

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CECÍLIA OLIVEIRA VILARINHO

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E *Bacillus* spp. NO CONTROLE DE
BICHO-MINEIRO EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Monte Carmelo - MG
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CECÍLIA OLIVEIRA VILARINHO

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E *Bacillus* spp. NO CONTROLE DE
BICHO-MINEIRO EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Andaló
Mendes de Carvalho

Monte Carmelo - MG
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CECÍLIA OLIVEIRA VILARINHO

NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E *Bacillus* spp. NO CONTROLE DE
BICHO-MINEIRO EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO

Trabalho de Conclusão apresentado ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, como requisito necessário para a obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Banca Examinadora

Profª. Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho
(Orientadora)

Profª. Dra. Gleice Aparecida de Assis

Dr. Lucas Silva de Faria

Monte Carmelo
2020

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO	7
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Cultura do cafeeiro	7
3.2 <i>Leucoptera coffeella</i>	9
3.3 Nematoides entomopatogênicos	11
3.4 <i>Bacillus</i> spp.	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Caracterização da área	13
4.2 Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos.....	14
4.3 Seleção de isolados de <i>Bacillus</i> spp.	14
4.4 Ajuste da concentração de <i>Bacillus</i> spp.	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos.....	16
5.2 Seleção de isolados de <i>Bacillus</i> spp.	17
5.3 Ajuste da concentração de <i>Bacillus</i> spp.	18
6 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

RESUMO

O bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella*, destaca-se como uma das principais pragas da cultura do cafeeiro, pois se alimenta do parênquima paliçádico, diminuindo a capacidade fotossintética da planta e reduzindo a produção. Com a crescente ocorrência da praga e seu elevado potencial de dano nas áreas cafeeicultoras, o controle biológico tem se mostrado uma excelente opção para o controle desse inseto, visto que a utilização de produtos fitossanitários químicos não tem apresentado resultado satisfatório. Objetivou-se avaliar a patogenicidade e virulência de nematoides entomopatogênicos e *Bacillus* spp. no controle de lagartas de *L. coffeella*. Para isso, foi realizada a seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos e de isolados de *Bacillus* spp. Posteriormente, realizou-se o ajuste de concentração de aplicação de *Bacillus* spp. Os isolados *Bacillus subtilis* 202 e *Bacillus thuringiensis* 22 foram os que apresentaram maior virulência a *L. coffeella*, sendo a concentração de 1×10^9 UFC a que causou mortalidade de lagartas. Os isolados *Heterorhabditis amazonensis* GL e o *Steinernema feltiae* causaram maior mortalidade de lagartas aos três dias de avaliação. Desta forma, vislumbra-se o potencial do uso de nematoides entomopatogênicos e *Bacillus* spp. no controle de *L. coffeella*, sendo necessária a realização de testes para verificar a ação dos entomopatógenos em condições de campo.

Palavras-chave: bactéria entomopatogênica, controle biológico, Heterorhabditidae, *Leucoptera coffeella*, Steinernematidae.

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma planta caracterizada como perene, de clima tropical, da família Rubiaceae (MATTIELO et al., 2010), tendo sua origem no continente africano, das partes altas da Etiópia. Foi introduzido no Brasil na região Norte, e posteriormente seu plantio foi realizado em diversas partes do país, tendo se adaptado bem às condições climáticas favoráveis ao cultivo (ALMEIDA et al., 2018). A cafeicultura nacional é responsável por movimentar boa parte da economia e parte da riqueza do país, tendo forte influência no desenvolvimento econômico e social (PRADO et al., 2017).

No Brasil, o bicho-mineiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet) (Lepidoptera: Lyonetiidae), destaca-se como uma das principais pragas da cultura do cafeeiro, sendo classificada como praga-chave, em função de sua ocorrência frequente associada a prejuízos econômicos. É um inseto monófago, no qual a lagarta é o estágio que causa maior dano à cultura, pois se alimenta do parênquima paliçádico foliar causando lesões de coloração marrom na folha do cafeeiro, oriundas da necrose no limbo foliar, assim, diminui a capacidade fotossintética da planta ocasionando a queda das folhas, o que acarreta redução na produção (SOUZA et al., 1998).

Devido aos danos causados pelo ataque desse inseto e a dificuldade de controle nos períodos de maior infestação, principalmente nos períodos de seca, o controle químico é o método mais utilizado, com pulverização de fosforados, carbamatos e alguns piretroides, entretanto, esses compostos não têm apresentando resultado positivos no controle da lagarta do bicho-mineiro (EMBRAPA, 2002).

Visando o uso do manejo integrado de pragas na cultura do cafeeiro, o controle biológico é uma alternativa potencial para o controle do bicho-mineiro. Dentre os inimigos naturais destacam-se as vespas predadoras presentes principalmente nos cafezais adensados, atraídas pelo fácil acesso ao nectário extrafloral, néctar e pólen para sua alimentação. Destaca-se também a presença de espécies de inimigos naturais pertencentes à família Chrysopidae, que apresenta uma relevância como reguladores populacionais de várias pragas nessa cultura, sendo a espécie *Chrysoperla externa* (Hagen) predadora de várias espécies de insetos e ácaros na Região Neotropical, ocorrendo em culturas como o cafeeiro (CARVALHO; SOUZA, 2000; CARVALHO et al., 2013; FONSECA et al., 2001).

