



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA APARECIDA GUIDE

**SELEÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E
AVALIAÇÃO DA SUA COMPATIBILIDADE COM
CIANTRANILIPROLE VISANDO O CONTROLE DE
Hypothenemus hampei (FERRARI, 1867) (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

BRUNA APARECIDA GUIDE

**SELEÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E
AVALIAÇÃO DA SUA COMPATIBILIDADE COM
CIANTRANILIPROLE VISANDO O CONTROLE DE
Hypothenemus hampei (FERRARI, 1867) (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane Sandra Alves

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Guide, Bruna Aparecida.

Seleção de nematoides entomopatogênicos e avaliação da sua compatibilidade com ciantraniliprole visando o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae / Bruna Aparecida Guide. - Londrina, 2016.
55 f. : il.

Orientador: Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves.

Coorientador: Viviane Sandra Alves.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Broca-do-café - Teses. 2. Pragas agrícolas - Teses. 3. Controle biológico - Teses. 4. Café Doenças e pragas - Teses. I. Neves, Pedro Manuel Oliveira Janeiro . II. Alves, Viviane Sandra . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

BRUNA APARECIDA GUIDE

**SELEÇÃO DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E
AVALIAÇÃO DA SUA COMPATIBILIDADE COM
CIANTRANILIPROLE VISANDO O CONTROLE DE
Hypothenemus hampei (FERRARI, 1867) (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira
Janeiro Neves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Mauricio Ursi Ventura
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^a. Patricia Helena Santoro
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Edson e Rosângela, por todo apoio, amor, carinho, dedicação e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda graça e bênçãos concedidas a cada dia. Aos meus Pais, Edson e Rosângela, por serem meu alicerce e por não medirem esforços para que eu pudesse realizar mais esta conquista.

A minha irmã, Hauanna, por todo apoio e incentivo.

A toda minha família, vó Nice, vó Zulmira, vô Otávio, tios, tias, primos e primas, a minha sogra Ester que, de alguma forma contribuíram e torceram por mim.

Ao meu melhor amigo, companheiro e namorado, Thiago, por estar sempre comigo.

As minhas melhores amigas, Karine, Bá e Diana, que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Aos amigos de laboratório, Kati, Marcelo, Hata, Gi, Mateus, Eduardo, Floyd, Matheus, Tainara, Adriana, Adriano, Ana Carol, Tati, Mari, Gabi e Orcial, que fizeram os dias serem mais divertidos.

Aos colegas de casa, Same e Willian, pela boa convivência durante esses dois anos. Ao técnico do laboratório, Davi, por toda ajuda durante os experimentos.

A Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do curso. A todos os professores do programa do Mestrado, em especial aos da Entomologia, Prof. Mauricio, Prof. Amarildo e Prof. Ayres, por todo conhecimento passado durante as disciplinas e até mesmo fora delas.

A minha co-orientadora, Vivi. Obrigada por tudo. Por sempre me atender, me ensinar e me apoiar. Pela confiança durante a graduação e durante o mestrado e também pela amizade.

Ao meu orientador, Prof. Pedro, pela confiança, pelos ensinamentos, pela dedicação e amizade.

A Edilene e a Dr^a. Ana Meneguim, por fornecerem as brocas-do-café utilizadas neste estudo. Ao Instituto Biológico e a UENP – CP, por fornecerem os isolados de nematoides entomopatogênicos.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa.

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei
Ou nada sei...

Almir Sater

GUIDE, Bruna Aparecida. **Seleção de nematoides entomopatogênicos e avaliação da sua compatibilidade com ciantraniliprole visando o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae)**. 2016. 55f. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, causa significativos prejuízos a esta cultura, pois, seu ataque afeta os frutos do café em seus diferentes estádios de desenvolvimento e conseqüentemente leva a perdas na produção. Seu controle é dificultado devido ao seu hábito críptico, uma vez que passa todo o ciclo de vida no interior do fruto de café, dificultando a ação de inimigos naturais, bem como a de produtos químicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a virulência de nematoides entomopatogênicos (NEPs) sobre a broca-do-café *H. hampei* e a sua compatibilidade com o inseticida ciantraniliprole em condições de laboratório. Foi avaliada a patogenicidade e virulência de 16 isolados dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, contra larvas e adultos de *H. hampei* sob condições controladas. Os isolados mais virulentos aos insetos (larvas e adultos) foram utilizados em teste de inoculação tópica sobre frutos de café infestados na concentração de 100 Juvenis Infectantes (JIs)/fruto e foram avaliados também, quanto a viabilidade e a infectividade quando combinados com o inseticida ciantraniliprole. Os isolados *S. feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (ALHO) foram os que apresentaram maior porcentagem de mortalidade sobre os adultos, ambos promovendo 54% de mortalidade. Já para larvas, foi possível observar uma maior virulência dos isolados *Steinernema feltiae*, *Heterorhabditis amazonenses*, *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis* sp. (JPM4), *Heterorhabditis* sp. (NEPET11), *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n 46) e *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n 44) que causaram 100% de mortalidade. Com relação ao teste de inoculação tópica sobre frutos infestados, observou-se que, tanto *S. feltiae* quanto *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46) não foram capazes de penetrar o fruto pelo orifício feito pela broca, infectar e causar a morte dos insetos. O produto ciantraniliprole afetou a viabilidade dos JIs de *S. feltiae* e IBCB-n 46 (*Heterorhabditis* sp.), principalmente após 48 horas de exposição, porém, apresentou menor efeito sobre a infectividade.

Palavras-chave: Controle Biológico. *Heterorhabditis*. *Steinernema*. *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. Compatibilidade.

GUIDE, Bruna Aparecida. **Selection of the entomopathogenic nematodes and evaluation of its compatibility with cyantraniliprole for the control of *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae)** 2016. 55p. Dissertation (Master's Degree) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, causes significant damage to this crop, because his attack affects coffee fruits at different development stages and consequently losses in production. Its control is difficult due to its cryptic habits, it passes all life cycle inside the coffee fruit, making difficult the action of natural enemies, as well as chemicals. The objective of this study was to evaluate the virulence of entomopathogenic nematodes (EPNs) on the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* and its compatibility with the insecticide cyantraniliprole under laboratory conditions. Pathogenicity and virulence of 16 isolates of *Steinernema* and *Heterorhabditis* were evaluated, for coffee berry borer larvae and adults on artificial diet under laboratory conditions. The most virulent isolates to both larvae and adults were used by topical inoculation tests using coffee fruits (berries) infested by the insect using a concentration of 100 infective juveniles (IJs) / fruit. The same isolates were also evaluated for viability and infectivity when combined with cyantraniliprole. The isolates *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis* sp. (Alho) were those with high virulence for adults, promoting both 54% mortality. For larvae, we observed a high virulence of *S. feltiae*, *Heterorhabditis amazonensis*, *Heterorhabditis indica*, *Heterorhabditis* sp. (JPM4), *Heterorhabditis* sp. (NEPET11), *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46) and *Heterorhabditis* sp. (IBCB- n44) that promote 100% mortality. Regarding topical inoculation test on infested fruits, it was observed that both *S. feltiae* as *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46) were not able to penetrate the fruit through the hole made by the borer, infect and cause death of insects. Cyantraniliprole formulations affected the viability of IJs of *S. feltiae* and *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46), mainly after 48 hours of exposure, however, smaller effect on infectivity.

Keywords: Biological Control. *Heterorhabditis*. *Steinernema*. *Coffea arabica*. *Coffea canephora*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de nematoides entomopatogênicos dos gêneros <i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i> utilizados no teste de seleção contra larvas e adultos de <i>Hypothenemus hampei</i> em condições de laboratório	28
Tabela 2 – Composição da dieta de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera: Pyralidae) adaptada de Parra (1998).	29
Tabela 3 – Porcentagem de mortalidade confirmada de adultos de <i>Hypothenemus hampei</i> causada por nematoides entomopatogênicos (<i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>) em condições de laboratório (25±1° C e sem fotofase).....	35
Tabela 4 – Mortalidade confirmada de larvas de <i>Hypothenemus hampei</i> causada por nematoides entomopatogênicos (<i>Steinernema</i> e <i>Heterorhabditis</i>) em condições de laboratório (25±1°, UR 70±10% e sem fotofase).	38
Tabela 5 – Porcentagem de viabilidade (M±EP) de <i>Steinernema feltiae</i> e <i>Heterorhabditis</i> sp. (IBCB-n46) após 24 horas de exposição ao produto fitossanitário ciantraniliprole (protocolo IOBC / WPRS, Vanio, 1992).....	42
Tabela 6 – Porcentagem de infectividade (M±EP) de <i>Steinernema feltiae</i> e <i>Heterorhabditis</i> sp. (IBCB-n46) a lagartas de último instar de <i>Galleria mellonella</i> após 24 e 48 horas de exposição ao produto fitossanitário ciantraniliprole (protocolo IOBC / WPRS, Vanio, 1992).....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO GERAL	13
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	CULTURA DO CAFÉ	14
3.2	A BROCA-DO-CAFÉ	15
3.2.1	Métodos de Controle da Broca-do-Café	17
3.3	NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	18
3.3.1	Importância dos Nematoides Entomopatogênicos no Controle Biológico de Insetos	20
3.3.2	Nematoides Entomopatogênicos no Controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	22
3.3.3	Compatibilidade de Nematoides Entomopatogênicos a Produtos Fitossanitários	23
3.3.3.1	Ciantraniliprole (Benevia™)	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	28
4.2	CRIAÇÃO DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)	29
4.3	MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS	29
4.4	PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A <i>H. HAMPEI</i>	30
4.4.1	Teste Patogenicidade e Virulência com Adultos	31
4.4.2	Teste Patogenicidade e Virulência com Larvas	31
4.5	INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DE FRUTOS DE CAFÉ POR <i>H. HAMPEI</i>	32
4.6	APLICAÇÃO DE JUVENIS INFECTANTES SOBRE FRUTOS DE CAFÉ INFESTADOS	32
4.7	COMPATIBILIDADE DE ISOLADOS DE NEPS COM CIANTRANILIPROLE	33

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	TESTE DE SELEÇÃO COM ADULTOS	35
5.2	TESTE DE SELEÇÃO COM LARVAS	38
5.3	APLICAÇÃO DE JUVENIS INFECTANTES SOBRE FRUTOS DE CAFÉ INFESTADOS	40
5.4	COMPATIBILIDADE DE ISOLADOS DE NEPS COM CIANTRANILIPROLE	41
	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) é cultivado em diversas regiões brasileiras e desempenha papel importante como fonte de geração de empregos no país e no mundo, sendo o segundo produto mais comercializado depois do petróleo. O Brasil é o maior produtor e exportador, sendo responsável por cerca de 30% da produção mundial (MAPA, 2015).

A ocorrência de problemas fitossanitários como, ataque por insetos pragas e doenças, pode causar redução significativa na produção de grãos de café. Há relatos de várias espécies de pragas que atacam o café, todavia, destaque deve ser dado à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) (VEGA et al., 2009).

H. hampei coloniza frutos de café nos quais se alimenta, se desenvolve e se reproduz. Os danos podem ser vistos em todos os estádios de maturação, desde os frutos verdes até maduros ou secos (SOUZA; REIS, 1997) e, além disso, o ataque pode facilitar a entrada de microrganismos que se desenvolvem nos grãos, afetando a qualidade da bebida (BENASSI, 1989).

Dentre os métodos de controle, o comumente utilizado é o controle químico. O endossulfan, atualmente proibido pela Anvisa, foi um dos inseticidas mais utilizados para o controle da broca em decorrência da sua eficiência. Contudo, apesar de ser um método eficiente no controle de pragas, não se restringindo apenas à broca-do-café, o uso do controle químico ao longo do tempo pode acarretar problemas irreversíveis como seleção de populações resistentes, contaminação de ambientes terrestres e aquáticos, bem como a contaminação humana (ANVISA, 2015)

Faz-se necessária a busca por controles alternativos ao químico. Alguns métodos para o controle da broca-do-café vêm sendo estudados. Destaca-se, pela eficiência, o controle cultural, que é realizado por meio da catação de frutos caídos e deixados na planta quando da colheita, evitando a reinfestação do inseto na entressafra. No entanto, este método não é muito utilizado pelos produtores devido à demanda elevada de mão-de-obra e aumento nos custos de produção (VEGA et al., 2009).

Alguns estudos sobre a utilização do controle biológico também já foram realizados, como o uso de parasitoides da família Bethyidae. Porém, os

resultados não foram promissores devido a problemas como dificuldades de criação e produção massal, adaptação e taxas de parasitismo não significativas (VEGA et al., 2009). Trabalhos utilizando fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Balsamo Vuillemin) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin), também demonstraram que estes são importantes agentes de controle, entretanto, necessitam de condições ideais para se manterem viáveis no ambiente dificultando sua utilização (NEVES; HIROSE, 2005).

