



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS-PPGPP

Telliane Santos Salgueiro Silva

Interação entre *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no parasitismo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae).

Rio Largo – AL
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS-PPGPP

Telliane Santos Salgueiro Silva

Interação entre *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no parasitismo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae).

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Proteção de Plantas.

Orientador: Dr. Elio Cesar Guzzo.

Co-orientador: Dr. Aldomário Santo Negrisoni Jr.

Rio Largo – AL

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana

- S586i Silva, Telliane Santos Salgueiro.
Interação entre *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no parasitismo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae). / Telliane Santos Salgueiro Silva. – 2020.
- 50f.: il.
Orientador: Prof. Dr. Elio Cesar Guzzo.
Co-orientador: Dr. Aldomário Santo Negrisoli Jr.
- Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas.) – Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2020.
- Inclui Bibliografia.
1. Controle biológico. 2. Broca da cana. 3. Competição intraguilda. I. Título
CDU: 632(813.5)

TELLIANE SANTOS SALGUEIRO SILVA

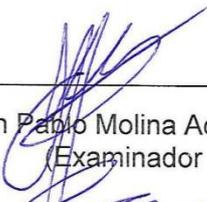
Interação entre *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae) no parasitismo de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Proteção de Plantas, do Centro de Engenharias e Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.



Dr. Elio Cesar Guzzo – Embrapa Tabuleiros Costeiros
(Orientador)

Banca examinadora:



Dr. Juan Pablo Molina Acevedo – Agrosavia
(Examinador Interno)



Dr. Geraldo Pereira de Arruda Filho - Usina Santo Antônio
(Examinador Externo)

Rio Largo, AL
2020

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado a chance de seguir a vida, restaurando minha saúde diante da enfermidade, isso só me fortaleceu para que assim, eu continue lutando cada dia mais por meus objetivos. Obrigada meu paizinho do céu.

À minha mãe, Telma Santos e à minha avó, Nair Santos, por proporcionarem toda a estrutura necessária para a minha caminhada até aqui.

Ao meu Orientador, Doutor Elio Guzzo, por toda paciência durante esses 2 anos de mestrado e ao meu co-orientador Aldomário Negrisoni, que me ajudou na condução de todo experimento.

Aos membros da banca, Doutor Juan Pablo Molina e Doutor Geraldo Arruda, por aceitarem o convite e, com toda experiência, contribuir com este trabalho.

À equipe da Fitoagro, nas pessoas de Antônio e Luís, por todo apoio com o material do experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, na pessoa da professora Iraildes, por toda compreensão durante uma fase difícil. E à FAPEAL, pela oportunidade de bolsa.

À Embrapa, pela oportunidade de estágio e aos seus funcionários José Carlos, Tenório e Antônio, pelas viagens a Ypioca para buscar os materiais do experimento.

Ao Doutor João Gomes pela ajuda na parte estatística.

Aos amigos que fiz na Embrapa, Junior (que foi fundamental no início do trabalho), Diego, Thais e Elisson pela ajuda no experimento, destacando ainda as amigas Rayanne e Patrícia, que por muitas vezes me salvaram nas avaliações, sendo meu braço direito nessa pesquisa.

Aos amigos que fiz no CECA durante esses 2 anos de mestrado, principalmente à Camila Alexandre que se fez mais presente por todo esse tempo.

Às minhas primeiras amigas de apartamento, Karen Oliveira e Gisliane Osorio, que começaram comigo lá em 2017 me apoiando em todos os momentos. Às amigas que vieram depois, Terezinha, Wanessa, Taci e Joyci.

Aos amigos que, desde a graduação, estão junto comigo nessa luta, Wellington Manoel e Symonni Fernandes.

Aos amigos Bruno Anacleto, Juliana Catonio e Douglas Alberto pela rápida ajuda na estatística, mas que foi de fundamental importância.

Ao meu amigo Naldo, esse que tanto me ajudou nas minhas idas e vindas entre Arapiraca e Maceió, sem ele minha caminhada seria bem mais difícil.

Ao meu NAMORADO Victor, que apareceu em minha vida aos 45 do segundo tempo, e aceitou passar comigo a fase mais estressante desse mestrado, aguentando minhas agonias e mudanças de humor, sempre me incentivando e sendo o companheiro que eu preciso por perto.

A todos que me ajudaram, seja financeiramente ou com orações, durante a fase de saúde mais difícil de minha vida.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para este trabalho, o meu muitíssimo obrigada!

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”

(Josué 1:9)

INTERAÇÃO ENTRE *Cotesia flavipes* (CAMERON, 1891) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) E *Heterorhabditis bacteriophora* POINAR, 1976 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) NO PARASITISMO DE *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1974) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE).

RESUMO

Nematoides entomopatogênicos (NEPs) são considerados microrganismos benéficos, porém, eles podem afetar insetos benéficos, como os parasitoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre o endoparasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e o nematoide *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae), no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae), contribuindo com a tomada de decisão para o uso do controle biológico no manejo integrado de pragas (MIP) por parte dos produtores de cana-de-açúcar. Lagartas de *D. saccharalis* foram oferecidas para fêmeas de *C. flavipes* para parasitismo. Posteriormente, a cada 3 dias, foram inoculados NEPs. Após a mortalidade (que acontecia após o segundo dia de inoculação), esperou-se 4 dias para se fazer a dissecação de *D. saccharalis*. Os resultados mostram que NEPs são capazes de matar em 48 horas lagartas de *D. saccharalis*, matando também as fases de pupa e adulto do inseto. Os resultados também mostram que os NEPs invadem o corpo de *C. flavipes* ainda dentro de *D. saccharalis*, impedindo assim o desenvolvimento do endoparasitoide. Pode-se concluir que existe competição intraguilda entre os agentes de controle biológico, porém os mesmos podem ser usados no MIP, respeitando-se um período de carência entre a aplicação deles. Após a liberação do endoparasitoide *C. flavipes*, deve-se aguardar 9 a 12 dias para aplicação de NEPs, assim o desenvolvimento da mesma não será prejudicado, aproveitando em campo a eficiência dos dois inimigos naturais.

Palavras chave: Controle biológico; Broca da cana; Competição intraguilda.

INTERACTION BETWEEN *Cotesia flavipes* (CAMERON, 1891) (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) AND *Heterorhabditis bacteriophora* POINAR, 1976 (RHABDITIDA: HETERORHABDITIDAE) IN THE PARASITISM OF *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1974) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE).

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are considered beneficial microorganism, however, they can affect beneficial insects, such as parasitoids. The objective of this work was to evaluate the interaction between the larval endoparasitoid *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) and the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae), in the control of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae), contributing to the decision-making process for the use of biological control in integrated pest management (IPM) by sugarcane producers. *Diatraea saccharalis* caterpillars were offered to *C. flavipes* females for parasitism. Subsequently, every 3 days, EPNs were inoculated. After mortality (which occurred after the second day of inoculation), it was waited 4 days to dissect *D. saccharalis*. Results show that EPNs are capable of killing *D. saccharalis* caterpillars in 48 hours, also killing the pupa and adult phases of the same insect. The results also show that EPNs invade the body of *C. flavipes* still inside *D. saccharalis*, thus preventing the development of the endoparasitoid. It can be concluded that there is intraguild competition between the biological control agents, but they can be used in the IPM, respecting a period between their applications. After the release of the endoparasitoid *C. flavipes*, 9 to 12 days should be waited for application of EPNs, so its development will not be hindered, taking advantage of the efficiency of the two natural enemies in the field.

Keywords: Biological control; Sugarcane borer; Intraguild competition.

Lista de figuras

Figura 1 - Evolução da área total de cana-de-açúcar colhida no Brasil.....	15
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>D. saccharalis</i>	17
Figura 3 - Galeria aberta por <i>D. saccharalis</i> em cana-de-açúcar com sintoma de podridão-vermelha-do-colmo.....	18
Figura 4 - Número de produtos biológicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, por tipo de agente biológico.....	21
Figura 5 - Copinho com massa de casulos e adultos de <i>C. flavipes</i> recém-emergidos, liberados em campo	23
Figura 6 - Ciclo de vida de <i>Heterorhabditis</i> sp. e <i>Steinernema</i> sp.....	25
Figura 7 - Multiplicação dos NEPs. A) Lagartas de <i>G. mellonella</i> com sintoma de morte por <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> em armadilha de White; B) Suspensão de JIs para uso nos bioensaios	28
Figura 8 - Procedimentos experimentais. A) Exposição das lagartas de <i>D. saccharalis</i> ao parasitismo por <i>C. flavipes</i> ; B) Acondicionamento do material durante o experimento; C) Quantificação dos NEPs sob microscópio estereoscópico.....	29
Figura 9 - Inoculação de NEPs.....	30
Figura 10 - Mortalidade de <i>D. saccharalis</i> por <i>C. flavipes</i> (com formação de massa) e NEPs	34
Figura 11 - Nematoides dentro de larva de <i>C. flavipes</i> ainda dentro do corpo de <i>D. saccharalis</i>	35
Figura 12 - Pupa de <i>C. flavipes</i> com sintoma de morte por nematoide	36
Figura 13 - Porcentagem de mortalidade de <i>D. saccharalis</i> por <i>C. flavipes</i>	37
Figura 14 - Porcentagem de mortalidade de <i>D. saccharalis</i> por <i>C. flavipes</i> com formação de massa.....	37
Figura 15 - A) <i>D. saccharalis</i> morta com formação de massa por <i>C. flavipes</i> . B) <i>D. saccharalis</i> morta com formação de massa de <i>C. flavipes</i> com sintoma de NEPs ...	38
Figura 16 - Porcentagem de mortalidade de <i>D. saccharalis</i> por nematoides	38
Figura 17 - A) <i>D. saccharalis</i> com sintoma de morte por NEPs; B) Dissecção de <i>D. saccharalis</i> com NEPs dentro; C) Pupa dissecada com morte confirmada por NEPs; D) Adulto dissecado com morte confirmada por NEPs	39
Figura 18 - Porcentagem de mortalidade de <i>D. saccharalis</i> por nematoides e <i>C. flavipes</i>	40

Figura 19 - *D. saccharalis* dissecada com a presença de larvas de *C. flavipes* e NEPs40

Lista de tabelas

Tabela 1 - Datas de inoculação de NEPs e de dissecação de <i>D. saccharalis</i>	30
Tabela 2 - Análise de variância para mortalidade total	32
Tabela 3 - Análise de variância para mortalidade de <i>D. saccharalis</i> por <i>C. flavipes</i> (com formação de massa) e NEPs.....	33