No entanto, a presença desses insetos no campo nem sempre garante que a praga permaneça com populações abaixo do nível de dano econômico, sendo a preservação e o aumento das taxas de controle biológico estratégias essenciais para o sucesso de programas de MIP, sobretudo o uso de inseticidas seletivos a inimigos naturais contribui para o aumento do intervalo de aplicações, diminuindo o reaparecimento da praga na lavoura, impedindo assim as pragas de adquirirem resistência aos inseticidas. Assim, o uso de outros agentes de controle como bactérias e nematoides entomopatogênicos podem auxiliar no controle do bicho-mineiro (ALBUQUERQUE et al., 2003; CARVALHO et al., 2013).

O uso dos nematoides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) tem se mostrado cada vez mais útil no controle de insetos-praga, principalmente os pertencentes às famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae. Os nematoides têm sido estudados para o emprego comercial, devido sua produção em larga escala, rápida multiplicação e pelo alto índice de eficácia no controle de insetos. As espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis* estão associadas de maneira mutualística às bactérias dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, respectivamente, que causam a morte do inseto hospedeiro em aproximadamente 48 h. A produção in vivo é a principal fonte de estudos básicos com NEPs, já que é utilizada no isolamento de espécies produção em pequena escala para trabalhos em laboratório, casa-de-vegetação (ALVES et al., 2009; MOLINA et al., 2004).

A diversidade de microrganismos e suas relações antagônicas têm se mostrado excelentes ferramentas para o controle biológico, tal como quando utilizadas bactérias no controle de pragas, tendo maior destaque para as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Streptomyces*. No entanto, as bactérias do gênero *Bacillus* spp. destacam-se pela multiplicidade dos mecanismos antagônicos causados pela formação do endósporo, possibilitando grande versatilidade no mecanismo de ação driblando os mecanismos de defesa (FILHO et al., 2010)

Contudo, devido ao controle químico se mostrar desvantajoso, de alto custo e causar poluição ambiental, o uso de produtos biológicos a base da bactéria *Bacillus* spp. se mostra fundamental, pois não causam danos ambientais, além de apresentarem baixo custo, sendo uma alternativa viável no controle do bicho-mineiro, fitonematoides e demais pragas de culturas agrícolas. Contudo, grande parte dos microrganismos envolvidos em controle biológico atua através de antibiose e diversas espécies de *Bacillus* são citadas como produtoras de antibióticos podendo secretar metabólitos

comercialmente importantes como enzimas aminolíticas e enzimas proteolíticas que podem ter ação inseticida (BETTIOL; GHINI, 1995; REMUSKA et al., 2007).

2 OBJETIVO

Verificar a eficácia do uso de nematoides entomopatogênicos e *Bacillus* spp. no controle de lagartas do bicho-mineiro em condições de laboratório.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultura do cafeeiro

A cultura do cafeeiro no Brasil apresenta alta relevância devido ao seu aspecto histórico/cultural, além da sua capacidade produtiva e de exportação, sobretudo pela diversidade na qualidade de seus grãos e produtos finais e também a relevância econômica da cultura para diversos municípios brasileiros (BRASIL, 2016).

O cafeeiro é classificado como um arbusto podendo atingir altura de 5 metros, além de apresentar crescimento contínuo e dimorfismo nos ramos, folhas simples, persistentes ou verticiladas, com estípulas interpecioladas, pequenas, largas com filotaxia oposta. É uma planta perene, pertencente à família Rubiaceae, gênero *Coffea*, dicotiledônea, grupo fanerógama, angiosperma (OLIVEIRA et al., 2012; MORAIS, 2011; BRASIL, 2016.)

Dentro do gênero *Coffea*, duas espécies são cultivadas comercialmente: *C. arabica* e *C. canephora*. O cafeeiro arábica tem maior área cultivada, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo, devido a sua qualidade superior nos produtos finais, permitindo assim ao consumidor degustar produtos mais finos, enquanto que o café conilon, popularmente conhecido como robusta, é usado em *blends* e no preparo de cafés solúveis (MAPA, 2017).

O Brasil tem clima favorável para o desenvolvimento pleno da cultura do cafeeiro, possibilitando o plantio em todo o país, inicialmente com produção voltada para o mercado doméstico, se instalando no Vale do Rio Paranaíba. Além disso, essa diversidade climática e de solos possibilita produção de cafés com qualidades diferentes, como aromas e sabores dentro dos gêneros economicamente produzidos (REVISTA CAFEICULTURA, 2009; MAPA, 2017).

O cafeeiro arábica é originário de plantas oriundas da Etiópia, cultivados originalmente em áreas com altitude acima de 800 m, apresentando frutos com coloração vermelha ou amarela de acordo com a cultivar, que resulta em produtos de qualidade superior, devido seus grãos serem maiores e mais lisos. É uma espécie autógama, com até 15% de fecundação cruzada. Como. Demanda tratos mais específicos o que aumenta os custos de produção, devido sua maior sensibilidade a doenças. Com isso, cerca de 75% da produção mundial exportável de café pertence a essa espécie, sendo seus produtos com maior valor no mercado (REVISTA CAFEICULTURA, 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

A espécie *C. canephora* é originária da África central e ocidental, sendo geograficamente melhor difundida devido à melhor adaptação às variações climáticas, tendo seu desenvolvimento inicial mais lento que o cafeeiro arábica. É caracterizada por ser uma planta com maior tolerância à pragas, espécie alógama, seus grãos são ligeiramente arredondados e menores que o arábica apresentando baixa acidez e mais sólidos solúveis, configurando a ele sabor único, além de apresentar maior teor de cafeína. É uma planta arbórea de porte menor, mais vigorosa, apresentando maior resistência a doenças e maior produtividade (OLIVEIRA et al., 2012).

