



**THAYLA FRÓES RODRIGUES MARTINS**

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA CONTROLE  
DO BICHO-MINEIRO-DO-CAFEIEIRO**

**LAVRAS – MG  
2023**

**THAYLA FRÓES RODRIGUES MARTINS**

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA CONTROLE DO BICHO-  
MINEIRO-DO-CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Alcides Moino Junior  
Orientador  
Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza  
Coorientador

**LAVRAS- MG**

**2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Martins, Thayla Froes Rodrigues.

Nematoides entomopatogênicos para controle do bicho-  
mineiro-do-cafeeiro / Thayla Froes Rodrigues Martins. - 2022.  
57 p. : il.

Orientador(a): Alcides Moino Junior.

Coorientador(a): Bruno Henrique Sardinha de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Manejo integrado. 2. *Leucoptera coffeella*. 3. Controle  
microbiano de pragas. I. Junior, Alcides Moino. II. Souza, Bruno  
Henrique Sardinha de. III. Título.

**THAYLA FRÓES RODRIGUES MARTINS**

**NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS PARA CONTROLE DO BICHO-  
MINEIRO-DO-CAFEEIRO  
ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES FOR CONTROL OF THE COFFEE  
LEAF MINER**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de dezembro de 2022.

Prof. Dr. Alcides Moino Junior UFLA

Prof. Dr. Luis Claudio Paterno Silveira UFLA

Profa. Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho UFU

Prof. Dr. Alcides Moino Junior  
Orientador  
Prof. Dr. Bruno Henrique Sardinha de Souza  
Coorientador

**LAVRAS- MG**

**2023**

*Aos meus pais*  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por me dar saúde, forças e discernimento para superar todos os desafios da minha vida.

À minha mãe, Zuleica, e ao meu pai, José, pela compreensão, ao serem privados em muitos momentos da minha companhia e atenção e, principalmente, pelo amor.

Ao professor Alcides Moino Junior por apoiar minha proposta de projeto e pela orientação, paciência e esclarecimentos ao longo do mestrado.

Ao professor Bruno Henrique Sardinha de Souza pela coorientação, paciência e esclarecimentos.

À banca examinadora, composta pelos professores Luis Claudio Paterno Silveira e Vanessa Andaló Mendes de Carvalho, pela disponibilidade.

Ao Deivid Martins da Silva pela parceria, paciência, disponibilidade, dedicação e principalmente pelo carinho e amor.

Ao Centro Espiritual Lua Branca e todos seus integrantes, pelo suporte emocional, espiritual e por todos os ensinamentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) que me proporcionou as condições necessárias para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos professores do Departamento de Entomologia da UFLA, com os quais eu tive a honra de poder compartilhar de seus conhecimentos.

Aos membros do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pela ajuda nos trabalhos realizados, pela amizade e pelas trocas de conhecimentos.

Aos membros do Laboratório de resistência de plantas e MIP pelo apoio nos experimentos e pela amizade.

Aos membros do Núcleo de Estudos em Entomologia (NEENTO) pelos conhecimentos e experiências compartilhadas.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

*Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) é uma praga primária na cafeicultura capaz de reduzir em até 80% a produção, causando perdas econômicas significativas aos produtores. O controle químico ainda é o principal método utilizado para o manejo de *L. coffeella*, e devido ao uso incorreto, não vem se mostrando eficiente. O método de controle biológico de *L. coffeella* é, basicamente, a adoção de práticas que conservam a presença de inimigos de ocorrência natural nas lavouras. Assim, se faz necessário o desenvolvimento de novas tecnologias biológicas, que possam ser utilizadas de maneira aplicada nas lavouras. Nesse contexto, o controle biológico com nematoides entomopatogênicos (NEP) mostra-se promissor para *L. coffeella*, em vista da eficiência dos NEP em ambientes críticos. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar os efeitos de NEP sobre *L. coffeella* em condições de laboratório, selecionando isolados promissores para o controle biológico desta praga. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (DEN/UFLA), em condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$ , 12h de fotofase), utilizando-se isolados de NEP pertencentes ao banco de entomopatógenos do laboratório. Para a avaliação da patogenicidade dos NEP, foram pulverizados 1,2 mL de suspensão aquosa contendo 1.000 juvenis infectantes (JI)/mL em minas ativas de *L. coffeella*. Foi avaliado, também, o efeito de diferentes concentrações de suspensões de JI, do tempo de mortalidade e de aplicações combinadas entre os isolados *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 sobre larvas de *L. coffeella*. Verificou-se que todos os NEP foram patogênicos às larvas, sendo o isolado *H. amazonensis* RSC05 aquele que ocasionou a maior mortalidade. A mortalidade das larvas foi proporcional ao aumento da concentração dos JI, sendo os valores de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  para o isolado *H. amazonensis* RSC05 de 844,20 e 2409,60 JI/mL, respectivamente, e para o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, a  $CL_{50}$  foi de 708,78 JI/mL, e a  $CL_{90}$  de 2107,88 JI/mL. No bioensaio de tempo de exposição aos NEP, foi possível verificar que o aumento no tempo aumentou a mortalidade das larvas para os dois isolados, porém o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 causou maiores taxas de mortalidade em comparação ao *H. amazonensis* RSC05. O isolado *H. amazonensis* RSC05, proporcionou  $TL_{50}$  de 76,28h e  $TL_{90}$  de 144,46h, enquanto que o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 apresentou  $TL_{50}$  de 73,12h e  $TL_{90}$  de 140,96h. No teste de aplicações combinadas e individuais, verificou-se que as aplicações combinadas foram menos prejudiciais às larvas de *L. coffeella*, demonstrando interação de competição entre os isolados nas concentrações adotadas. Com isso, conclui-se que os nematoides pertencentes à família Heterorhabditidae são mais virulentos a larvas de *L. coffeella*, que os pertencentes à família Steinernematidae, e que aplicações combinadas de *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 e *H. amazonensis* RSC05 não aumentam a eficiência de controle de larvas de *L. coffeella* em condições de laboratório.

**Palavras chave:** Manejo integrado. *Leucoptera coffeella*. Controle microbiano de pragas.

## ABSTRACT

*Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) is a primary pest in coffee growing capable of reducing production by up to 80%, causing significant economic losses to producers. Chemical control is still the main method used to manage *L. coffeella*, and due to incorrect use, it has not been proving to be efficient. The method of biological control of *L. coffeella* is, basically, the adoption of practices that conserve the presence of naturally occurring enemies in crops. Thus, it is necessary to develop new biological technologies that can be applied in crops. In this context, biological control with entomopathogenic nematodes (NEP) shows promise for *L. coffeella*, in view of the efficiency of NEP in cryptic environments. Thus, the objective of this work was to characterize the effects of NEP on *L. coffeella* under laboratory conditions, selecting promising isolates for the biological control of this pest. The experiments were carried out at the Laboratory of Pathology and Microbial Control of Insects (DEN/UFLA), under controlled conditions ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , RH  $70 \pm 10\%$ , 12h of photophase), using NEP isolates belonging to the laboratory entomopathogens. To assess the pathogenicity of NEP, 1.2 mL of aqueous suspension containing 1,000 infective juveniles (JI)/mL were sprayed on active mines of *L. coffeella*. The effect of different concentrations of JI suspensions, mortality time and combined applications between the isolates *H. amazonensis* RSC05 and *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 on *L. coffeella* larvae. It was found that all NEP were pathogenic to the larvae, with the *H. amazonensis* RSC05 isolate causing the highest mortality. Larval mortality was proportional to the increase in JI concentration, with LC<sub>50</sub> and LC<sub>90</sub> values for the *H. amazonensis* RSC05 isolate being 844.20 and 2409.60 JI/mL, respectively, and for the *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, the LC<sub>50</sub> was 708.78 JI/mL, and the LC<sub>90</sub> was 2107.88 JI/mL. In the bioassay of time of exposure to NEP, it was possible to verify that the increase in time increased the mortality of the larvae for both isolates, however the isolate *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 caused higher mortality rates compared to *H. amazonensis* RSC05. The isolate *H. amazonensis* RSC05, provided TL<sub>50</sub> of 76.28h and TL<sub>90</sub> of 144.46h, while the isolate *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 presented TL<sub>50</sub> of 73.12h and TL<sub>90</sub> of 140.96h. In the test of combined and individual applications, it was verified that the combined applications were less harmful to *L. coffeella* larvae, demonstrating competition interaction between the isolates in the adopted concentrations. Thus, it is concluded that nematodes belonging to the Heterorhabditise family are more virulent to *L. coffeella* larvae than those belonging to the Steinernematidae family, and that combined applications of *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 and *H. amazonensis* RSC05 do not increase the efficiency of controlling *L. coffeella* larvae under laboratory conditions.

**Keywords:** Integrated management. *Leucoptera coffeella*. Microbial pest control.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Coleta de folhas com minas ativas de *Leucoptera coffeella* em lavoura experimental de cafeeiro *Coffea arabica* de cultivar Topázio MG 1190, na Universidade Federal de Lavras - UFLA.....24
- Figura 2:** Gaiola de criação de *Leucoptera coffeella* em folhas de cafeeiro *Coffea arabica* de cultivar Topázio MG 1190. (A) Área externa da gaiola de criação. (B) Área interna da gaiola de criação.....25
- Figura 3:** Unidade experimental utilizada nos bioensaios (Composição: placa de Petri 9 cm, 2 papeis filtro 90 mm, 2 minas ativas de bicho-mineiro-do-cafeeiro).....29
- Figura 4:** Larva de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) infectada por nematoide entomopatogênico, dentro de mina em folhas de cafeeiro *Coffea arabica* cultivar Topázio MG 1190. (A) mina fechada. (B) mina aberta com alfinete. ....33
- Figura 5:** Larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), com a sintomatologia de infecção por NEP. (A) sintomatologia promovida por nematoides do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). (B) sintomatologia ocasionada por nematoides do gênero *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). ....34
- Figura 6:** Mortalidade causada por nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) em larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (T:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 10\%$  e F: 12 horas). ....35
- Figura 7:** Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella*, em diferentes concentrações de juvenis infectantes (A) *Heterorhabditis amazonensis* RSC05; (B) *Heterorhabditis* sp. NEPET 11. ....36
- Figura 8:** Análise de regressão para a mortalidade confirmada de larvas de *Leucoptera coffeella* submetidas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 (Amaz) e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (NEPET).....37
- Figura 9:** Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) em diferentes tempos de exposição aos juvenis infectantes (JI). (A) *Heterorhabditis amazonensis* RSC05; (B) *Heterorhabditis* sp. NEPET 11.....38
- Figura 10:** Análise de regressão para a mortalidade confirmada de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) submetidas a diferentes tempos de exposição aos juvenis infectantes (JI) de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae). ....39
- Figura 11:** Mortalidade confirmada ( $\pm$  Erro Padrão) de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) em pulverizações combinadas e individuais de juvenis infectantes de isolados de nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae). ....41

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Composição da dieta artificial fornecida para larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).....26
- Tabela 2:** Isolados de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) utilizados nos bioensaios. ....27
- Tabela 3:** Tratamentos executados no bioensaio 4. (NEPET 11: *Heterorhabditis* sp. NEPET 11; RSC05: *H. amazonensis* RSC05). ....31
- Tabela 4:** Concentração letal (CL) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae) necessária para causar mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae).....37
- Tabela 5:** Tempo letal (TL) em horas, necessário para juvenis infectantes (JI) de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae) causarem mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae).....40

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1 Geral .....	15
2.2 Específicos .....	15
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1 Cafeicultura.....	16
3.2 Bicho-Mineiro .....	17
3.2.1 Injúrias e danos.....	18
3.2.2 Métodos de controle de Bicho-Mineiro-do-Cafeeiro .....	18
3.2.2.1 Controle Biológico .....	20
3.2.2.2 Controle Microbiano .....	21
3.2.2.3 Nematoides entomopatogênicos.....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 Local dos experimentos .....	24
4.2 Obtenção de populações de <i>Leucoptera coffeella</i> .....	24
4.3 Criação de <i>Leucoptera coffeella</i> .....	25
4.4 Criação de <i>Galleria mellonella</i> .....	26
4.5 Obtenção dos Nematoides Entomopatogênicos .....	27
4.6 Multiplicação e manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos..	27
4.7 Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de <i>Leucoptera coffeella</i> .....	28
4.8 Bioensaio 2: Concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre minas ativas de <i>Leucoptera coffeella</i> .....	29
4.9 Bioensaio 3: Mortalidade de larvas de <i>Leucoptera coffeella</i> pelos isolados <i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05 e o <i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET 11 em diferentes tempos de exposição .....	30
4.10 Bioensaio 4: Compatibilidade entre <i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05 e o <i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET 11 sobre <i>Leucoptera coffeella</i> .....	30
4.11 Análise Estatística.....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
5.1 Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de <i>L. coffeella</i> .....	33

<b>5.2 Bioensaio 2: Efeito de concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre minas ativas de <i>Leucoptera coffeella</i> .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 Bioensaio 3: Mortalidade de larvas de <i>L. coffeella</i> pelos isolados <i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05 e o <i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET 11 em diferentes tempos de exposição.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4 Bioensaio 4: Teste de pulverizações combinadas e individuais de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05 e o <i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET 11 sobre <i>Leucoptera coffeella</i></b>	<b>40</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura possui grande importância socioeconômica para o Brasil, visto que o país é o maior produtor e exportador de café no mundo (EMBRAPA, 2018), movimentando cerca de R\$ 61,82 bilhões em receita bruta no ano de 2022 (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2022). Na safra de 2022, esperava-se um grande incremento na produção de café em relação ao ano de 2021, porém devido aos acontecimentos climáticos, a bialidade positiva não se confirmou e a expectativa é que sejam colhidas aproximadamente 50,38 milhões de sacas de café no país, com aumento de apenas 5,6% em relação ao ano de 2021 (CONAB, 2022). Além de movimentar a economia brasileira e o desenvolvimento social, alguns cafeicultores vêm promovendo a sustentabilidade ambiental, priorizando boas práticas agrícolas e a segurança alimentar por meio do uso de sistemas de produção sustentáveis e orgânicos (PRADO, 2018).

Uma das principais pragas das lavouras brasileiras é o bicho-mineiro-do-cafeeiro (BMC), *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). Praga-chave, monófaga e holometábola, porém apenas a fase larval causa danos à lavoura cafeeira (SOUZA et al., 1998). Com a eclosão, a larva penetra a epiderme foliar e se instala no parênquima paliçádico, onde à medida que se alimenta, também abre minas nas folhas (SOUZA et al., 1998; GUERREIRO FILHO, 2006). As lesões causadas nas folhas pelas larvas tornam-se áreas necrosadas, as quais promovem a queda prematura das folhas, o que resulta na diminuição da capacidade fotossintética das plantas, e conseqüentemente reduz a produção (SOUZA et al., 1998; DANTAS et al., 2021). De acordo com Parra e Reis (2013), o BMC pode conferir perdas de até 80% na produção da safra seguinte nas lavouras cafeeiras, refletindo em grandes prejuízos econômicos para os cafeicultores.