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	14
2.2 Broca da cana-de-açúcar (<i>Diatraea saccharalis</i>)	16
2.3 Controle biológico	19
2.4 Controle biológico da broca da cana-de-açúcar	22
2.5. Nematoides entomopatogênicos (NEPs)	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Local do experimento	27
3.2 Obtenção de <i>C. flavipes</i> e <i>D. saccharalis</i>	27
3.3 Obtenção dos nematoides	27
3.4 Bioensaio	28
3.5 Delineamento experimental e análise estatística	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) família Poaceae, exerce importante papel na economia brasileira, principalmente pela grande produção alcançada. Para a safra de 2019/2020, a área total a ser colhida no Brasil está estimada em 8.481,2 mil hectares, e a produção está estimada em 642,7 milhões de toneladas. Deste total, 297,3 mil hectares são do estado de Alagoas, com uma expectativa de produção de 18 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

Esta cultura é severamente atacada por pragas que causam redução em sua produção, como a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae), que é considerada a principal praga da cultura no Brasil, causando sérios prejuízos econômicos, principalmente pela dificuldade de seu controle. As lagartas de *D. saccharalis*, ao se alimentam da cana-de-açúcar, causam danos diretos e indiretos. Cada 1% de infestação de *D. saccharalis* causa redução de 0,77% no peso da cana; 0,25% na produção de açúcar; e 0,20% na produção de álcool. A população dessa praga aumenta consideravelmente em certas regiões devido a fatores como o aumento da área de plantio, uso de variedades mais suscetíveis e, principalmente, pela não adoção de práticas de manejo adequadas, como o controle biológico, no manejo integrado de pragas (MIP) (GALLO et al., 2002; DINARDO-MIRANDA et al., 2011).

A utilização de inimigos naturais para o controle de pragas reduz a necessidade da aplicação de defensivos agrícolas, diminuindo assim os impactos ambientais. No Brasil, o manejo de *D. saccharalis* é baseado na liberação de inimigos naturais, com destaque para os parasitoides *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) e *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae), que apresentam eficiência no controle da broca da cana (GALLO et al., 2002; PINTO et al., 2006a; OLIVEIRA, 2012). Nematoides entomopatogênicos (NEPs) também vêm se destacando nas últimas três décadas como um potencial agente natural, recebendo grande destaque internacional. Atualmente, existem empresas especializadas na produção em massa de NEPs e de formulações prontas para sua aplicação (ALMENARA et al., 2012).

Já existem trabalhos com aplicação de NEPs no controle de diversas pragas, como o gorgulho da raiz dos citros, *Diaprepes abbreviatus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) (BULLOCK; MILLER, 1994), gorgulho da cenoura,

Listronotus oregonensis (LeConte, 1857) (Coleoptera: Curculionidae) (MIKLASIEWICZ et al., 2002) e *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (FIGUEIROA et al., 2019). Porém, ainda são necessárias pesquisas para a incorporação dos NEPs ao MIP de outras culturas.

Portanto, pretende-se com este trabalho, estudar em laboratório a interação entre o parasitoide *C. flavipes* e o NEP *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae), no controle da broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis*, contribuindo com a tomada de decisão para o uso do controle biológico no MIP por parte dos produtores de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar *Saccharum* spp. (Poaceae), originária do Sudoeste asiático, atualmente é cultivada em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo. O gênero *Saccharum* abrange sete espécies (TOPPA et al., 2010; MAPA, 2014), sendo que as variedades atualmente cultivadas no Brasil e no mundo são híbridos multiespecíficos (DIOLA; SANTOS, 2010).

É uma planta perene, e apresenta características botânicas semelhantes às de outras plantas da família Poaceae, como por exemplo, a inflorescência terminal do tipo panícula, o crescimento do caule em colmos, os quais, na fase inicial de desenvolvimento, perfilham de maneira abundante, e as folhas com lâminas de sílica em suas bordas, além de as nervuras se posicionarem paralelamente à nervura principal e a bainha foliar aberta (RODRIGUES, 1995).

No Brasil, a cana-de-açúcar foi introduzida pelos portugueses, através da expedição de Martim Afonso de Souza, no início do século XVI, logo após a colonização. Assim, foram implantadas em duas regiões: no Nordeste (na Capitania de Pernambuco) e no Sudeste (São Paulo). Na região de Pernambuco, devido às condições edafoclimáticas do território, o cultivo destacou-se de imediato com melhores resultados de produção (FERNANDES, 1990). Após o declínio da exploração do pau-brasil, a cultura da cana-de-açúcar representou o segundo ciclo econômico da coroa portuguesa no Brasil (ROSILLO-CALLE; BEZZON, 2005).

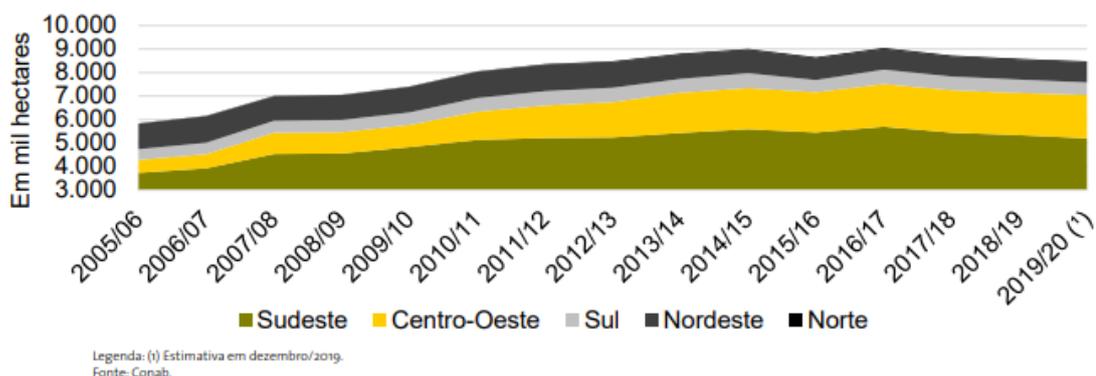
O progresso advindo dessa cultura se expressou em muitos aspectos, seja pela liderança na produção do açúcar no mercado mundial, até o ano de 1650, destinando este produto a exportações, principalmente para a Europa (MOZAMBANI et al., 2006), ou mesmo pelo fortalecimento econômico e social de algumas regiões geopolíticas do país, como a Região Sudeste, principalmente o estado de São Paulo, onde os imigrantes europeus contribuíram para o desenvolvimento industrial, movimentando a economia local e incitando a indústria metalúrgica, fundamental na construção de usinas cada vez mais modernas e sofisticadas (ROSILLO-CALLE; BEZZON, 2005).

A cultura da cana-de-açúcar tem importância econômica mundial. No cenário brasileiro, assume também posição de destaque, sobretudo, por ser matéria-prima

para a fabricação de vários produtos, movimentando a economia nacional e sendo responsável pela geração de emprego, no campo ou na indústria (LOPES; DINARDO-MIRANDA; BUSOLI, 2011). É considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e seus respectivos subprodutos. Além da produção de etanol e açúcar, as unidades de produção têm buscado aumentar sua eficiência na geração de energia elétrica, auxiliando no aumento da oferta e redução dos custos e contribuindo para ampliar a sustentabilidade do setor (CONAB, 2019). Na indústria, seu processamento aproveita praticamente todas as partes da planta para a produção de açúcar e álcool, sendo os resíduos ainda aproveitados como subprodutos, como por exemplo a vinhaça, usada na fertirrigação da própria cultura, como fonte de potássio em substituição ao adubo químico (DEMETRIO; ZONETTI; MUNHOZ, 2008).

O Brasil, na condição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tem o Sudeste como a principal região produtora (Figura 1), e projeta-se para o segmento de crescente relevância para o agronegócio brasileiro. O aumento da demanda mundial por etanol, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um participante na comercialização mundial com elevada competitividade (CONAB, 2019).

Figura 1 - Evolução da área total de cana-de-açúcar colhida no Brasil.



Fonte: CONAB (2019).

A área colhida para a safra 2019/20 está estimada em 8,48 milhões de hectares, com redução de 1,3% quando comparada com a safra 2018/19. A produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra atual, é de 642,7 milhões de toneladas, obtendo-se um acréscimo de 3,6% em relação à anterior. Em relação aos

estados, para a safra 2019/20, São Paulo continua sendo o maior produtor nacional, seguido por Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas e Pernambuco. Em Alagoas, o setor vem experimentando melhora na eficiência, em uma área menor. É estimado para o estado que a área em produção seja de 297,3 mil hectares com expectativa de produção de 18 milhões de toneladas, representando acréscimo de 11,3% em relação à safra anterior (CONAB, 2019).

2.2 Broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*)

A broca da cana-de-açúcar *D. saccharalis* (Fabricius, 1974) (Lepidoptera: Crambidae) é considerada como a principal praga da cultura no Brasil, tendo sua origem provável nas Américas Central e do Sul. Nos canaviais, sua ocorrência é frequente em todo o território brasileiro, apresentando um leque de hospedeiros dentro da família Poaceae. Assim, constantemente pode ser encontrada acarretando problemas também no milho (*Zea mays* L.), no sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), no arroz (*Oryza sativa* L.) e em outras plantas não domesticadas (PINTO; GARCIA; OLIVEIRA, 2006).

O desenvolvimento de *D. saccharalis* é do tipo holometabólico, passando pelas fases de ovo, lagarta, pupa e adulto (Figura 2). Seu ciclo biológico depende da temperatura, e pode variar de 4 a 12 dias na fase de ovo, de 20 a 90 dias no estágio larval, de 7 a 14 dias no pupal e de 3 a 15 dias no estágio adulto (BOTELHO, 1985; GALLO et al., 2002; PINTO et al., 2009). O ciclo completo do inseto varia de 53 a 60 dias, dependendo das condições climáticas. Esses insetos podem ter ao longo do ano de 4 a 5 gerações (GALLO et. al., 2002).

Após a liberação de feromônios pelas fêmeas, os machos são atraídos para acasalamento. Depois da cópula, as fêmeas realizam a postura de massas de ovos, colocando cerca de 5 a 50 ovos em cada postura, realizada na face dorsal das folhas de cana, sendo essa postura feita de forma imbricada, assemelhando-se a um segmento de couro de cobra ou escamas de peixe. Os ovos são achatados e possuem coloração amarelada, escurecendo próximo à eclosão do primeiro estágio larval (GALLO et al., 2002; OLIVEIRA, 2012).