A colheita é uma etapa importante do ciclo da cultura, pois interfere na qualidade dos grãos, que depende do grau de secagem, ponto de senescência, entre outros fatores. A colheita manual causa menor dano ao fruto, entretanto, com a expansão da cafeicultura foram desenvolvidos máquinas e equipamentos que possibilitam a retirada dos frutos e seu recolhimento com maior rendimento, menor custo, menor tempo, além de preservar a qualidade do produto durante a colheita no momento mais adequado de maturação (EMATER, 2016).

O ciclo bienal é característica do cafeeiro e consiste na alternância de um ano com grande florada, seguido por outro ano com florada menos intensa, sendo o cafeeiro arábica o mais afetado por esse fenômeno. Devido a esse fator, a produtividade esperada para a safra de 2020, considerando um ano de bienalidade positiva é de alcançar entre

57,2 milhões e 62,02 milhões de sacas beneficiadas. A produtividade para o café arábica está estimada em 28,53 e 30,36 sacas ha⁻¹, representando aumento entre 26% e 34,1%, respectivamente. Já a produção de *C. canephora* está estimada entre 27,4 e 29,58 sacas ha⁻¹há. Por ser uma espécie mais rústica e ser menos afetada pelas variações ocasionadas pela bienalidade quando comparada ao arábica, os dados de produtividade desta espécie se aproximam aos da safra passada que foi de 14,36 milhões de sacas, com redução de 15,2% (CONAB 2019; CONAB, 2020).

3.2 *Leucoptera coffeella*

O bicho-mineiro é considerado praga-chave na cafeicultura brasileira devido ao dano econômico causado pela presença do inseto na área que se alimenta do tecido paliçádico das folhas, causando minas (TUELHER et al., 2003).

É uma praga exótica no país, sendo originária do continente africano, e recebeu esse nome vulgar pelo hábito alimentar da lagarta que se estabelece entre a epiderme superior e inferior, alimentando-se do parênquima paliçádico foliar, ocasionando as lesões conhecidas popularmente como minas. Quando a lavoura apresenta elevado índice de infestação, a queda na produção pode atingir até 50%, sendo sua presença no Brasil notificada nos anos de 1860 a 1861 (SCALON et al., 2013; SOUZA et al., 1998).

Apresenta ciclo evolutivo variável, sendo o adulto uma mariposa de aproximadamente 6,5 mm de envergadura, de coloração prateada com manchas circulares pretas circundadas de amarelo, localizadas uma em cada ponta das asas anteriores. Já em relação às asas posteriores é caracterizada pelas franjas. Essas mariposas quando paradas ficam na parte abaxial das folhas do cafeeiro e aparentemente é visto apenas as asas anteriores, pois elas cobrem as posteriores. Sua atividade se inicia ao anoitecer e seu repouso acontece durante o período diurno, portanto para vê-las durante o dia é preciso vibrar a planta. Na fase de lagarta, chega a medir cerca de 3,5 mm, apresentando três pernas na região torácica e cinco falsas pernas na região abdominal. O ovo do bicho-mineiro mede 0,3 e 0,25 mm, de comprimento e de largura, respectivamente, com coloração branco brilhante e de formato achatado (SOUZA et al., 1998; COSTA et al., 2015).

É um inseto holometabólico, passa por todas as etapas da metamorfose, sendo elas ovo, lagarta, pupa e adulto. O ovo se mantém por cinco a vinte e um dias, no máximo, e posteriormente eclode a lagarta. A duração da fase larval é de nove a quarenta dias, dependendo das condições climáticas. As injúrias se iniciam pela formação de uma lesão ou mina, e transforma em uma lesão necrótica que pode coalescer com outras, isto se deve à ação da lagarta que se alimenta da folha do cafeeiro por meio do seu aparelho bucal do tipo mastigador. Quando a lagarta interrompe sua alimentação, deixa a região lesionada e desce para o terço inferior da planta por meio dos fios de seda que produz. Produz um casulo de fios de seda geralmente na parte abaxial da folha, onde se aloja até se tornar pupa, ocorrendo esta transformação por volta de cinco a vinte e seis dias (SOUZA et al., 1998).

A incidência do bicho-mineiro na lavoura é condicionada às condições climáticas existentes na área, da mesma forma que ocorre com outras espécies. A presença dele é favorecida por temperaturas amenas, ambientes com baixa umidade relativa e que estão sujeitas a maior tempo de exposição de raios solares. Conforme Tuelher et al. (2003), os danos causados por essa praga são consequência das lesões que as lagartas fazem na epiderme foliar e que com a necrose propicia a queda das folhas, ocasionando uma perda de área foliar na planta, que reduz a atividade fotossintética, e por fim há perda de produção na lavoura (CUSTÓDIO et al., 2009).