O controle químico ainda é o principal método de controle utilizado para o BMC (LEITE et al., 2020; DANTAS et al., 2021). No entanto, é preocupante o uso excessivo de defensivos químicos na agricultura, devido aos impactos negativos ao ambiente, à saúde humana e de outros animais (GUEDES et al., 2017). Além de elevar os custos de produção, é conhecido que o uso incorreto de defensivos químicos, com altas dosagens e sem rotação de mecanismo de ação, causa pressão entre os insetos atingidos, o que acaba selecionando indivíduos resistentes (GUEDES et al., 2017; LEITE et al., 2020). O surgimento de populações resistentes induz o produtor a aplicar doses cada vez mais altas de defensivos químicos, o que conseqüentemente, reduz a eficiência do manejo, devido à maior contaminação do meio

ambiente, e principalmente, à eliminação de inimigos naturais (VIEIRA et al., 2011; LEITE et al., 2020).

Com isso, a aplicação do MIP se torna a melhor opção para o controle do BMC, uma vez que combina várias táticas para gerenciar populações pragas, de modo ecologicamente sustentável e rentável (TIMPRASERT et al., 2014).

O controle biológico de pragas é uma das ferramentas utilizadas no MIP, porém ainda não houve o desenvolvimento de um programa de controle biológico aplicado para o BMC. Entretanto, frequentemente pode-se verificar a presença natural de insetos inimigos de BMC nas lavouras cafeeiras, como por exemplo, parasitoides (micro-himenópteros) e predadores (vespas e formigas) (CARVALHO et al., 2004; PICANÇO et al., 2012; DAVID-RUEDA et al., 2016). Segundo Figueiredo et al. (2021) e Silva et al. (2021), outro inimigo natural promissor que atua sobre o BMC é *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae), visto sua capacidade em predar esse inseto-praga em diferentes fases de desenvolvimento. Porém, esses agentes de controle em condições naturais nem sempre são capazes de reduzir as densidades populacionais do BMC a um nível em que não cause dano econômico, principalmente em lavouras convencionais, devido à utilização incorreta de defensivos químicos não seletivos aos inimigos naturais (LEITE et al., 2020).

Existem estudos sendo desenvolvidos com agentes microbianos para o controle de diversas pragas agrícolas. No entanto, ainda há escassez de estudos neste sentido para o BMC, fazendo-se necessária a busca por agentes entomopatogênicos capazes de realizar esse controle. Assim, o controle microbiano é uma tática promissora para reduzir a utilização de inseticidas químicos nas lavouras.

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) (Nematoda: Rhabditida), principalmente das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, são patógenos eficientes para pragas subterrâneas e de ambientes crípticos e também sido cada vez mais estudados e utilizados para o controle de pragas de parte aérea (STEYN et al., 2019; NDEREYIMANA et al., 2019; YAN et al., 2020). Esse fato se deve a características únicas dos NEP, como o comportamento de busca ao hospedeiro, que os destaca dentre os demais agentes entomopatogênicos (BEGLEY, 1990; GAUGLER e CAMPBELL, 1991). Além disso, algumas linhagens de NEP apresentam compatibilidade com defensivos químicos e biológicos, podendo ocorrer sinergismo em misturas (FUGA et al., 2012; SABINO et al., 2018; DOLINSKI et al., 2020).

De acordo com a literatura, algumas espécies de nematoides entomopatogênicos possuem a capacidade de infectar larvas de outros minadores, com eficiência de até 100% de controle, como *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae); *Plutella xylostella*

(Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae); *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae) (BAUR et al., 1995; GONZALES et al., 2000; HASSANI et al., 2013; AGUDELO, 2014; YOUSSEF, 2015; STEYN et al., 2019; NDEREYIMANA et al., 2019). Dessa forma, a utilização de NEP, se torna uma opção promissora a ser incorporada no manejo do BMC.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Caracterizar os efeitos de diferentes isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *L. coffeella*, selecionando potenciais agentes para o manejo integrado do bicho-mineiro.

### 2.2 Específicos

- a) Avaliar a patogenicidade de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *L. coffeella*.
- b) Testar o efeito de diferentes concentrações de suspensões aquosas de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *L. coffeella*, determinando a CL<sub>50</sub> e a CL<sub>90</sub>.
- c) Mensurar o tempo de ação de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *L. coffeella*, definindo os valores de TL<sub>50</sub> e o TL<sub>90</sub>.
- d) Avaliar a interação entre isolados de nematoides entomopatogênicos em aplicações combinadas sobre larvas de *L. coffeella*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cafeicultura

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo (EMBRAPA, 2018). Atualmente, 50% de todo o café do mundo são produzidos pelo Brasil, Vietnã e Colômbia. Para a safra de 2022, a estimativa é que o Brasil produza cerca de 50,38 milhões de sacas de 60kg de café beneficiado, o que representa um incremento de 5,6% em relação ao ano de 2021 (CONAB, 2022). Da espécie *Coffea arabica* L., são esperados 32,41 milhões de sacas no ano de 2022, e de *Coffea canephora* Pierre 17,97 milhões de sacas (CONAB, 2022). Espera-se que os cafés do Brasil gerem R\$ 61,82 bilhões em receita bruta total para o ano 2022 (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2022).

Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais merece destaque, sendo o maior produtor de café no país, seguido pelo Espírito Santo, São Paulo e Bahia. Considerando-se o valor bruto da produção (VBP), o estado de Minas Gerais já faturou R\$ 34 bilhões na cafeicultura para o ano-cafeeiro 2022, o equivalente a 54% do total arrecadado pelas lavouras dos cafés do Brasil neste ano, e em segundo lugar vem o estado do Espírito Santo com 22,5% (EMBRAPA, 2022).

Do início do ano de 2022 até agosto, 136 países receberam cafés do Brasil, entre eles os Estados Unidos (20,9%), Alemanha (18,6%), Bélgica (9,0%), Itália (8,4%) e Japão (4,3%) (CONAB, 2022). O café é a 5ª *commoditie* mais exportada do Brasil, sendo que cerca de 25,7 milhões de sacas de café já foram exportadas até o mês de agosto de 2022 (CONAB, 2022). Com relação aos cafés diferenciados, o Brasil exportou até agosto de 2022 um volume físico de 4,54 milhões de sacas de 60kg, movimentando US\$ 1,292 bilhões em receita cambial. São classificados como cafés diferenciados os que apresentam qualidade superior ou certificados por práticas sustentáveis (CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ, 2022).

O café movimenta a economia de muitos países, devido à influência dessa *commoditie* no desenvolvimento social, questões ambientais e econômicas de países produtores (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2022). Sabe-se que 53% de todo o café produzido no mundo são consumidos pelos mercados da América do Norte, Europa e Japão (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2022). O café contribui positivamente em questões sociais, gerando empregos rurais e dando estabilidade às comunidades envolvidas. Do ponto de vista ambiental, o café contribui para o sequestro de carbono, auxilia na estabilização de solos e também pode permitir a manutenção da

biodiversidade local, principalmente em cultivos orgânicos (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2022).

### 3.2 Bicho-mineiro

O Bicho-mineiro-do-cafeeiro (BMC) tem sua origem no continente africano (GUERIN-MÈNEVILLE e PERROTTET, 1842; BOX, 1923; GALLO et al., 1988). Este inseto ocorre em países da África, Ásia e países neotropicais, incluindo América Central, ilhas do Caribe e América do Sul (BOX, 1923; GREEN, 1984; MEY, 1994; PEREIRA et al., 2007; DANTAS et al., 2021). No século 19 o BMC foi detectado no Brasil, e desde lá essa praga veio ganhando grande importância dentro da cultura no país tornando-se praga chave (MEDINA et al., 1977), principalmente em lavouras do Cerrado brasileiro (DANTAS et al., 2021).

O BMC apresenta as fases de ovo, larva, pupa e adulto alado (SOUZA et al., 1998). Os adultos de BMC são mariposas (microlepidópteros) prateadas, com asas posteriores franjadas, e as anteriores apresentam uma mancha preta de forma circular com halo amarelado. De hábito crepuscular-noturno, durante o dia os adultos se escondem sob as folhas das plantas (COSTA et al., 2012). Os adultos medem aproximadamente 6,5 mm de envergadura e 2 mm de comprimento corporal (SOUZA et al., 1998; DANTAS, et al., 2021). Não causam injúrias diretas, uma vez que seu aparelho bucal é do tipo sugador-maxilar (SOUZA et al., 1998). Morfologicamente, as fêmeas e os machos são bastante semelhantes, exceto pelas diferentes estruturas da genitália, e também pelo fato das fêmeas apresentarem comprimento médio do corpo ligeiramente maior que os machos (MOTTA et al., 2021).

A oviposição é feita na face adaxial das folhas, os ovos são postos isoladamente e apresentam formato oval e côncavo, com 0,3mm de comprimento e 0,25mm de largura, são brancos, translúcidos e brilhantes (BOX, 1923; COSTA et al., 2012; GUERREIRO FILHO, 2006). Após a eclosão, as larvas penetram imediatamente a epiderme foliar, se alojam no mesófilo e começam a se alimentar do tecido paliçádico (SOUZA et al., 1998; GUERREIRO FILHO, 2006). Apresentam quatro instares larvais, as quais possuem cabeça plana, aparelho bucal do tipo mastigador, corpo achatado e segmentado, que pode atingir cerca de 4-5mm de comprimento (NOTLEY, 1948; BOX, 1923; NIELSEN, 1991; GUÉRIN-MÉNEVILLE et al., 1842). Ao fim do quarto instar, as larvas abandonam as minas, tecem um fio de seda e produzem o seu casulo (crisálida) de aproximadamente 2mm, geralmente na região abaxial da folha e no terço inferior do cafeeiro (BOX, 1923; COSTA et al., 2012).

Deversos fatores influenciam a densidade populacional e o ciclo de vida de *L. coffeella*, como por exemplo, o clima (principalmente temperatura, umidade relativa do ar e precipitação), uso indiscriminado de inseticidas, inimigos naturais, práticas culturais, entre outras. Em condições controladas, com temperatura de 25°C, um indivíduo pode completar seu ciclo de vida em até 22 dias (ovo - 5 dias; larva -12 dias; pupa - 5 dias) (KATIYAR e FERRER, 1968). Em outras situações, o ciclo de vida do BMC pode variar de 19 a 87 dias (SOUZA et al., 1998). De acordo com Souza (2018), no Brasil em condições naturais (campo), o BMC pode ter de 8 a 12 gerações.

Regiões com temperaturas elevadas, baixa umidade relativa e baixa pluviosidade, favorecem o aumento da infestação do BMC (SOUZA et al., 1998). Em Minas Gerais, pode-se citar as regiões do Alto Paranaíba, Triângulo Mineiro, Jequitinhonha, Alto São Francisco, Paracatu e Rio Doce como sendo muito favoráveis a explosões populacionais dessa praga (SOUZA et al., 1998). Estudos estimam um aumento das populações de BMC devido às mudanças climáticas, visto o aumento da temperatura global, que conseqüentemente, aumentará também o número de gerações do inseto (GHINI et al., 2008; JARAMILLO et al., 2011).

### **3.2.1 Injúrias e danos**

As larvas do BMC são responsáveis pelas injúrias nas folhas dos cafeeiros, uma vez que ao se alimentar, abrem minas nas folhas. As minas se transformam em áreas necróticas, ocasionando queda prematuras das folhas, reduzindo a taxa fotossintética das plantas, o que pode levar ao esgotamento da planta com queda de produtividade e em alguns casos até a morte (SOUZA et al., 1998; COSTA et al., 2012). A ocorrência da queda das folhas minadas se deve ao fato do aumento dos níveis do hormônio etileno nas folhas lesionadas (SOUZA et al., 1998).

Esse inseto-praga gera prejuízos na produção, no rendimento e na longevidade das plantas de café (SOUZA et al., 1998). Já se sabe que o BMC pode trazer prejuízos na produção de até 80%, que pode variar de acordo com a desfolha das plantas (PAULINI et al., 1977).

### **3.2.2 Métodos de controle de Bicho-mineiro-do-cafeiro**

O controle químico ainda é o principal método de controle utilizado para conter as populações de BMC, entretanto cafeicultores vêm observando certa ineficiência na maioria

dos defensivos químicos devido à seleção de populações resistentes (DANTAS et al., 2021). Isso ocorre principalmente devido ao uso intensivo de defensivos químicos sem rotação de ingrediente ativo com diferentes mecanismos de ação. Estudos recentes mostraram que 94% das populações de *L. coffeella* no estado da Bahia foram resistentes ao ingrediente ativo clorantraniliprole (LEITE et al., 2020). Nesses casos, além da necessidade de várias pulverizações, o que aumenta o custo de produção, o controle químico também afeta o equilíbrio ambiental pois, nem sempre são seletivos aos inimigos naturais (LEITE et al., 2020). Outra desvantagem da utilização dos defensivos químicos, são os riscos aos trabalhadores e ao ambiente, devido à sua toxicidade. Os inseticidas das classes dos organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides e diamidas, são os mais utilizados pelos cafeicultores (TRDAN, 2016; LEITE et al., 2020).

O monitoramento é uma das bases para a aplicação do MIP. O monitoramento do BMC é usualmente realizado por meio da amostragem de folhas com minas intactas, nas quais o nível de controle varia entre 15 e 30% dependendo da região em que se encontra a lavoura (SILVA et al., 2019). O nível de não ação, ou seja, a não necessidade de efetuar o controle da praga, ocorre quando 40% das folhas minadas coletadas durante a amostragem apresentem sinais de predação (SILVA et al., 2019). Outra estratégia de monitoramento é a utilização do feromônio 5,9-dimetilpentadecano em armadilhas tipo delta a cada 4 hectares (LIMA, 2001; IBARRA, 2006). Além disso, os produtores de café também podem contar com duas cultivares resistentes ao BMC, a Siriema AS1 e a Siriema VC4 (MATIELLO et al., 2014; MATIELLO et al., 2015).

Devido à grande importância dessa praga e da dificuldade de controle, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver novas ferramentas para o manejo do BMC, como novos semioquímicos, pesticidas nanoencapsulados (nanobioprodutos), bioprodutos (extratos vegetais), melhoramento genético e novas estratégias de controle biológico (DANTAS et al., 2021).

Há vários relatos na literatura sobre a ação de parasitoides e predadores (vespas, crisopídeos e formigas) atuando naturalmente como agentes de controle biológico de BMC (PARRA et al., 1977; LOMELI-FLORES et al., 2009; PICANÇO et al., 2012; DAVID-RUEDA et al., 2016). Nesse contexto, é extremamente promissor o desenvolvimento de novas estratégias de controle biológico para compor o manejo integrado do bicho-mineiro.