As lagartas, quando recém-eclodidas, alimentam-se do parênquima das folhas, convergindo, a seguir, para a bainha foliar, onde sofrem uma primeira ecdise e procuram a região mais tenra do colmo, onde penetram, abrindo galerias

transversais e longitudinais no mesmo. Por causa deste comportamento, recebem o nome de brocas (BOTELHO; MACEDO, 2002). Ao atingirem o desenvolvimento completo, medem aproximadamente 25 mm de comprimento, e possuem coloração amarelo-pálida e cápsula cefálica marrom. Ao se aproximar a fase de pupação, as larvas fazem um orifício para o exterior do colmo, fechando-o com fios de seda e serragem provinda de restos de sua alimentação. Entram então na fase de pupa, ainda no interior de sua planta hospedeira, e completam sua metamorfose (GALLO et al., 2002).

Figura 2 - Ciclo biológico de *D. saccharalis*.



Fonte: Autora (2020).

Os insetos adultos apresentam uma longevidade média de aproximadamente cinco a sete dias. A principal característica do adulto desta espécie é a coloração amarelo-pardo das asas anteriores, com cerca de 25 mm de envergadura. As asas posteriores são esbranquiçadas (GALLO et al., 2002). Apresentam dimorfismo sexual à medida que os machos são geralmente menores que as fêmeas, e possuem maior pigmentação nas asas e cerdas no último par de pernas (BOTELHO; MACEDO, 2002).

A espécie *D. saccharalis* é de grande importância no Brasil, pois está amplamente distribuída nas regiões canavieiras. Além do Brasil, a espécie também está presente em outros países da América, causando danos econômicos. A praga ataca a cana durante todo seu desenvolvimento, porém, quando a cana é jovem e não apresenta seus entrenós formados, esta incidência é menor, ocorrendo a morte

da gema apical, com secamento das folhas mais novas, o que resulta no sintoma conhecido como coração morto. Já em canaviais mais desenvolvidos, a produtividade agrícola diminui com o ataque da praga, pois os colmos perdem peso, sendo menores e mais finos, quebram devido à incidência do vento, secam e morrem (BOTELHO; MACEDO, 2002). Como dano indireto, as galerias abertas no colmo contribuem para a entrada dos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, que causam a chamada podridão-vermelha-do-colmo (Figura 3), acarretando na inversão de sacarose, e competindo com as leveduras no processo de fermentação alcoólica na indústria, diminuindo o rendimento de açúcar (GALLO et al., 2002).

Figura 3 - Galeria aberta por *D. saccharalis* em cana-de-açúcar com sintoma de podridão-vermelha-do-colmo.



Fonte: Autora (2020).

Para controlar *D. saccharalis*, é preciso realizar uma amostragem do seu nível de infestação no canavial, pois a liberação de parasitoides é feita em função da população da broca em campo. A estimativa da população da praga é de fundamental importância para o sucesso do programa de manejo. A recomendação para se realizar a amostragem é que a cultura esteja com seus entrenós formados. Existem formas distintas de se fazer a amostragem e uma delas é escolhendo-se aleatoriamente dois pontos de 2 m lineares/ha, nos quais os colmos são cortados e dispostos de forma que se possa verificar a existência de orifícios feitos pela broca. O número de entrenós broqueados é calculado com a seguinte fórmula (GALLO et al., 2002; DINARDO-MIRANDA, 2008; DINARDO-MIRANDA, 2011):

$$\text{Intensidad e de infestação (II)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de entrenós broqueados}}{\text{n}^\circ \text{ total de entrenós}} \times 100$$

Dinardo-Miranda (2011) sugere a coleta de amostras em grid de 40 x 40, resultando em aproximadamente 6 pontos de amostragem por hectare, a fim de se estimar as populações de formas imaturas da praga em canaviais.

Atualmente, 62 inseticidas são registrados para o controle de *D. saccharalis* em cana-de-açúcar no Brasil, dos quais 21 são oriundos de agentes biológicos (AGROFIT, 2020). No entanto, os inseticidas químicos devem ser utilizados apenas em caráter emergencial, mediante surtos populacionais da praga. Normalmente, o controle de *D. saccharalis* é feito quase que exclusivamente por métodos biológicos.

2.3 Controle biológico

A expressão controle biológico foi utilizada pela primeira vez em 1919, por Harry Scott Smith, para mencionar o uso de inimigos naturais para o controle de insetos-praga. Em seguida, esse termo foi empregado para designar todas as formas de controle alternativas aos produtos químicos, que envolvessem práticas biológicas. O controle biológico pode ser definido como um fenômeno natural que consiste em uma regulação do número de plantas e animais pelos inimigos naturais e agentes bióticos de mortalidade. Este fenômeno natural atua sempre que uma população é regulada por outra população, ou seja, um ser vivo é sempre explorado por outro ser vivo e com efeitos na regulação do crescimento populacional, e assim mantendo o equilíbrio da natureza, com a oportunidade de selecionar tanto o invasor quanto o ambiente invadido (BUENO; VAN LENTEREN, 2011; ABRAM; MOFFAT, 2018).

Existem três formas de se explicar o controle biológico, sendo a primeira como um campo de estudos em diferentes áreas, tais como ecologia de populações, biosistemática, comportamento, fisiologia e genética. A segunda é como um fenômeno natural (quase todas as espécies têm inimigos naturais que regulam suas populações) e, a terceira, como uma estratégia de controle de pragas através da utilização de parasitoides, predadores e patógenos (BUENO; VAN LENTEREN, 2011).

Blackburn et al. (2016) ratificam que os agentes de controle biológico, incluindo uma ampla variedade de organismos, como predadores, parasitoides e entomopatógenos (bactérias, fungos, nematoides e vírus) são frequentemente usados para controlar insetos-praga. Apesar da disponibilidade comercial desses agentes de biocontrole, seu uso é limitado devido a dificuldades biológicas e econômicas. Os autores afirmam ainda que a produção em massa depende muito do ambiente em que o agente é cultivado. No Brasil, o primeiro inseto introduzido para uso como agente de controle biológico foi o parasitoide *Prospaltella berleseii* (Howard, 1906) (Hymenoptera, Aphelinidae), importado dos EUA em 1921, para o controle da cochonilha escama-branca *Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni-Tozzetti, 1886) (Hemiptera, Diaspididae) (PARRA, 2006).

O controle biológico pode ser dividido em dois tipos na agricultura: o controle biológico natural e o controle biológico aplicado. O controle biológico natural, também conhecido como equilíbrio da natureza, pode ser definido como tendência natural das populações de plantas e animais de não crescer até o infinito, nem decrescer até a extinção, como resultado de processos reguladores (como os inimigos naturais) em ambientes não perturbados (ecossistemas naturais). Este tipo de controle é responsável pela mortalidade natural no agroecossistema e, conseqüentemente, pela manutenção de um nível de equilíbrio das pragas. Porém, mesmo em agroecossistemas, muitas pragas potenciais são mantidas em níveis que não causam danos, por meio da ação dos inimigos naturais que ocorrem naturalmente (BUENO; VAN LENTEREN, 2011). De acordo com Debach e Rosen (1991), 90% de todas as pragas agrícolas são mantidas sob controle natural.

O controle biológico aplicado trata-se de liberações em massa de predadores ou parasitoides, após criação de larga escala em laboratório. Esse tipo de controle biológico é bem aceito pelo mercado, pois tem um tipo de ação rápida, muito semelhante à de inseticidas convencionais, podendo ainda ser rotulado como clássico, de conservação ou aumentativo. O controle biológico clássico consiste em estabelecer um equilíbrio biológico a uma dada praga, envolvendo a importação dos agentes de controle de um país para outro ou de uma região para outra. Uma referência no controle biológico clássico como um método de controle de pragas, foi a joaninha australiana *Rodolia cardinalis* (Mulsant, 1850) (Coleoptera: Coccinellidae) levada da Austrália em 1888 para a Califórnia – EUA, para o controle da cochonilha *Icerya purchasi* (Maskell, 1878) (Hemiptera: Margarodiadae), praga que estava

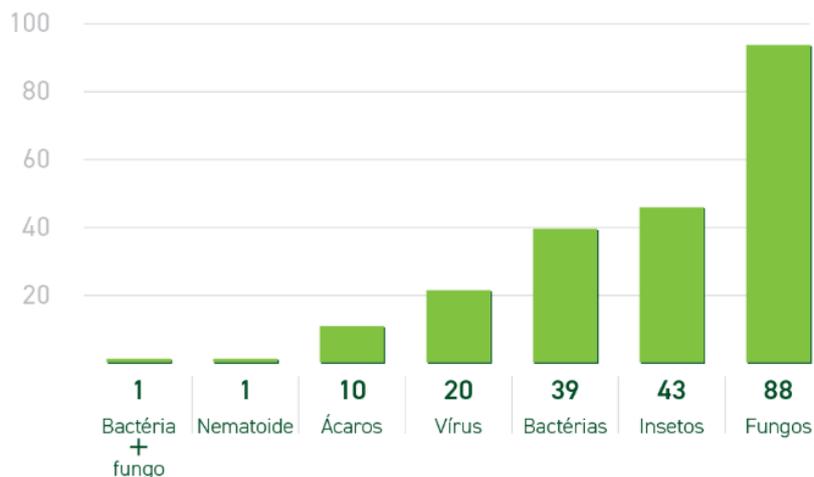
dizimando os plantios de citros (BUENO; VAN LENTEREN, 2011; BEGG et al., 2017).

O controle biológico do tipo conservativo consiste em um conjunto de medidas que evitam práticas culturais inadequadas, preservando habitat e fontes de alimentação, e uso de produtos fitossanitários seletivos, preservando assim os inimigos naturais em um agroecossistema, ou seja, manipulando o seu ambiente de forma favorável. De acordo com Bueno e Van Lenteren (2011), os inimigos naturais incidem em toda forma de agricultura, podendo ser adaptados ao ambiente local e às pragas-alvo. A preservação e a manutenção dos inimigos naturais são importantes para situar o equilíbrio biológico e minimizar os custos de produção.

O controle biológico aumentativo acontece com a liberação e a introdução dos inimigos naturais concebidos em laboratórios, de forma comercial, em grandes áreas e em vários sistemas de cultivo ao redor do mundo. Esta forma de controle é muito utilizada em cultivos com baixo índice de infestação de pragas, podendo também ser utilizado em cultivos protegidos (BUENO; VAN LENTEREN, 2011).

São considerados agentes de controle biológico os predadores, parasitoides e entomopatógenos (bactérias; fungos; nematoides; insetos; ácaros) que atuam na regulação populacional de pragas e doenças em muitos sistemas agrícolas. Existem pelo menos 194 produtos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (Figura 4), que apresentam em sua formulação algum organismo benéfico. Sendo a maioria, composta por fungos (MAPA, 2019).