Desta forma, o controle dessa praga é essencial para evitar posteriores problemas que já foram citados acima, sendo necessário o monitoramento da lavoura. Sendo esse monitoramento do bicho mineiro realizado através por meio de amostragens no campo determinando-se a porcentagem de folhas minadas, o que não reflete verdadeiramente a realidade de infestação devido à ação de inimigos naturais além de minimizar os pontos de amostragem. Contudo, em áreas de plantio de grande extensão, comuns em cafezais no Brasil, a viabilidade de tais programas é questionável devido a minimização do real nível de infestação. Dentre as possíveis alternativas para melhoria do método de amostragem, a adoção do uso de feromônios apresenta destaque pelas vantagens de diminuição do esforço de coleta e ganho de tempo, pois são realizadas as coletas específicas do inseto-alvo sem a desnecessária interferência na ação dos inimigos naturais. Precetti e Parra (1981) destacaram a necessidade da inclusão do feromônio de *L. coffeella* em programas de manejo integrado de pragas do cafeeiro para realização do monitoramento populacional de adultos presentes na área (LIMA, 2001).

O método de controle mais usual é o químico, sendo utilizados produtos fitossanitários de ação sistêmica e preventiva. A antiga realidade era a aplicação do inseticida aldicarbe, que possui alta eficiência e amplo espectro de ação, porém devido sua alta toxicidade foi proibido por lei. Hoje se busca aplicação de produtos com menor toxicidade como os neonicotinoides. No entanto, há alguns anos vem se percebendo a ineficiência do controle padrão, que eram aplicados de forma incorreta (local e quantidade) e provocavam a resistência dos insetos. Diante disso, tem sido trabalhado com o manejo integrado para o controle de pragas (SOUZA et al., 2006; MATIELLO et al., 2020).

O manejo integrado de pragas é a forma mais coerente de administrar a lavoura, pois desta forma se consegue ter o controle eficiente das pragas e doenças, não tendo consequências negativas como resistência, problemas ambientais, desequilíbrio populacional dos inimigos naturais e inconveniências à saúde humana. Ou seja, basicamente é uma estratégia que prioriza pontos como econômico, ecológico e toxicológico, isto tudo, aproveitando dos recursos naturais (GRAVENA, 1992).

3.3 Nematoides entomopatogênicos

Nematoides podem variar em formato, tamanho, tipo de alimentação e papel ecológico, apresentando em alguns casos dimorfismo sexual entre a própria espécie. A presença de nematoides entomopatogênicos em uma lavoura é desejada, já que esses organismos são entomopatógenos, auxiliando no controle de pragas (EMBRAPA, 2002).

A diversidade dentro dessa classe é ampla, e se focarmos nos entomopatogênicos é perceptível o quanto agregam em uma lavoura. Pesquisas de utilização como agentes de controle de pragas ocorreram somente depois da década de 60, e após anos de estudos e aprimoramento, são utilizados e comercializados. Os nematoides entomopatogênicos pertencem principalmente às famílias: Mermithidae, Phaenospitylenchidae, Heterorhabditidae e Steinernematidae, sendo mais relevantes as duas últimas (ALVES, 2008).

Conforme Negrisoli et al. (2008), as famílias de nematoide mais usuais (Heterorhabditidae e Steinernematidae) tem ampla distribuição geográfica, sobrevivem

nos solos e são dependentes de água, pois é por meio dela que se locomovem a procura de um hospedeiro que seja capaz de garantir sua sobrevivência (alimentação) e perpetuação da espécie (reprodução). O ambiente que apresenta as condições ideais para sobrevivência e reprodução dos nematoides é adequado para usá-los como método de controle de praga, podendo ser liberadas em massa para atacar pragas específicas.

O uso desses nematoides é altamente benéfico em uma lavoura, pois são resistentes a muitos produtos fitossanitários e podem até mesmo trabalhar em sinergismo com alguns deles. Entretanto, para que esses organismos sejam capazes de ter sua máxima eficiência são necessários cuidados na formulação e armazenamento. Com isto, as pesquisas nessa área são cada vez mais frequentes, e, por exemplo, na cultura do cafeeiro, já se obtiveram resultados promissores para controle de pragas como a broca-do-café, cochonilhas e cigarras (SILVA, 2011).

3.4 *Bacillus* spp.

As espécies do gênero *Bacillus* são microrganismos pertencentes ao reino das bactérias, e possuem forma de bastonetes, podendo ser aeróbias facultativas ou obrigatórias. Os *Bacillus* produzem endósporos que são estrutura de sobrevivência das bactérias, possuindo a capacidade de se preservar intacta na natureza por anos e até mesmo séculos (ALVES, 2008).

Alguns *Bacillus* são bactérias de grande relevância em controle de insetos, no qual se enquadra especificadamente no controle biológico. São capazes de produzir inclusões proteicas cristalinas a partir de sua esporulação, no qual também são conhecidas por cristais, que se constitui de proteínas originadas na configuração de protoxinas, que são convertidas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto, devido ao caráter básico do pH do intestino e presença das proteases. Quando a toxina é excitada ocorre a lise das células epiteliais e conseqüentemente a morte das larvas (EMBRAPA, 2002).

A utilização de *Bacillus* possui algumas vantagens, como o fato de ser específica para alguns insetos, portanto, apresentam seletividade. São consideradas eficazes no controle de pragas, não tem ação prejudicial aos mamíferos e vertebrados, e são atóxicos as plantas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986).