### 3.2.2.1 Controle Biológico

A densidade populacional de uma espécie é influenciada basicamente por duas classes de processos ecológicos, os processos abióticos (flutuações ambientais) e os bióticos (presença de inimigos naturais e oferta de alimentos). As relações ecológicas que envolvem inimigos naturais regulando populações de insetos-praga, podem ser definidas como controle biológico, o qual pode ocorrer naturalmente em qualquer ambiente sem a interferência antrópica (FONTES et al., 2020).

O método de controle biológico apresenta diversas vantagens, como por exemplo, a possibilidade dos agentes de controle localizarem as pragas-alvo, não geram resíduos, a maioria exibe alto grau de especificidade e protegem a biodiversidade, entre tantas outras vantagens (GALLO et al., 2002; BADI et al., 2015).

O controle biológico de pragas, dentro do contexto agrícola, pode ser classificado em três tipos: natural, clássico e aplicado (PARRA et al., 2002). O controle biológico natural, acontece por ação de inimigos naturais, que quando se encontram em quantidade suficiente conseguem manter em equilíbrio as densidades populacionais de insetos-praga; o controle biológico clássico é utilizado com o objetivo de conter pragas exóticas, para isso inimigos naturais da praga alvo são importados e introduzidos; e, o controle biológico aplicado visa o controle da praga alvo em um curto período de tempo, a partir da liberação massal do agente biológico (PARRA et al., 2002). Os inimigos naturais podem ser classificados em predadores, parasitoides e entomopatogênicos, incluindo os vírus, fungos, bactérias, protozoários e nematoides, entre outros.

O controle biológico de *L. coffeella*, ocorre principalmente através da ação natural de parasitoides (microhimenópteros), formigas e vespas predadoras (PICANÇO et al., 2012; FERNANDES, 2012; DAVID-RUEDA, et al., 2016). Existem muitos parasitoides atuando sobre larvas de *Leucoptera* sp. em lavouras cafeeiras reduzindo as densidades populacionais da mesma, mesmo assim, houve poucas tentativas de se utilizar esses inimigos naturais como ferramentas de controle biológico (ALMEIDA et al., 2020). Atualmente, não há um programa de controle biológico estabelecido para *L. coffeella*, porém muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com essa finalidade utilizando predadores do gênero *Chrysoperla*, os quais são capazes de predação de larvas, pré-pupas e pupas (ECOLE et al., 2002; FIGUEIREDO et al., 2021; SILVA 2021).

### 3.2.2.2 Controle Microbiano

Além de parasitoides e predadores, outros agentes de biocontrole já foram testados contra *L. coffeella* como nematoides, bactérias e fungos (VILLACORTA, 1983; DRAGANOVA e TOMOV, 1998). Villacorta (1983) verificou patogenicidade do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre ovos e larvas de *L. coffeella*. Os fungos *Metarhizium robertsii* e *Metarhizium brunneum*, também são capazes de interferir no desenvolvimento de *L. coffeella*. Por meio de inoculação conjunta de *M. robertsii* e *M. brunneum* em substrato de mudas de cafeeiro, Franzin (2021) constatou redução da porcentagem de área foliar minada. O fungo *Beauveria bassiana* foi descrito como sendo patogênico para *Leucoptera malifoliella* (COSTA, 1836) (Lepidoptera: Lyonetiidae), infectando larvas fora das minas (DRAGANOVA e TOMOV, 1998).

Já foi verificada patogenicidade de bactérias *Bacillus thuringiensis* (gene *cryIAc*) por meio de plantas transgênicas a *L. coffeella* em condições controladas (PERTHUIS et al., 2005). Por meio de aplicação direta em condições controladas, Vilarinho (2020), comprovou patogenicidade da bactéria *Bacillus subtilis* isolado 202 sobre larvas de *L. coffeella* com mortalidade de até 80%.

O controle de pragas utilizando-se entomopatógenos é aplicado principalmente de forma inundativa (LACEY et al., 2015). Devido à sua alta especificidade e seletividade, os agentes de controle microbiano influenciam minimamente organismos não-alvo, além disso, muitos desses organismos são resistentes a moléculas químicas, possibilitando a sua aplicação de forma conjunta, simultânea ou intercalada com outros métodos de controle (ALVES, 1998; ROSSI-ZALAF et al., 2008; SABINO et al., 2018).

### 3.2.2.3 Nematoides entomopatogênicos

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) causam doença e, posteriormente, morte em seus insetos hospedeiros. Uma grande diversidade de espécies e linhagens de NEP vêm sendo isoladas de solos de diferentes partes do mundo (DOLINSKI et al., 2017). Os NEP são mais uma ferramenta biológica para o manejo integrado de pragas, visto que muitas espécies são generalistas, capazes de infectar diferentes espécies de insetos-praga, tornando-se potenciais agentes de biocontrole (FUGA et al., 2012; JAMES et al., 2018).

Os nematoides das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae, são os mais utilizados no manejo de pragas atualmente. Esses nematoides possuem associação simbiótica

com bactérias da família Enterobacteriaceae, as quais se alojam no intestino dos NEP (DOLINSKI et al., 2020). Tratam-se de bactérias Gram-negativas, que produzem antibióticos e toxinas responsáveis por levar o inseto à morte. Os NEP do gênero *Steinernema* se associam com as bactérias do gênero *Xenorhabdus*, enquanto os NEP do gênero *Heterorhabditis* são associados ao grupo de bactérias do gênero *Photorhabdus* (AKHURST, 1982; DOLINSKI; LACEY, 2007; LACEY et al., 2015).

Os NEP apresentam três fases de desenvolvimento em seu ciclo de vida: ovo, juvenil e adulto. Os juvenis são divididos em quatro estádios, porém apenas os juvenis do terceiro estádio atuam como agentes de biocontrole, conhecidos também como juvenis infectantes (JI), os quais têm vida livre e são encontrados no solo (LACEY et al., 2015; DOLINSKI et al., 2020). Os JI localizam seus hospedeiros por meio de gradientes de temperatura, níveis de CO<sub>2</sub> e de seus produtos de excreção (DOLINSKI et al., 2020). Infectam seus hospedeiros principalmente através de aberturas naturais como aparelho bucal, ânus, espiráculos. Os NEP da família Heterorhabditidae também conseguem infectar seus hospedeiros perfurando a sua cutícula, utilizando estruturas quitinosas presentes em sua extremidade anterior (DOLINSKI; LACEY, 2007; DOLINSKI et al., 2020).

Uma vez dentro do organismo do hospedeiro, os JI vão até a hemocele dos insetos, e liberam as bactérias simbióticas, alojadas em seu tubo digestivo. As bactérias começam a produzir toxinas, que além de levar o inseto à morte por septicemia, evitam o ataque de microrganismos oportunistas e decompõem os tecidos do inseto, os quais servem de alimento para os JI, que passam para o estádio J4. (AKHURST, 1982; DOLINSKI; LACEY, 2007; LACEY et al., 2015). Quando o alimento se esgota, os novos juvenis do terceiro estádio capturam células bacterianas e saem do cadáver em busca de novos hospedeiros (DOLINSKI; LACEY, 2007; LABAUDE; GRIFFIN, 2018).

Embora existam muitos trabalhos que comprovem a eficiência de diferentes isolados de NEP, poucos vêm sendo comercializados (LACEY et al., 2015). Algumas espécies de NEP já possuem registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, como o *Heterorhabditis bacteriophora*, para o controle da broca do cupuaçu (*Conotrachelus humeropictus*) (Coleoptera: Curculionidae), bicudo da cana-de-açúcar (*Sphenophorus levis*) (Coleoptera: Curculionidae), vaquinha verde amarela (*Diabrotica speciosa*) (Coleoptera: Chrysomelidae), percevejo-castanho (*Scaptocoris castanea*) (Hemiptera: Cydnidae) e lagarta-militar (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera: Noctuidae), e o NEP *Steinernema carpocapsae*, para o controle de moscas-dos-fungos (*Bradysia matogrossensis*) (Diptera: Sciaridae), lagarta-militar e bicudo da cana-de-açúcar

(MAPA, 2022). Tavares et al. (2007), estudando a patogenicidade do isolado *Steinernema* sp. IBCB-6 sobre larvas do bicudo da cana-de-açúcar, verificaram mortalidade de até 73% em condições de casa-de-vegetação.

São várias as vantagens de se utilizar os NEP, como por exemplo, compatibilidade com defensivos químicos e biológicos, auxílio no manejo de resistência, eficiência em ambientes críticos, não são tóxicos ao homem, inexistência de intervalo de reentrada para colheita, e diferentemente de fungos, vírus e bactérias, os NEP apresentam hábito de busca por seus hospedeiros (FUGA et al., 2012; SABINO et al., 2018; DOLINSKI et al., 2020).

Poucos trabalhos estudaram os efeitos de nematoides entomopatogênicos em *L. coffeella*. Mendonça (2021) avaliou o efeito de dez isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *L. coffeella* em condições laboratoriais, concluindo que todos foram patogênicos ao inseto-praga, verificando mortalidades de aproximadamente 80%.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos e as criações foram mantidas no Laboratório de Resistência de Plantas e MIP do Departamento de Entomologia (DEN) da Universidade Federal de Lavras - UFLA, sob condições controladas de temperatura, umidade relativa e fotofase ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  e 12 horas).

### 4.2 Obtenção de populações de *Leucoptera coffeella*

Larvas do BMC foram capturadas em lavoura experimental da Universidade Federal de Lavras (UFLA), provenientes de plantas de *Coffea arabica* cultivar Topázio MG 1190, nas coordenadas geográficas de latitude  $21^\circ 13' 34.74''$  Sul e longitude  $44^\circ 58' 17.08''$  Oeste, com altitude média de 975 metros. Foram coletadas larvas em minas ativas no terço médio e superior de plantas escolhidas aleatoriamente, durante a safra agrícola do ano de 2021/2022 (Figura 1). As minas coletadas foram transportadas em sacos plásticos para o Laboratório de Resistência de Plantas e MIP, onde foram transferidas para gaiolas até a emergência dos adultos.

**Figura 1:** Coleta de folhas com minas ativas de *Leucoptera coffeella* em lavoura experimental de cafeeiro *Coffea arabica* de cultivar Topázio MG 1190, na Universidade Federal de Lavras - UFLA.



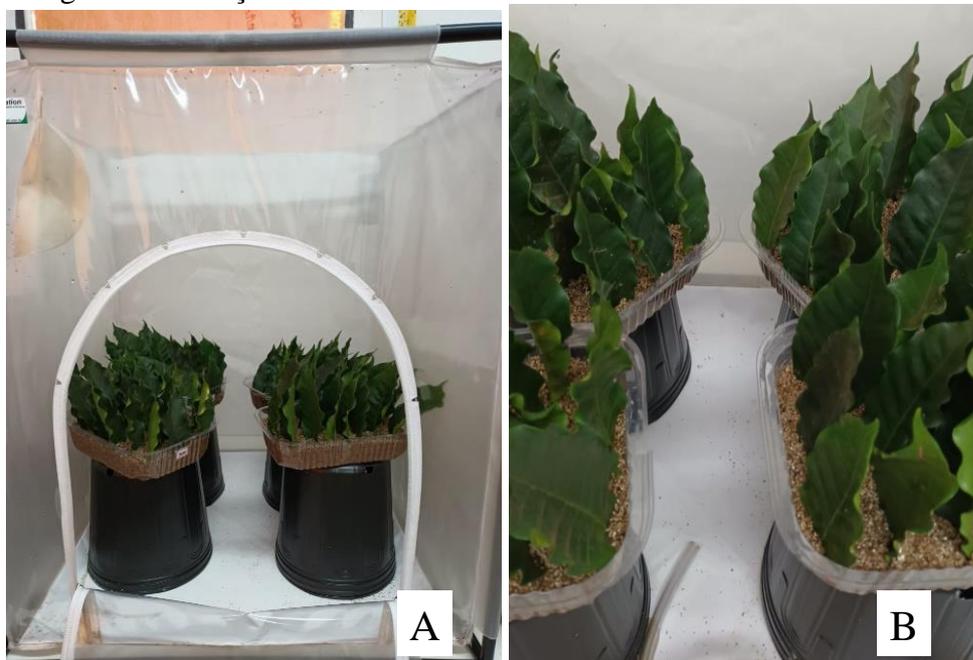
Fonte: da Autora (2022).

### 4.3 Criação de *Leucoptera coffeella*

Os adultos recém emergidos oriundos das folhas coletadas em campo, foram transferidos para gaiolas de criação (60 x 60 x 60 cm), revestidas por tecido “voil”. As gaiolas foram mantidas em laboratório sob condições controladas. Os adultos foram alimentados com solução de sacarose a 10%, fornecida em papel filtro mantido no canto superior das gaiolas, o qual foi trocado regularmente para evitar a proliferação de fungos (NANTES e PARRA, 1978; CONCEIÇÃO, 2005).

Para a oviposição, foram introduzidas nas gaiolas de criação folhas sadias de plantas de *Coffea arabica* da cultivar Topázio MG 1190, as quais foram fixadas verticalmente e distribuídas em bandejas plásticas contendo vermiculita, frequentemente umidecida com água, de modo a manterem as folhas túrgidas ao longo do desenvolvimento dos insetos (Figura 2). As bandejas foram dispostas sobre vasos de plantio de 4 L, para simular a altura de mudas de cafeeiro.

**Figura 2:** Gaiola de criação de *Leucoptera coffeella* em folhas de cafeeiro *Coffea arabica* de cultivar Topázio MG 1190. (A) Área externa da gaiola de criação. (B) Área interna da gaiola de criação.



Fonte: da Autora (2022).

A troca das bandejas com as folhas já ovipositadas por novas bandejas com folhas sadias foi feita a cada 3 dias. As bandejas contendo folhas com ovos foram transferidas para outras

gaiolas até a formação de minas com larvas no 3° e 4° ínstaes, das quais, parte foi utilizada em experimentos e parte foi mantida nas gaiolas para a manutenção da criação. Após a formação das pupas e, posteriormente, a emergência dos adultos, estes foram capturados com auxílio de um sugador, e transferidos para gaiolas contendo folhas sadias para a renovação da criação.

#### 4.4 Criação de *Galleria mellonella*

A multiplicação dos nematoides é comumente realizada sobre a traça dos favos *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). No Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, populações de *G. mellonella* foram conduzidas de acordo com a metodologia adaptada de Dutky, Thompson e Cantwe (1964), e em dieta artificial ajustada por Parra et al. (1998).

Os adultos de *G. mellonella* foram acondicionados em potes de vidro cilíndricos (1.300 mL) e tampa plástica de rosca furada (para trocas gasosas com o ambiente externo). Para a oviposição, foram colocadas dentro do pote folhas de papel sulfite A4 com dobraduras sanfonadas. Após um período de cinco dias, as folhas foram recolhidas com a postura e os adultos descartados. Os papéis contendo os ovos foram transferidos para outros potes plásticos (40 x 27 x 13 cm) com tampa furada e tecido *voil*, forrados com papel sulfite A4 onde foi fornecida dieta artificial (Tabela 1).