O controle de insetos à base de nematoides entomopatogênicos (NEPs) pode ser uma alternativa viável, eficiente e segura. Estes entomopatógenos apresentam características como, capacidade de busca ao hospedeiro e compatibilidade com produtos fitossanitários que os tornam vantajosos em relação a outros agentes de controle biológico. Além disso, estudos demonstraram que NEPs conseguem penetrar frutos de café caídos no solo através do orifício feito pela broca, podendo então apresentar bons resultados no controle de *H. hampei* (LARA et al., 2004; MOLINA; LOPES, 2009).

Entre os grupos de nematoides entomopatogênicos considerados importantes no controle de pragas, destacam-se os gêneros *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) e *Steinernema* (Travassos, 1927) dos quais já se conhecem os aspectos relativos à ecologia, estratégias de ação sobre a praga, bem como a produção em larga escala e as condições de aplicação.

Hipotetiza-se que, isolados de nematoides virulentos à broca-do-café podem infectar o inseto através do orifício feito pelo mesmo causando sua morte. É também provável que existam diferenças quanto à capacidade de deslocamento e virulência para diferentes isolados. Também existe a possibilidade do uso de nematoides entomopatogênicos associado com ciantraniliprole (ingrediente ativo utilizado no manejo das populações da praga), caso exista compatibilidade entre eles.

Tendo em vista que, os frutos de café infestados caídos no solo e deixados na planta após a colheita são considerados a principal fonte de reinfestação na safra seguinte (BENAVIDES et al., 2010) e a dificuldade de se controlar esta praga devido ao hábito críptico, a utilização de nematoides entomopatogênicos pode ser uma alternativa promissora.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do uso de nematoides entomopatogênicos como uma alternativa no controle biológico da broca-do-café *Hypothenemus hampei*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a patogenicidade e virulência de nematoides entomopatogênicos nativos sobre larvas e adultos da broca-do-café;
- Avaliar a capacidade de penetração dos isolados mais virulentos em frutos de café infestados;
- Avaliar a compatibilidade dos isolados mais virulentos com o inseticida Ciantraniliprole.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CULTURA DO CAFÉ

O café é uma planta originária da Etiópia, pertence à família das Rubiáceas, gênero *Coffea* L. que reúne 103 espécies (OLIVEIRA; OLIVEIRA; MOURA, 2012; DAVIS et al., 2006) sendo *Coffea arabica* L., conhecida também como café arábica e *Coffea canephora* (Pierre e Froehner), conhecida como café conilon, as espécies de maior importância comercial, representando respectivamente 70% e 30% da produção mundial (CEPLAC, 2015).

A cultura foi introduzida no Brasil em 1727, trazida da Guiana Francesa por Francisco de Mello Palheta diretamente para a cidade de Belém (OLIVEIRA; OLIVEIRA; MOURA, 2012). Diante à adaptação ao solo, clima e à diversidade de regiões ocupadas pela cultura, o café adquiriu importância no mercado e, atualmente, é sinônimo de progresso, sendo responsável pela geração de mais de oito milhões de empregos no país (MAPA, 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial, maior exportador e o segundo maior consumidor do produto, apresentando atualmente um parque cafeeiro estimado em 2,3 milhões de hectares (MAPA, 2015). Dentre os principais estados brasileiros produtores de café, destacam-se Minas Gerais como maior produtor do país, seguido do Espírito Santo, São Paulo, Paraná, Bahia e Rondônia (CONAB, 2015).

A cafeicultura brasileira, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é uma das mais exigentes do mundo em relação a questões sociais e ambientais, havendo uma preocupação em garantir a produção de um café sustentável. No entanto, a cultura sofre perdas consideráveis devido ao grande número de pragas que a atacam (ALVES et al., 2009a).

Dentre as principais pragas, destacam-se, o bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae), a cigarra *Quesada gigas* (Olivier, 1790) (Hemiptera: Cicadidae), as cochonilhas *Coccus viridis* (Green, 1889) (Hemiptera: Coccidae) e *Dysmicoccus texensis* (Hempel, 1918) (Hemiptera: Pseudococcidae) e a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae), sendo esta considerada a principal praga da cultura do café em todas as regiões produtoras do mundo (JARAMILLO;

BORGEMEISTER; BAKER, 2006; MOLINA et al., 2009; VEGA et al., 2009).

3.2 A BROCA-DO-CAFÉ

H. hampei (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae), comumente chamada de broca-do-café, é originária da África Equatorial e foi introduzida no continente americano no início do século passado (LE PELLEY, 1968).

No Brasil, o primeiro registro de ocorrência da broca foi em 1913 e, acredita-se que esta foi introduzida por meio de sementes importadas da África e de Java. O inseto se disseminou por todas as regiões cafeeiras do país e, desde então vem causando danos à cultura e grandes perdas na produção (LAURENTINO; COSTA, 2004).

Sua ocorrência é constatada tanto em *C. arabica* quanto em *C. canephora*, entretanto, esta última é mais susceptível ao ataque e, segundo Mattiello (2008) isso se deve provavelmente à diferenças intrínsecas entre as espécies e também à condições diferenciadas nas regiões onde são cultivadas.

O adulto da broca-do-café é um coleóptero, de coloração preta e corpo em formato cilíndrico, ligeiramente recurvado para a região posterior. Apresenta o par de élitros revestidos de cerdas e escamas piriformes. Machos e fêmeas diferem entre si em tamanho e tipo de asa. Os machos são menores, medindo aproximadamente 1,25 mm e apresentam asas rudimentares, motivo pelo qual são incapazes de voar e por isso nunca deixam os frutos onde se originam. A fêmea mede cerca de 1,74 mm e, após acasalamento, deixa o fruto a procura de um novo fruto para ovipositar (GALLO, 2002; LAURENTINO; COSTA, 2004). Como os machos não abandonam o fruto, estes podem fertilizar até 30 fêmeas, sendo a razão sexual de um macho para 10 fêmeas (DAMON, 2000; GALLO, 2002).

H. hampei é uma espécie críptica, pois passa todo o seu ciclo de vida (ovo a adulto) no interior do fruto. O ciclo dessa praga é multivoltino com sobreposições de gerações, resultando na presença de indivíduos com diferentes idades dentro do mesmo fruto (BAKER; BARREIRA; RIVAS, 1992).

A oviposição ocorre após a fêmea fertilizada encontrar um novo fruto em condições adequadas, geralmente quando o fruto começa o estágio de maturação (CURE et al., 1998). A fêmea perfura o fruto na região da coroa e começa a construir uma galeria, onde inicia a postura. Os ovos são pequenos, brancos e

elípticos e uma fêmea, cuja longevidade é de 156 dias, deposita de 31 a 119 ovos (GALLO, 2002).

Após quatro a 10 dias da postura, eclodem as larvas que medem entre 0,72 e 0,84 mm. A larva é ápoda, recurvada, de cor branca e corpo provido de pêlos esparsos e uma sutura mediana longitudinal visível (SOUZA E REIS, 1997; GALLO, 2002). O período larval é de aproximadamente 14 dias e após esse período a larva se transforma em pupa (GALLO, 2002).

A pupa apresenta coloração branca nos três ou quatro primeiros dias e o tamanho varia de acordo com o sexo, e nesta fase a broca não se alimenta. O período pupal dura sete dias em média, emergindo em seguida o adulto (LAURENTINO; COSTA, 2004).

Segundo Gallo (2002), o ciclo evolutivo da broca-do-café desde a postura até a emergência do adulto completa-se de 27 a 30 dias e, se as condições ambientais forem adequadas e houver produção constante nos cafezais, o inseto pode alcançar até sete gerações. Entretanto, fatores como clima, temperatura e umidade podem interferir direta ou indiretamente no desenvolvimento da broca-do-café, influenciando a intensidade de infestações (SOUZA; REIS, 1997; GUHARAY; MONTERREY 1997; MORAES, 1998).

O fruto de café é o alimento para todas as fases de desenvolvimento da broca, proporcionando um meio para o seu crescimento e reprodução (BENASSI, 1989), favorecendo a ocorrência de danos, que podem ser diretos ou indiretos e ocorrerem em todos os estádios de maturação, desde os frutos verdes aos secos (SOUZA; REIS, 1997).

A fase larval alimenta-se dos cotilédones da semente. No entanto, o maior dano é causado quando os frutos estão em estágio cereja, pois é nesta fase que a fêmea coloniza e perfura o fruto, abrindo galerias nas sementes, proporcionando uma porta de entrada para microrganismos que, sob condições ideais, podem se desenvolver, atingindo os grãos e alterando a qualidade da bebida do café (BENASSI, 1989; GALLO, 2002; REIS, 2002).

As perdas quantitativas ou dano direto decorrem da destruição das sementes e da queda prematura dos frutos, com conseqüente redução no peso, qualidade e produção dos grãos maduros, podendo o prejuízo chegar a 21%, dependendo do nível de infestação (SOUZA; REIS, 1997).

3.2.1 Métodos de Controle da Broca-do-Café

O controle de *H. hampei* é dificultado, uma vez que passa todo o seu ciclo de vida dentro do fruto do café, ficando protegido da ação dos inseticidas e até mesmo de inimigos naturais (DAMON, 2000). A principal forma de controle dessa praga é por meio de produtos químicos. Dentre os produtos já utilizados para o controle da broca estão, o DDT e BHC, porém o uso dos mesmos foi proibido, devido à alta persistência e toxicidade (GUTIERREZ et al., 1998; BARBOSA, 2009).

Segundo Reis (2007) entre os anos de 1973 e 2003, o endossulfan foi o inseticida mais utilizado para o controle da broca a eficiência deste variou de 70 a 100%. No entanto, em julho de 2013 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu o uso do endossulfan em função de sua persistência, por ser carcinogênico e altamente tóxico ao meio ambiente (ANVISA, 2015).

Atualmente, os produtos registrados para o controle deste inseto restringem-se em: clorpirifós, etofenproxi, azadiractina, abamectina + clorantianiliprole, *Beauveria bassiana* (Bovemax EC), Bio Broca (feromônio sintético) (AGROFIT, 2016) e o ciantraniliprole, que foi liberado pelo MAPA, devido as medidas emergenciais de defesa fitossanitária contra a broca-do-café no estado de Minas Gerais (MAPA, 2015).

Embora o controle químico seja o mais eficiente para *H. hampei*, a sua contínua utilização na agricultura provoca desequilíbrios, como a eliminação de insetos benéficos, explosões populacionais de pragas e, principalmente, a perda da eficácia de inseticidas mediante a seleção de populações resistentes aos compostos químicos repetidamente utilizados (KAY; COLLINS, 1987; NEVES; HIROSE, 2005).

Faz-se necessária a busca por novas estratégias de controle da broca que diminuam o uso de agrotóxicos e, o controle biológico, demonstra ser uma alternativa promissora como uma importante ferramenta no manejo das populações.

Muitos inimigos naturais da broca-do-café têm sido relatados, incluindo parasitoides, nematoides e fungos entomopatogênicos (VEGA et al., 2009). Dentre os parasitoides, *Prorops nasuta* (Waterston, 1923) (Hymenoptera: Bethyridae) conhecido popularmente como vespa-de-Uganda e *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem, 1961) (Hymenoptera: Bethyridae), foram os primeiros parasitoides a serem introduzidos e liberados no Brasil. No entanto, os resultados não foram promissores, devido a problemas como, dificuldades de criação e produção massal, adaptação e

taxas de parasitismo não significativas (JARAMILLO; BORGEMEISTER; BAKER, 2006; VEGA et al., 2009).

Em relação aos entomopatógenos, vários fungos entomopatogênicos foram relatados infectando a broca-do-café, como *Spicaria javanica* (Bally), *Metarhizium anisopliae* (Metsch Sorokin) e *Beauveria bassiana* (Balsamo Vuillemin) (BUSTILLO et al., 2002; VEGA et al., 2009). Estudos demonstraram que esses agentes apresentam potencial para o controle de *H. hampei*, podendo as taxas de infecção em condições de campo variar entre 20% e 90% (OKUMURA et al., 2003; NEVES; HIROSE, 2005; BENAVIDES; GÓNGORA; BUSTILLO, 2012).

Os métodos utilizados para o manejo da broca em frutos de café caídos no solo, como por exemplo, os inseticidas e os fungos entomopatogênicos, têm se mostrado pouco eficientes, uma vez que, não conseguem controlar a praga no interior do fruto. Por outro lado, os NEPs podem ser uma alternativa para o controle da broca-do-café, pois estes são controladores de pragas de hábito criptico, apresentam compatibilidade com alguns produtos fitossanitários registrados para a cultura do café são os únicos agentes biológicos que poderiam controlar a broca no interior do fruto visto que, algumas espécies possuem capacidade de se deslocar em busca do hospedeiro (ANDALÓ et al., 2004b; MOLINA et al., 2009).

3.3 NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Nematoides entomopatogênicos pertencem à ordem Rhabditida, onde se encontram a família Steinernematidae, que inclui os gêneros *Steinernema* (Travassos, 1927) e *Neosteinernema* (Nguyen & Smart, 1994), e a família Heterorhabditidae, que compreende apenas um gênero, *Heterorhabditis* (Poinar, 1976) (ADAMS, 2006).