Conforme Alves (2008), não são todos os *Bacillus* que são considerados entomopatogênicos, dessa forma apenas algumas espécies podem ser classificadas como tal, sendo elas, por exemplo, *B. thuringiensis* e *B. sphaericus*. Essas espécies podem ser utilizadas para controle de diversos dípteros, sendo utilizados tanto no meio agrícola quanto para controle de insetos vetores de doenças humanas.

Entre os microrganismos utilizados no controle de insetos praga, o *B. thuringiensis* destaca-se como a bactéria mais utilizada e estudada no controle de insetos, ocupando cerca de 90% do mercado mundial de produtos biológicos. O fato de ser uma bactéria com relativa seletividade favorece a preservação de organismos que não são alvo (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; BATISTA et al., 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área

O experimento foi conduzido no laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia. O cafeeiro utilizado para coleta das folhas e obtenção dos insetos localiza-se na área experimental da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, com área total de 1.225 m² (35 m x 35 m), situada em uma vertente convexa, com declividade em torno de 5% localizada no terço médio/superior da encosta. A área já havia sido previamente utilizada com lavouras cafeeiras, mas encontrava-se há mais de uma década sendo utilizada com pastagem de braquiária, *Brachiaria decumbens* Stapf.

Para a coleta das folhas foi utilizada o cafeeiro pré-existente na área experimental, com cultivares Topázio, espaçamento de 2,5 m entre plantas. A coleta foi realizada no terço médio superior do cafeeiro, num caminhamento aleatório totalizando 100 folhas com minas viáveis.

4.2 Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos

Foram utilizados cinco isolados de nematoides, quatro do gênero *Heterorhabditis* e um *Steinernema*, testados sobre lagartas de *L. coffeella* em condições de laboratório, verificando-se a virulência sobre o inseto.

Cada ensaio conteve seis tratamentos, sendo esses isolados *H. amazonensis* GL, *Steinernema feltiae*, *H. amazonensis* MC01, *S. carpocapsae*, *S. brazilense* e o controle. A viabilidade inicial dos juvenis infectantes (JIs) das suspensões de cada isolado foi confirmada através da motilidade dos nematoides antes da aplicação.

Colocou-se uma folha minada em placa de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) forrada com duas folhas de papel filtro e para cada isolado foi aplicado 1 mL por placa de suspensão do nematoide na concentração de 100 JI lagarta⁻¹ emergidos de até três dias, armazenados por até cinco dias.

Para o preparo das suspensões contabilizou-se com auxílio de microscópio estereoscópio em placas de microtitulação de 96 poços a quantidade de JIs existentes em cada mL das suspensões. Foram realizadas cinco repetições totalizando 30 placas para cada ensaio, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. As placas foram fechadas com Parafilm[®] e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 25 ± 2°C, 70% UR e 24 h de escuro. As avaliações de mortalidade foram realizadas após 24, 48 e 72 h. As lagartas mortas foram mantidas em B.O.D. a 25 ± 2°C em câmara seca por dois dias para posterior dissecação, sendo então, observadas em microscópio estereoscópio para confirmação da mortalidade pelo nematoide. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de médias Scott-Knott ($p < 0,05$) com auxílio do software estatístico Speed Stat 2.3 (CARVALHO; MENDES, 2017).

4.3 Seleção de isolados de *Bacillus* spp.

Para avaliação da patogenicidade e virulência de *Bacillus* sobre lagartas de *L. coffeella* em condições de laboratório foram testados seis isolados e o controle, totalizando sete tratamentos. No controle utilizou-se apenas água destilada e

esterilizada, em volume equivalente aos tratamentos. Os isolados testados foram B18 – *Bacillus subtilis*, B22 – *Bacillus thuringiensis*, B05 – *Bacillus methylophilus*, B202 – *Bacillus subtilis*, B33 – *Bacillus subtilis* e B31- *Bacillus subtilis*.

Para crescimento das bactérias foi utilizado o meio de cultura sólido 523 (KADO; HESCKET, 1970). Após o crescimento das colônias o conteúdo bacteriano foi diluído em água destilada (quantidade suficiente para cobrir a placa), coletado com uma pipeta de plástico e transferido para um béquer. Para quantificar em espectrofotômetro, adicionou-se água destilada no béquer até atingir a concentração desejada e posteriormente o líquido com a solução bacteriana foi transferido para um tubo de plástico para ser quantificado. O processo de quantificação consistiu em calibrar o espectrofotômetro com o lambda em 600 nm, para se obter uma concentração de 1×10^9 (UFC).

Para montagem do experimento foi colocada uma folha minada em placa de Petri de vidro (9 cm de diâmetro) forrada com duas folhas de papel filtro e para cada isolado foi aplicado 1 mL por placa de suspensão da bactéria na concentração de 1×10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

Foram feitas cinco repetições por tratamento para cada dia de avaliação, totalizando 35 placas por tratamento (sete tratamentos x cinco repetições), totalizando 70 placas distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. As placas foram fechadas com Parafilm® e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 70% UR e fotofase de 12 h. As avaliações foram realizadas após sete e 10 dias da inoculação das bactérias verificando-se a mortalidade das lagartas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de médias Scott-Knott ($p < 0,05$) com auxílio do software estatístico Speed Stat 2.3 (CARVALHO; MENDES, 2017).