**Tabela 1:** Composição da dieta artificial fornecida para larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

Componentes	Quantidades
Farelo de trigo	200 g
Farinha de trigo	200 g
Gérmen de trigo	200 g
Glicerina	130 g
Leite em pó desnatado	400 g
Levedura de cerveja	120 g
Mel	240 g

Fonte: Parra et al. (1998).

Quando atingiram o terceiro ínstar de desenvolvimento, as larvas foram transferidas para outro pote plástico com tampa furada, forrado com papel sulfite A4 contendo dieta artificial. Quando os adultos emergiram foram recolhidos e transferidos com ajuda de tubo de ensaio, para potes de vidro cilíndricos com tampa, para a manutenção da criação. A

manutenção da criação foi realizada três vezes por semana, por meio da limpeza dos recipientes, coleta de adultos, coleta de posturas e adição de dieta.

#### 4.5 Obtenção dos Nematoides Entomopatogênicos

No presente trabalho, foram utilizados seis isolados de nematoides entomopatogênicos (NEP), sendo três pertencentes ao gênero *Steinernema* e três pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* (Tabela 2). Os nematoides foram multiplicados pelo método *in vivo*, adaptado de Woodring e Kaya (1988), utilizando-se larvas de sexto ínstar de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).

**Tabela 2:** Isolados de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) utilizados nos bioensaios.

Isolado	Local de origem
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> RSC05	Benjamin Constant/AM/Brasil
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> GL	Lavras/MG/Brasil
<i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET 11	Palmeiras das Missões/RS/Brasil
<i>Steinernema carpocapsae</i> All	Carolina do Norte/EUA
<i>Steinernema feltiae</i>	Flórida/EUA
<i>Steinernema brazilense</i> IBCB-06	São Paulo/SP/Brasil

Fonte: da Autora (2022).

#### 4.6 Multiplicação e manutenção dos isolados de nematoides entomopatogênicos

O Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos possui isolados de nematoides entomopatogênicos armazenados em câmara de B.O.D. sob condições controladas (temperatura de  $15 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e ausência de luz) (Figura 3). A manutenção do banco de isolados de NEP é realizada por meio da multiplicação dos mesmos em larvas de *G. mellonella* (WOODRING, KAYA, 1998).

Foram utilizadas placas de Petri (9 x 1,5 cm) forradas com dois discos de papel (90 mm), nas quais foram colocadas dez larvas de *G. mellonella*. Na sequência foram aplicados 1,8 mL de suspensão aquosa contendo em torno de 200 juvenis infectantes (JI) de NEP. Essas placas foram acondicionadas em câmara climatizada por 48 horas (temperatura de  $25 \pm 1$  °C, UR de  $70 \pm 10$  % e fotofase de 12 horas). Após esse período as larvas mortas foram transferidas para câmara seca (placa de Petri de 9x1,5 cm com papel filtro seco ao fundo), na qual

permaneceram durante cinco dias, nas mesmas condições citadas anteriormente. Em seguida, para a coleta dos JI, as larvas mortas foram transferidas para armadilha de White modificada (WHITE, 1927), sobre as quais foram adicionados 3 mL de água destilada.

Os NEP foram recolhidos utilizando-se uma proveta de 1000 mL, sobre a qual foi vertida a suspensão de NEP da armadilha de White e, posteriormente, o volume da proveta foi completado com água destilada. A suspensão foi mantida na proveta ao longo de 24 horas para decantação e lavagem dos nematoides. Em seguida o sobrenadante foi descartado e a suspensão de NEP foi transferida para frascos para cultura de tecido com capacidade de 250mL, adicionando-se água destilada até completar o volume. Os frascos foram armazenados em câmara climatizada ( $15 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$ , no escuro) por no máximo 5 dias, até a montagem dos experimentos.

#### **4.7 Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *Leucoptera coffeella***

Foi avaliada a patogenicidade de seis isolados de NEP pertencentes aos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema* sobre minas ativas de *L. coffeella*. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 20 repetições por tratamento, onde cada repetição foi constituída por uma placa de Petri (9 x 1,5 cm) forrada com dois discos de papel (90 mm).

Para a montagem do bioensaio, foram adicionadas sobre as placas de Petri 2 minas ativas intactas, infestadas com larvas de *L. coffeella*, oriundas de criação laboratorial (Figura 3). Em seguida, foram pulverizados 1,2 mL de uma suspensão de NEP com 1.000 JI/mL, com o auxílio de um bico pulverizador conectado a um compressor de ar, regulado com pressão de 10 Psi, e para o controle, foram pulverizados 1,2mL de água destilada esterilizada, conforme a metodologia de Agudelo (2014). Por fim, as placas foram vedadas com filme plástico Parafilm® e acondicionadas em câmara B.O.D com condições controladas (T:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 10\%$  e F: 12 horas).

**Figura 3:** Unidade experimental utilizada nos bioensaios (Composição: placa de Petri 9 cm, 2 papeis filtro 90 mm, 2 minas ativas de bicho-mineiro-do-cafeeiro).



Fonte: da Autora (2022).

A avaliação foi realizada após 168 horas da aplicação, com a aberturas das minas foliares com auxílio de alfinetes entomológicos, e posteriormente, observação da sintomatologia e dissecação dos cadáveres, contabilizando o número de larvas mortas por NEP.

A mudança de coloração no corpo do hospedeiro é um sintoma característico da infecção por NEP, ocasionada pela ação de bactérias simbióticas transportadas no intestino dos JI (MRÁČEK; SPITZER, 1983). As bactérias associadas aos gêneros de NEP *Steinernema* e *Heterorhabditis*, pertencem, respectivamente, aos gêneros *Xenorhabdus* spp. e *Photorhabdus* spp. (AKHURST, 1982; DOLINSKI; LACEY, 2007; LACEY et al., 2015).

#### **4.8 Bioensaio 2: Concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre minas ativas de *Leucoptera coffeella***

No bioensaio 2, foram utilizados os isolados *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, pois foram os isolados mais virulentos para larvas de *L. coffeella* no bioensaio anterior. O estudo foi executado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com oito tratamentos e vinte e cinco repetições, onde cada repetição foi constituída por uma placa de Petri, contendo 2 minas de BMC que foram recortadas de folhas de cafeeiro.

Para a montagem do bioensaio, as placas de Petri (9 x 1,5 cm) foram forradas com dois discos de papel (90 mm), e foram transferidas 2 minas ativas e intactas de *L. coffeella* oriundos

de criação. Em seguida, foram pulverizados 1,2 mL de diluições seriadas e padronizadas (0, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 e 2000 JI/mL) dos isolados sobre as minas, com o auxílio de um bico pulverizador ligado a um compressor de ar, colibrado com uma pressão de 10 Psi e, como testemunha, foi utilizada água destilada esterilizada (AGUDELO, 2014).

As unidades experimentais foram avaliadas após 168 horas e a confirmação da mortalidade por NEP foi realizada por meio da observação dos sintomas (morte e coloração do corpo) e da dissecação dos cadáveres.

#### **4.9 Bioensaio 3: Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* pelos isolados *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e o *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 em diferentes tempos de exposição**

Para determinar a mortalidade ao longo do tempo de larvas de *L. coffeella* submetidas aos isolados *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, foram feitas pulverizações dos mesmos na concentração definida no bioensaio anterior (2.000 JI/mL).

Esse estudo foi composto por oito tratamentos, sete tempos de avaliação 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h, e o controle, no qual houve pulverização apenas de água destilada esterilizada e a avaliação foi realizada em todos os tempos.

O bioensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com vinte e cinco repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri (9 x 1,5 cm) forrada com dois discos de papel (90 mm), contendo 2 minas de BMC cada, nas quais foram pulverizados 1,2 mL de suspensão aquosa dos isolados de nematoide. O experimento foi realizado utilizando o mesmo procedimento experimental adotado no bioensaio 2. O número de larvas mortas foi registrado em cada caso, sendo os insetos examinados e dissecados para a verificação da presença de nematoides.

#### **4.10 Bioensaio 4: Compatibilidade entre *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e o *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 sobre *Leucoptera coffeella***

Após a seleção de isolados de nematoides mais virulentos a *L. coffeella*, foram realizados testes de pulverizações combinadas desses isolados, com a finalidade de verificar o caráter das interações.

O bioensaio foi realizado utilizando o mesmo delineamento e procedimento experimental adotados nos bioensaios anteriores, em DIC com vinte e cinco repetições por

tratamento, e cada repetição sendo uma placa de Petri (9 x 1,5 cm) forrada com dois discos de papel (90 mm) e duas minas ativas de *L. coffeella*. Ao todo foram realizados sete tratamentos (Tabela 3), nos quais foram pulverizados 1,2 mL de suspensão aquosa de NEP nos tratamentos de aplicações individuais, e 0,60 mL de cada isolado nos tratamentos com pulverizações combinadas.

**Tabela 3:** Tratamentos executados no bioensaio 4. (NEPET 11: *Heterorhabditis* sp. NEPET 11; RSC05: *H. amazonensis* RSC05).

Tratamentos
T1: Controle (água destilada)
T2: 2.000 JI/mL de NEPET 11
T3: 2.000 JI/mL de RSC05
T4: 1.000 JI/mL de RSC05 + 1.000 JI/mL de NEPET 11
T5: 500 JI/mL de RSC05 + 500 JI/mL de NEPET 11
T6: 500 JI/mL de NEPET 11 e após 12 horas, 1.500 JI/mL de RSC05
T7: 500 JI/mL de RSC05 e após 12 horas, 1.500 JI/mL NEPET 11

Fonte: da Autora (2022).

As avaliações foram realizadas após cinco dias, tempo determinado no experimento anterior (bioensaio 3). Para a confirmação da morte por NEP, as larvas foram examinadas através da sintomatologia apresentada pelos cadáveres e da dissecação dos mesmos.

#### 4.11 Análise Estatística

Utilizou-se o software R 3.6 (R CORE TEAM, 2019) para o estudo de todos os dados obtidos, sendo utilizados os pacotes lme4 (BATES et al., 2015), emmeans (SEARLE; SPEED; MILLIKEN, 1980), drc e hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade sobre os resíduos da variável resposta, que indicou a não normalidade de distribuição. Sendo assim, foram realizados os devidos ajustes de distribuição e, posteriormente, os dados foram submetidos à rotina GLM (Generalized Linear Models) do software R (R CORE TEAM, 2019).

Nos bioensaios 1 e 4, foram testados os diferentes tratamentos em larvas de *L. coffeella* utilizando-se o Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição quasibinomial com função de ligação logit. Para isso, foi ajustado um GLM considerando o efeito dos isolados de NEP sobre as larvas e a interação entre eles. Para verificar o efeito dos diferentes NEP, foi aplicado o teste da razão de verossimilhança (log-likelihood ratio) seguido por comparações das médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para o bioensaio 2, no qual foram estudados os efeitos de diferentes concentrações de *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, também foi utilizado o GLM com distribuição quasibinomial e função de ligação probit. O mesmo GLM em função de ligação probit também foi utilizado para o teste de mortalidade de larvas de *L. coffeella* ao longo do tempo de exposição (bioensaio 3) para o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, enquanto que, para o isolado *H. amazonensis* RSC05 o GLM foi ajustado em função de ligação logit.

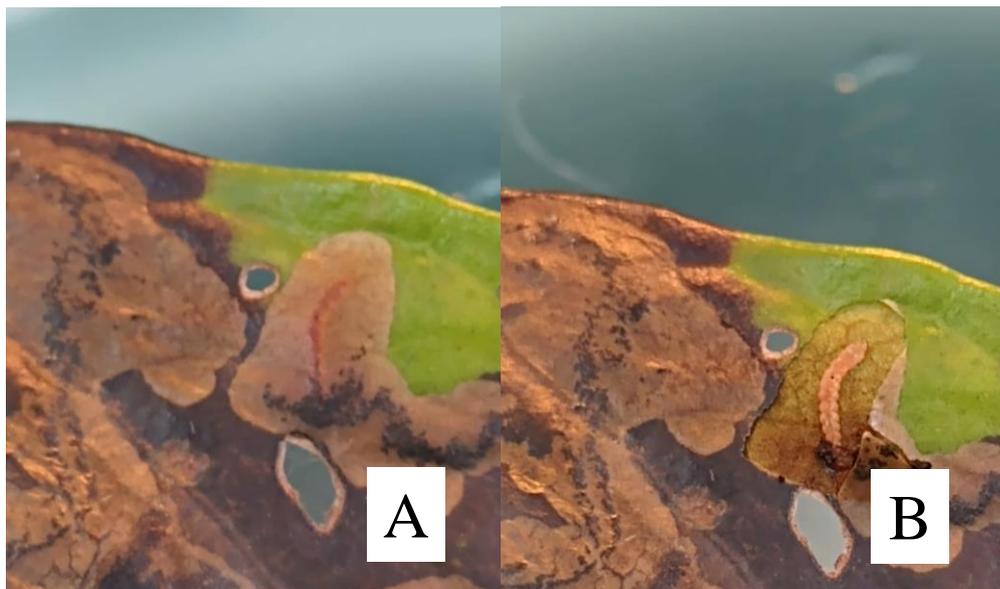
Para as análises de concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) e tempo letal (TL<sub>50</sub> e TL<sub>90</sub>) dos isolados *H. amazonensis* RSC05 e o *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, os modelos foram ajustados em log-logístico com dois parâmetros  $y = 1/(1+\exp\{b[\ln(x)-\ln(e)]\})$ , com o teste “Goodness-of-fit test” para verificar a qualidade do ajuste.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Bioensaio 1: Patogenicidade de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *L. coffeella*

Após a avaliação do experimento, com a observação dos sintomas (Figura 5), dissecação dos indivíduos, e posteriormente análise dos dados, foi possível verificar que as populações de *L. coffeella* utilizados no presente trabalho apresentaram susceptibilidade a todos os isolados de NEP estudados. Os JI de todos os isolados foram capazes de localizar, infectar e causar mortalidade nos indivíduos dentro das minas (Figura 4), porém foi verificada grande variabilidade na mortalidade das larvas entre os tratamentos (Figura 6).

**Figura 4:** Larva de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) infectada por nematoide entomopatogênico, dentro de mina em folhas de cafeeiro *Coffea arabica* cultivar Topázio MG 1190. (A) mina fechada. (B) mina aberta com alfinete.



Fonte: da Autora (2022).

**Figura 5:** Larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), com a sintomatologia de infecção por NEP. (A) sintomatologia promovida por nematoides do gênero *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). (Rhabditida: Steinernematidae).

