; PEREIRA, A. R. Comportamento da *Drosophila suzukii* em cultivos de pequenos frutos no Rio Grande do Sul. AGAPOMI. 4p, 2018.

SCHLESENER, D. C. H. ; WOLLMANN, J. ; KRUGER, A. ; MARTINS, L. N. ; GEISLER, F. C. S. ; GARCIA, F. R. M. Rearing method for *Drosophila suzukii* and *Zaprionus indianus* (Diptera: Drosophilidae) on artificial culture media. **Drosophila information Service**, v. 100, p. 185-189, 2017.

SCHLESENER, D. C. H. ; WOLLMANN, J. ; PAZINI, J. B. ; GRUTZMACHER, A. D. ; GARCIA, F R M . Effects of insecticides on adults and eggs of *Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 43, p. 208-214, 2017.

SCHLESENER, D. C. H.; WOLLMANN, J. ; PAZINI, J. ; PADILHA, A. C.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, F. R. M. Insecticide Toxicity to *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) parasitoids: (Hymenoptera: Diapriidae) and (Hymenoptera: Pteromalidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 2019, p. 1-10, 2019.

SILVA, A. B.; BRITO, J. M. de. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. **Revista Agropecuária**, v. 36, n. 1, p. 248-258, 2015.

SILVA, A. C.; BRAGA, V. O; NASCIMEN, L. S. Efeito de nematoides entomopatogênicos na mortalidade da mosca-do mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e do gorgulho-da-goiaba, *Conothachelus psidii*. **Nematologia Brasileira**, v. 34, n.1, p. 31-40, 2010.

SIOZIOS, S.; CESTARO, A.; KAUR, R.; PERTOT, I.; ROTA-STABELLI, O.; ANFORA, G. Draft genome sequence of the *Wolbachia* endosymbiont of *Drosophila suzukii*. **Genome Announc**, v.1, n.1, p. 1-2, 2013.

SOUZA, L. M.; MOINO JUNIOR, A.; MERTZ, N. R.; SILVA, M. A. T.; Soares, F. M.; BONETE FILHO, R. Z. Nematoides Entomopatogênicos e Compatibilidade com Imidaclopride Visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* em Viveiro Florestal. **Nematologia Brasileira**, v.38, p. 32-41, 2012.

TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, L.G.; LEITE, L.C.; ALMEIDA, A. C. Efeitos sinérgicos de combinações entre nematoides entomopatogênicos (Nemata: Rhabditida) e inseticidas químicos na mortalidade de *Sphenophorus levis* (Vaurie) (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay**, v. 4, n. 7, p. 1-10, 2009.

TAYLOR, D. B.; SZALANSKI, A. L.; ADAMS, B. J.; PETERSON, R. D. Susceptibility of house fly (Diptera: Muscidae) larvae to entomopathogenic nematodes (Rhabditidae, Steinernematidae). **Biological Control**, v.27, n. 6, p. 1514-1519, 1998.

TOLEDO, J.; RASGADO, M.A.; IBARRA, J.E.; GÓMEZ, A.; LIEDO, P.; WILLIAMS, T. Infection of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) larvae by *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technol**, v.15, n.6, p. 627-634, 2005.

VAINIO, A. Guideline for laboratory testing of the side-effects of pesticides on entomophagous nematodes *Steinernema* spp. **IOBC / WPRS Bulletin**, v.15. p. 145-147, 1992.

WALSH, D. B.; BOLDA, M. P.; GOODHUE, R. E.; DREVES, A. J.; LEE, J.; BRUCK, D. J.; WALTON, V. M.; O'NEAL, S. D.; ZALOM, F. G. *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive pest of ripening soft fruit expanding its geographic range and damage potential. **Journal of Integrates Pest Management**, v. p. 1-8, 2011.

WANG, Y.; CAMPBELL, J. F.; GAUGLER, R. Infection of entomopathogenic nematodes *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis bacteriophora* against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v 66. p. 178-184, 1994.

WESTERMAN, P. The influence of time of storage on performance of the insect parasitic nematode, *Heterorhabditis* sp. *Fundamentals in Applied Nematology*. v.15, p.407-412, 1992.

WHITE, G. F. A Method for Obtaining Infective Nematode Larvae from Cultures *Science*. v.66, p. 302-303, 1927.

WOLLMANN, J. ; SCHLESENER, D. C. H. ; FERREIRA, M. S. ; KRUGER, A. P. ; BERNARDI, D. ; GARCIA, J. A. B. ; NUNES, A. M. ; GARCIA, M. S. ; GARCIA, F. R. M. Population Dynamics of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Berry Crops in Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 48, p. 1-7, 2019.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. "Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: A Handbook of Biology and Techniques." Southern Cooperative Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR. 1988.

WOUTS, W. M.; MRÁČEK, M. Z.; GERDIN, S.; BEDDING, R. A. *Neoaplectana* Steiner 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos (Nematoda: Rhabditida). *Systematic Parasitology*, v. 4, p. 147-154, 1982.

ZALOM, F. G. Situación de *Drosophila suzukii* en otros países. Investigación y estado del control de *Drosophila suzukii* en los Estados Unidos. **PHYTOMA**. v. 269. p. 85-86, 2015.

ZIL, C. V.; MALAN, A. P. Cost-effective culturing of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* and entomopathogenic nematode production in various hosts. **African Entomology**, v. 23, n. 2, p. 361-375, 2015.