Muitos autores como Fuga; Fernandes; Lopes (2012), Voss (2010), Molina; Moino Jr; Cavalcanti (2004) e Molina et al. (2005a), referem-se a esses patógenos como vermes cilíndricos, parasitos exclusivos de insetos e estão entre os organismos mais numerosos do planeta. Vivem no solo, sendo amplamente distribuídos nesse ambiente e, espécies dos gêneros, *Steinernema* e *Heterorhabditis*, apresentam alta eficácia como agentes biológicos para controle de várias espécies de insetos pragas, sendo considerados ferramentas promissoras em

programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) em diferentes culturas.

NEPs dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* são patógenos obrigatórios na natureza e carregam consigo bactérias do gênero *Xenorhabdus* (Thomas e Poinar, 1979) e *Photorhabdus* (Boemare, Akhurst e Mourant, 1983), respectivamente, com as quais realizam uma associação do tipo simbiótica. Essas bactérias pertencem à família Enterobacteriaceae, caracterizadas por célula gram-negativa, respiração anaeróbica facultativa, locomoção por flagelo tipo peritríquios e ausência de esporos. Assim, não apresentam estágios resistentes, sendo encontradas nos Juvenis Infectantes (terceiro estágio – J3) ou em insetos infectados por nematoides (BRENNER, 1999).

A relação simbiótica entre bactéria e nematoide tem papel importante, pois a bactéria proporciona um ambiente favorável para o nematoide se alimentar do inseto, reproduzindo-se com êxito e o nematoide por sua vez, garante abrigo e dispersão para a bactéria, transportando-a de um hospedeiro para outro (CLARKE, 2008). Vale ressaltar que, apesar das bactérias serem a causa principal da morte dos insetos, os próprios nematoides também produzem toxinas que são letais aos insetos (BURMAN, 1982).

A sintomatologia típica de infecção por NEPs pode ser observada de acordo com a coloração apresentada pelo inseto hospedeiro morto. A infecção típica por NEPs do gênero *Steinernema* varia desde coloração amarelada até cor café, enquanto que por NEPs do gênero *Heterorhabditis* a coloração típica geralmente vai de cor avermelhada a cor café (MOLINA et al., 2004; MOLINA et al., 2005b; VOSS, 2010; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012).

Os nematoides entomopatogênicos também apresentam dois tipos de comportamento de busca pelo hospedeiro: “cruiser” e “ambusher”. NEPs com hábito “cruiser” são bastante ativos e deslocam-se no solo em busca de hospedeiro, enquanto que, os de hábito “ambusher”, permanecem parados, à espreita do hospedeiro que passa por eles (ALVES; MOINO JUNIOR, 2009b).

Com relação ao ciclo de vida, os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* passam por três fases durante o seu desenvolvimento: ovo, quatro estádios juvenis (juvenis – J1, J2, J3, J4) e fase adulta (ALMENARA et al., 2012). O gênero *Steinernema* inicia o ciclo quando juvenis de terceiro estágio (J3), chamados também Juvenis Infectantes (JIs) que carregam a bactéria simbiótica na parte anterior do intestino, infectam um inseto através das aberturas naturais (boca, ânus,

espiráculos), chegam ao hemoceloma, onde perdem a cutícula extra e defecam as bactérias onde estas se multiplicam, matando o hospedeiro por septicemia.

Após a morte do hospedeiro, os NEPs então se alimentam, tornam-se fêmeas e machos adultos, ocorre a cópula e oviposição dentro do hospedeiro. Dos ovos eclodem juvenis de primeiro estágio (J1) que sucessivamente mudam para juvenis de segundo, terceiro e quarto estágio, dando continuidade ao ciclo. A reprodução continua até que as fontes de nutrientes provindas do inseto se esgotem. Uma vez esgotados os recursos, JIs ingerem bactérias e deixam o cadáver em busca de outro hospedeiro, pois este estágio não se alimenta e pode sobreviver por longo período de tempo no solo (MOLINA et al., 2005b; DOLINSKI; MOINO Jr., 2006; VOSS, 2010; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012).

O ciclo de vida de *Heterorhabditis* é bastante semelhante ao de *Steinernema*, porém há algumas particularidades. Os JIs desse gênero regurgitam as bactérias e, além de penetrarem o inseto através das aberturas naturais, conseguem infectá-lo também através da cutícula, pois, possuem um dente quitinoso na região cefálica. Outra diferença entre os dois gêneros é que, na primeira geração formam-se apenas fêmeas hermafroditas e a diferenciação em macho e fêmea ocorre somente a partir da segunda geração (DOLINSKI; MOINO Jr., 2006; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2012).

3.3.1 Importância dos Nematoides Entomopatogênicos no Controle Biológico de Insetos

Segundo Fuga; Fernandes; Lopes (2012) a descoberta e a descrição de espécies de nematoides entomopatogênicos possibilitaram a utilização de mais uma alternativa biológica para se controlar insetos pragas em diversas culturas.

Os nematoides entomopatogênicos apresentam diversas características vantajosas quando comparados aos outros agentes de controle biológico de insetos. Dentre as características destacam-se: compatibilidade com diversos produtos fitossanitários (NEGRISOLI JÚNIOR; BARBOSA; MOINO JÚNIOR, 2008; ANDALÓ; MOINO JÚNIOR; SANTA-CECÍLIA, 2004; KOPPENHÖFER; GREWAL; KAYA, 2000); capacidade de se adaptar a novos ambientes, com exceções às condições extremas (LEWIS et al., 2006); sinergismo com outros entomopatogênicos, como fungos e bactérias (ACEVEDO et al., 2007;

GASSMANN et al., 2008); especificidade a insetos não sendo prejudiciais a vertebrados e plantas (VOSS, 2010); podem ser produzidos *in vivo* ou *in vitro* em larga escala (VOSS, 2010); se deslocam em busca do hospedeiro podendo se difundir pelo ambiente (LEWIS et al., 2006); podem ser aplicados com equipamentos convencionais (ALVES et al., 2009a).

No Brasil, estudos com nematoides entomopatogênicos vêm aumentando e, vários exemplos podem ser citados como estudos com a cigarra-da-raiz do cafeeiro, *Quesadas gigas* (Olivier, 1790) (Hemiptera: Cicadidae), broca-da-cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae), cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley, 1900) (Hemiptera: Pseudococcidae) e com cigarrinha-das-raízes em cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) (SILVA, 2011; BELLINI, 2011; ALVES et al., 2009a; ANDALÓ et al., 2004a; LEITE et al., 2002).

No que se refere a trabalhos visando o controle de coleópteros, pode-se citar o realizado por Leite et al. (2012), com o bicudo-da-cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) e com *Leucothyreus* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) onde demonstraram que os insetos são susceptíveis aos isolados *Steinernema braziliense* e *Heterorhabditis indica*.

Giometti et al. (2011) avaliando a patogenicidade de 17 isolados de nematoides sobre adultos do bicudo-da-cana-de-açúcar, observaram que o inseto foi susceptível a todos os isolados. Mwaitulo et al. (2011) testando a virulência de nove isolados contra larvas de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) observaram que todos os isolados causaram mortalidade nos insetos. Tavares et al. (2007) demonstraram que os isolados *Heterorhabditis indica* e IBCB-n6 foram patogênicos a larvas de *Sphenophorus levis*, obtendo até 95% de mortalidade.

Shapiro-Ilan et al. (2013) avaliaram a eficiência de NEPs no controle de “plum curculio”, *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) e, constataram que *S. riobrave* e *S. feltiae* foram virulentos ao inseto com porcentagem de mortalidade de 95% e 77% respectivamente.

Alves et al. (2009c) avaliaram o potencial *S. carpocapsae* sobre adultos de *Hedipathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae) obtendo até 78,1% de mortalidade para os insetos adultos. Machado et al. (2005), testaram *S. glaseri* (Rhabditida: Steinernematidae) no controle de *Migdolus fryanus* (Coleoptera: Cerambycidae) obtendo 100% de mortalidade em larvas recém-eclodidas,

demonstrando o potencial destes no controle de coleópteros com hábitos cripticos.

Foram realizados trabalhos em condições de laboratório com *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecido comumente como cascudinho, e diante dos resultados e dentre os isolados testados foi possível observar que *S. carpocapse*, se mostrou patogênico a adultos e larvas do inseto, causando 48% e 96% de mortalidade respectivamente (PEZOWICZ, 2003; ALVES; ROHDE; ALVES, 2005).

Alves et al. 2012 avaliando NEPs para o controle de *A. diaperinus* observaram que todos os isolados testados foram patogênicos aos adultos do inseto, porém, *Steinernema arenarium* foi o mais virulento, provocando 99,0% de mortalidade.

3.3.2 Nematoides Entomopatogênicos no Controle de *Hypothenemus hampei*

O primeiro registro de ocorrência natural de nematoide infectando brocas-do-café, ocorreu na Índia, onde o nematoide *Panagrolaimus* sp. (Panagrolaimidae) foi encontrado infectando adultos do inseto (VARAPRASAD et al., 1994). O segundo registro foi no México, cujo isolado de nematoide foi encontrado em frutos de café caídos no solo e foi identificado como *Sphaerulariopsis* sp. (Tylenchida: Sphaerularioidea) (CASTILLO; BARRERA, 1998; CASTILLO et al., 2002).

Poinar Jr. et al. (2004) e Pérez et al. (2015) registraram *Methaparasitylenchus hypothenemi* (Tylenchida: Allantonematidae) parasitando naturalmente brocas-do-café em plantações de cafeeiro no México.

No que se refere a patogenicidade de espécies de nematoides dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* sobre a broca-do-café, destaca-se o trabalho de Allard e Moore (1989), no qual os autores observaram o efeito de *S. carpocapse* e *H. bacteriophora*, sobre adultos e larvas. Também Lubego (1992) e Castillo e Marbán (1996) realizaram estudos em laboratório e registraram que isolados *Steinernema* spp. e *Heterorhabditis* spp. foram patogênicos à larvas e adultos de *H. hampei*.

Molina e Lopes (2002, 2003) testaram a atração de isolados de NEPs a diferentes estágios de desenvolvimento do fruto brocado. Os autores observaram que em frutos secos e maduros caídos no solo os nematoides foram

capazes de entrar pelo orifício de perfuração feito pela broca e infectar diferentes estádios do inseto.

Lara et al. (2004), Molina e Lopes (2002, 2003) e Molina et al. (2009) observaram que os nematoides conseguiram se multiplicar no interior das larvas de *H. hampei*. A capacidade de se multiplicar no hospedeiro é um fator importante, pois favorece o controle da praga nas gerações seguintes sem a necessidade de realizar uma nova aplicação do entomopatógeno.

Foi avaliado, também, o efeito da aplicação de nematoides entomopatogênicos em diferentes doses sobre frutos caídos e infestados com broca-do-café, no qual se observou que ambos os isolados testados (*H. bacteriophora* e *S. feltie*) conseguiram penetrar no fruto de café e que as altas dosagens aplicadas foram responsáveis pelas maiores porcentagens de mortalidade do inseto (MOLINA; LOPES, 2009).

Lara et al. (2004) demonstraram que isolados dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* foram capazes de penetrar os frutos caídos no solo, parasitaram principalmente estádios imaturos da broca, se multiplicaram no interior do inseto e reduziram as populações de brocas nos cafezais.

Benavides-Machado et al. (2010) avaliando o potencial de NEPs para o controle da broca observaram que a maior porcentagem de mortalidade das larvas foi causada pelas espécies do gênero *Steinernema* e em adultos por espécies do gênero *Heterorhabditis*. Além disso, os autores observaram ainda que todas as espécies testadas se deslocaram em direção ao fruto e a porcentagem de mortalidade variou entre 83 e 100% no interior do fruto de café.

Manton et al. (2012) avaliaram o potencial de *S. carpocapse* no controle de *H. hampei* e evidenciaram que este possui capacidade de entrar nos frutos de café e causar mortalidade significativa em vários estágios de desenvolvimento do inseto no campo.

3.3.3 Compatibilidade de Nematoides Entomopatogênicos a Produtos Fitossanitários

A ação dos produtos fitossanitários sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das dosagens utilizadas (ALVES; MOINO JR.; ALMEIDA, 1998). Nesse

sentido, é necessário que se utilizem produtos seletivos que não afetem o equilíbrio entre pragas e seus inimigos naturais.

O uso inadequado de produtos químicos pode interferir na capacidade infectante e reprodutiva desses agentes de controle, influenciando negativamente a sua eficácia (MONTEIRO et al., 2014). Assim, a interação entre produtos fitossanitários e entomopatógenos deve receber atenção especial, principalmente em culturas nas quais o uso de controle químico seja indispensável, como é o caso da cultura do café.