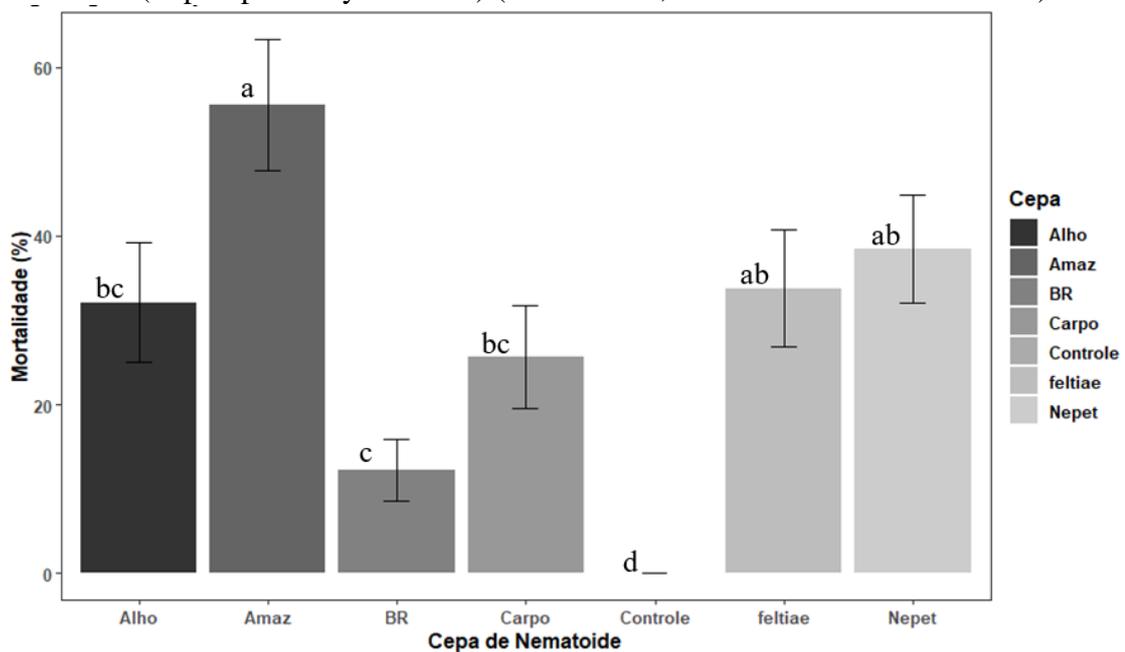


Fonte: da Autora (2022).

A mortalidade variou entre 12,2 e 55,5 %, sendo que os isolados pertencentes ao gênero *Heterorhabditis* proporcionaram maiores mortalidades (*H. amazonensis* RSC05 55,5%, *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 38,4%, *Heterorhabditis* sp. Alho 32,1%). Os isolados do gênero *Steinernema*, de modo geral, foram menos prejudiciais às larvas de *L. coffeella*, com mortalidade de 33,7, 25,6 e 12,2%, para os isolados *Steinernema feltiae*, *S. carpocapsae* All e *S. brazilense*, respectivamente (teste de Tukey 0,05;  $X^2= 175,82$ , Df= 114,  $p < 0,001$ ).

O controle, foi significativamente diferente dos demais tratamentos, sendo o único tratamento no qual não houve indivíduos mortos (Figura 6). Os isolados *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 foram selecionados para dar sequência aos demais bioensaios.

**Figura 6:** Mortalidade causada por nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Heterorhabditidae e Steinernematidae) em larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) (T:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; UR:  $70 \pm 10\%$  e F: 12 horas).



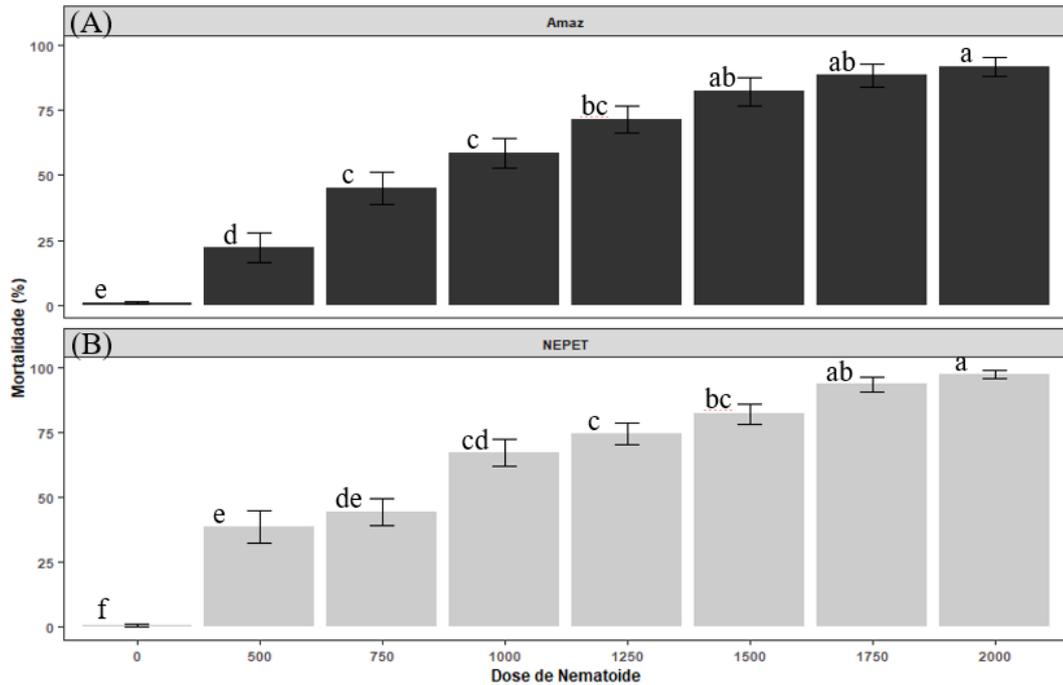
Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* entre os isolados de NEP estudados, pelo teste de Tukey a 5% de significância (Alho: *Heterorhabditis amazonensis* GL; Amaz: *Heterorhabditis amazonensis* RSC05; BR: *Steinernema brazilense* IBCB-06; Carpo: *Steinernema carpocapsae* All; Feltiae: *Steinernema feltiae*; Nepet: *Heterorhabditis* sp. NEPET 11; Controle: testemunha).

## 5.2 Bioensaio 2: Efeito de concentrações de isolados de nematoides entomopatogênicos sobre minas ativas de *Leucoptera coffeella*

Verificou-se que os isolados *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 causaram mortalidade em larvas de *L. coffeella* em todas as concentrações estudadas, exceto no tratamento controle. Foi observado um incremento na mortalidade das larvas, dos dois isolados de NEP estudados, com o aumento das concentrações das suspensões.

Houve diferença entre as concentrações estudadas do isolado *H. amazonensis* RSC05. As maiores médias de mortalidade observadas para o isolado *H. amazonensis* RSC05 foram nas concentrações de 1.500, 1.750 e 2.000 JI/mL, onde a concentração de 2.000 JI/mL apresentou a maior mortalidade (91,8 %) (GLM, teste da razão de verossimilhança;  $X^2=284,20$ , Df= 168,  $p < 0,001$ ) (Figura 7). No estudo das concentrações de suspensões de *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, as maiores mortalidades foram obtidas nas concentrações de 1.750 e 2.000 JI/mL, com 93,5% e 97,3%, respectivamente (GLM, teste da razão de verossimilhança;  $X^2= 260,56$ , Df= 168,  $p < 0,001$ ) (Figura 7).

**Figura 7:** Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella*, em diferentes concentrações de juvenis infectantes (A) *Heterorhabditis amazonensis* RSC05; (B) *Heterorhabditis* sp. NEPET 11.

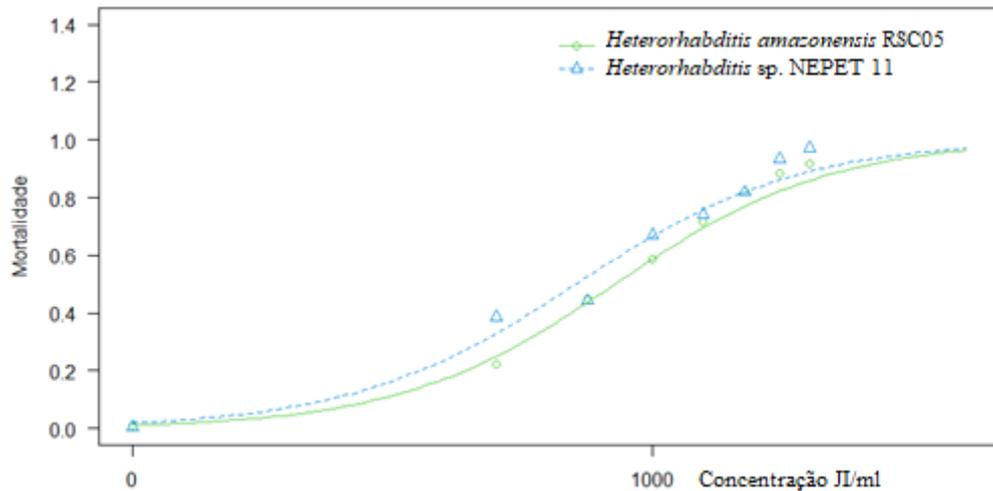


Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade de larvas de *L. coffeella* entre as diferentes concentrações de nematoides entomopatogênicos, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A mortalidade das larvas infectadas por *H. amazonensis* RSC05 variou entre 22,3 e 91,8%, enquanto que a mortalidade das larvas infectadas por *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 variou entre 38,7 e 97,3% (Figura 7).

A análise de regressão foi aplicada nos dados de concentração para identificar os valores de concentração letal (CL) (Figura 8). Verificaram-se menores concentrações de JI nas análises do isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 em comparação com o isolado *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 (Tabela 4).

**Figura 8:** Análise de regressão para a mortalidade confirmada de larvas de *Leucoptera coffeella* submetidas a diferentes concentrações de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 (Amaz) e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (NEPET).



Modelo log-logístico com dois parâmetros  $y=1/(1+\exp\{b[\ln(x)-\ln(e)]\})$ , utilizando o teste “Goodness-of-fit test”.

**Tabela 4:** Concentração letal (CL) de juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae) necessária para causar mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae).

Mortalidade esperada	Concentração de juvenis infectantes (JI/mL)	
	<i>H. amazonensis</i> RSC05	<i>Heterorhabditis</i> sp. NEPET 11
Mortalidade de 10% (CL <sub>10</sub> )	295,76 ± 32,69	238,33 ± 29,85
Mortalidade de 20% (CL <sub>20</sub> )	435,57 ± 35,35	356,34 ± 33,44
Mortalidade de 30% (CL <sub>30</sub> )	563,37 ± 35,41	465,56 ± 34,43
Mortalidade de 40% (CL <sub>40</sub> )	695,64 ± 34,44	579,65 ± 34,13
Mortalidade de 50% (CL <sub>50</sub> )	844,20 ± 33,77	708,78 ± 33,35
Mortalidade de 60% (CL <sub>60</sub> )	1024,47 ± 36,23	866,68 ± 33,78
Mortalidade de 70% (CL <sub>70</sub> )	1265,02 ± 48,01	1079,04 ± 40,32
Mortalidade de 80% (CL <sub>80</sub> )	1636,19 ± 81,47	1409,78 ± 65,28
Mortalidade de 90% (CL <sub>90</sub> )	2409,60 ± 182,13	2107,88 ± 150,95
Mortalidade de 99% (CL <sub>99</sub> )	7569,10 ± 1244,10	6924,80 ± 1138,10

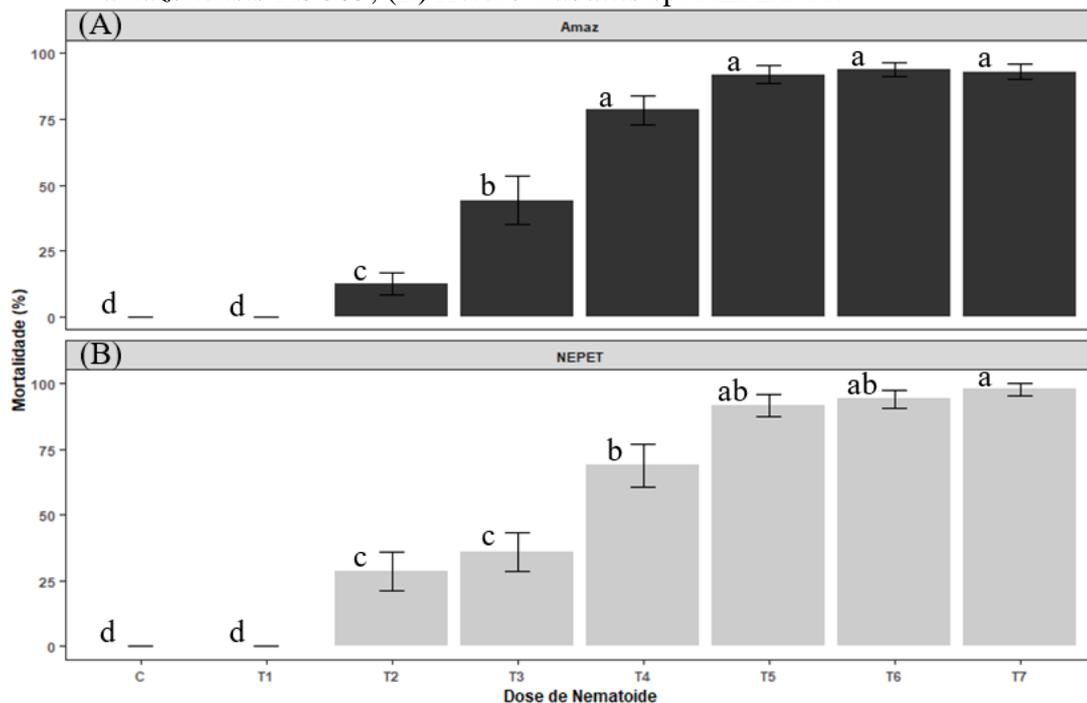
O isolado *H. amazonensis* RSC05 apresentou dose efetiva de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> de 844.20 JI/mL e 2409.60 JI/ mL (log-logístico, X<sup>2</sup>= 844,20, Df = 4, p= 0,8221), e o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 obteve concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) de 708.78 JI/mL e 2107.88 JI/mL (log-logístico, X<sup>2</sup>=708,77, Df = 4, p=0,9688) (Tabela 4).

A concentração de 2.000JI/mL foi escolhida para realizar os bioensaios seguintes, com objetivo de causar maiores taxas de mortalidade em larvas de *Leucoptera coffeella*.

### 5.3 Bioensaio 3: Mortalidade de larvas de *L. coffeella* pelos isolados *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e o *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 em diferentes tempos de exposição

O tempo T1 (24h) não diferiu do tratamento controle, não sendo suficiente para a ocorrência de infecção nas larvas de *L. coffeella*. Os demais tratamentos permitiram infecção por parte dos dois isolados de NEP estudados. Tanto o isolado *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 quanto o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, apresentaram as maiores mortalidades nos maiores tempos de exposição (Figura 9).

**Figura 9:** Mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) em diferentes tempos de exposição aos juvenis infectantes (JI). (A) *Heterorhabditis amazonensis* RSC05; (B) *Heterorhabditis* sp. NEPET 11.