Figura 4 - Número de produtos biológicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, por tipo de agente biológico.



Fonte: MAPA (2019).

Embora o número de produtos registrados seja significativo, a diversidade de agentes biológicos utilizadas ainda é muito baixa. São apenas 30 espécies distribuídas entre bactérias, fungos, nematoides, insetos, ácaros e algumas cepas de vírus. O que evidencia a necessidade de mais investimentos em pesquisas nessa área (MAPA, 2019).

2.4 Controle biológico da broca da cana-de-açúcar

Os primeiros trabalhos com controle biológico aplicado de *D. saccharalis* no Brasil consistiram na tentativa de introdução do parasitoide exótico *Lixophaga diatraea* (Townsend, 1916) (Diptera: Tachinidae), importado de Cuba e, posteriormente, na produção e liberação dos parasitoides nativos *Lydella minense* (Townsend, 1927) e *Billaea claripalpis* (Wulp, 1896) (Diptera: Tachinidae), todos sem sucesso (BOTELHO; MACEDO, 2002). Entre os principais inimigos naturais para controle de *D. saccharalis*, destacam-se *C. flavipes* e *T. galloi*, as duas únicas espécies de parasitoides produzidas e liberadas massalmente para o controle de *D. saccharalis* nos canaviais do Brasil (AGROFIT, 2020).

O parasitoide larval *C. flavipes* é um dos maiores casos de sucesso de controle biológico no mundo e tem sido largamente utilizado em plantios comerciais da cana-de-açúcar. Foi introduzido pela primeira vez no estado de São Paulo, em 1971, porém nesse ano não se obteve sucesso (PINTO; GARCIA; OLIVEIRA, 2006b), já em 1978, houve o aperfeiçoamento na tecnologia de criação, o que tornou sua produção em laboratório mais simples (DINIZ, 2008). Atualmente, *C. flavipes* é produzida massalmente e liberada em campo em praticamente todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil (GUZZO; NEGRISOLI JR, 2012). O bom desempenho do agente de controle biológico, no campo, depende de variáveis ambientais, climáticas e da qualidade do próprio agente, entendida como a sua capacidade de localizar e parasitar o hospedeiro (SANTOS; MIHSFELDT, 2014).

O parasitoide *C. flavipes* apresenta desenvolvimento holometabólico com ciclo de vida ao redor de 20 dias, dependendo da temperatura e idade do hospedeiro. A qualidade da criação desse parasitoide depende de uma série de cuidados durante o processo de produção, desde a obtenção do hospedeiro até o acondicionamento. Essa produção envolve diferentes tecnologias que utilizam dietas

naturais e artificiais e condições de ambiente controladas (PÁDUA; PARRA, 1994; CANO et al., 2006; DINIZ, 2008). As fêmeas de *C. flavipes* fazem a postura diretamente no interior da hemocele da praga, as larvas vão consumindo os tecidos do hospedeiro durante o seu desenvolvimento, até sua morte. Antes de empuparem, as larvas confeccionam um casulo de seda no exterior, sendo que os diversos indivíduos provenientes de um mesmo hospedeiro geralmente se agrupam, formando uma massa de casulos (BOTELHO; MACEDO, 2002).

Para o controle de *D. saccharalis*, são liberadas em campo cerca de 6.000 vespinhas/ha, em forma de massa dentro de copinhos (Figura 5) que são distribuídos em 4 a 12 pontos. Cerca de 2 semanas após a liberação, é feito um novo levantamento, para se avaliar a eficiência do parasitoide e a necessidade de novas liberações (DINARDO-MIRANDA, 2008). Em áreas de alta infestação, recomenda-se o uso combinado de *T. galloi* e *C. flavipes*, sendo que três liberações semanais de *T. galloi*, seguidas por uma de *C. flavipes* após um mês, provocam acentuada redução na intensidade de infestação de *D. saccharalis* em campo (BOTELHO et al., 1995).

Figura 5 - Copinho com massa de casulos e adultos de *C. flavipes* recém-emergidos, liberados em campo.



Fonte: Autora (2020).

O parasitoide de ovos *T. galloi* é um dos mais estudados e apresenta a vantagem de controlar a praga antes da eclosão da lagarta, ou seja, controla ainda na fase inicial, de ovo (BOTELHO et al., 1995; PINTO et al., 2006b). Os adultos são vespas muito diminutas, cujas fêmeas fazem a postura nos ovos da praga. O período de desenvolvimento dura cerca de 10 dias, durante os quais as larvas consomem o conteúdo dos ovos do hospedeiro, matando os seus embriões. Não há

critérios muito bem definidos para o início da liberação de *T. galloi* nos canaviais, mas recomenda-se a liberação de 200.000 vespinhas/ha, divididas em 25 pontos e em três liberações semanais consecutivas. Após três liberações consecutivas, o parasitismo dos ovos de *D. saccharalis* por *T. galloi* pode chegar a 71,4% (DINARDO-MIRANDA, 2008).

Práticas adequadas de manejo e condições ambientais favoráveis são fundamentais para o sucesso do controle biológico e, por isso, o produtor deve estar atento ao momento e à maneira de fazer liberações de inimigos naturais nos canaviais.

2.5. Nematoides entomopatogênicos (NEPs)

As instituições pioneiras em pesquisas com NEPs foram a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), na década de 1990, sendo que a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e o Instituto Biológico (IB) também intensificaram as pesquisas na mesma década (VOSS et al., 2009).

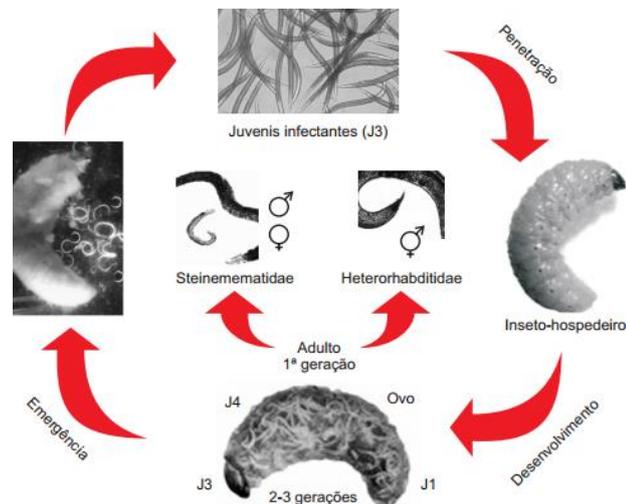
São conhecidos três gêneros de nematoides entomopatogênicos: *Steinernema*, *Neosteinernema* e *Heterorhabditis* (BURNELL; STOCK, 2000). Esses NEPs pertencem à ordem Rhabditida (Nematoda: Secernentea) da qual fazem parte as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae. Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart (1994), enquanto Heterorhabditidae possui o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976. Cerca de 53 espécies de NEPs foram descritas nos últimos 20 anos, são 41 espécies do gênero *Steinernema*, uma do gênero *Neosteinernema* e 9 do gênero *Heterorhabditis* (ADAMS et al., 2006).

Esses biocontroladores possuem características que são desejáveis para o controle biológico: com apenas 1 mm de comprimento, possuem habilidade para matar rapidamente o hospedeiro, invadindo o corpo do mesmo por suas aberturas naturais (boca, ânus e espiráculos) ou mesmo através da cutícula; não atacam plantas; não poluem as águas; podem ser produzidos em insetos ou em meio de cultura; deslocam-se no substrato em busca do inseto e podem se estabelecer no solo, mantendo, por longo tempo, baixa população da praga combatida (PINTO et al., 2006b; VOSS et al., 2009).

Os NEPs matam seus hospedeiros através da liberação de bactérias, as bactérias do gênero *Xenorhabdus* são simbioses dos nematoides do gênero *Steinernema*, enquanto que as do gênero *Photorhabdus* são simbioses dos nematoides do gênero *Heterorhabditis*. Depois de invadir o corpo do inseto, os NEPs liberam sua bactéria simbiote, que provoca septicemia (rápida multiplicação pelo corpo infectado e sua deterioração) e morte do hospedeiro dentro de 48 horas (BOEMARE et al., 1993; VOSS et al., 2009).

O ciclo de infecção dos NEPs (Figura 6) inicia-se a partir da penetração dos (juvenis infectantes JIs) no inseto hospedeiro e chegam a apresentar uma ou várias gerações dentro do mesmo cadáver (KAYA; GAUGLER, 1993). O ciclo inclui três fases de desenvolvimento: ovo, juvenil e adulto (machos e fêmeas), sendo a fase juvenil composta por quatro estádios (J1, J2, J3 ou JI e J4) (DOLINSKI; MOINO JÚNIOR, 2006). O juvenil de terceiro estágio dos nematoides esteinernematídeos e heterorhabditídeos não se alimenta e carrega suas bactérias específicas no intestino. Os nematoides se alimentam da bactéria e tecido hospedeiro, se reproduzem por 2 a 3 gerações, e emergem dos cadáveres como JIs para a procura de novos hospedeiros (ALMENARA et al., 2012).

Figura 6 – Ciclo de vida de *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema* sp.



Fonte: Dolinski; Moino Júnior (2006).

Recentemente, a empresa Biocontrole lançou um produto à base de nematoides do gênero *Heterorhabditis*, o Biobacteriophora. Aceito para registro em 2019, esse inseticida está inserido na classe agronômica como agente biológico de controle em classe ambiental IV que é um produto pouco perigoso ao meio

ambiente. O mesmo é um pó solúvel em água que deve ser aplicado na forma de pulverização com jato direcionado ao solo. É um produto registrado para o controle da broca do cupuaçu *Conotrachelus humeropictus* (Fiedler, 1940) (Coleoptera: Curculionidae), para a larva alfinete *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) em todas as cultura atacadas por ela, e para o bicudo da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) (AGROFIT, 2020).

NEPs também têm se mostrado promissores como agentes de controle biológico de *D. saccharalis*, em testes de laboratório (GUZZO et al., 2011; NEGRISOLI JUNIOR et al., 2012). Outros trabalhos demonstram resultados promissores para o controle de diversos insetos com aplicação de NEPs, como *Listronotus oregonensis* (LeConte, 1857) (Coleoptera: Curculionidae) (MIKLASIEWICZ et al., 2002), *Dysmicoccus texensis* (Tinsley, 1900) (Hemiptera: Pseudococcidae) (ANDALO et al., 2004), *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae) (MACHADO et al., 2005), *Bradysia mabiusi* (Lane, 1959) (Diptera: Sciaridae) (LEITE et al., 2007), *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) (BARBOSA-NEGRISOLI et al., 2009) e *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (FIGUEIROA et al., 2019). Mais estudos devem ser feitos para descobrir quais pragas podem ser controladas através desses nematoides e como eles podem ser empregados no MIP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no laboratório de entomologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento de Rio Largo, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas CECA/UFAL, em Rio Largo – AL, Brasil.