Os nematoides entomopatogênicos são compatíveis com a maioria dos produtos testados como herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas e fertilizantes orgânicos quando expostos a eles por curtos períodos (KOPPENHÖFER; GREWAL, 2005). Essa característica é de fundamental importância para integrar os NEPs em programas de manejo de pragas, possibilitando assim, a diminuição da quantidade de inseticidas utilizados (BORTOLLUZI et al., 2013). No entanto, existem diferenças de compatibilidade dependendo da espécie de nematoide e do produto utilizado (ANDALÓ et al., 2004).

Segundo Negrisoni Jr. et al. (2008) os efeitos dos produtos fitossanitários sobre os nematoides entomopatogênicos podem ser diretos, ou seja, relacionados com a viabilidade e comportamento dos JIs, ou indiretos, influenciando na capacidade infectiva dos nematoides.

De acordo com Koppenhöfer et al. (2000) o produto pode causar efeito estressante no inseto, o que facilitaria a infecção/colonização pelos nematoides. Os mesmos autores observaram em testes realizados com larvas de escarabeídeos, que o inseticida imidaclopride reduziu a atividade das larvas o que facilitou a penetração dos JIs de *S. glaseri* e *H. bacteriophora* nas mesmas.

As interações entre produtos fitossanitários e NEPs podem ser positivas, negativas e/ ou neutras. Andaló et al. (2004b) avaliaram o efeito de produtos químicos utilizados na cultura do café sobre nematoides entomopatogênicos considerados potenciais para o controle de pragas na cultura, entre elas a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro. Para os autores, apenas os herbicidas 2,4-D, acetoclor e oxifluorfen diminuíram a viabilidade de *S. carpocapse*, *S. glaseri*, *S. arenarium* e *H. bacteriophora*, sendo considerados incompatíveis. Os demais produtos como imidaclopride, tiametoxan, glifosato e carbofuran foram considerados compatíveis.

Em alguns casos, além do nematoide não ser prejudicado pela exposição ao produto, pode ocorrer um aumento na eficiência de controle da praga, resultado de um possível sinergismo entre os dois agentes (BORTOLUZZI et al., 2013). Estudos realizados por Koppenhöfer et al. (2002) demonstraram sinergismo entre o inseticida imidaclopride e os isolados *H. bacteriophora* e *S. glaseri* no controle de larvas de *Popillia japônica* e com os nematoides *H. bacteriophora*, *H. megidis*, *H. marelatus*, *S. glaseri* e *S. feltiae* para o controle de *Exomala orientalis*.

Tavares et al. (2009) testaram o efeito de combinações dos nematoides entomopatogênicos *H. indica* e *Steinernema* sp. (IBCB-n06) com subdose dos inseticidas químicos fipronil, tiametoxam e imidaclopride contra adultos e larvas do curculionídeo *Sphenophorus levis*. Os autores observaram que os produtos foram compatíveis com os agentes, não afetando a viabilidade dos juvenis infectantes após 24 horas de exposição. Além disso, observaram também efeito sinérgico nas misturas dos NEPs com tiametoxam, na qual os níveis de mortalidade aumentaram significativamente.

Negrisola Junior, Barbosa e Moino Junior (2008) avaliando a compatibilidade de alguns produtos fitossanitários com *H. bacteriophora* e *S. carpocapse* observaram que tiofanato metílico e aldicarbe são incompatíveis com *S. carpocapse* e tiametoxam, tiofanato metílico, aldicarbe e carbofuram são incompatíveis com *H. bacteriophora*.

Souza et al. (2012) realizando testes de compatibilidade dos nematoides entomopatogênicos *H. amazonensis* RSC05, *Heterorhabditis* sp. JPM4 e *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 com imidaclopride visando o controle de *Spodoptera frugiperda* verificaram que o produto não afetou a viabilidade e infectividade dos NEPs.

Recentemente Sabino et al. (2014) testaram a compatibilidade de *S. carpocapse* All e *H. amazonensis* JPM4 com oito inseticidas usados na cultura do tomate. Segundo os autores, os inseticidas abamectina e clorpirifós não mataram os juvenis infectantes, mas reduziram a sua infectividade. Já os produtos triflumuron, deltametrina, dimetilamina-propil, lambda-cialotrin + clorantraniliprole, clorantraniliprole e tiametoxam + lambda-cialotrin foram compatíveis com ambas as espécies de nematoides.

Não há registro na literatura de trabalhos que estudaram especificamente a aplicação de NEPs simultaneamente com um inseticida visando o

controle de *H. hampei* e nem sobre a compatibilidade dos mesmos com o produto ciantraniliprole pertencente ao grupo químico das diamidas antranílicas, recentemente liberado uso para o controle de *H. hampei* na cultura do café.

Porém, Koppenhöfer e Fuzy (2008) avaliaram o efeito do inseticida clorantraniliprole, também pertencente ao grupo das diamidas antranílicas sobre *H. bacteriophora* no controle de larvas de coró em gramados. Os autores observaram que o produto não afetou a viabilidade nem a infectividade dos JIs e houve um efeito sinérgico, no qual, a combinação do nematoide com o inseticida proporcionou um controle maior do inseto do que os agentes utilizados individualmente.

3.3.3.1 Ciantraniliprole (Benevia™)

Ciantraniliprole, pertencente ao grupo das diamidas antranílicas, age no inseto ativando os receptores de rianodina através de um estímulo para a liberação das reservas de cálcio do retículo sarcoplasmático de células musculares (principalmente para insetos mastigadores), causando má regulação, paralisia e morte de espécies sensíveis. Apresenta ação de profundidade e atua por ingestão e contato, demonstrando boa atividade adulticida, ovicularicida e larvicida. Tem baixa toxicidade para muitos artrópodes não alvo e outros organismos como pássaros, peixes, mamíferos, minhocas, microrganismos, algas e outras plantas. É seletivo para invertebrados estuarinos, mas os estudos demonstram que alguns artrópodes, como aqueles do gênero *Daphnia*, são mais sensíveis (SOUZA et al., 2014).

Com o nome comercial de Benevia™, o ciantraniliprole, em fase de registro no Brasil, é um novo inseticida do grupo das diamidas antranílicas (antranilamida) desenvolvido em vários países pelo IE DuPont de Nemours and Company, Inc.

Em julho de 2014, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) publicou a portaria nº 711 que descreve as orientações para o manejo de *H. hampei*. O documento traz as medidas emergenciais de defesa sanitária vegetal e permite o controle químico da broca-do-café com inseticida à base de Ciantraniliprole a ser realizado em talhões da lavoura – áreas específicas onde há plantas da mesma idade – por meio do monitoramento.

As recomendações para o uso do produto são: aplicação foliar, dose de 175 g de i.a/ha e as aplicações devem ser feitas no início da formação de grãos e

no momento da migração dos adultos. O intervalo de aplicação é de 30 a 60 dias, sendo duas, o número máximo de aplicações (MAPA, 2014).

Como já mencionado anteriormente, não há registro de estudos que avaliaram a compatibilidade de nematoides ao ciantraniliprole. Por outro lado, devido a eficiência já comprovada do produto no controle da broca-do-café (SOUZA et al., 2014) e liberação do uso nos cafeeiros do Brasil, faz-se necessários estudos que avaliem os efeitos da interação dos NEPs com o produto, visto que, estudos também demonstraram que os nematoides entomopatogênicos são agentes potenciais no controle de *H. hampei*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em condições de laboratório e os insetos (*H. hampei*) foram obtidos da criação de broca-do-café do Laboratório de Entomologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), mantida em câmara climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10\%$ e ausência de luz) e desenvolvida em dieta artificial adaptada de Villacorta e Barrera (1993), com as seguintes modificações: Acrescentou-se 150g de café em pó (grão cru) e 0,5g de mistura vitamínica de Vanderzant para insetos.

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Isolados de nematoides entomopatogênicos foram obtidos do banco de entomopatógenos do Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano da Universidade Estadual do Norte do Paraná (Cornélio Procópio – PR) e do Instituto Biológico em Campinas, SP (Tabela 1).

A multiplicação foi feita pelo método *in vivo* adaptado de Molina e Lopes (2001), utilizando-se lagartas de último instar de *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) provenientes de criação estabelecida.

Tabela 1 - Isolados de nematoides entomopatogênicos dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* utilizados no teste de seleção contra larvas e adultos de *Hypothenemus hampei* em condições de laboratório.

Isolado	Espécie	Origem
RSC 05	<i>Heterorhabditis amazonenses</i>	Benjamin Constant, AM, Brasil
IBCB-n 05	<i>Heterorhabditis indica</i>	Itapetininga, SP, Brasil
HP88	<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	New Jersey, Estados Unidos
NEPET11	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Palmeira das Missões, RS, Brasil
ALHO	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Lavras, MG, Brasil
JPM 4	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Lavras, MG, Brasil
IBCB-n 40	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Tabaporã, SP, Brasil
IBCB-n 46	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Santo Antônio de Posse, SP, Brasil
IBCB-n 44	<i>Heterorhabditis</i> sp.	Santa Adélia, SP, Brasil

IBCB-n 27	<i>Steinernema</i> sp.	Mogi Guaçu, SP, Brasil
IBCB-n 02	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Flórida, Estados Unidos
AM163	<i>Steinernema diaprepesi</i>	Sinop, MT, Brasil
PAM	<i>Steinernema rarum</i>	Aceguá, RS, Brasil
SN	<i>Steinernema feltiae</i>	Flórida, Estados Unidos
CER-n 125	<i>Steinernema puertoricense</i>	Rio Verde, GO, Brasil
-	<i>Steinernema glaseri</i>	Flórida, Estados Unidos

Fonte: a própria autora

4.2 CRIAÇÃO DE *GALLERIA MELLONELLA* L. (LEPIDÓPTERA: PYRALIDAE)

As lagartas foram obtidas da criação de *G. mellonella* do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano da UEL e mantidas na sala de criação, acondicionadas em potes plásticos com tampas providas de tela e sob temperatura ambiente. A manutenção e alimentação foram realizadas diariamente com dieta artificial adaptada de Parra (1998), preparada com os ingredientes (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição da dieta de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) adaptada de Parra (1998).

Ingredientes	Quantidade
Farelo de trigo	200g
Gérmen de trigo	200g
Farinha de trigo	200g
Leite em pó	400g
Levedura de cerveja	120g
Glicerina	130g
Mel	240g
Água Destilada	20 ml

Fonte: Parra (1998, p. 1015-1037).

4.3 MULTIPLICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS NEMATÓIDES ENTOMOPATOGÊNICOS

Para multiplicação dos NEPs, dez lagartas de último instar de *G. mellonella* foram dispostas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo dois

papéis filtro secos. Posteriormente aplicou-se com auxílio de micropipeta 2 mL de suspensão do nematoide (aproximadamente 20 JIs/lagarta) nas placas e estas foram armazenadas por 72 horas, em câmara climatizada a $23\pm 1^{\circ}$ C e sem fotofase. Após este período as lagartas mortas foram transferidas para câmara seca (MOLINA; LOPES, 2001) na qual permaneceram por cinco dias em câmara climatizada a $23\pm 1^{\circ}$ C e sem fotofase, para multiplicação dos NEPs no interior das lagartas.

Em seguida, as lagartas foram colocadas em armadilha de White (White, 1927), método utilizado para coleta dos JIs. As armadilhas foram mantidas sob as mesmas condições já mencionadas. Os JIs em suspensão aquosa (água destilada + JIs) foram coletados diariamente e armazenados em recipientes plásticos que foram mantidos em câmara climatizada à temperatura de $18\pm 1^{\circ}$ C e sem fotofase, por um período de até sete dias após a produção para, posteriormente, serem utilizados nos experimentos.

4.4 PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS A *H. HAMPEI*

Para a realização dos ensaios os 16 isolados (Tabela 1) foram multiplicados de acordo com a metodologia já citada e avaliados quanto à virulência e patogenicidade sobre larvas e adultos de *H. hampei*.

Previamente a aplicação, os NEPs foram quantificados para padronização da concentração dos mesmos em 100 JIs/cm². A quantificação procedeu-se da seguinte maneira: os NEPs foram coletados suspensos em água destilada e acondicionados em recipientes plásticos (aproximadamente 200 mL de suspensão contendo água destilada + JIs). Com auxílio de micropipeta, foi retirado 1 mL da suspensão e colocado em tubo de fundo chato no qual foram adicionados mais 9 mL de água destilada, totalizando 10 mL, obtendo-se uma suspensão 10 vezes mais diluída que a suspensão original, para facilitar a contagem.

Em seguida, o tubo foi agitado em vortex e foram retiradas cinco alíquotas de 50 μ e distribuídas em cinco poços de uma placa de Elisa. Posteriormente, foram contados, com auxílio de microscópio estereoscópio, os JIs de cada poço. Após a contagem, foi feita a média e esta foi submetida a regra de três para estimar quantos JIs continham em 1 mL. Multiplicando-se por 10 este resultado, obteve-se a concentração da suspensão original. Feito isso, foi realizada

uma nova regra de três para saber quantos mL seriam necessários para aplicar os JIs na concentração de 100JIs/cm².