4.4 Ajuste da concentração de *Bacillus* spp.

Para ajuste da concentração de aplicação foram testadas quatro concentrações dos *Bacillus* spp. (*B. thuringiensis* 202 e *B. subtilis* 22) selecionados no teste anterior que causaram maior mortalidade a lagartas de *L. coffeella*. Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições do ensaio anterior.

Os experimentos contiveram cinco tratamentos, sendo quatro concentrações (1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 unidades formadoras de colônia mL^{-1}) e o controle no qual foi aplicada somente água. Foram feitas cinco repetições por tratamento (cinco tratamentos x cinco repetições), distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. Foram feitas duas avaliações, aos sete dias (cinco placas/tratamento) e 10 dias (cinco placas/tratamento) após a aplicação das bactérias.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e análise de regressão com auxílio do software estatístico Speed Stat 2.3 (CARVALHO; MENDES, 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de isolados de nematoides entomopatogênicos

Na primeira avaliação não houve diferença entre os isolados de nematoides entomopatogênicos. Quando avaliados no segundo dia, o comportamento desses isolados se manteve, deferindo apenas do controle. No terceiro dia de avaliação os isolados *H. amazonensis* GL e *S. feltiae* apresentaram maior virulência sob as lagartas de *L. coffeella*, diferindo dos demais tratamentos. Considerando a média das avaliações não foi verificada diferença entre os isolados testados (Tabela 1). Os nematoides foram considerados potenciais no controle de lagartas de bicho-mineiro, em função dos índices de mortalidade obtidos de até 90% (Tabela 1), podendo considerá-los com alta virulência ao inseto.

Dessa forma, mesmo que em condições de laboratório, o resultado obtivo apresenta alto grau de relevância, pois o controle com os isolados de nematoides chegou a atingir o nível de 90% de mortalidade e quando comparado aos métodos tradicionais utilizados (inseticidas químicos) que tem um percentual de mortalidade por volta de 50 a 60%. Rodriguez et al 2006, o aldicarbe e tiametoxam, tratamentos mais usuais no controle da praga, para as doses testadas contribuíram para manter a infestação do bicho-mineiro inferior, entre os 90 DAA e 210 DAA e os 120 DAA e 240 DAA, respectivamente.

Tabela 1. Mortalidade de lagartas de *Leucoptera coffeella* (%) causada por isolados de nematoides entomopatogênicos.

Tratamento	Mortalidade (%) [*]			
	24 h	48h	72h	Média
<i>H. amazonensis</i> GL	75,0 ± 26,3 a	70,0 ± 34,9 a	90,0 ± 21,1 a	78,3 ± 17,5 a
<i>Steinernema feltiae</i>	65,0 ± 33,7 a	80,0 ± 25,8 a	85,0 ± 24,1 a	76,6 ± 16,6 a
<i>H. amazonensis</i> MC01	60,0 ± 31,6 a	80,0 ± 25,8 a	65,0 ± 33,7 b	68,3 ± 21,6 a
<i>S. carpocapsae</i>	60,0 ± 21,1 a	70,0 ± 25,8 a	55,0 ± 36,9 b	61,6 ± 16,6 a
<i>S. brazilense</i>	55,0 ± 28,4 a	60,0 ± 31,6 a	55,0 ± 36,9 b	56,6 ± 13,6 a
Controle	0,0 ± 0,0 b	0 ± 0,0 b	0 ± 0,0 c	0 ± 0,0 ± b
CV (%)	30,66	26,94	34,51	14,97

*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Dados transformados em $y + 1,0 - \sqrt{(y + 1,0)}$.

Para realização de testes posteriores, sugere-se a seleção dos isolados *H. amazonensis* GL e *S. feltiae*, pois foram considerados os mais virulentos a *L. coffeella* no terceiro dia de avaliação (Tabela 1).

O uso de nematoides entomopatogênicos para o controle biológico de diversas ordens de insetos em culturas agrícolas vem se mostrando eficazes (TAVARES et al., 2007). Foelkel et al. (2016) constataram um controle de 90% da população de *Anastrepha fraterculus* (Schiner) (Diptera: Tephritidae), com isolados de nematoides entomopatogênicos.

O uso de *H. amazonensis* JPM4 associado a inseticidas químicos foi considerado um método integrado eficaz no controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em ensaios em laboratório e em tomateiros mantidos em condições de casa de vegetação, alcançando índices de mortalidade de até 70% de lagartas (SABINO et al., 2019).

5.2 Seleção de isolados de *Bacillus* spp.

Os isolados *B. thuringiensis* 22, *B. subtilis* 202 e *B. methylotrophicus* 05 diferiram dos demais na avaliação de sete dias, causando mortalidade de até 50%. Enquanto que para a segunda avaliação, após 10 dias, *B. thuringiensis* 22 e *B. subtilis*

202 apresentaram maior virulência às lagartas de *L. coffeella* causando mortalidade de até 80% (Tabela 2).

Tabela 2. Mortalidade de lagartas de *Leucoptera coffeella* (%) causada por isolados de *Bacillus* spp.