3.2 Obtenção de *C. flavipes* e *D. saccharalis*

O parasitoide *C. flavipes* e a broca *D. saccharalis*, foram fornecidos pela empresa Fitoagro, especializada na produção massal do parasitoide, localizada na cidade de Maceió - AL. Foram disponibilizados copinhos com cerca de 1.500 *C. flavipes* prontas para parasitismo. As lagartas de *D. saccharalis* foram fornecidas com 14 dias de idade em potes de vidro contendo dieta artificial adaptada da metodologia descrita por Parra (1998).

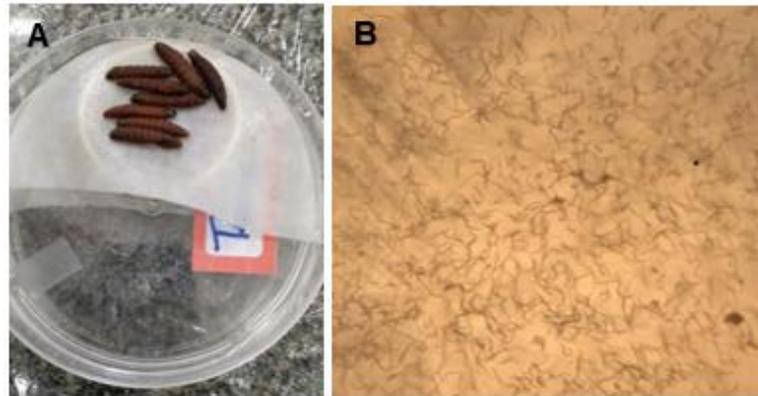
3.3 Obtenção dos nematoides

A espécie *H. bacteriophora* foi adquirida da Coleção de Nematoides Entomopatogênicos do Banco de Entomopatógenos da Embrapa Tabuleiros Costeiros - Unidade de Pesquisa de Rio Largo, multiplicado em lagartas de 3^o a 5^o instar da traça dos favos *Galleria mellonella* (L., 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), criada em dieta artificial segundo metodologia descrita por Parra (1998), e mantida no laboratório há várias gerações.

Seguindo a metodologia modificada por Woodring; Kaya (1988), as lagartas de *G. mellonella* foram infectadas e colocadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com duas folhas de papel filtro umedecido com 2 mL de uma suspensão de nematoides contendo aproximadamente 200 JIs. As placas foram seladas com plástico filme, identificadas e colocadas em câmara incubadora BOD a 25 ± 1 °C; UR > 80% e fotofase de 0 horas, durante 48 horas.

Para recolher os nematoides produzidos, após 5 ou 7 dias de sua morte, as lagartas foram colocadas em armadilhas de White (WHITE, 1927) (Figura 7A), constituídas por placas de Petri com anel de PVC e um pedaço de papel filtro sobre o anel. Os cadáveres foram colocados sobre o papel e água destilada foi adicionada na base da placa até a metade dos anéis de PVC. As armadilhas foram colocadas em BOD (25 ± 1 °C; UR > 80% e fotofase de 0 horas) até a emergência dos JIs, que, em geral, leva de 11 a 12 dias. Após o início da emergência, os JIs foram mantidos em suspensão aquosa (Figura 7B) e armazenados a 12 °C em BOD e usados no experimento em no máximo 30 dias.

Figura 7 – Multiplicação dos NEPs. A) Lagartas de *G. mellonella* com sintoma de morte por *Heterorhabditis bacteriophora* em armadilha de White; B) Suspensão de JIs para uso nos bioensaios.



Fonte: Autora (2020).

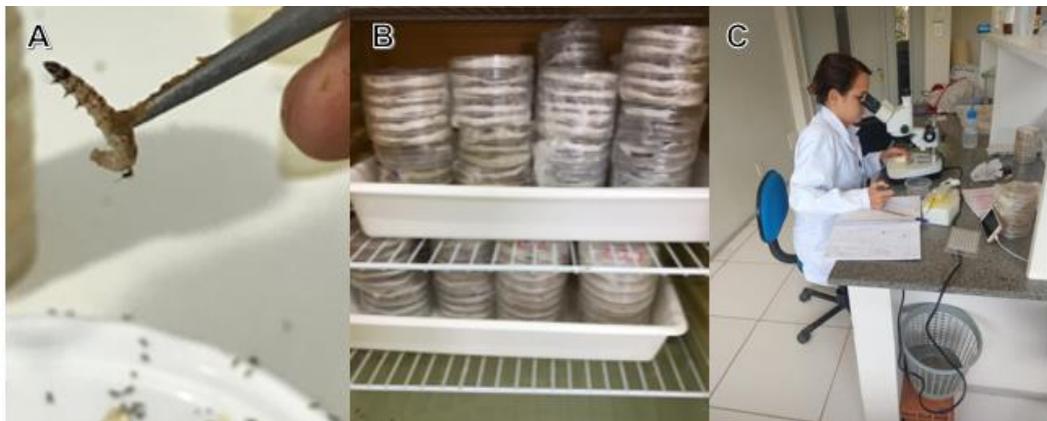
3.4 Bioensaio

Lagartas de *D. saccharalis* (com 14 dias de idade) foram oferecidas a fêmeas de *C. flavipes* para oviposição (Figura 8A) e, após a constatação visual da mesma, as lagartas foram distribuídas em placas de Petri (5 lagartas por placa) e realimentadas com dieta artificial segundo metodologia de Parra (1998). As placas foram forradas com duas folhas de papel filtro e acondicionadas em BOD (25 ± 1 °C; UR > 80% e fotofase de 0 horas) (Figura 8B) para posteriores inoculações com os NEPs, de acordo com os tratamentos.

A fim de se avaliar a competição entre *H. bacteriophora* e *C. flavipes*, as lagartas de *D. saccharalis* previamente parasitadas pelo parasitoide foram inoculadas com o NEP. Antes da realização de cada inoculação, procedeu-se a

quantificação dos NEPs. Para isso, foram utilizadas pipeta graduada, placas do tipo Elisa de 4 poços, e um contador de colônias manual. Com a pipeta, 25 μ L da suspensão de JIs foram colocados nos 4 poços da placa, quantificando-se os JIs presentes em cada um deles sob microscópio estereoscópico, com o auxílio do contador manual (Figura 8C). Assim foi possível obter o número de JIs em 1 mL de suspensão, para posterior aplicação dos tratamentos.

Figura 8 - Procedimentos experimentais. A) Exposição das lagartas de *D. saccharalis* ao parasitismo por *C. flavipes*; B) Acondicionamento do material durante o experimento; C) Quantificação dos NEPs sob microscópio estereoscópico.



Fonte: Autora (2020).

Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

- T1: *D. saccharalis* sem parasitismo ou inoculação;
- T2: *D. saccharalis* somente parasitada por *C. flavipes*;
- T3: *D. saccharalis* somente inoculada com NEP;
- T4: *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* e inoculada com NEP no mesmo dia;
- T5: *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* e inoculada com NEP após 3 dias;
- T6: *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* e inoculada com NEP após 6 dias;
- T7: *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* e inoculada com NEP após 9 dias;
- T8: *D. saccharalis* parasitada por *C. flavipes* e inoculada com NEP após 12 dias.

No dia determinado para cada tratamento, procedeu-se a aplicação dos NEPs (Figura 9). Em cada placa de Petri, foram aplicados 2 mL da suspensão de NEPs contendo 500 JIs/mL, totalizando 1.000 JIs/placa. Considerando que em cada placa tinham 5 lagartas, foi aplicada uma média de 200 JIs por lagarta. Após a inoculação,

as placas foram novamente fechadas e mantidas em BOD (25 ± 1 °C; UR > 80% e fotofase de 0 horas).

Figura 9 – Inoculação de NEPs.



Fonte: Autora (2020).

As placas eram então vistoriadas diariamente, registrando-se a mortalidade das lagartas de *D. saccharalis*. Após 4 dias de sua morte, as lagartas eram dissecadas para confirmação da sua morte por *C. flavipes* ou pelo nematoide. Os tratamentos 1 e 2 foram avaliados ao final do experimento. A Tabela 1 apresenta os dias de inoculação e os dias em que as lagartas foram dissecadas.

Tabela 1 - Datas de inoculação de NEPs e de dissecação de *D. saccharalis*.

Tratamentos	Inoculação de NEPs	Dissecação
T3 e T4	22/11/2019	28/11/2019
T5	25/11/2019	01/12/2019
T6	28/11/2019	04/12/2019
T7	01/12/2019	07/12/2019
T8	04/12/2019	10/12/2019

As variáveis analisadas foram: mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes*, mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flvipes* com formação de massa, mortalidade de *D. saccharalis* por NEPs e mortalidade de *D. saccharalis* por NEPs e *C. flavipes* juntos.

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com os 8 tratamentos já descritos, e 20 repetições, sendo cada lagarta considerada uma repetição. As médias obtidas foram submetidas à análise de variância e comparadas entre si pelo teste de Tukey a 1% de significância, sendo aplicada análise de regressão quando pertinente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os valores da análise de variância para a variável mortalidade total, onde todos os resultados apresentaram diferença significativa ao nível 1% de probabilidade entre eles.

Tabela 2 - Análise de variância para mortalidade total.

FV	GL	Quadrado Médio
Tratamento	7	19062,857**
Resíduo	133	192,180
CV (%)		18,36
Tratamentos		Médias
T1		0 ± 0 c
T2		88 ± 13,61 ab
T3		88 ± 15,07 ab
T4		84 ± 13,91 ab
T5		78 ± 18,23 b
T6		86 ± 16,02 ab
T7		85 ± 14,32 ab
T8		95 ± 12,77 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. FV – Fonte de variação; GL - número de graus de liberdade; CV - coeficiente de variação. ** - significativo a 1% ($p < 0,01$), pelo teste F

Para T1 (*D. saccharalis* sem nenhuma aplicação), não houve mortalidade ou interferência no seu ciclo biológico, o tratamento foi avaliado no 12^o dia, sendo encontrados pupas e adultos de *D. saccharalis* vivos. As lagartas podem durar cerca de 20 a 90 dias nesta fase, dependendo da temperatura, e passam por cinco ou seis mudas (BOTELHO, 1985; PINTO et al., 2006a). Para o T2 (*D. saccharalis* parasitada apenas com *C. flavipes*), os resultados mostram uma mortalidade total de 88%. As lagartas utilizadas para parasitismo estavam com 14 dias de vida e, de acordo com Pádua (1983), para a produção massal de *C. flavipes* em laboratório, esta idade é a ideal, normalmente já utilizada por laboratórios. Lagartas nessa fase apresentam estrutura corporal bem desenvolvida, e grande quantidade de gordura e água nos tecidos internos. No T3 (*D. saccharalis* inoculada apenas com nematoide), se obteve 88% de mortalidade, ficando evidenciada a eficiência de *Heterorabditis*

bacteriophora no controle de *D. saccharalis*. Esta mortalidade de 88% se iguala ao resultado da mortalidade total por *C. flavipes*, comprovando assim a eficiência dos dois agentes de controle biológico.