4.4.1 Teste de Patogenicidade e Virulência com Adultos

Cada isolado (tratamento) foi repetido cinco vezes. A unidade experimental correspondeu a uma placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro, contendo dez insetos e dois papéis filtro secos na base e na tampa da placa. Em seguida aplicou-se sobre os papéis, com auxílio de micropipeta, 1 mL da suspensão contendo os isolados na concentração de 100 Juvenis Infectantes (JIs)/cm².

Após a aplicação, as placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada a 25±1°C, UR: 70±10% e sem fotofase. Foi feito também um tratamento adicional (testemunha) que recebeu apenas 1 mL de água destilada. A avaliação ocorreu após cinco dias da inoculação na qual contou-se os insetos mortos.

O experimento foi em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância, transformados em raiz² (x+0,5) para que fossem atendidos os pressupostos de uma análise paramétrica e, em seguida, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de significância utilizando o software Sisvar 5.4 (FERREIRA, 2011).

4.4.2 Teste de Patogenicidade e Virulência com Larvas

Os tratamentos constituíram de quatro repetições. Cada repetição correspondeu a uma placa de Petri de 5,5 cm de diâmetro, contendo dez larvas de segundo instar, dois papéis filtro na base e um pedaço de dieta (a mesma utilizada para criação). Em seguida aplicou-se sobre os papéis filtro, com auxílio de micropipeta, 1 mL de suspensão contendo os isolados na concentração de 100 JIs/cm².

Após a inoculação, as placas foram tampadas e mantidas em câmara climatizada a 25±1°C, UR: 70±10% e sem fotofase. Foi feito também, um tratamento adicional (testemunha) que recebeu apenas 1 mL de água destilada. A avaliação ocorreu após cinco dias da inoculação, na qual contou-se as larvas mortas.

O experimento foi em delineamento experimental inteiramente casualizado. O procedimento estatístico realizado com os dados do teste de seleção com larvas de broca-do-café foi o mesmo para os adultos. No entanto, não foi necessária a transformação dos dados.

4.5 INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DE FRUTOS DE CAFÉ POR *H. HAMPEI*

Para os ensaios com frutos de café, foi realizada infestação artificial. Coletou-se manualmente frutos em estágio chumbão em plantas de café da variedade IAPAR 59, cultivadas sem uso de agrotóxicos na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Os frutos foram levados ao laboratório, previamente lavados com água corrente, mergulhados em solução de hipoclorito de sódio a 5% por aproximadamente um minuto para desinfecção superficial e, em seguida, após serem retirados do pedúnculo foram secos com papel toalha.

Posteriormente, os frutos foram expostos aos adultos da broca, utilizando-se uma placa de Petri de vidro de 9 cm de diâmetro contendo um papel filtro e um fruto, na qual se adicionou os insetos na proporção de 5:1 (cinco brocas adultas por fruto). Os adultos foram retirados da criação em dieta artificial. As placas foram mantidas sob temperatura ambiente durante 15 dias e uma vez por semana um fruto era escolhido aleatoriamente e dissecado para observar se estava ocorrendo oviposição. Nos bioensaios foram utilizados frutos com no mínimo duas perfurações causadas pelo inseto.

4.6 APLICAÇÃO DE JUVENIS INFECTANTES SOBRE FRUTOS DE CAFÉ INFESTADOS

Neste ensaio foram utilizados os isolados *S. feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46) que estavam entre os mais virulentos dos testes de seleção.

Os tratamentos constituíram de cinco repetições e a unidade experimental foi uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, na qual foram adicionadas 60 gramas de areia (previamente autoclavada e seca em estufa a 80 °C) e dois frutos infestados. Aplicou-se 100 JIs sobre cada fruto com auxílio de micropipeta. No tratamento testemunha foi aplicado apenas água destilada sobre os frutos. Para manter a umidade na placa foram aplicados sobre a areia 10 mL de água destilada.

As placas foram tampadas e mantidas em câmara climática a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e sem fotofase durante cinco dias.

Para a avaliação, os frutos foram lavados superficialmente com água destilada de modo a eliminar os NEPs que não penetraram. Em seguida, realizou-se dissecação dos frutos e, por último, com exceção dos ovos, todos os estádios do inseto (larva, pupa e adulto) foram separados em placa de Petri. Foram contados os insetos vivos e mortos, sendo as brocas mortas dissecadas com auxílio de microscópio estereoscópio para confirmação do parasitismo por NEPs.

4.7 COMPATIBILIDADE DE ISOLADOS DE NEPS COM CIANTRANILIPROLE

Para avaliar a compatibilidade dos isolados *S. feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46) com o inseticida ciantraniliprole, foi utilizada a metodologia sugerida por Vanio (1992).

Um litro da formulação do produto foi preparado com o dobro da dose recomendada (1750 mL do produto comercial/400 L de água). Assim, 8,75 mL de produto comercial foram adicionados à 1000 mL de água. Desta solução, foi retirado e distribuído 1 mL em cinco tubos de vidro por tratamento, aos quais foi adicionado mais 1 mL de água destilada contendo 2500 JIs, reestabelecendo assim, a dose recomendada para aplicação a campo. Como testemunha, 1 mL da suspensão dos isolados foi misturado a 1 mL de água destilada. Os tubos foram armazenados em câmara climatizada a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e sem fotofase.

A viabilidade dos nematoides foi avaliada 24 e 48 horas após exposição ao produto. Para tanto, 50 μ da suspensão de cada tubo (repetição) foi retirado e observou-se 100 JIs sob microscópio estereoscópio, para determinação da viabilidade. Foram considerados mortos aqueles que estavam imóveis e que não responderam ao toque com estilete (NEGRISOLI JÚNIOR; BARBOSA; MOINO JÚNIOR, 2008) e vivos aqueles que apresentavam movimentação.

A infectividade dos JIs foi avaliada no mesmo período que a viabilidade. Os tubos foram completados com 3 mL de água destilada e deixados para decantar por 30 minutos na geladeira a 10°C , e após esse período o sobrenadante (aproximadamente 3 mL) foi descartado. Esse procedimento de lavagem foi repetido por três vezes (NEGRISOLI JÚNIOR; BARBOSA; MOINO JÚNIOR, 2008) de forma a retirar o máximo de inseticida. Após a última lavagem, 1

mL (cerca de 1000 JIs) foram retirados do fundo de cada tubo e aplicados em cinco placas de Petri contendo dois papéis filtros e dez lagartas de último instar de *G. mellonella*.

As placas foram mantidas em câmara climatizada a 23 °C durante cinco dias. Após este período, as lagartas mortas foram transferidas para novas placas contendo um papel filtro seco e limpo e mantidas no escuro por mais 72 horas, sendo submetidas à dissecação com auxílio de microscópio estereoscópio para confirmação da morte por nematoides.

Os dados de viabilidade dos nematoides após exposição ao ciantraniliprole e de mortalidade das lagartas infectadas por NEPs, foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 TESTE DE SELEÇÃO COM ADULTOS

Os isolados *Steinernema puertoricense* (CER-n 125) e *Steinernema* sp. (IBCB-n 27) não diferiram da testemunha. Os demais isolados são patogênicos, porém, apresentam diferença quanto a virulência. Os isolados *Heterorhabditis* sp. (ALHO) e *Steinernema feltiae* (IBCB-n 47) foram os que apresentaram maior porcentagem de mortalidade, ambos provocando 54% de mortalidade nos adultos (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de mortalidade de adultos de *Hypothenemus hampei* causada por nematoides entomopatogênicos (*Steinernema* e *Heterorhabditis*) em condições de laboratório ($25 \pm 1^\circ \text{C}$ e sem fotofase).

Isolados	% Mortalidade \pm (EP)
Testemunha	2,0 \pm 2,0 a*
CER-n 125 (<i>Steinernema puertoricense</i>)	4,0 \pm 2,4 a
IBCB-n 27 (<i>Steinernema</i> sp.)	6,0 \pm 4,0 a
NEPET11 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	16,0 \pm 6,0 b
IBCB-n 02 (<i>Steinernema carpocapsae</i>)	22,0 \pm 7,3 c
JPM 4 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	22,0 \pm 5,8 c
RSC 05 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>)	24,0 \pm 7,5 c
PAM (<i>Steinernema rarum</i>)	38,0 \pm 6,6 d
IBCB-n 44 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	40,0 \pm 8,4 d
IBCB-n 40 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	40,0 \pm 7,1 d
<i>Steinernema glaseri</i>	42,0 \pm 7,3 d
AM163 (<i>Steinernema diaprepesi</i>)	44,0 \pm 9,8 d
IBCB-n 05 (<i>Heterorhabditis indica</i>)	44,0 \pm 13,6 d
HP88 (<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>)	46,0 \pm 9,8 d
IBCB-n 46 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	50,0 \pm 7,1 d
ALHO (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	54,0 \pm 7,5 d
IBCB-n 47 (<i>Steinernema feltiae</i>)	54,0 \pm 8,1 d
	CV (%) = 30,97

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferiram significativamente pelo teste Skott-Knott ($\alpha=5\%$) com dados transformados em $\text{raiz}^2(x+0,5)$.

Fonte: da autora.

A diferença de virulência entre isolados, até mesmo de uma mesma espécie, pode ser justificada por vários fatores. Isolados diferentes podem estar adaptados a diferentes condições climáticas ou mesmo ter desenvolvido especificidade a hospedeiros locais (ALVES et al., 2009a). E, de acordo com Almenara et al. (2012) a variação de susceptibilidade é esperada, pois, diferentes isolados coevoluíram com diferentes espécies de hospedeiro e, portanto, possuem especificidades que os tornam mais ou menos virulentos sobre determinado inseto. Por este motivo os testes de seleção de isolados são de grande importância.

Castillo e Marbán-Mendoza (1996) avaliando a patogenicidade de oito isolados de NEPs sobre adultos da broca-do-café, em placas de Petri com dieta, observaram que os isolados *Heterorhabditis* LIM-1, DOM-8 e PC-3 e o isolado *Steinernema carpocapse* foram os mais patogênicos aos insetos, com porcentagem de mortalidade acima de 50%. Neste trabalho, observou-se porcentagem de mortalidade semelhante para alguns dos isolados *Heterorhabditis*, porém, *S. carpocapse* causou mortalidade inferior (22,0%) à observada pelos autores.

Benavides-Machado et al. (2010) avaliando a virulência de isolados de nematoides sobre adultos da broca-do-café, verificaram que todos os tratamentos foram patogênicos ao inseto e a mortalidade, após cinco dias da aplicação, variou entre 3,6 e 24,6%, sendo *H. bacteriophora* o isolado mais virulento (24,6%). Estes resultados são inferiores aos encontrados neste trabalho, uma vez que *H. bacteriophora* causou 46% de mortalidade nos insetos.

Observou-se também, que de maneira geral, os isolados do gênero *Heterorhabditis* foram mais virulentos aos adultos de *H. hampei*. O mesmo foi observado por Castillo e Marbán-Mendoza (1996) e Benavides-Machado et al. (2010) em testes realizados com adultos de broca-do-café.

Sepúlveda-Cano et al. (2008) obtiveram melhor resultado com *H. bacteriophora* (58%) comparado à *S. carpocapse* (40%) ao avaliarem a virulência destes nematoides sobre adultos de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), apresentando semelhança com os resultados deste trabalho, no qual *S. carpocapse* foi menos virulento aos adultos da broca-do-café comparado à *H. bacteriophora* (22,0 e 46,0%, respectivamente).

No trabalho de Tavares et al. (2007) e Giometti et al. (2011), isolados heterorhabditídeos apresentaram maior virulência que os

esteinernematídeos sobre o bicudo-da-cana, *Sphenoforus levis* (Coleoptera: Curculionidae).

Outros trabalhos realizados em condições semelhantes evidenciaram a susceptibilidade dos curculionídeos aos nematoides do gênero *Steinernema*, mas, preferencialmente à isolados do gênero *Heterorhabditis* (SHAPIRO-ILAN; MCCOY, 2000; STUART et al., 2004, SEPÚLVEDA-CANO et al., 2008).

A maior suscetibilidade aos heterorhabditídeos pode ser explicada, em parte, pelo menor tamanho destes em relação aos esteinernematídeos, tendo estes últimos maiores dificuldades de penetrar pelas aberturas naturais de insetos pequenos (STUART et al., 1997), como é o caso da broca-do-café. Além de serem menores, os heterorhabditídeos possuem pequenos apêndices na região cefálica que lhes permitem penetrar no inseto rompendo seu tegumento (GEDEN et al., 1985).

Foi possível observar ainda que, os adultos de *H. hampei* infectados por NEPs não apresentaram coloração típica de infecção para ambos os gêneros de nematoides. Isso pode ser explicado devido a coloração escura e cutícula bastante quitinizada que estes insetos apresentam. No entanto, uma característica observada para alguns adultos infectados, foi a separação da cabeça do tórax (Figura 1). Tal característica também foi observada por Benavides-Machado et al. (2010), tendo ressaltado o fato que, a causa desta separação é provavelmente, devido à pressão gerada pelo nematoide durante o seu desenvolvimento no interior do inseto.