Tratamento	Mortalidade (%) [*]	
	7 dias	10 dias ^{**}
<i>Bacillus thuringiensis</i> 22	50 ± 22,3 a	70 ± 22,3 a
<i>Bacillus subtilis</i> 202	40 ± 22,3 a	80 ± 27,3 a
<i>Bacillus methylotrophicus</i> 05	40 ± 22,3 a	20 ± 27,3 b
<i>Bacillus subtilis</i> 33	0 ± 0,0 b	40 ± 22,3 b
<i>Bacillus subtilis</i> 18	0 ± 0,0 b	40 ± 22,3 b
<i>Bacillus subtilis</i> 31	0 ± 0,0 b	20 ± 27,3 b
Controle	0 ± 0,0 b	0 ± 0,0 b

*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. M ± DP(M)

**Mortalidade acumulada.

Segundo Germida, Heins e Manker (2000) bactérias do gênero *Bacillus* são consideradas eficazes para o controle de populações de bicho-mineiro, sendo uma alternativa para ser utilizada no manejo da praga.

Santos (2012) verificou que houve mortalidade de lagartas de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) causada por *B. subtilis* e *B. pumilus*, causando redução na ocorrência da praga em pomares de macieira. No entanto, Brehelin et al. (1989) relata que *B. subtilis*, quando na hemolinfa de insetos, apresenta efeito ativador de enzimas do sistema imunológico de diversas espécies, sendo assim pouco efetivo em causar a morte de insetos.

5.3 Ajuste da concentração de *Bacillus* spp.

Dentre as concentrações avaliadas, *B. thuringiensis* 22 e *B. subtilis* 202 na concentração de 1×10^9 UFC apresentaram maior virulência às lagartas de *L. coffeella* nos períodos avaliados de sete e 10 dias, causando mortalidade de até 70% de lagartas (Figuras 1 e 2).

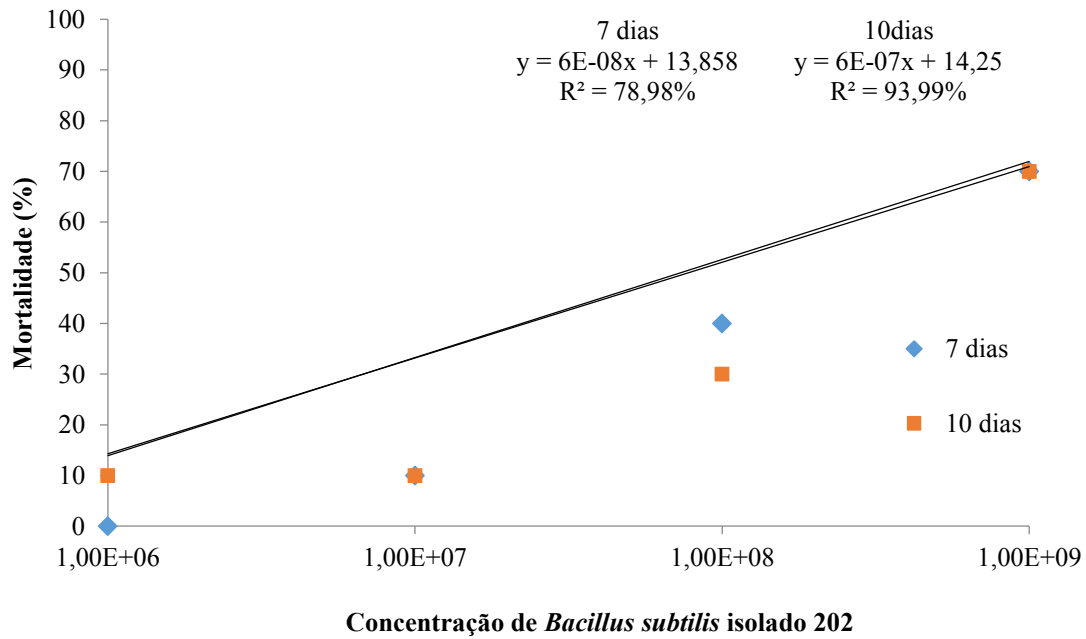


Figura 1. Mortalidade (%) de lagartas de *Leucoptera coffeella* em função da aplicação de *Bacillus subtilis* isolado 202 aos sete e dez dias de avaliação.