De acordo com Giometti et al. (2011), adultos de *S. levis* são suscetíveis a nematoides do gênero *Heterorhabditis*, porém, uma dose relativamente alta de 1200 JIs/inseto é necessária para matar mais de 50% dos insetos. Essa dose é superior à utilizada no presente trabalho.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores da análise de variância para as variáveis mortalidade por *C. flavipes*; mortalidade por *C. flavipes* com formação de massa; mortalidade por NEPs e mortalidade por *C. flavipes* e NEPs (juntos), em que todos os resultados apresentaram diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade entre eles. Os melhores resultados para mortalidade por NEPs foram obtidos nos tratamentos 3, 4 e 5 e, para *C. flavipes* 2, 7 e 8, onde ocorreu maior mortalidade de *D. saccharalis* pelos agentes de controle biológico.

Tabela 3 - Análise de variância para mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes* (com formação de massa) e NEPs.

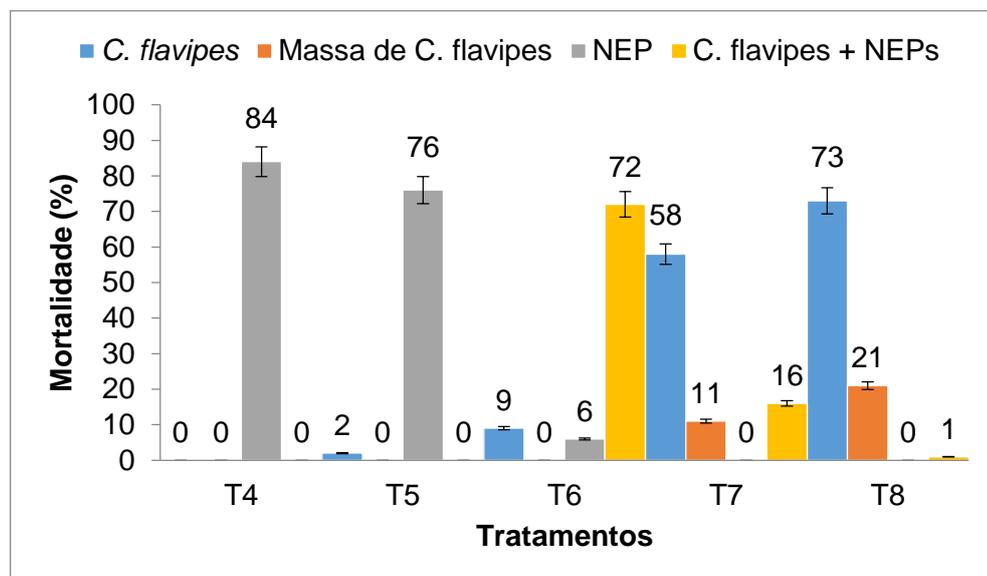
FV	GL	Quadrados Médios			
		<i>C. flavipes</i>	Massa <i>C. flavipes</i>	NEPs	<i>C. flavipes</i> e NEPs
Tratamentos	7	17467,14**	6811,42**	35850**	12716,78**
Resíduo	152	321,84	180,78	119,47	134,07
CV (%)		80,63	128,06	34,43	104,08
Tratamentos		Médias			
T1		0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a	0 ± 0 a
T2		36 ± 27,22 b	52 ± 24,62 c	0 ± 0 a	0 ± 0 a
T3		0 ± 0 a	0 ± 0 a	88 ± 15,07 c	0 ± 0 a
T4		0 ± 0 a	0 ± 0 a	84 ± 13,91 bc	0 ± 0 a
T5		2 ± 6,15 a	0 ± 0 a	76 ± 16,67 b	0 ± 0 a
T6		9 ± 21,98 a	0 ± 0 a	6 ± 16,02 a	72 ± 24,62 c
T7		58 ± 28,20 c	11 ± 18,89 ab	0 ± 0 a	16 ± 21,12 b
T8		73 ± 22,73 c	21 ± 21,98 b	0 ± 0 a	1 ± 4,47 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. FV – Fonte de variação; GL - número de graus de liberdade; CV - coeficiente de variação. ** - significativo a 1% ($p < 0,01$), pelo teste F

Em todos os tratamentos, as lagartas de *D. saccharalis* estavam mortas após 2 dias da inoculação de NEPs. A inoculação de NEPs não avançou para o 15^o dia, pois neste dia as lagartas de *D. saccharalis* já estavam mortas, algumas com massa de *C. flavipes* formada e com adultos emergidos, inviabilizando assim o teste.

A figura 10 apresenta a mortalidade por cada agente de controle. Para os tratamentos T4 ao T8, foi observada uma competição entre NEPs e *C. flavipes*, pois com a presença do nematoide nos primeiros dias de parasitismo de *C. flavipes*, o endoparasitoide não conseguiu se desenvolver, ou seja, quando os NEPs foram inoculados nos primeiros dias de parasitismo de *C. flavipes* (0 a 3 dias), eles tiveram maior chance de se desenvolver. Por outro lado, quando os NEPs foram inoculados durante o estágio larval tardio do parasitoide, este conseguiu se desenvolver no corpo do hospedeiro.

Figura 10 - Mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes* (com formação de massa) e NEPs.



Segundo Atwa et al. (2013), nematoides entomopatogênicos geralmente são considerados organismos benéficos, porém, eles podem afetar insetos que também são benéficos, como por exemplo os parasitoides. De acordo com Akhurst; Smith (2002), após a aplicação inundativa por NEPs, existe um impacto associado à sua não seletividade, pois estes organismos têm o potencial de infectar espécies não-alvo susceptíveis no momento de sua aplicação.

Alguns organismos não-alvo foram testados a fim de confirmar o efeito de nematoide sobre eles. Kaya (1978) utilizou *Steinernema carpocapsae* e *Heterorhabditis bacteriophora* em *Apanteles militaris* (Walsh) (Hymenoptera: Braconidae) e verificou um efeito indireto em laboratório, com a morte do hospedeiro. Em *Compsilura concinnata* (Meigen, 1824) (Diptera: Tachinidae), Kaya (1984) aplicou também *Steinernema carpocapsae*, causando o mesmo efeito indireto em laboratório com hospedeiro morto. Utilizando *S. feltiae* e *H. bacteriophora*, Triggiani (1985) aplicou esses organismos em *Apanteles ultor* Reinhard, 1880 (Hymenoptera: Braconidae) e verificou que os mesmos causaram a morte do hospedeiro em laboratório. Já em *Cephalcia arvensis* (Panzer, 1805) (Hymenoptera: Ichneumonidae), Battisti (1994) utilizou o nematoide *Steinernema feltiae* e a espécie teve sua emergência reduzida em campo.

No presente trabalho, após se dissecar *D. saccharalis* no tratamento T6 (lagartas de *D. saccharalis* com 20 dias de vida), foi observado que o nematoide penetrou em larvas de *C. flavipes* quando estas ainda estavam no corpo do hospedeiro, impedindo assim seu desenvolvimento e causando sua morte (Figura 11). Isso mostra que ocorreu uma competição intraguildda dos dois agentes de controle biológico.

Figura 11 - Nematoides dentro de larva de *C. flavipes* ainda dentro do corpo de *D. saccharalis*.



Fonte: Autora (2020).

Nesse caso, o nematoide se comportou como um hiperparasitoide. Segundo Berti Filho (2011), parasitoide secundário (hiperparasitoide) é um parasitoide que se desenvolve em outro parasitoide, isto é, ele será um parasitoide de outro parasitoide. Associando essa informação ao presente trabalho, o nematoide se

comporta como um hiperparasitoide facultativo, pois aconteceu naturalmente, nas condições do bioensaio, não sendo obrigatório esse comportamento.

Ainda de acordo com Berti Filho (2011), pode existir mais de um nível de hiperparasitismo numa relação (secundário, terciário). O hiperparasitismo pode ser direto (quando a fêmea do parasitoide procura pelo hospedeiro parasitado) ou indireto (quando a fêmea do parasitoide não procura pelo hospedeiro parasitado, mas sim, pelo ambiente). Nas condições do presente trabalho, foi observado hiperparasitismo direto, já que o mesmo foi realizado em laboratório, sendo os testes realizados em placas de Petri.

Apresentando o comportamento de hiperparasitismo, os nematoides ainda atingiram pupa de *C. flavipes* (Figura 12), o que pode ser verificado por meio da coloração avermelhada que a pupa apresentou, coloração essa que é característica da bactéria simbiote do gênero de nematoide utilizado.

Figura 12 - Pupa de *C. flavipes* com sintoma de morte por nematoide.



Fonte: Autora (2020).

Discutindo os resultados separadamente, de acordo com a Figura 13, foi observado um ajuste quadrático com boa capacidade preditiva ($R^2 = 0,92$) para a variável mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes*. A melhor mortalidade obtida foi com a aplicação de nematoides no 12^o dia, chegando a um índice de 73% de mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes*. A aplicação de nematoide nesse dia não influenciou consideravelmente o desenvolvimento do parasitoide.

De acordo com a Figura 14, foi observado um ajuste quadrático ainda melhor ($R^2 = 0,97$), para a variável mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes* com formação de massa. O melhor resultado encontrado foi com a aplicação de nematoides no 12º dia, obtendo-se 21% de formação de massas de *C. flavipes* em *D. saccharalis*.

Figura 13 - Porcentagem de mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes*.