Figura 1. Adulto de *H. hampei* infectado por nematoides entomopatogênicos. A flecha indica o local de separação da cabeça do tórax, confirmando a morte do inseto por nematoide.

Fonte: da autora.

5.2 TESTE DE SELEÇÃO COM LARVAS

Pode-se observar, com exceção do isolado *S. puertoricense* (CER-n 125), que todos os demais isolados foram patogênicos às larvas de *H. hampei*, porém, houve variação quanto a virulência. A porcentagem de mortalidade variou entre 15,0 e 100%. Observou-se também, que cinco isolados causaram mortalidade acima de 80% e sete isolados, sendo seis do gênero *Heterorhabditis* e um do gênero *Steinernema*, foram capazes de matar 100% das larvas (Tabela 4).

Tabela 4 – Mortalidade confirmada de larvas de *Hypothenemus hampei* causada por nematoides entomopatogênicos (*Steinernema* e *Heterorhabditis*) em condições de laboratório ($25\pm 1^{\circ}$, UR $70\pm 10\%$ e sem fotofase).

Isolados	Mortalidade \pm EP (%)
Testemunha	5,0 \pm 2,9 a
CER-n 125 (<i>Steinernema puertoricense</i>)	15,0 \pm 5,0 a
AM163 (<i>Steinernema diaprepesi</i>)	32,0 \pm 2,5 b
<i>Steinernema glaseri</i>	35,0 \pm 5,0 b
HP88 (<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>)	70,0 \pm 10,0 c
IBCB-n 27 (<i>Steinernema</i> sp.)	85,0 \pm 2,9 c
IBCB-n 02 (<i>Steinernema carpocapsae</i>)	87,5 \pm 2,5 c
IBCB-n 40 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	87,5 \pm 6,3 c
PAM (<i>Steinernema rarum</i>)	90,0 \pm 5,8 c
ALHO (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	97,0 \pm 2,5 d
IBCB-n 47 (<i>Steinernema feltiae</i>)	100,0 \pm 0,0 d
RSC 05 (<i>Heterorhabditis amazonensis</i>)	100,0 \pm 0,0 d
IBCB-n 46 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	100,0 \pm 0,0 d
IBCB-n 44 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	100,0 \pm 0,0 d
NEPET 11 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	100,0 \pm 0,0 d
JPM4 (<i>Heterorhabditis</i> sp.)	100,0 \pm 0,0 d
IBCB-n 05 (<i>Heterorhabditis indica</i>)	100,0 \pm 0,0 d
	CV (%) = 10,12

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferiram entre si pelo Teste de Scott-Knott ($\alpha=5\%$).

Fonte: da autora.

Benavides-Machado et al. (2010) avaliando a virulência de NEPs sobre larvas da broca-do-café, observaram que todos os isolados foram patogênicos e as espécies do gênero *Steinernema* causaram mortalidade entre 75 e 90% e as do gênero *Heterorhabditis* entre 36,5% e 42%. Estes dados diferem dos valores observados neste trabalho, pois, para o gênero *Steinernema*, a mortalidade variou entre 15 e 100% e para *Heterorhabditis* entre 70 e 100%.

Ficou ainda evidente que, as larvas de *H. hampei* foram mais susceptíveis aos nematoides do que os adultos, reforçando uma tendência de maior susceptibilidade à NEPs que tem sido verificada para larvas da broca-do-café (MOLINA; LOPES, 2009; BENAVIDES-MACHADO et al., 2010) e de vários outros coleopteros da família Curculionidae, em testes de laboratório (SHAPIRO-ILAN et al., 2000, 2003; STUART et al., 2004; DUNCAN et al., 2003).

As variações nos resultados de susceptibilidade dos diferentes estágios (larva e adulto) de *H. hampei* podem ser explicadas devido às diferenças na morfologia. As larvas apresentam cutícula menos rígida e os espiráculos mais expostos, favorecendo a entrada dos juvenis infectantes. Os adultos de *H. hampei*, apresentam cutícula mais rígida, espiráculos pequenos e escondidos sob os élitros, grandes mandíbulas e alta mobilidade, ao contrário das larvas (BENAVIDES-MACHADO et al., 2010; RUBIO, 2003). Todos esses fatores, contribuem para uma baixa mortalidade, tornando o estágio adulto da broca-do-café mais resistente ao ataque por NEPs.

Na fase larval de *H. hampei* foi possível observar o desenvolvimento completo dos nematoides e decomposição dos tecidos das larvas. Observou-se ainda, a sintomatologia típica de infecção por isolados do gênero *Steinernema*, na qual as larvas passaram a apresentar coloração amarela (Figura 2A). Da mesma forma, foram observados sintomas típicos de infecção por isolados do gênero *Heterorhabditis*, na qual as larvas infectadas apresentaram coloração entre laranja e vermelho (Figura 2B). Estes sintomas de infecção também foram observados nos trabalhos de Molina e Lopes (2009) e Benavides-Machado et al. (2010).

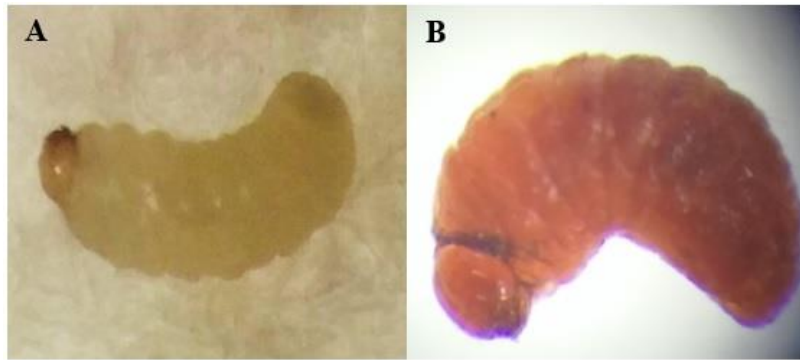


Figura 2 – (A) Larva de *H. hampei* infectada por nematoide do gênero *Steinernema*. **(B)** Larva de *H. hampei* infectada por nematoide do gênero *Heterorhabditis*.

Fonte: da autora.

5.3 APLICAÇÃO DE JUVENIS INFECTANTES SOBRE FRUTOS DE CAFÉ INFESTADOS

Foi possível observar que tanto *S. feltiae* quanto IBCB-n46 (*Heterorhabditis* sp.) não foram capazes de penetrar o fruto pelo orifício feito pela broca, infectar e causar a morte dos insetos no interior do fruto. Não foi constatada também a presença de JIs nas galerias feitas pelas brocas e nenhum inseto com sintoma de infecção por nematoides. No entanto, observou-se após cinco dias da aplicação dos NEPs a presença de alguns JIs sobre o fruto e estes ainda apresentavam mobilidade, fato observado também por Molina e Lopes (2009).

Castillo e Marbán-Mendoza (1996) realizaram ensaios semelhantes em condições de laboratório com oito isolados de NEPs, sendo cinco do gênero *Steinernema* e três do gênero *Heterorhabditis* e observaram após seis dias da aplicação, que nenhum dos isolados causaram mortalidade nos insetos no interior dos frutos, corroborando com o observado neste estudo.

Ainda, Allard e Moore (1989) observaram que, *Heterorhabditis* sp., aplicado na concentração de 240JIs/por repetição, após quatro dias, causou 68% de mortalidade nos adultos da broca dentro do fruto. Segundo os autores, 47 adultos e seis larvas dissecados estavam infectados pelo nematoide, o que não foi possível observar neste estudo, visto que, os insetos se encontravam vivos no interior do fruto.

No trabalho de Molina e Lopes (2009), foi observado após sete dias da aplicação dos JIs, que a penetração e o parasitismo foram proporcionais às dosagens aplicadas sobre o fruto. Segundo os autores, nas altas dosagens (125 e

625 Jls/por fruto) foram obtidos os maiores índices de penetração e as maiores mortalidades. Nas concentrações de 125 e 625 Jls/por fruto, as porcentagens de mortalidade provocadas por *S. feltiae* foram de 42,88 e 40,58% e por *H. bacteriophora* foram de 56,27, 61,16%, respectivamente.

Molina e Lopes (2003) realizaram testes em condições de laboratório e observaram que os Jls da espécie *H. bacteriophora* apresentaram alta capacidade de deslocamento no interior do fruto, discordando com o observado neste estudo, uma vez que, *Heterorhabditis* sp. (IBCBn-46) não foi capaz de se deslocar para o interior do fruto de café.

Manton et al. 2012 também demonstraram com testes realizados em laboratório com frutos infestados, que, após sete dias da aplicação, *S. carpocapse* conseguiu penetrar os frutos e causar uma mortalidade de 26,6% dos adultos e 23,7% das larvas de *H. hampei*. Segundo os autores, o teste-t confirmou que a mortalidade foi significativamente maior nos frutos de café tratados com nematoide.

Lara et al. (2004) estudaram o efeito de *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema* sp. aplicados em diferentes doses sobre frutos caídos no campo. Os autores observaram após um mês da aplicação, que as porcentagens de mortalidade para *Heterorhabditis* sp. variaram entre 53,2 e 82,0% e para *Steinernema* sp. entre 71,25 e 88,19%.

Há de se considerar que, as doses utilizadas nos trabalhos citados acima foram maiores do que a utilizada neste trabalho e isso pode ter proporcionado maiores chances de encontro do nematoide com a broca-do-café e por isso ter ocorrido a penetração e infecção dos insetos no interior do fruto. Porém, deve-se ressaltar que, ao se pensar em controle no campo, altas dosagens são economicamente inviáveis.

5.4 COMPATIBILIDADE DE ISOLADOS DE NEPS COM CIANTRANILIPROLE

Observou-se nos resultados obtidos para porcentagem de viabilidade de *S. feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (IBCBn-46) após 24 e 48 horas de exposição ao produto fitossanitário, que houve diferença estatística entre a testemunha e o tratamento com ciantraniliprole, mostrando que o produto alterou a viabilidade dos Jls desses nematoides, principalmente após 48 horas de exposição (Tabela 05).

Tabela 05. Porcentagem de viabilidade ($M \pm EP$) de *Steinernema feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46) após 24 e 48 horas de exposição ao produto fitossanitário ciantraniliprole (protocolo IOBC / WPRS, Vanio, 1992).

Tratamento	Viabilidade ¹ (%) 24 horas após exposição	
	<i>Steinernema feltiae</i> (SN)	<i>Heterorhabditis</i> sp. (IBCBn-46)
Testemunha	80,6 ± 1,5 a*	98,6 ± 0,2 a
Ciantraniliprole	70,4 ± 1,9 b	64,2 ± 2,0 b
CV (%)	3,34	4,28

Tratamento	Viabilidade ¹ (%) 48 horas após exposição	
	<i>Steinernema feltiae</i> (SN)	<i>Heterorhabditis</i> sp. (IBCBn-46)
Testemunha	68,0 ± 2,5 a	98,2 ± 0,4 a
Ciantraniliprole	55,6 ± 2,1 b	51,4 ± 2,5 b
CV (%)	4,69	4,79

¹Refere-se a porcentagem de JIs vivos.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferiram entre si pelo teste de Tukey $P \leq 0,05$.

Fonte: da autora

Embora tenha sido observada redução na viabilidade, a infectividade de *S. feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (IBCBn-46) após serem expostos por 24 horas ao ciantraniliprole foi de 90,0% e ambos não diferiram das respectivas testemunhas. Após 48 horas, a infectividade de *S. feltiae* foi de 86,0% não diferindo da testemunha e a infectividade de *Heterorhabditis* sp. (IBCBn-46) foi de 76,0%, diferindo do tratamento testemunha (Tabela 06). Estes valores sugerem que, o produto teve efeito deletério afetando a sobrevivência dos JIs, porém apresentou menor efeito sobre a infectividade.

Tabela 06. Porcentagem de infectividade ($M \pm EP$) de *Steinernema feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n46) a lagartas de último instar de *Galleria mellonella* após 24 e 48 horas de exposição ao produto fitossanitário ciantraniliprole (protocolo IOBC / WPRS, Vanio, 1992).

Tratamento (24 horas)	Infectividade (%) ¹	
	<i>Steinernema feltiae</i> (SN)	<i>Heterorhabditis</i> sp. (IBCBn-46)
Testemunha (JIs + água destilada)	86,0 ± 4,0 a*	96,0 ± 2,4 a
JIs expostos ao Ciantraniliprole	90,0 ± 3,2 a	90,0 ± 5,5 a
CV (%)	7,19	11,53

Tratamento (48 horas)	Infectividade (%)	
	<i>Steinernema feltiae</i> (SN)	<i>Heterorhabditis</i> sp. (IBCBn-46)
Testemunha (JIs + água destilada)	90,0 ± 6,3 a*	96,0 ± 2,4 a
JIs expostos ao Ciantraniliprole	86,0 ± 7,5 a	76,0 ± 6,3 b
CV (%)	13,45	10,7

¹Refere-se a média de lagartas mortas por tratamento.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferiram entre si pelo teste de Tukey P≤0,05.