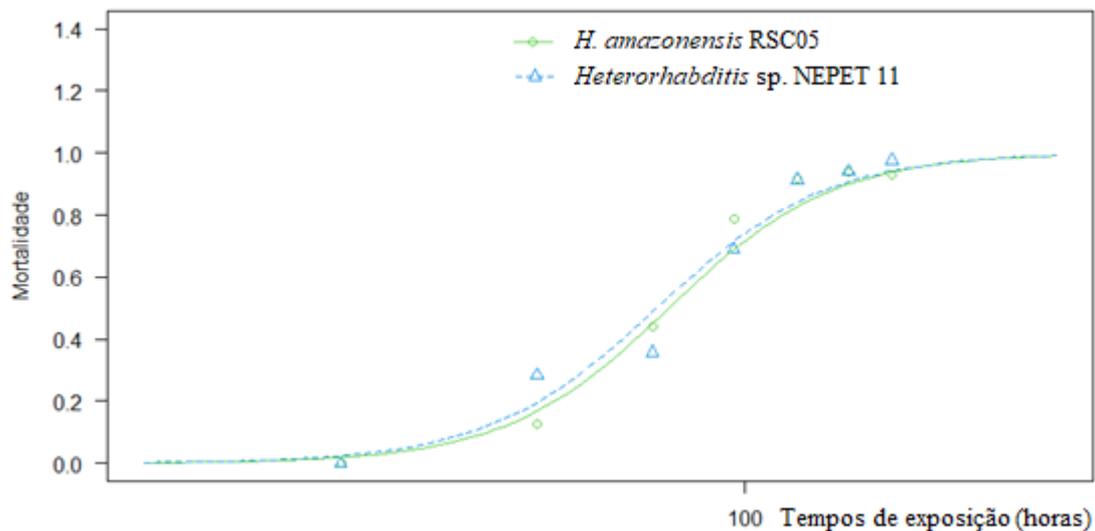
Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade das larvas de *L. coffeella* entre os diferentes tempos de exposição aos nematoides entomopatogênicos, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Tempos de exposição: T1 - 24h; T2 - 48h; T3 - 72h; T4 - 96h; T5 - 120h; T6 - 144h e T7 - 168.

Para o isolado *Heterorhabditis amazonensis* RSC05, foi observado um incremento na mortalidade das larvas de *L. coffeella* somente até 96h, após esse tempo não houve aumento na mortalidade (Figura 9). À medida que o tempo de exposição aumentou, houve um aumento na mortalidade das larvas de *L. coffeella* até 120h para o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET

11 (GLM, teste da razão de verossimilhança;  $X^2= 292,82$ , Df= 168,  $p<0,001$ ;  $X^2= 366,22$ , Df= 168,  $p<0,001$ , respectivamente).

Quando as larvas de *L. coffeella* ficaram expostas por 96, 120, 144 e 168 horas ao isolado *H. amazonensis* RSC05, apresentaram mortalidade de 79, 92, 94 e 93%, respectivamente; e mortalidade de 69, 91, 94 e 98%, respectivamente, nas larvas infectadas por *Heterorhabditis* sp. NEPET 11. Nos períodos de 48 e 72h, houve diferença na mortalidade apenas nas larvas infectadas por *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 (Figura 9). Foi escolhido o tempo de 120h para realizar o bioensaio 4, o qual foi responsável por matar mais de 90% das larvas de *L. coffeella*.

**Figura 10:** Análise de regressão para a mortalidade confirmada de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) submetidas a diferentes tempos de exposição aos juvenis infectantes (JI) de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae).



Modelo log-logístico com dois parâmetros  $y=1/(1+\exp\{b[\ln(x)-\ln(e)]\})$ , utilizando o teste “Goodness-of-fit test”.

Aplicando-se a análise de regressão, foi possível a verificação do tempo letal para os dois isolados estudados (Figura 10). O tempo letal do isolado *H. amazonensis* RSC05 ( $TL_{50}$  e  $TL_{90}$ ) foi de 76,28 e 144,46 horas, e o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 apresentou  $TL_{50}$  de 73,12h e  $TL_{90}$  de 140,96h (log-logístico,  $X^2=76,28$ , Df=4,  $p< 0,001$ ; log-logístico,  $X^2=73,11$ , Df=4,  $p<0,001$ , respectivamente) (Tabela 5). Nota-se também, que o isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 precisa de um menor tempo para causar a mesma mortalidade que o isolado *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 (Figura 10).

**Tabela 5:** Tempo letal (TL) em horas, necessário para juvenis infectantes (JI) de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae) causarem mortalidade de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae).

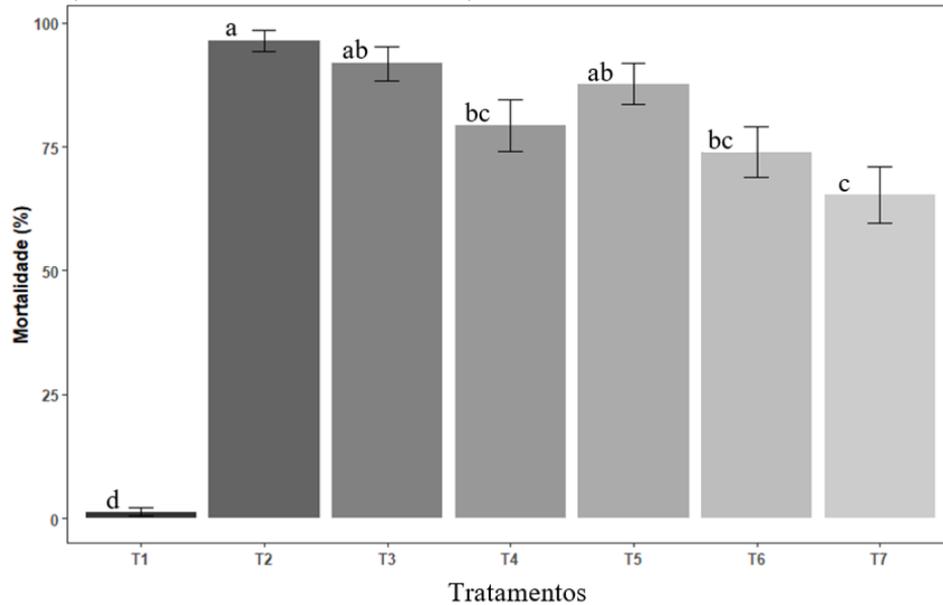
Mortalidade desejada	Tempo (horas) de exposição aos JI	
	<i>H. amazonensis</i>	<i>H. sp. NEPET 11</i>
Mortalidade de 10% (TL <sub>10</sub> )	40,28 ± 2,23	37,92 ± 2,16
Mortalidade de 20% (TL <sub>20</sub> )	50,98 ± 2,18	48,32 ± 2,14
Mortalidade de 30% (TL <sub>30</sub> )	59,63 ± 2,11	56,76 ± 2,08
Mortalidade de 40% (TL <sub>40</sub> )	67,80 ± 2,07	64,77 ± 2,05
Mortalidade de 50% (TL <sub>50</sub> )	76,28 ± 2,08	73,12 ± 2,07
Mortalidade de 60% (TL <sub>60</sub> )	85,82 ± 2,22	82,53 ± 2,21
Mortalidade de 70% (TL <sub>70</sub> )	97,57 ± 2,61	94,18 ± 2,60
Mortalidade de 80% (TL <sub>80</sub> )	114,13 ± 3,51	110,63 ± 3,50
Mortalidade de 90% (TL <sub>90</sub> )	144,46 ± 5,89	140,96 ± 5,89
Mortalidade de 99% (TL <sub>99</sub> )	289,99 ± 23,19	288,563 ± 23,54

#### 5.4 Bioensaio 4: Teste de pulverizações combinadas e individuais de *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e o *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 sobre *Leucoptera coffeella*

Foram contabilizados indivíduos mortos em todos os tratamentos estudados. As maiores mortalidades foram observados nos tratamentos em que os isolados foram aplicados individualmente, e no tratamento (T5) no qual foram pulverizados 500 JI/mL de cada um dos isolados. De maneira geral, as aplicações combinadas foram menos prejudiciais às larvas de *L. coffeella*, demonstrando interações de competição entre os isolados estudados (Figura 11).

A menor mortalidade (65,3%) foi verificada no tratamento (T7) onde foram pulverizados 500 JI/mL de *H. amazonensis* RSC05 e após 12 horas, adicionaram-se 1.500 JI/mL *H. sp. NEPET 11*, e a maior mortalidade (96,3%) no tratamento (T2) onde utilizaram-se 2.000 JI/mL do isolado *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (teste de Tukey 0,05;  $X^2 = 248,10$ , Df= 144,  $p < 0,001$ ).

**Figura 11:** Mortalidade confirmada ( $\pm$  Erro Padrão) de larvas de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) em pulverizações combinadas e individuais de juvenis infectantes de isolados de nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae).



Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas na mortalidade de larvas de *L. coffeella* ocasionada por pulverizações combinadas e individuais dos nematoides entomopatogênicos *Heterorhabditis amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 (Rhabditida: Heterorhabditidae), pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## 6 DISCUSSÃO

Este é um dos primeiros relatos da patogenicidade de nematoides entomopatogênicos sobre larvas de *L. coffeella*, as quais foram suscetíveis aos seis isolados testados. Os isolados *S. carpocapsae*, *S. Feltiae*, *S. Brazilense* e *H. amazonensis* GL, recentemente tiveram a sua virulência comprovada em larvas e pupas de *L. coffeella* (Mendonça, 2021). No entanto, o relato da ação patogênica dos demais isolados estudados, *Heterorhabditis* sp. RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET11 sobre larvas de *L. coffeella* é inédita.

Os bioensaios de patogenicidade são essenciais para selecionar os NEP mais virulentos a cada artrópode (JAMES et al., 2018; LABAUDE e GRIFFIN, 2018; CHERGUI et al., 2019). Assim como observado por Gözel e Kasap (2015), Van Damme et al. (2016) e Ndereyimana et al., (2019), no presente trabalho também foi verificada grande variabilidade entre os graus de virulência de cada isolado.

Mendonça (2021), verificou as maiores taxas de mortalidade de larvas de *L. coffeella* quando submetidas aos isolados *H. amazonensis* GL (79,42%) e *H. amazonensis* MC01 (76,48%), corroborando o que foi obtido no presente estudo, no qual as espécies de *Heterorhabditis* se sobressaíram. Griffin et al. (2005), explicam o sucesso das espécies do gênero *Heterorhabditis* pela presença de “dentes” na região anterior de seu corpo que auxiliam na penetração do corpo do inseto.

Mesmo tratando-se de organismos que vivem no solo, os NEP se mostraram eficientes contra larvas de *L. coffeella* no presente estudo. De acordo com estes resultados, muitos autores já verificaram a eficiência de NEP sobre outras pragas que vivem em habitats crípticos, como nas galerias foliares (BATALLA-CARRERA et al., 2010; GARCIA DEL PINO et al., 2013; HASSANI-KAKHKI et al., 2013; KEPENEKCI et al., 2013; STEYN et al., 2019; NDEREYIMANA et al., 2019; YAN et al., 2020).

Estudando a suscetibilidade de larvas minadoras de *Holoracista capensis* (Lepidoptera: Heliozelidae) a NEP, Steyn et al. (2019), comprovaram a capacidade dos nematoides de penetrar nas galerias foliares e infectar as larvas com altas taxas de mortalidade ocasionadas por *H. baujardi* (92%), *H. noenieputensis* (85%) e *H. indica* (83%).

Neste trabalho, foi verificado no estudo de diferentes concentrações de NEP, que os dois isolados testados apresentaram o mesmo comportamento, pelo qual a mortalidade foi diretamente proporcional ao aumento da concentração até um ponto máximo, a partir do qual o aumento da concentração da suspensão não elevou significativamente as taxas de mortalidade. Resultado semelhante foi observado pelos autores Batalla-Carrera et al. (2010),

Kepenekci et al. (2013), Youssef (2015), Mutegi et al. (2017), Yuksel et al. (2018) e Kajuga et al. (2018), onde houve aumento nas taxas de mortalidade das pragas com o acréscimo de JI nas suspensões.

Youssef (2015), estudou *S. carpocapsae* em três dosagens de 250, 500 e 1000 JI/mL sobre larvas de *T. absoluta*, verificando incremento nas taxas de mortalidade com o aumento da concentração (80, 100 e 100%, respectivamente).

Analisando a patogenicidade de *Heterorhabditis indica* em três instares larvais (3º, 4º e 5º) de *Eudocima materna* (Linnaeus, 1767) (Lepidoptera: Erebididae), Kumar et al. (2022), obtiveram a CL<sub>50</sub> de 14,43; 17,08 e 23,63 JI/larva, e CL<sub>90</sub> de 59,56; 80,44 e 106,52 JI/larva, respectivamente, visualizando variação progressiva da CL<sub>50</sub> para CL<sub>90</sub> conforme o desenvolvimento larval.

Gaugler et al. (1994) elucidaram que para um NEP combater o sistema imunológico do hospedeiro e conseguir levá-lo à morte, é necessário um número mínimo de JI. Além disso, o aumento da concentração da suspensão eleva a chance de mais JI adentrarem o corpo do inseto, liberando mais toxinas e enzimas hidrolíticas secretadas pelas bactérias simbióticas no hemolinfa do hospedeiro, aumentando, conseqüentemente, as taxas de mortalidade (NDEREYIMANA et al., 2019; VAN DAMME et al., 2016). Entretanto, sabe-se que quando a quantidade de JI/inseto é excessiva, podem ocorrer interações não desejáveis, como a competição intra-específica, que acaba reduzindo a eficiência dos NEP (SELVAN et al., 1993). Assim, se torna imprescindível o desenvolvimento de pesquisas para identificar doses ótimas de JI para cada praga alvo, a fim de elevar a eficiência do bioinsumo de forma economicamente viável.

Já se sabe que após a infecção, as células bacterianas liberadas pelos NEP matam o hospedeiro entre 24 e 72h (GÖZEL E KASAP, 2015; VAN DAMME et al., 2016; NDEREYIMANA et al., 2019). No presente trabalho, as mortalidades começaram a ser observadas a partir de 48h, podendo isso se dever ao fato de que as larvas estavam protegidas dentro de suas minas nas folhas de cafeeiro, que num primeiro momento, podem ter funcionado como uma barreira para os JI. O ápice de mortalidade foi atingido entre 96 e 120h, sendo que nesse último, as taxas de mortalidade ultrapassaram 90% para os dois isolados estudados. Os NEP *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11, apresentaram TL<sub>50</sub> bastante similar, em torno de 70h.

Visando selecionar isolados de NEP para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), Ndereyimana et al. (2019) estudaram quatro tempos de

exposição de larvas a NEP (24, 48, 72 e 96h), observando altas taxas de mortalidade logo nas primeiras 24h, alcançando 100% de mortalidade para a maioria dos isolados em 96h.