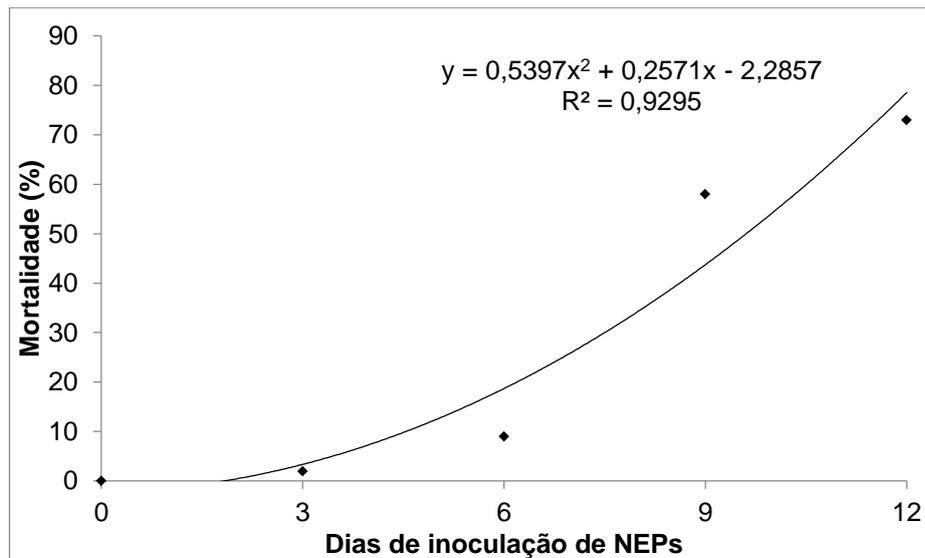
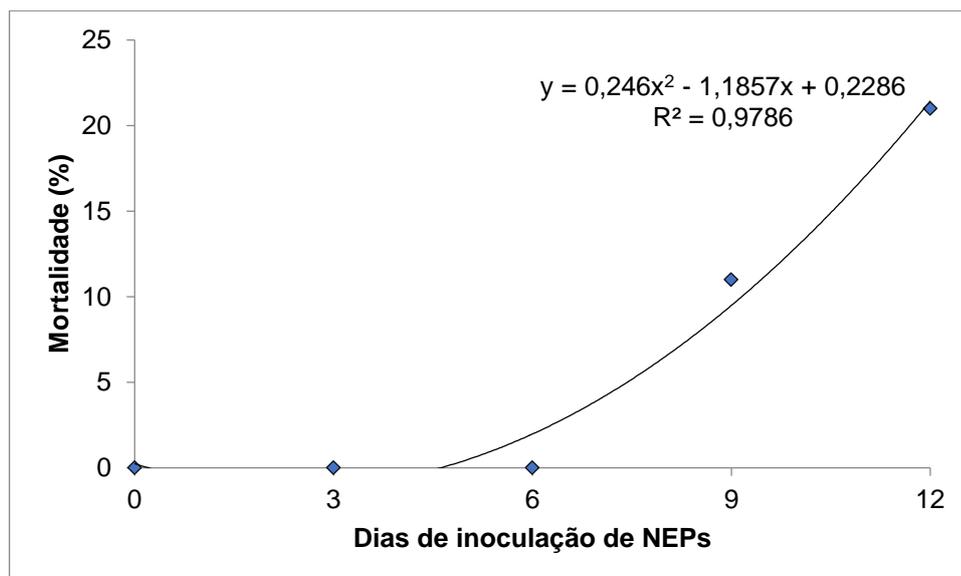


Figura 14 - Porcentagem de mortalidade de *D. saccharalis* por *C. flavipes* com formação de massa.



Essa porcentagem foi inferior ao resultado apresentado no tratamento T2 (52%). Isso ocorreu devido à inoculação de nematoides. Everard (2009) concluiu

que, quando *Heterorhabditis downesi* é aplicado, ocorre uma redução na formação de casulos do parasitoide *Bracon hylobii* Ratzeburg, 1848 (Hymenoptera: Braconidae) e menos casulos são fechados. A figura 15 mostra a comparação de massas, onde é possível ver *D. saccharalis* completamente coberta por massa de *C. flavipes* (Figura 15A), sem aplicação de NEPs, e uma coloração avermelhada nas massas (Figura 15 B), com aplicação de NEPs.

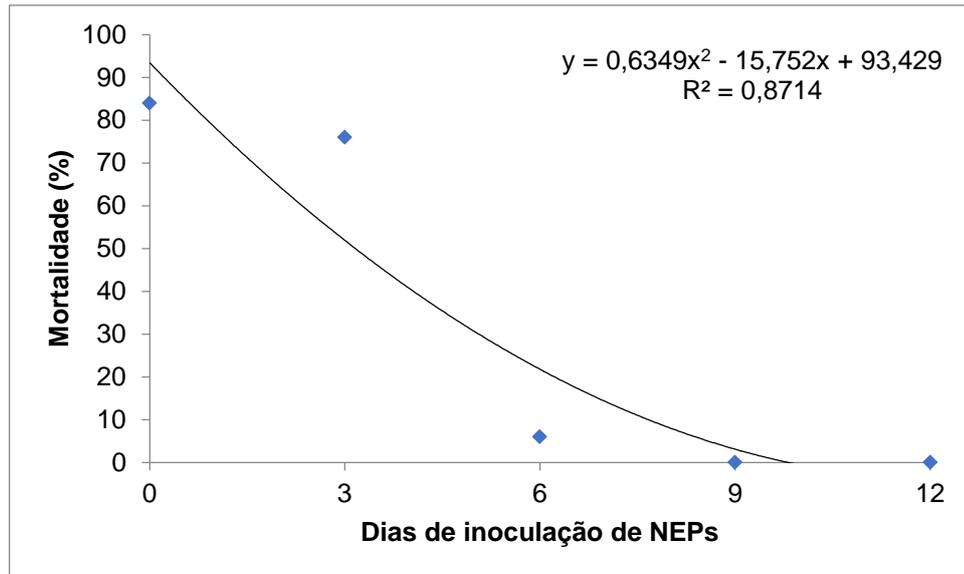
Figura 15 - A) *D. saccharalis* morta com formação de massa por *C. flavipes*. B) *D. saccharalis* morta com formação de massa de *C. flavipes* com sintoma de NEPs.



Fonte: Autora (2020).

Para a variável mortalidade de *D. saccharalis* por nematoide (figura 16), o ajuste quadrático foi de $0,87R^2$. O número de nematoides infectando *D. saccharalis* foi diminuindo ao passar dos dias, considerando uma queda brusca entre o terceiro e o sexto dia. A maior mortalidade foi com o nematoide inoculado no mesmo dia de parasitismo de *C. flavipes* (88%).

Figura 16 - Porcentagem de mortalidade de *D. saccharalis* por nematoides.



Nos testes realizados, foi observado que as lagartas que não foram parasitadas por *C. flavipes* conseguiam prosseguir no seu ciclo, sendo posteriormente atacadas pelos NEPs. A figura 17 mostra que o nematoide matou *D. saccharalis* nas fases de larva, pupa e adultos (adultos já se encontravam com ovos).

Figura 17 - A) *D. saccharalis* com sintoma de morte por NEPs; B) Dissecção de *D. saccharalis* com NEPs dentro; C) Pupa dissecada com morte confirmada por NEPs; D) Adulto dissecado com morte confirmada por NEPs.



Fonte: Autora (2020).

Leite et al. (2002) testaram a eficiência de NEPs contra outras pragas da cana-de-açúcar e obtiveram 80% de mortalidade da cigarrinha da raiz, *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae), por *Heterorhabditis* sp. e *Steinernema* sp.

A figura 18 apresenta a mortalidade de *D. saccharalis* pelos dois agentes de controle biológico. Esta variável apresentou um ajuste quadrático baixo ($R^2 = 0,47$), porém este foi o modelo que melhor se ajustou para os resultados.

Segundo Kaya (1981), o efeito do nematoide *S. carpocapsae* sobre *Apanteles medicaginis* Muesebeck, 1947 e *Chelonus* sp. (Hymenoptera: Braconidae) resulta na morte do hospedeiro antes que os parasitoides possam emergir. A figura 19 mostra o que foi dito por Kaya (1981), NEPs invadindo *D. saccharalis* antes que *C. flavipes* pudesse emergir, considerando assim a morte de *D. saccharalis* pelos dois agentes de controle biológico.

Figura 18 - Porcentagem de mortalidade de *D. saccharalis* por nematoides e *C. flavipes*.

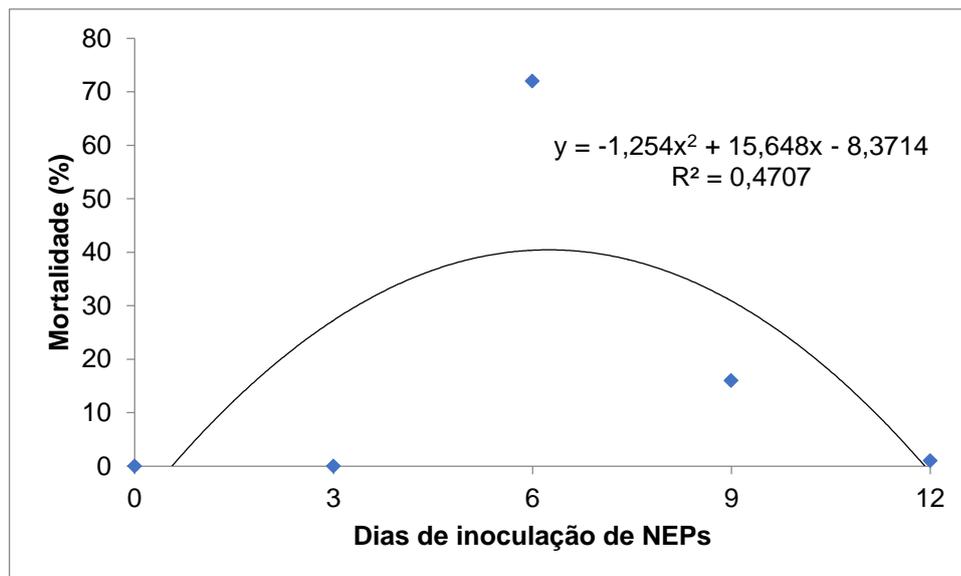


Figura 19 - *D. saccharalis* dissecada com a presença de larvas de *C. flavipes* e NEPs.



Fonte: Autora (2020).

Não existem produtos à base de NEPs registrados para *D. saccharalis* (AGROFIT, 2020), havendo assim a necessidade de mais trabalhos para aumentar o emprego de nematoides entomopatogênicos no mercado agrícola, sendo utilizados no MIP. Segundo Bellini (2012), NEPs podem ser mais uma alternativa de controle de *D. saccharalis*, porém, para se implantar esse tipo de controle em uma propriedade, deve-se avaliar o potencial que estes inimigos naturais possuem em controlar esta praga diretamente nos canaviais.