Fonte: da autora

O efeito de produtos pertencentes ao grupo das diamidas antranílicas, grupo ao qual pertence o ciantraniliprole, sobre a viabilidade de nematoides entomopatogênicos foi observado por Koppenhöfer e Fuzy (2008). Os autores constataram que o produto clorantraniliprole foi compatível com o nematoide *H. bacteriophora* quando exposto em tanque de mistura e ainda observaram que a combinação do nematoide com o produto proporcionou maior mortalidade contra larvas de corós, indicando efeito aditivo ou sinergismo entre eles.

No trabalho realizado por Rovesti et al. (1988) e Rovesti e Deseö (1990), os autores estudaram a compatibilidade de vários produtos fitossanitários com *H. bacteriophora*, *S. carpocapse* e *S. feltiae* e observaram baixa viabilidade de *H. bacteriophora* após exposição aos fungicidas mancozeb e metalaxil + folpet, porém, verificou-se alta infectividade em lagartas de *G. mellonella*, corroborando com o observado neste trabalho.

Ainda, Silva (2011) avaliou a compatibilidade de *Heterorhabditis* sp. (JPM4) com nove produtos fitossanitários e observou que a viabilidade dos JIs foi afetada principalmente pelo inseticida Actara® (tiаметoxan), o fungicida Impact® (flutriafol) e o herbicida Sencor® (metribuzin), que inviabilizaram 40%, 55% e 24% dos nematoides, respectivamente. Porém, a infectividade não foi afetada, demonstrando que os NEPs que sobreviveram a exposição ao produto foram eficientes quando em contato com lagartas de *G. mellonella*, assim como demonstrado neste estudo para *Heterorhabditis* sp. (IBCBn-46).

Silva (2011) também avaliou a compatibilidade de *Steinernema riobrave* e demonstrou que, o fungicida Alto 100® (ciprononazol) e o herbicida Flumyazin 500® (flumioxazin) foram os produtos que mais afetaram a viabilidade dos JIs, provocando mortalidade de 70% e 30%, respectivamente. Por outro lado, a

infectividade de *S. riobrave*, assim como observado neste estudo para *S. feltiae*, não foi afetada por nenhum dos produtos avaliados.

Em contrapartida, no trabalho de Bortoluzzi et al. (2013) no qual foi avaliada a compatibilidade de *Heterorhabditis* sp. (IBCB-n40) com inseticida carbofuran, foi observado que o produto não afetou significativamente a viabilidade dos JIs, no entanto, causou uma redução de 72% na infectividade dos NEPs. O mesmo foi observado por Andaló et al. (2004b), no qual o inseticida carbofuran não afetou a viabilidade, porém reduziu 50% da infectividade dos JIs de *S. arenarium*.

Alguns autores acreditam que, a alteração na infectividade e não sobre a viabilidade pode estar relacionada ao efeito dos produtos sobre características relacionadas ao comportamento do nematoide, levando à inibição do movimento, da dispersão e da atração pelo hospedeiro ou mesmo inibir a capacidade de reprodução e desenvolvimento, de tal forma que, mesmo o nematoide estando vivo, este não é capaz de causar mortalidade (ROVESTI; DESEO, 1990, LAZNIK et al. 2012).

Além disso, segundo Andaló et al. (2004b) alguns produtos atuam como inibidores de síntese de lipídeos, que são a principal fonte de energia dos JIs e representam cerca de 30% do seu peso corporal e, é por meio desta reserva que os NEPs se mantêm vivos até encontrarem um novo hospedeiro para parasitar. Desta forma, sugere-se que, o ciantraniliprole (Benevia™) não afetou o comportamento e nem a reserva lipídica dos juvenis infectantes de *S.feltiae* e *Heterornabditis* sp. (IBCB-n46) e, por isso, estes permaneceram infectantes.

Segundo protocolo de Vanio (1992) taxa de mortalidade ou redução de infectividade em relação à testemunha, maiores que 50% são indicativos de incompatibilidade. Nesse sentido, o produto ciantraniliprole pode ser considerado compatível com os nematoides avaliados neste trabalho, visto que, a redução na viabilidade bem como na infectividade foram menores que 50%.

Estudos sobre o efeito dos NEPs com outros agentes de controle; novas estratégias de aplicação, para aumentar a eficiência e reduzir os custos da sua utilização no campo; descoberta e utilização de isolados nativos; estudos para avaliar sua eficácia sob várias condições ambientais, tipos de solo e densidade populacional da praga, são necessários para que, os NEPs sejam utilizados como ferramentas do manejo de populações de *H. hampei*.

CONCLUSÕES

Com exceção dos isolados *S. puertoricense* (CER-n 125) e *Steinernema* sp. (IBCB-n 27), todos os isolados avaliados apresentaram patogenicidade sobre adultos e larvas de *H. hampei*.

As larvas da broca-do-café foram mais susceptíveis aos nematoides em relação aos adultos.

S. feltiae e *Heterorhabditis* sp. (IBCBn-46) não foram capazes de penetrar os frutos de café infestados com adultos e larvas de *H. hampei*.

O inseticida Benevia™ (ciantraniliprole) foi compatível com *S. feltiae* e *Heterorhabditis* sp. (IBCBn-46).

REFERÊNCIAS

ACEVEDO, J.P.M.; SAMUELS, R.I.; MACHADO, I.R.; DOLINSKI, C. Interactions between isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM4 during infection of the sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of invertebrate pathology**, v.96, n.2, p.187-192, 2007.

ADAMS, B. J.; FODOR, A.; KLEIN, M. G.; H. L.; STACKEBRANDT, E.; STOCK, S. P. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. **Biological Control**, 38: 4-21, 2006.

AGROFIT, 2016. **Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 12 jan 2016

ALLARD, G.B.; MOORE, D. *Heterorhabditis* spp. nematodes as control agents for coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.54, n.1, p.45-48, 1989.

ALVES, S.B.; MOINO Jr, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos Fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2ed. Piracicaba-SP: Fealq, 1998. v. 4. p.217-238.

ALVES, L.F.A.; ROHDE, C.; ALVES, V.S. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapsae* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p.139-141, 2005.

ALVES, V. S., MOINO, J. A., SANTA-CECILIA, L. V. C., ANDALÓ, V., SOUZA, G. C. Patogenicidade de nematoides entomopatogênicos a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 67-73, 2009a.

ALVES, V.S.; MOINO J.R. A. Deslocamento vertical de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae) na busca por *Dysmicoccus texensis* (Tinsley) (Hemiptera: Pseudococcidae) em laboratório e casa-de-vegetação. **Ciência Agrotecnica**, v. 33, n. 4, p. 971-976, 2009b.

ALVES, V.S.; ALVES, L.F.A.; QUADROS, J. C.; LEITE, L.G. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 479-482, 2009c.

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

ALMENARA, D.P.; ROSSI, C.; NEVES, C.M.R.; WINTER, C.E. Nematoides Entomopatogênicos. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. INCT-EM, p.1-40, 2012.

ANDALÓ, V.; MOINO Jr. A.; SANTA-CECILIA, L. V. C.; SOUZA, G. C. Seleção de isolados de fungos e nematoides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.2, p. 181-187, 2004a.

ANDALÓ, V.; MOINO Jr. A.; SANTA-CECILIA, L.V.C. Compatibilidade de nematoides entomopatogênicos com produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 149-158, 2004b.

ANVISA, 2015. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal>. Acesso em: 22 jul 2015.

BAKER, P.S.; BARRERA, J.F.; RIVAS, A. Life-history studies of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*, Scolytidae) on coffee trees in southern Mexico. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 29, n.3, p.656-662, 1992.

BARBOSA, A.E.A.D. **Transformação genética de *Coffea arabica* para resistência a broca-do-café**. 2009. 70p. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia), Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2009.

BELLINI, L.L. **Avaliação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* Fabr. e de fitonematóides em cana-de-açúcar**. 2011. 99p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011.

BENASSI, V.L.R.M. A broca-do-café. **Documentos 57**. Vitória: EMCAPA, 63p. 1989.

BENAVIDES, P; GÓNGORA, C; BUSTILLO, A. 2012. Insecticides – Advances in Integrated Pest Management. IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia Perveen F (ed). 1 ed. Rijeka, Croacia, In Tech. p. 511-540.

BENAVIDES-MACHADO, P.; QUINTERO, J. C.; LÓPEZ J. C. Evaluación en el laboratorio de nematodos entomopatogênicos nativos para el control de la broca del café. **Cenicafé**, v.61:(2), p.119-131. 2010.

BRENNER, D.J. Additional genera of Enterobacteriaceae. In: DWORKIN, M. et al., (Ed). **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. New York: Springer, 1999. p. 2673-2695.

BORTOLUZZI, L.; ALVES, L. F. A.; ALVES, V. S.; HOLZ, N. Entomopathogenic nematodes and their interaction with chemical insecticide aiming at the control of banana weevil borer, *Cosmopolites Sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 2013, v.80, n.2, p.183-192.

- BURMAN, M. *Neoplectana carpocapse*: toxin production by axenic insect parasitic nematodes. **Nematológica**, v. 78, p.62-70, 1982.
- BUSTILLO, A.E. Utilización del control biológico clásico em un programa de manejo integrado: El caso de la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia, p.143-148. In Manejo Integrado de Plagas. Curso Internacional. Instituto Agropecuario, Santa Fé de Bogotá, Colômbia, 1995, 232p.
- BUSTILLO, A.E. 'El manejo de los cafetales y su relación con el control de la broca del café en Colombia', FNC-Cenicafé, Chinchiná, Colombia. **Boletín Técnico**, 24, Cenicafe, 2002.
- CASTILLO, A.; BARRERA, J.F. Primer registro de nematodo parasitando a la broca del café en cafetales de México. In: **Reunión intercontinental sobre broca del café II**, Tapachula (Chiapas) México, 1998, p. 47.
- CASTILLO, A., F. INFANTE., J.F. BARRERA., L. CARTA. & F.E. VEGA. First field report of a nematode (Tylenchida: Spherularioidea) attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.79, p.199-202, 2002.
- CASTILLO, A.; MARBÁN, M.N. Evaluación em laboratorio de nematodos Steinernematidos y Heterorhabditidos para el control biológico de la broca del café, *Hypothenemus hampei* Fer. **Nematropica**, v.26, p.101-109, 1996.
- CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **A cultura do Café**. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/cafe.html>>. Acesso em: 22 jul. 2015.
- CLARKE, D.J. Photorhabdus: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. **Cellular Microbiology**, 10: 2159-2167, 2008.
- CONAB, 2015. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Safra 2015**. Primeiro Levantamento, Brasília, 2015.
- CURE, J. R.; SANTOS, R. H. S.; MORAES, J. C.; VILELA, E. F.; GUTIERREZ, A. P. Fenologia e dinâmica populacional da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) relacionadas às fases de desenvolvimento do fruto. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n.3, 1998.
- DUNCAN, L. W.; DUNN, D. C.; BAGUE, G.; NGUYEN, K. Competition between entomopathogenic and free-living bacterivorous nematodes in larvae of the weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Journal of Nematology**, v.35, n.2, p.187-193.
- DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 90, n. 6, p. 453-465, 2000.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFF ELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.152, p.465-512, 2006.

DOLINSKI C.; A. MOINO JR. Utilização de nematóides entomopatogênicos nativos e exóticos: O perigo das introduções. **Nematologia Brasileira**. v.30(2), p.139-149, 2006.

ELLIOT, S.L.; SABELIS, M.W.; JANSEN, A.; GEEST, L.P.S.V.D.; BEERLING, E.A.M.; FRANSEN, J. Can plants use entomopathogens as bodyguards? **Ecology letters**, 2000, v.3, p.228-235.

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

FUGA, C.A.G.; FERNANDES, R.H; LOPES, E. A. Nematoides entomopatogênicos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 3, p.56-75, 2012.

GALLO, D. Pragas das Plantas e seu Controle. In: GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. **Entomologia Agrícola**. ed. Fealq. p.433-450, 2002.

GASSMANN, A. J.; STOCK, S. P.; SISTERTON, M. S.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Synergism between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* crops: integrating biological control and resistance management. **Journal of Applied Ecology**, v.45, n.3, p.957-966.

GEDEN, C. J.; AXTELL, R. C.; BROOKS, W. M. Susceptibility of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) to the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae*, *S. glaseri* (Steinernematidae) and *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). **Journal of Entomological Science**, v. 20, n. 3, p. 331-339, 1985.

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**, Campinas, v.70, p.81-86, 2011.

GREWAL, P. S.; KOPPENHÖFER, A. M.; CHOO, H. Y. Lawn, turfgrass and pasture applications. **Nematodes as biocontrol agents**, p. 115-146, 2005.

GUHARAY, F.; MONTERREY, J. Manejo ecologico de la broca del cafeto (*Hypothenemus hampei*) em America Central. **Manejo Integrado de Plagas**, San José, 22, p. i-viii, set. 1997.

GUTIERREZ, A.P.; VILLACORTA, A.; CURE, J.R.; ELLIS, C.K.. Tritrophic analysis of the coffee (*Coffea arabica*) – Coffee berry borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] – Parasitoid system. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil** v. 27, p. 357-385, 1998.