Houve um aumento significativo do número de pesquisas que estudaram diferentes combinações entre NEP e outros agentes ou táticas de controle, como químicos e biológicos (LACEY et al., 2015). Muitos fungos entomopatogênicos já foram aplicados de forma conjunta com NEP, como por exemplo *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium brunneum*, *Isaria javanica*, *Isaria fumosorosea* e *Beauveria bassiana*, com os quais foram confirmadas interações sinérgicas (ANSARI et al., 2004; ANSARI et al., 2006; ACEVEDO et al., 2007; GOMES, 2021).

Rohde (2007), estudando a eficiência de controle de aplicações combinadas do isolado *S. carpocapsae* e *Heterorhabditis* sp. RSC01 sobre larvas de *C. capitata*, constatou que o isolado *Heterorhabditis* sp. RSC01 reduz a eficiência de *S. carpocapsae*. Esse resultado corrobora os resultados do presente estudo, no qual as aplicações combinadas reduziram as taxas de mortalidade das larvas de *L. coffeella*.

Em aplicações isoladas, os NEP *Heterorhabditis* RSC05 (91,8%) e *Heterorhabditis* sp. NEPET11 (96,3%) causaram elevadas taxas de mortalidade, e em aplicações conjuntas a mortalidade das larvas variou entre 65,3% e 87,6%. Assim, foi observada competição entre os isolados em questão. Já foi estudada a interação entre os isolados *S. carpocapsae* e *H. bacteriophora*, na qual os autores verificaram que *S. carpocapsae* infectou e se reproduziu com mais sucesso que *H. bacteriophora* (ALATORRE-ROSAS e KAYA, 1991).

O isolado *S. carpocapsae* também já foi testado de forma conjunta com *S. glaseri*, porém neste caso a produção de JI foi comprometida (KONDO, 1989). Essas interações negativas, com redução da eficiência de controle em aplicações combinadas de diferentes de nematóides podem ocorrer, principalmente devido à competição dentro do hospedeiro. Esta competição também pode ocorrer entre as bactérias que vivem no intestino dos nematóides (ALATORRE-ROSAS e KAYA, 1991). Segundo Boemare (2002), as bactérias simbióticas ao gênero *Steinernema* (*Xenorhabdus*) produzem bacteriocinas letais para as bactérias associadas ao gênero *Heterorhabditis* (*Photorhabdus*), o que diminui a eficiência dos isolados de *Heterorhabditis* no caso de aplicações combinadas com *Steinernema*.

Devido à dificuldade de se controlar *L. coffeella*, aos vários casos de resistência a inseticidas sintéticos e aos resultados promissores encontrados nesse trabalho, os NEP tornam-se potenciais agentes de controle do BMC. Contudo, estudos adicionais são necessários para determinar a eficácia dos NEP sobre outras fases de desenvolvimento de *L. coffeella*, verificar

interações com inimigos naturais e definir estratégias de aplicação em campo, buscando adicionar os NEP no manejo integrado desta importante praga.

## 7 CONCLUSÕES

Todas as espécies e isolados de nematoides entomopatogênicos testados são patogênicas às larvas de *L. coffeella*.

A mortalidade das larvas de *L. coffeella* é diretamente proporcional ao aumento da concentração dos NEP *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11.

O aumento do tempo de exposição das larvas de *L. coffeella* provocou aumento na mortalidade ocasionada pelos dois isolados.

A interação entre os NEP *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 é antagônica.

A aplicação conjunta de *H. amazonensis* RSC05 e *Heterorhabditis* sp. NEPET 11 reduz as taxas de mortalidade de larvas de *L. coffeella*.

## 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.04.003>
- AGUDELO, E. J. G. Avaliação de nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae e Heterorhabditidae) e interação com o predador *Macrolophus basicornis* (Stål) (Hemiptera: Miridae) no manejo integrado de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em cultivos de tomate. Tese apresentada a UFLA para obtenção do título de doutor. Lavras – MG, 2014.
- AKHURST, R. J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families heterorhabditidae and steinernematidae. *Journal of General Microbiology*, v. 128, n. 12, p. 3061–3065, 1982. doi: 10.1099/00221287-128-12-3061.
- ALATORRE-ROSAS, R.; KAYA, H. K. Interactions between two entomopathogenic nematode species in the same host. *Journal Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 57, p. 1-6, Jan. 1991.
- ALMEIDA, J. D.; MOTTA I. O.; VIDAL, L. A.; BÍLIO, J. V. F.; PUPE J. M.; VEIGA, A. D.; CARVALHO, C. H. S.; LOPES, R. B.; ROCHA, T. L.; SILVA, L. P.; PUJOL-LUZ, J. R.; ALBUQUERQUE, E. V. S. Bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*): uma revisão sobre o inseto e perspectivas para o manejo da praga. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF 2020. 1ª edição, ISSN 0102-0110.
- ALVES, S. B., A. MOINO JR.; ALMEIDA J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (ed). *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª. ed. FEALQ, Piracicaba, p. 217-238. 1998.
- ANSARI, M. A., TIRRY, L.; MOENS, M. Interaction between *Metarhizium anisopliae* CLO 53 and entomopathogenic nematodes for the control of *Hoplia philanthus*. *Biological Control*, v. 31, n. 2, p. 172-180, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.04.002>
- ANSARI, MA; SHAH, FA; TIRRY L.; MOENS, M. Ensaios de campo contra *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) com uma combinação de um nemátodo entomopatogênico e o fungo *Metarhizium anisopliae* CLO 53. *Biological Control*, v. 39, n. 3, pág. 453-459, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.07.004>
- BADII, K. B.; BILLAH, M. K.; AFREH NUAMAH, K.; OBENG OFORI, D.; NYARKO, G. Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. *African Journal of Agricultural Research*, v. 10, n. 12, p. 1488–1498, 2015. doi: 10.5897/ajar2014.9278.

BATALLA-CARRERA, L.; MORTON, A.; GARCÍA-DEL-PINO, F. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. *BioControl* 55, 523–530 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10526-010-9284-z>

BAUR, M.; KAYA, H.; THURSTON, G. Factors affecting entomopathogenic nematode infection of *Plutella xylostella* on a leaf surface. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, Dordrecht, v. 77, n. 3, p. 239-250, 1995.

BEGLEY, J. W. Efficacy against insects in habitats other than the soil. In: GAUGLER, R.; KAYA, H.K. (Ed.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.215-231.

BOEMARE, N. Biology, taxonomy and systematic of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: GAUGLER, R. *Entomopathogenic nematology*, Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 35-56.

BOX, H. E. The Bionomics of the White Coffee-Leaf Miner, *Leucoptera coffeella*, Guér., in Kenya Colony. (Lepidoptera, Lyonetidae). *Touro. Entomol. Res.* 14, 133-145. 1923.

CARVALHO, G. A.; MIRANDA, J. C.; VILELA, F. Z.; MOURA, A. P.; MORAES, J. C. “Impacto de inseticidas sobre vespas predadoras e parasitoides e sua eficiência no controle de *Leucoptera Coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)”. Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil - 2004.

CHERGUI, S.; BENZEHRA, A.; BOUDJEMAA, K.; BARKOU, H.; KARACA, I. Efficacy of Turkish isolate of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in controlling the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, v. 29, n. 60, 2019. doi: 10.1186/s41938-019-0162-4.

CONAB, et al. Brasil - Boletim da safra brasileira de café. Disponível em: [http://www.consorcioesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2022/setembro/3\\_levantamento\\_safra\\_conab.pdf](http://www.consorcioesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2022/setembro/3_levantamento_safra_conab.pdf). Terceiro levantamento, setembro - 2022. Acesso em: 27 out. 2022.

CONCEIÇÃO, C. H. C. Biologia, dano e controle do bicho-mineiro em cultivares de café arábica. Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto Agronômico de Campinas, IAC. Campinas-SP, 2005.

CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ. Faturamento das lavouras dos Cafés do Brasil totaliza R\$ 62 bilhões em 2022/ Exportações dos cafés diferenciados representam 18% do volume físico total vendido pelo País ao exterior em oito meses. Disponível em: <https://www.consorcioesquisacafe.com.br/index.php/imprensa/noticias>. Acesso em: 27 out. 2022.

COSTA, J. N. M.; TEIXEIRA, C. A. D.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; ROCHA, R. B.; FERNANDES, C. F. Informações para facilitar a identificação das diferentes fases do bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) em campo. p 4. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2012.

DANTAS, J.; MOTTA, I. O.; VIDAL, L. A.; NASCIMENTO, E. F. M. B.; BÍLIO, J.; PUPE, J. M.; VEIGA, A.; CARVALHO, C.; LOPES, R. B.; ROCHA, T. L.; SILVA, L. P.; PUJOL-LUZ, J. R.; ALBUQUERQUE, É. V. S. A Comprehensive Review of the Coffee Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae)—A Major Pest for the Coffee Crop in Brazil and Others Neotropical Countries. *Insetos* 2021, 12, 1130. DOI: 10.3390/insects12121130.

DAVID-RUEDA, G.; CONSTANTINO, C. L. M.; MONTOYA, E. C.; ORTEGA, M. O. E.; GIL, Z. N.; BENAVIDES-MACHADO, P. Diagnóstico de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) y sus parasitoides en el departamento de Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, v. 42, p. 4-11, 2016.

DOLINSKI, C. M. Controle Biológico de Pragas da Agricultura. Capítulo 9: Controle de artrópodes-praga com nematoides entomopatogênicos. P 275-286. Embrapa, Brasília – DF, 2020.

DOLINSKI, C. M.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L. G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. *Nematoda*, v. 4, 2017. DOI: 10.4322/nematoda.01017.

DOLINSKI, C.; LACEY, L. A. Microbial control of arthropod pests of tropical tree fruits. *Neotropical Entomology*, v. 36, n. 2, p. 161–179, 2007. DOI: 10.1590/S1519-566X2007000200001.

DRAGANOVA, S. A.; TOMOV; R. I. Virulence of a strain *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hyphomycetes, Deuteromycotina) against larvae of *Leucoptera malifoliella* (Costa) (Lepidoptera, Lyonetiidae). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v. 4, p. 435-439, 1998.

DUTKY, S. R.; THOMPSON, J. V.; CANTWE, G. E. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology*, San Diego, v. 6, n. 4, p. 417-422, 1964.

ECOLE, C. C.; SILVA, R. A.; LOUZADA, J. N. C.; MORAES, J. C.; BARBOSA, L. R.; AMBROGI, B. G. Predation of eggs, and larvae, and pupae of coffee leaf miner *Leucoptera Coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) By *Chrysoperla Externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae). 2002.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Faturamento bruto da cafeicultura de Minas Gerais foi estimado em R\$ 34 bilhões e equivale a 54% do total das lavouras dos Cafés do Brasil em 2022. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/71507628/faturamento-bruto-da-cafeicultura-de-minas-gerais-foi-estimado-em-r-34-bilhoes-e-equivale-a-54-do-total-das-lavouras-dos-cafes-do-brasil-em-2022>. Acesso em: 27 out. 2022.

EMBRAPA, et al. Brasil - maior produtor mundial de café - exporta 35,15 milhões de sacas com média mensal de 2,92 milhões de sacas em 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/41551077/brasil---maior-produtor-mundial-de-cafe---exporta-3515-milhoes-de-sacas-com-media-mensal-de-292-milhoes-de-sacas-em-2018>. Acesso em: 27 out. 2022.

FERNANDES, F. L. Ecology of Vespidae (Hymenoptera) predators in *Coffea arabica* plantations. *Sociobiology*, v. 59, n. 4, p. 1269-1280, 2012. DOI: 10.13102/sociobiology.v59i4.504.

FIGUEIREDO, G. P.; DAMI, B. G.; SOUZA, J. M. R.; PAULA, W. B. S. P.; CABRAL, E. O.; RODRIGUEZ-SAONA, C.; VACARI, A. M. Releases of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) eggs for the control of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Arthropod Management Tests*, Volume 46, Edição 1, 2021. DOI: 10.1093/amt/tsab148.

FONTES, E. M. G. PIRES, C. S. S. SUJII, E. R. Controle Biológico de Pragas da Agricultura. Capítulo 1: Estratégias de uso e histórico. P. 21 - 40. Embrapa, Brasília-DF, 2020.

FRANZIN, M. L. Potential of metarhizium from soils and rhizosphere of diversified coffee systems in insect suppression and its indirect effect on a coffee pest through endophytic association. Tese apresentada a UFV para obtenção do título de doutor. Viçosa – MG, 2021.

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. DOI: 10.0000/RTCAB.V6I3.900.

GALLO, D. (in memoriam); NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. *Entomologia Agrícola*. Capítulo 10: Métodos de controle biológico. P 282 – 287. ISBN: 85-7133-011-5. Volume 10. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GALLO, D. O.; NAKANO, S. S.; NETO, RPL; CARVALHO, GC; BATISTA, EB; FILHO, JRP; PARÁ, RA; ABOBRINHA, SB; ALVES, JD Vendramim Manual de Entomologia Agrícola; Ceres Agronômica: Ouro Fino, Brasil, 1988; pág. 649.

GARCIA-DEL-PINO, F. D. O; ALABERN, X.; MORTON, A. Efficacy of soil treatments of entomopathogenic nematodes against the larvae, pupae and adults of *Tuta absoluta* and their interaction with the insecticides used against this insect. *Biocontrol* 58 (6), 723-731. 2013.

GAUGLER, R.; CAMPBELL, J. Behaviour response to the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* to oxamyl. *Annals of Applied Biology*, v. 119, p. 131-138, 1991.

GAUGLER, R.; WANG, Y.; CAMPBELL, J. F. Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae: defences against entomopathogenic nematode attack. *Journal of Invertebrate Pathology*, San Diego, v. 64, n. 3, p. 193-199, Nov. 1994.

GHINI, R.; HAMADA, E.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; MARENGO, J. A.; GONÇALVES, R. R. do V. Risk analysis oclimate change on coffee nematodes and leaf miner in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, p. 187- 194, 2008.

GOMES, M. D. F. Eficácia de fungos e nematoides entomopatogênicos testados isoladamente ou em combinação para controle de *Rhizoglyphus microplus*: do laboratório para o campo.

Tese apresentada a UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS para obtenção do título de doutor, 2021.

GONZALES, M. et al. Susceptibility of *Mocis latipes* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Heterorhabditis bacteriophora* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Journal of Economic Entomology*, Lanham, v. 93, n. 4, p. 1105-1108, Apr. 2000.

GÖZEL, Ç.; KASAP, I. Efficacy of entomopathogenic nematodes against the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in tomato field. *Turk Entomol Derg* 39 (3):229–237, 2015.

GREEN, G. A proposed origin of the coffee leaf-miner, *Leucoptera coffeella* (Guerin-Meneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Bulletin of the ESA, Entomol. Soc. Sou.* 30, 30-31. 1984.

GRIFFIN, C.; BOEMARE, N.; LEWIS, E. E. Biology and behaviour. In: Greval, P., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D (Eds.), *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, Reino Unido, pp 47-64, 2005.

GUEDES, R. N. C.; WALSE, S. S.; THRONE, J. E. Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. *Current opinion in insect science*, v. 21, p. 47-53, 2017.