5 CONCLUSÕES

- Existe competição intraguilda entre os inimigos naturais *Cotesia flavipes* e nematoide entomopatogênico da espécie *Heterorabditis bacteriophora*.
- Para o uso desses dois agentes biológicos no manejo integrado de pragas é necessário um período de carência entre a aplicação de ambos.
- Após a liberação do parasitoide *Cotesia flavipes*, deve ser aguardado um período de 9 a 12 dias para aplicação de NEPS.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, P. K.; MOFFAT, C. E. Rethinking biological control programs as planned invasions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 27, p. 9-15, 2018.
- ADAMS, B. J. et al. Reprint of “Biodiversity and systematics of nematode–bacterium entomopathogens”. **Biological Control**, v. 38, n. 1, p. 4-21, 2006.
- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons >. Acesso em 02 de janeiro de 2020.
- AKHURST, R.; SMITH, K. Regulation and safety. In: GAUGLER, R. (Ed.). **Entomopathogenic nematology**. New York: CABI Publishing, 2002. p. 311-332.
- ALMENARA, D. P. et al. Nematoides entomopatogênicos. **Tópicos avançados em entomologia molecular**. Rio de Janeiro, INCT-EM, p. 1-40, 2012.
- ANDALÓ, V. et al. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz- do cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2004.
- ATWA, A. A. et al. Interaction of the koinobiont parasitoid *Microplitis rufiventris* of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, with two entomopathogenic rhabditids, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **Journal of insect science**, v. 13, n. 1, p. 84, 2013.
- BARBOSA-NEGRISOLI, C. R. C. et al. Efficacy of indigenous entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae), from Rio Grande do Sul Brazil, against *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in peach orchards. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, n. 1, p. 6-13, 2009.
- BATTISTI, A. Effects of entomopathogenic nematodes on the spruce web-spinning sawfly *Cephalcia arvensis* panzer and its parasitoids in the field. **Biocontrol Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 95-102, 1994.
- BEGG, G. S. et al. A functional overview of conservation biological control. **Crop Protection**, v. 97, p. 145-158, 2017.

BELLINI, L. L.; DOLINSKI, C. Aplicação foliar de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) para o controle de *Diatraea saccharalis* em casa de vegetação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 3, p. 997-1004, 2012.

BERTI FILHO, E.; M, L. P. M. Fundamentos de controle biológico de insetos-praga. 2011.

BLACKBURN, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; ADAMS, B. J. Biological control and nutrition: Food for thought. **Biological Control**, v. 97, p. 131-138, 2016.

BOEMARE, N. E. et al. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 249-255, 1993.

BOTELHO, P. S. M. et al. Efeito do número de liberações de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Scientia Agricola**, v. 52, n. 1, p. 65-69, 1995.

BOTELHO, P. S. M. **Tabela de vida ecológica e simulação da fase larval de *Diatraea saccharalis* (Fabricius 1794) (Lepidoptera: Pyralidae)**. 1985. Tese de Doutorado, ESALQ/USP, Piracicaba, 110p.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P. et al. **Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores** São Paulo: Manole, 2002, 635p.

BUENO, V. H. P.; VAN LENTEREN, J. C. Controle biológico de pragas em cultivos protegidos. **Ciência & Ambiente**, v. 43, p. 211-230, 2011.

BULLOCK, R. C.; MILLER, R. W. Suppression of *Pachnaeus litus* and *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) adult emergence with *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) soil drenches in field evaluations. **Florida State Horticultural Society**, v. 107, p. 90-92, 1994.

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

CANO, M. A. V; SANTOS, E. M. DOS; PINTO, A. DE S. Produção de *Cotesia flavipes* para controle da broca-da-cana. In: PINTO, A. DE S. **Controle de pragas da cana de açúcar**. Sertãozinho: Biocontrol, 2006. p. 21-24.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da Safra Brasileira da Cana-de-açúcar**: safra 2019/2020, terceiro levantamento, Brasília, 2019, v. 6, n. 1, p. 58.

DEBACH, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. University Press, Cambridge. 1991, 440p.

DEMETRIO, A. P.; ZONETTI, P. C.; MUNHOZ, R. E. F. Avaliação de clones de cana-de-açúcar promissores RBs quanto à resistência à broca da cana (*Diatraea saccharalis*) na região noroeste do Paraná. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 10, n. 1, p. 13-16, 2008.

DINARDO MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M.G.A. **Cana-de-açúcar. Campinas: IAC**, 2008, 882p.

DINARDO MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; PERECIN, D. Variabilidade espacial de populações de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método de amostragem. **Bragantia**, v. 70, n. 3, p. 577-585, 2011.

DINIZ, F. R. et al. Produção do parasitoide *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) para controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Nucleus**, v. 5, n. 2, 2008.

DIOLA, V.; SANTOS, F. Fisiologia da Cana-de-açúcar. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Álcool – Tecnologia e Perspectivas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. p. 25-50.

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

DOLINSKI, C.; DEL VALLE, E.; STUART, R. J. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. **Biological Control**, v. 38, n. 3, p. 422-427, 2006.

- EVERARD, A.; GRIFFIN, C. T.; DILLON, A. B. Competition and intraguild predation between the braconid parasitoid *Bracon hylobii* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis downesi*, natural enemies of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. 2, p. 151-161, 2009.
- FERNANDES, A.J. **Manual da cana-de-açúcar**. 2 ed. São Paulo: Livro Ceres, 1990. p. 196.
- FIGUEIROA, L. E. et al. Patogenicidad y multiplicación de aislados de nemátodos entomopatógenos para el control de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae). **Revista Chilena de Entomología**, v. 45, n. 1, 2019.
- GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- GIOMETTI, F. H. C. et al. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 81-86, 2011.
- GUZZO, E. C. et al. Avaliação da capacidade de busca hospedeira de *Heterorhabditis* sp. AL39 (Rhabditida: Heterorhabditidae) em coluna de areia. In: **12º Simpósio de Controle Biológico**, 2011, São Paulo. Anais do 12º Simpósio de Controle Biológico, 2011. p. 298.
- GUZZO, E. C.; NEGRISOLI JUNIOR, A. S. Diagnóstico dos processos tecnológicos utilizados no manejo integrado de pragas da cana-de-açúcar em El Salvador. **Boletim Técnico Embrapa Tabuleiros Costeiros**, v. 174, p. 1-33, 2012.
- KAYA, H. K. Effect of the Entomogenous Nematode *Nemphlectana carpocapsae* on the Tachinid Parasite *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). **Journal of Nematology**, v. 16, n. 1, p. 9-13, 1984.
- KAYA, H. K. Infectivity of *Neoaplectana carpocapsae* and *Heterorhabditis heliothidis* to pupae of the parasite *Apanteles militaris*. **Journal of Nematology**, v. 10, n. 3, p. 241-244, 1978.
- KAYA, H. K.; GAUGLER, R. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**, v. 38, p. 181-206, 1993.

KAYA, H. K.; HOTCHKIN, P. G. The nematode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser and its effect on selected ichneumonid and braconid parasites. **Environmental Entomology**, v. 10, n. 4, p. 474-478, 1981.

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

LEITE, L.G. et al. 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.

LOPES, D. O. P.; DINARDO MIRANDA, L. L.; BUSOLI, A.C. Atualidades em pragas da cultura da cana-de-açúcar: sudeste e nordeste do Brasil. In: BUSOLI, A.C. et al. **Tópicos em entomologia agrícola – IV**. Jaboticabal, 2011. 250p.

MACHADO, L. A. et al. 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.

MAPA - (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento), 2019. Disponível em: <https://www.abcbio.org.br/blog/produtos-biologicos/>. Acesso em: 10 de janeiro de 2020.

MAPA - (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento). Cana-de-açúcar. Sistema de Acompanhamento de Produção Canavieira, Brasília, 2014. p. 3.

MIKLASIEWICZ, T. J. et al. Evaluation of entomopathogenic nematodes for suppression of carrot weevil. **Biological Control**, v. 47, p. 545-561, 2002.

MOZAMBANI, A. E. et al. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2006. p. 11-18.

NEGRISOLI JR., A. S. et al. Efeito da distância, umidade e tempo na capacidade de busca hospedeira de *Heterorhabditis* sp. AL39 (Rhabditida: Heterorhabditidae) em coluna de areia. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia**, 2012, Curitiba, PR. Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2012.

OLIVEIRA, H. N. **Recomendações para obter um controle biológico mais eficaz da broca-da-cana-de-açúcar**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste (Comunicado Técnico 181), 2012. 8p.

PÁDUA, L. E.M; PARRA, J.R.P. Efeito da temperatura e umidade relativa do ar na biologia de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1981). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 23, p. 105-114, 1994.

PÁDUA, L.E.M. **Biologia comparada de *Apanteles flavipes* (Cameron, 1981) (Hymenoptera: Braconidae) para determinação das exigências térmicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1983. p. 53.

PARRA, J. R. P. A prática do controle biológico de pragas no Brasil. In: PINTO, A. S. et al. **Controle Biológico de pragas: na prática**. Piracicaba, 2006. p 287.

PARRA, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

PINTO, A. S.; BOTELHO, P. S. M.; OLIVEIRA, H. N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana de açúcar**. Piracicaba, 2009. 160 p.

PINTO, A. S.; CANO M. A.V.; SANTOS, E. M. A broca-da-cana. *Diatraea saccharalis*. In: PINTO, A. S. **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Sertãozinho: Biocontrol, 2006a. p. 15-20.

PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; OLIVEIRA, H. N. Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2006b. 415p.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995. p. 100.

ROSILLO CALLE, F. BEZZON, G. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2005. p. 448.

SANTOS, L. A. O.; MIHSFELDT, L. H. Capacidade de busca e de parasitismo de *Cotesia flavipes* (Cameron, 1981) (Hymenoptera: Braconidae) em lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae). **EntomoBrasilis**, v. 7, n. 2, p. 106-109, 2014.

TOPPA, E.V.B. et al. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 3, n. 3, p. 215-22, 2010.

TRIGGIANI, O. Influenza dei nematode della famiglia Steinernematidae e Heterorhabditidae sul parassitoide *Apanteles ultor* Rhd (Hymenoptera: Braconidae). **La Difesa Delle Piante**, v. 2, p. 293-300, 1985.

VOSS, M. et al. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Passo Fundo: Embrapa Trigo (Documentos, 119). 2009. 44p.

WHITE, G. F. et al. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**, v. 66, p. 302-303, 1927.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. **Steinernatidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques Southern cooperative**. Arkansas: Arkansas Agricultural Experimental Station Fayetteville, 1988. 88p.