- JARAMILLO J.; BORGEMEISTER C.; BAKER P.S. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. **Bull Entomol Res**, 2006, 96: 223–233.
- KAY, I.R.; COLLINS, P.J. The problem of resistance to insecticides in tropical insects pests. **Insect Science Aplicata**, 1987, 8:715-721.
- KOPPENHOFER, A. M.; GREWAL, P. S. Compatibility and Interactions with Agrochemicals and Other Biocontrol Agents. **Nematodes as biocontrol agents**, p. 363, 2005.
- KOPPENHÖFER, A.M.; GREWAL, P.S.; KAYA, H.K. Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: the mechanism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.94, n.3, p.283-293, 2000.
- 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**, 2002, v.24, n.1, p.90-97.
- KOPPENHÖFER, A. M.; FUZY, E. M. Effect of the anthranilic diamide insecticide, chlorantraniliprole, on *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) efficacy against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biological Control**, 2008, v.45, n.1, p.93-102.
- LAZNIK, Z.; VIDRIH, M.; TRDAN, S. The effects of different fungicides on the viability of entomopathogenic nematodes *Steinernema feltiae* (Filipjev), *S. carpocapsae* Weiser, and *Heterorhabditis downesi* Stock, Griffin & Burnell (Nematoda: Rhabditida) under laboratory conditions. **Chilean journal of agricultural research**, v. 72, n. 1, p. 62-67, 2012.
- LARA, J. C.; LÓPEZ, J. C.; BUSTILLO, A. E. 2004. Efecto de entomonematodos sobre poblaciones de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), en frutos en el suelo. **Revista Colombiana de Entomología**, 30 (2): 179-185.
- LAURENTINO, E.; COSTA, J.N.M. Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia. **Documentos 90**. Embrapa Rondônia. ed. 21p. 2004.
- LE PELLEY, R.H. Pests of coffee. Longmans Green and Company Ltd, London, 1968, 590p.
- LEITE, L.G.; MACHADO L.A.; AGUILLERA, M.M.; RODRIGUES, R.C.D.; NEGRISOLI JR. A.S. Patogenicidade de *Steinernema* e *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida) contra ninfas da cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). **Revista Agrícola**, v.78, p.139-148, 2002.
- LEITE, L.G.; TAVARES, F.M.; BOTELHO, P.S.M.; BATISTA FILHO, A.; POLANCZYK, R.A.; SCHMIDT, F.S. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e

inseticidas químicos contra *Sphenophorus Levis* e *Leucothyreus* sp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, p. 40-48, 2012.

LEWIS, E.D.; CAMPBELL, J.; GRIFFIN, C.; KAYA, H.; PETERS, A. 2006. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, v.38, n.1, p.66-79.

LUBEGO, S. The use of four Rhabditid Nematode species in the control of *Cosmopolites sordidus*, *Hypothenemus hampei* and *Cylas puncticollis*. 1992. 111p. Tese (Doctorate in Technology of Crop Protection), University of Reading, Reading - UK, 1992.

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

MANTON, J.L.; HOLLINGSWORTH, R. G.; CABOS, R.Y.M. Potential of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) Against *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) in Hawai'i. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 4, p. 1194-1197, 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café**. (2015). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe>. Acesso em: 22 jul. 2015.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café**. (2015). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2015/03/emergencia-fitossanitaria-e-prorrogada-em-minas-gerais>. Acesso em 03 set. 2015.

MATIELLO, J. D. **Perdas no rendimento e qualidade de *Coffea canephora* devido a *Hypothenemus hampei***. 2008. 36p. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

MOLINA, J.P.A; LÓPEZ, N.J.C. Producción in vivo de três entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. **Revista Colombiana de Entomología**, v.27, n.1-2, p.73-78, 2001.

McCOY, C. W.; SHAPIRO, D. I.; DUNCAN, L. W.; NGUYEN, K. Entomopathogenic nematodes and other natural enemies as mortality factors for larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, 2000, v.19, n.2, p.182-190.

MOLINA, J. P. A.; MOINO JR, A.; CAVALCANTI, R. S. Produção in vivo de nematoides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n.3, p. 347-354, 2004.

MOLINA, J.P.A; MOINO, A.J.R.; CAVALCANTI, R.S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, F.A. Amostragem e avaliação de técnicas de isolamento de nematoides entomopatogênicos nativos obtidos em Lavras, Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v. 29(1), p.17-23, 2005a.

MOLINA, J.P.A.; MOINO, A. JR.; CAVALCANTI, R.S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, F.A. Patogenicidade, Multiplicação e Biologia de Isolados Nativos de Nematóides Entomopatogênicos (*Rhabditida: Heterorhabditidae*) provenientes de Lavras, MG. **Nematologia Brasileira**, 2005b, Vol. 29(1): 25-30.

MOLINA, J.P.; J.C. LÓPEZ. Desplazamiento y parasitismo de los entomonematodos *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) y *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae) hacia frutos infestados con la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae). **Revista Colombiana de Entomología**, 2002, v.28, p. 63-69.

MOLINA, J.P.; J.C. LÓPEZ. Supervivencia y parasitismo de nematodos entomopatogênicos para el control de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) en frutos de café. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, 2003, v.29, p. 523-533.

MOLINA, J.P.; LÓPEZ J.C. Efeito da aplicação de nematoides entomopatogênicos sobre frutos infestados com broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Nematologia Brasileira**, v. 33(2), p.115-122, 2009.

MORAES, J. C. **Pragas do cafeeiro**: importância e métodos alternativos de controle. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998. 74 p.

MONTEIRO, C. M. O; Matos, R. S.; PRATA, M. C. A; BATISTA, E. S.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; CARVALHO, V. A. M. Compatibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) isolado RSC-5 com diferentes carrapaticidas utilizados no controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.1, p.2-7, 2014.

MWAITULO, S.; HAUKELAND, S.; SÆTHRE, M. G.; LAUDISOIT, A.; MAERERE, A. P. First report of entomopathogenic nematodes from Tanzania and their virulence against larvae and adults of the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, 2011, v.31(03), p.154-161.

NEGRISOLI JR, A. S.; BARBOSA, C. R.C; MOINO Jr. A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) utilizando o protocolo modificado da IOBC/WPRS. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 111-116, 2008.

NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 77-82, 2005.

OKUMURA, A. S.; NEVES, P. M. O. J.; PASSAGNOLO, A. F. ; CHOCOROSQUI, V. R. C.; SANTORO, P. H. Controle de *Hypothenemus hampei* (FERRARI) em Terreiros de Secagem de Café. **Semina**, v. 24, n.2, p. 277-282, 2003.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v.5, n.4, p.17-32, 2012.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2ed. Piracicaba-SP: Fealq, 1998. v. 4. p.1015-1037.

PÉREZ, J.; INFANTE, F.; POINAR JR, G.; CASTILLO, A.; VEGA, F. E. Natural parasitism of *Metaparasitylenchus hypothenemi* (Tylenchida: Allantonematidae) on the coffee berry borer in Chiapas, Mexico. **Biocontrol Science and Technology**, 2015 v. 25(5), p. 608-612.

PEZOWICZ, E. Effects of Steinernematidae and Heterorhabditidae on the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **IOBC WPRS BULLETIN**, v.26, n.1, p.193-196, 2003.

POINAR JR, G.; VEGA, F. E.; CASTILLO, A.; CHAVEZ, I.; INFANTE, F. *Metaparasitylenchus hypothenemi* n. sp. (Nematoda: Allantonematidae), a parasite of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Curculionidae: Scolytinae). **Journal of parasitology**, 2004, v.90(5), p.1106-1110.

RASMANN, S.; KÖLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; TURLINGS, T. C. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, 2005, v.434, p.732-737.

REIS, P.R. Broca-do-café: conheça os métodos para eliminar a ameaça. **Cultivar**, Pelotas, v.38, p.10-13, 2002.

REIS, P. R. **Controle químico no manejo integrado da broca-do-café**. In: HOMANN, C. L. (Org.). Manejo da broca-do-café. Londrina: IAPAR, p. 151-175, 2007.

ROVESTI, L.; DESEÖ, K. V. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). **Nematológica**, v. 36, n. 1, p. 237-245, 1990.

RUBIO G., J.D. **Estudios morfológicos de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) en la búsqueda de estructuras de Mycangia**. Manizales: Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2003. 180 p.

SABINO, P. H. D. S.; SALES, F. S.; GUEVARA, E. J.; MOINO JR, A.; FILGUEIRAS, C. C. Compatibility of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Rhabditida) with insecticides used in the tomato crop. **Nematoda**, v.1, n.1, p.0-0, 2014.

SEPULVEDA-CANO, P.A.; LOPEZ-NUNEZ, J.C.; SOTO-GIRALDO, A. Effect of two entomopathogenic nematodes on *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Dryphthoridae). **Revista Colombiana de Entomologia**, v.34, p.62-67, 2008.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; WRIGHT, S. E.; TUTTLE, A. F.; COOLEY, D. R.; LESKEY, T. C. Using entomopathogenic nematodes for biological control of plum curculio, *Conotrachelus nenuphar*. Effects of irrigation and species in apple orchards. **Biological Control**, 2013, v.67(2), p.123-129.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GARDNER, W. A.; FUXA, J. R.; WOOD, B. W.; NGUYEN, K. B.; ADAMS, B. J.; HALL, M. J. Survey of entomopathogenic nematodes and fungi endemic to pecan orchards of the Southeastern United States and their virulence to the pecan weevil (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, 2003, v.32, n.1, p.187-195.

Shapiro, D. I.; McCoy, C.W., Fares, A.; Obreza, T.; DOU, H. Effects of soil type on virulence and persistence of entomopathogenic nematodes in relation to control of *Diaprepes abbreviatus*. **Environmental Entomology**, 2000, v.29 p.1083-1087.

SILVA, M. A. T. da. **Controle de *Quesada gigas* (Hemiptera: Cicadidae) pela aplicação de nematoides entomopatogênicos e compatibilidade com alguns produtos fitossanitários em cafeeiro**. 2011. 91p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R. **Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle**. 2ed. Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1997. 40p. (Boletim Técnico, 50).

SOUZA, L. M., JÚNIOR, A. M., MERTZ, N. R., SILVA, M. A. T., SOARES, F. M., FILHO, R. Z. B. Nematoides Entomopatogênicos e Compatibilidade com Imidaclopride Visando ao Controle de *Spodoptera frugiperda* em Viveiro Florestal.

STUART, R. J.; POLAVARAPU, S.; LEWIS, E. E.; GAUGLER, R. Differential susceptibility of *Dysmicoccus vacinni* (Homoptera: Pseudococcidae) to entomopathogenic nematodes (Rhabdita: Heterorhabditidae and Steinernematidae), **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 4, p. 925-932, 1997.

STUART, R.J.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; JAMES, R.R.; NGUYEN, K.B.; McCOY, C.W. Virulence of new and mixed strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* to larvae of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus*. **Biological Control**, v.30, p.439-445, 2004.

TAVARES, F.M.; FILHO, A.B.; LEITE, L.G.; ALMEIDA, L.C.; SILVA, A.C.; AMBROS, C.M.G. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema sp.* (Nemata: Rhabditida) sobre larvas do bicudo da cana-de-acucar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em laboratório e casa-de-vegetacao. **Nematologia Brasileira**, v. 31, p. 12-19, 2007.

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

TREVERROW, N.L.; BEDDING, R.A. Development of system for the control of the banana weevil borer, *Cosmopolites sordidus* with entomopathogenic nematodes. p.41-47. In: BEDDING, R. **Nematodes and the biological control of insect pest.** Austrália: CSIRO, 164p. 1993.

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

VARAPRASAD, K. S.; BALASUBRAMANIAN, S.; DIWAKAR, B. J.; RAO, C. R. First report of an entomogenous nematode, *Panagrolaimus* sp. from coffee-berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) from Karnataka, India. **Plant Protection Bulletin** (Faridabad), 1994, 46(2/3).

VEGA, F.E; INFANTE, F; CASTILLO, A; JARAMILLO, J. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions (en línea). En: **Terrestrial Anthropolod Reviews**, v.2, p.129-147, 2009.

VENEZIANO, W. Cafeicultura em Rondônia: situação atual e perspectivas. Porto Velho: Embrapa-CPAF Rondônia, 1996. 24p. **Documentos 30**, (Embrapa-CPAF Rondônia).

VILLACORTA, A.; BARRERA J.F. Nova dieta merídica para criação de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 1993, v. 22, p. 405-409.

VOSS, Marcio. Nematoides Entomopatogênicos (NEPs) como Agentes de Controle Biológico de Insetos. In:_____. **Manual de Técnicas Laboratoriais para Obtenção, Manutenção e Caracterização de Nematoides Entomopatogênicos.** ed. Embrapa Trigo. Documentos 97, p. 9-17, 2010.

WHITE, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematodes larvae from cultures. *Science*, 66: 302-303.