GUÉRIN-MÉNEVILLE, F.-É.; PERROTTET, S. Mémoire sur un Insecte et un Champignon qui Ravagent les Cafiers aux Antilles; Bouchard-Huzard: Paris, França, págs. 6–30. 1842.

GUERREIRO FILHO, O. Coffee leaf miner resistance. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 18, n. 1, p. 109-117, 2006.

HASSANI, K.; KARIMI, J.; HOSSEINI, M. Efficacy of entomopathogenic nematodes against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology*, Oxford, v. 23, n. 2, p. 146-159, Oct. 2013.

IBARRA, R. T. L. B. Monitoring of *Leucoptera coffeella* with sexual pheromone traps. 101 f. Tese (Doutorado em Ciência Entomológica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2006.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO. Promoção e desenvolvimento de Mercado/ Sustentabilidade. London: ICO, 2022. Disponível em: <https://www.ico.org/>. Acesso em: 27 out. 2022.

JAMES, M.; MALAN, A. P.; ADDISON, P. Surveying and screening South African entomopathogenic nematodes for the control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). *Crop Protection*, v. 105, p. 41–48, 2018. DOI: 10.1016/J.CROPRO.2017.11.00

JARAMILLO, J.; MUCHUGU, E.; VEGA, F. E.; DAVIS, A.; BORGEMEISTER, C.; CHABI-OLAYE. Some like it hot: the influence and implications of climate change on coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee production in East Africa. *PloS One*, v. 6, n. 9, e24528, 2011.

KAJUGA, J.; HATEGEKIMANA, A.; YAN, X.; WAWERU B. W.; LI, H.; LI, K. Management of white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) with entomopathogenic nematodes in Rwanda. *Egypt J Biol Pest Co* 28(1):2, 2018.

KATIYAR, K. P.; FERRER, F. Technique biology and sterelization of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* Guér (lepidoptera-lyonetiidae). Viena: Internacional Atomic Energy, IAEA, 1968. p.165-175.

KEPENEKCI, I., TÜLEK, A., ALKAN, M., SELÇUK HAZIR. Biological control potential of native entomopathogenic nematodes against the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Turkey. *Pakistan J. Zool.* 45 (5), 14151422. 2013.

KONDO, E. Studies on the infectivity and propagation of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp. (Rhabdititida: Steinernematidae) in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin on the Faculty of Agriculture, Saga University, Saga*, v. 67, n. 1, p. 1-87, 1989.

KUMAR, K. K.; GEORGE, A.; BEHERE, G. T. Pathogenicity of *Heterorhabditis indica* against developmental stages of *Eudocima materna* L. (Lepidoptera, Erebidae). *Egypt J Biol Pest Control* 32, 65 (2022). DOI: 10.1186/s41938-022-00563-1

LABAUDE, S.; GRIFFIN, C. T. Transmission success of entomopathogenic nematodes used in pest control. *Insects*, v. 9, n. 2, 2018. DOI: 10.3390/insects9020072.

LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 132, p. 1–41, 2015. DOI: 10.1016/J.JIP.2015.07.009.

LEITE, S. A.; GUEDES, R. N. C.; SANTOS, M. P. D.; COSTA, D. R. D.; MOREIRA, A. A.; MATSUMOTO, S. N.; CASTELLANI, M. A. Profile of coffee crops and management of the Neotropical coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella*. *Sustainability*, v. 12, n. 19, p. 8011, 2020.

LIMA, E. R. de. Feromônio sexual do bicho-mineiro do café, *Leucoptera coffeella*: avaliação para uso em programas de manejo integrado. 71 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, MG. 2001.

LOMELI-FLORES, J. R.; BARRERA, J. F.; BERNAL, J. S. Impact of natural enemies on coffee leafminer *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) population dynamics in Chiapas, Mexico. *Biological Control*, v. 51, n. 1, p. 51-60, 2009.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários). 2022. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 15 out 2022.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R.; SILVA, M. B. da; FERREIRA, I. B.; CAR-VALHO, C. H. S. Siriema AS1, cultivar de cafeeiro com resistência à ferrugem e ao bicho-mineiro. UFV, 2014.

MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R.; SILVA, M. B. da; FERREIRA, I. B.; CARVALHO, C. H. S. de. Siriema VC 4, cultivar clonal de cafeeiros com resistência múltipla, à ferrugem e ao bicho-mineiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 41., 2015,

Poços de Caldas. Com mais tecnologia, o melhor café se aprecia: trabalhos apresentados. Varginha: Fundação Procafé, 2015.

MEDINA FILHO, H. P.; CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C. Melhoramento do cafeeiro: XXXVII—Observações sobre a resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro. *Bragantia*, 36, 131-137. 1977.

MENDONÇA, T. F.N. Controle de bicho-mineiro com nematoides entomopatogênicos e uso de imagens para detecção de minas. Dissertação apresentada a UFU, para obtenção do título de Mestrado. Monte Carmelo –MG, 2021.

MEY, W. Taxonomische bearbeitung der westpaläarktischen arten der gattung leucoptera hübner, '1825', s. 1. (Lepidoptera, Lyonetiidae) Taxonomic revision of the westpalaeartic species of the genus *Leucoptera* Hübner, "1825", s. I. (Lepidoptera, Lyonetiidae). *Deutsche entomologische Zeitschrift*. 41, 173-234. 1994.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. *Journal of Statistical Software*, v. 81, n. 10, 2017. DOI: 10.18637/jss.v081.i10.

MOTTA, I. O.; DANTAS, J.; VIDAL, L.; BÍLIO, J.; PUJOL-LUZ, J. R.; ALBUQUERQUE, É. V. The coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae): identification of the larval instars and description of male and female genitalia. *Revista Brasileira de Entomologia*, 65. 2021.

MŘÁČEK, Z.; SPITZER, K. Interaction of the predators and parasitoids of the sawfly, *Cephalcia abietis* (Pamphilidae: Hymenoptera) with its nematode *Steinernema kraussei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 42, n. 3, p. 397–399, 1983. DOI: 10.1016/0022-2011(83)90181-7.

MUTEGI, D. M.; KILALO, D.; KIMENJU, J. W.; WATURU, C.; DAVID M. Pathogenicity of selected native entomopathogenic nematodes against tomato leaf miner (*Tuta absoluta*) in Kenya. *World Journal of Agricultural Research*, v. 5, n. 4, p. 233-9, 2017.

NANTES, J.F.D.; PARRA, J.R.P. Influência de alimentação sobre a biologia *Periluoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera-Lyonetiidae). *Cientifica*, Jaboticabal, v.6, n.2, p.263-268, 1978.

NDEREYIMANA, A.; NYALALA, S.; MURERWA, P.; GAIDASHOVA, S. Potential of entomopathogenic nematode isolates from Rwanda to control the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control* 29 (57), 1-7. 2019.

NIELSEN, C. D. of. The insects of Australia: a textbook for students and research workers. Carlton, VIC: Melbourne Univ. Press, 1991.

NOTLEY, F. B. The *Leucoptera* leaf miners of coffee on Kilimanjaro; *Leucoptera coffeella*, Guér. *Bulletin of Entomological Research*, v. 39, n. 3, p. 399- 416,1948.

PARRA, J. R. P. e REIS, P. R. Manejo integrado para as principais pragas da cafeicultura, no Brasil. *Controle e fitossanidade. Visão agrícola* N° 12, janeiro/julho 2013.

- PARRA, J. R. P. Raising insect for studies of pathogens. In: ALVES, S. B. (Ed.). Microbial control of insects. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 1015-1037.
- PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico: Terminologia. In: PARRA, J. R. P. (Ed.). Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Manole. 2002. p. 1–16.
- PARRA, J. R. P.; GONÇALVES, W.; GRAVENA, S.; MARCONATO, A. R. Parasitos e predadores do bicho-mineiro do cafeeiro *Peri Leucoptera coffeella* (Guérin-Ménéville, 1842) em São Paulo. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 6, p. 138-143, 1977.
- PAULINI, A. E.; FERREIRA, A. J.; D' ANTONIO, A. M.; MATIELLO, J. B. Efeito da desfolha causada por bicho-mineiro – *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mén., 1842) na produtividade do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5, 1977, Guarapari. Resumos. Rio de Janeiro: IBC – CERCA. P. 146-147. 1977.
- PEREIRA, E. J. G.; PICANÇO, M. C.; BACCI, L.; LÚCIA, T. M. C. D.; SILVA, É. M.; FERNANDES, F. L. "Natural mortality factors of *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) on *Coffea arabica*". Biocontrol Science and Technology. V. 17, 441-455. 2007.
- PERTHUIS, B.; PRADON, J.; MONTAGNON, C.; DUFOUR, M.; LEROY, T. Resistência estável contra o mineiro *Leucoptera coffeella* expresso por *Coffea Canephora* geneticamente transformado em um experimento de campo plurianual na Guiana Francesa. Euphytica 144, 321-329. 2005.
- PICANÇO, M. C.; OLIVEIRA, I. R. de; FERNANDES, F. L.; MARTINEZ, H. E. P.; BACCI, L.; SILVA, E. M. da. Ecology of Vespidae (Hymenoptera) Predators in *coffea arabica* plantations. Sociobiology, v. 59, p. 1269-1280, 2012.
- PRADO, R. R. Responsabilidade ambiental nas pequenas propriedades certificadas pelo programa certifica minas café. Dissertação de mestrado apresentada a UNIFENAS. Alfenas-MG, 2018.
- R CORE TEAM. R: A language and Environment for Statistical Computing. 2019.
- ROHDE, C. Avaliação de nematóides entomopatogênicos (rhabditida) para o controle da mosca-dasfrutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Dissertação de mestrado apresentada a UFLA. Lavras - MG, 2007.
- SABINO, P. H. S.; NEGRISOLI, A. S.; ANDALÓ, V.; FILGUEIRAS, C. C.; MOINO, A. JR.; SALES, F. S. Combined Application of Entomopathogenic Nematodes and Insecticides in the Control of Leaf-Miner *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on Tomato. Epub 2018, Nov 7. PMID: 30406599. DOI: 10.1007/s13744-018-0643-2
- SEARLE, S. R.; SPEED, F. M.; MILLIKEN, G. A. Population Marginal Means in the Linear Model: An Alternative to Least Squares Means. The American Statistician, v. 34, n. 4, p. 216–221, 1980. DOI: 10.1080/00031305.1980.10483031.
- SELVAN, S.; CAMPBELL, J.F.; GAUGLER, R. Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. Journal of Invertebrate Pathology, San Diego, v. 62, n. 3, p. 278-284, Nov. 1993.

SILVA, B. K. R.; FERNANDES, F. L.; EUGÊNIO, J. L.; SAIRRE, L. A. P.; SILVA, M. M. J.; MACEDO, A. F.; OLIVEIRA, M. M. F.; SILVA, R. M.; ROCHA, E. A. A.; OLIVEIRA, I. S. Agroecologia: Métodos e técnicas para uma agricultura sustentável - Volume 5. Capítulo 16: Liberação de chrysoperla spp. para o controle de *leucoptera coffeella* no café *coffea arabica* L. e influência na qualidade da bebida. P. 206-208. DOI: 10.37885/210605056, 2021.

SILVA, R. A.; SOUZA, J. C.; MATOS, C. S. M.; PEREIRA, A. B. Bicho-Mineiro-do-Cafeeiro. EPAMIG Sul, Lavras – MG. Fev, 2019.

SILVESTRI, F. Compendio di Entomologica Applicata (Agraria, Forestale, Medica, Veterinaria) ; Bellavista: Portici, Itália. pág. 512. 1943.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. O. “Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado”. 2º edição revista aumentada, reimpressão. Uma publicação da Empresa De Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais- EPAMIG. Boletim técnico. Nº 54. ISSN 0101-062X. maio 1998, Belo Horizonte.

STEYN, L.A.I., ADDISON, P., MALAN, A.P. Potential of South African entomopathogenic nematodes to control the leaf miner, *Holocacista capensis* (Lepidoptera: Heliozelidae). S. Afr. J. Enol. Vitic. 40 (2), 1-9. 2019.

TAVARES, F. M.; FILHO, A. B.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, A. C.; AMBRÓS, C. M. G. Efeito de *Heterorhabditis indica* e *Steinernema* sp. (Nemata: Rhabditida) sobre Larvas do Bicudo da Cana-de-Açúcar, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), em Laboratório e Casa-de-Vegetação. Nematologia Brasileira Piracicaba (SP) Brasil, 2007.

TIMPRASERT, S.; DATTA, A.; RANAMUKHAARACHCHI, S. L. Factors determining adoption of integrated pest management by vegetable growers in Nakhon Ratchasima Province, Thailand. Crop protection, v. 62, p. 32-39, 2014. DOI: 10.1016/j.cropro.2014.04.008.

TRDAN, S. Insecticides Resistance. BoD–Books on Demand. InTech: Rijeka, Croácia. págs. 4–13. 2016.

VAN DAMME, V.M., BECK, B.K.E.G., BERCKMOES, E., MOERKENS, R., WITTEMANS, L., DE VIS, R., ET AL. Efficacy of entomopathogenic nematodes against larvae of *Tuta absoluta* in the laboratory. Pest Manag. Sci. 72 (9), 1702-1709. 2016. DOI: 10.1002/ps.4195.

VIEIRA, F. P.; FERNANDES, F. L.; GENTIL, F. H.; SILVA, L. O. D.; DINIZ, J. F. S.; ALVES, F. M. Histórico Da Aplicação De Inseticidas Para Controle De Pragas No Alto Paranaíba Visando Estudos De Resistência De *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae). VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Agosto de 2011 - Araxá – MG.

VILARINHO, C. O. Nematoides entomopatogênicos e bacillus spp. no controle de bicho-mineiro em condições de laboratório. Trabalho de Conclusão apresentado a UFU para a obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo. Monte Carmelo –MG 2020.

VILLACORTA, A. Ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolate, CM-14 on the coffee leaf miner. *Perileucoptera coffeella* (Lep.: Lyonetiidae). Entomophaga, v. 28, n. 2, p. 179-184, 1983.

WHITE, G. F. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, Washington, v. 66, n.1, p. 302-303, Sept. 1927.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematidae and heterorhabditidae nematodes: handbook of biology and techniques. Arkansas: Agricultural Experimental Station, 1998.

YAN, J., SARKAR, S.C., MENG, R., REITZ, S., GAO, Y. Potential of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) as a biological control agent against potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Integr. Agr.* 19 (2), 389-393. 2020.

YOUSSEF, N. A. Eficácia de nematóides e fungos entomopatogênicos no controle da bicho-mineiro, *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). *Jornal de Ciências Agrícolas das Universidades Árabes* , v. 23, n. 2, pág. 591-598, 2015.

YUKSEL, E., TASKESEN, Y.E., ERARSLAN, D. Effectiveness of different entomopathogenic nematode species against the variegated cutworm, *Peridroma saucia* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egypt J Biol Pest Control* 28, 8 (2018). DOI: 10.1186/s41938-017-0019-7.