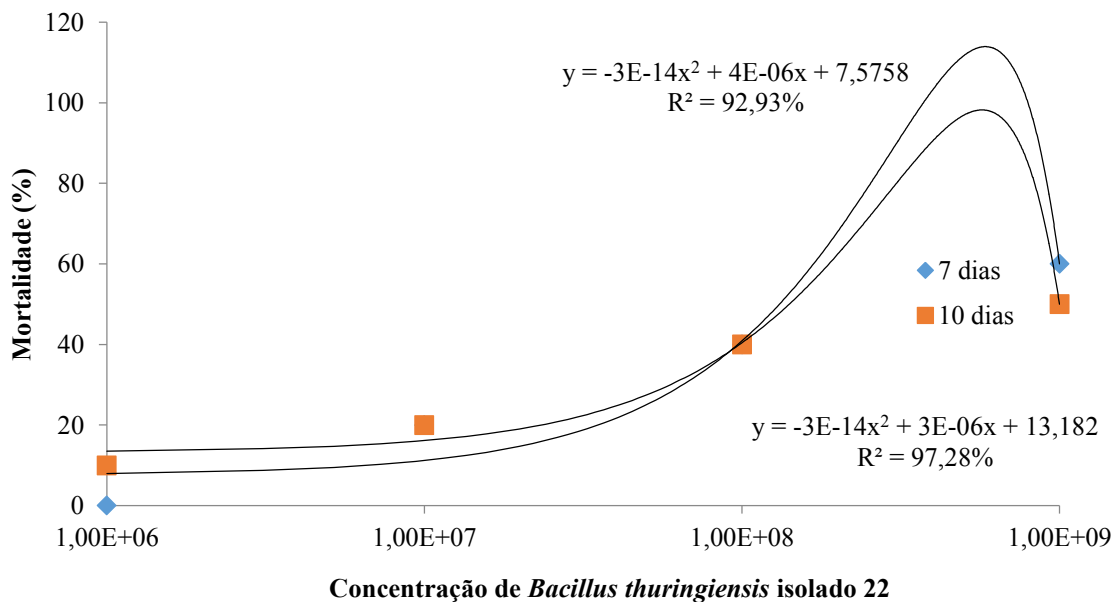


Figura 2. Mortalidade (%) de lagartas de *Leucoptera coffeella* em função da aplicação de *Bacillus thuringiensis* isolado 22 aos sete e 10 dias de avaliação.

A adoção do uso de inseticidas microbianos à base de *B. thuringiensis* é uma técnica empregada por mais de 50 anos, sobretudo no controle de pragas-chaves da ordem dos lepidópteros, sobretudo para controle de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (MEDEIROS et al., 2006; HECKEL et al., 2007).

De acordo com González-Cabrera (2011), *B. thuringiensis* foi considerado eficaz no controle de *T. absoluta* em testes realizados em laboratório, casa de vegetação e campo, sendo as lagartas de primeiro instar as mais suscetíveis ao entomopatógeno. Contudo, os resultados obtidos para os isolados de *Bacillus* spp. se mostraram satisfatório abrindo possibilidades para o controle da praga.

CONCLUSÃO

Heterorhabditis amazonensis GL e *S. feltiae* causaram maior mortalidade de lagartas de bicho-mineiro após os três dias de inoculação. Para as demais avaliações não houve diferença entre os nematoides testados.

Os isolados de *B. subtilis* 202 e *B. thuringiensis* 22 foram considerados os mais virulentos no controle de lagartas de *L. coffeella*, causando maiores índices de mortalidade na concentração de 1×10^9 UFC.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F.A. de; OLIVEIRA, J.V. de; GODIM JUNIOR, M.G.C.; TORRES J.B. Efeito de inseticidas e acaricidas sobre ovos e fêmeas adultas do ácaro rajado, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 1-8, 2003.
- ALMEIDA, L. A. et al. Influência do teor de umidade do café arábica na rentabilidade do produtor rural de Iúna - ES. In: VIII SIMPOSIO DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO E TECNOLOGIA, 2018. **Anais...**, p.1-16, 2018.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América latina. In: ALVES, S. B.; LOPES; R. B. **Controle microbiano de pragas na América Latina**. 2ª ed. Piracicaba, FEALQ, p.69-110, 2008.
- ALVES, V. S. et al. Suscetibilidade da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) ao nematoide *Steinernema carpocapsae* (Nematoda, Steinernematidae). **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 76, n. 3, p. 479-482, 2009.
- BATISTA, A. et al. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera frugiperda***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 19. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 81).
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN, A.F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de Fitopatologia. Princípios e Conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 717-728.
- BRASIL. Ministério da Educação. **Caderno de aulas práticas dos Institutos Federais: cafeicultura**. Ministério da Educação, Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica: Brasília, DF, 2016. 115 p.
- BREHELIN, M.; DRIF, L.; BOEMARE, H. Insect haemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. **Insect biochemistry**, v. 19, p. 301-307, 1989.
- CARVALHO, A.M.X.; MENDES, F.Q. SPEED Stat: a minimalist and intuitive spreadsheet program for classical experimental statistics. **Anais da 62ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**, 2017. 333pp.
- CARVALHO, C.E. et al. **Dinâmica populacional do bicho mineiro e seus inimigos naturais em cafeeiros orgânicos e adensados**. Disponível em: <<http://www.revistadeagricultura.org.br/index.php/revistadeagricultura/article/view/39>> Acesso em: 25 de jul de 2019.
- CARVALHO, C.F; SOUZA, B. Métodos de criação e produção de crisopídeos. In: BUENO, V.H.P. (Ed.). **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras, UFLA, p. 91-109, 2000.
- COSTA, F. M. D. et al. Análise estatística das distribuições espaciais do bicho- mineiro do cafeeiro e das vespas predadoras. **Coffee Science**, v. 10, n. 2, p. 149-157, 2015.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2019, n.1 - Primeiro Levantamento**, Brasília, p. 1-62, Jan.2019. Disponível em:
<<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafes>> Acesso em: 10 de out. de 2019.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café, safra 2020, n.1 - Primeiro Levantamento**, Brasília, p. 1-62, Jan.2020. Disponível em:
<<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafes>> Acesso em: 10 de mai. de 2020.

CUSTÓDIO, A.A.P. et al. Incidência do bicho-mineiro do cafeeiro em lavoura irrigada sob pivô central. **Coffee Science**, v.4, n.1, p.16-26, 2009.

EMATER. **Manual do café colheita e preparo (*Coffea arabica* L.)**. Belo Horizonte: EMATER-MG, p. 52 , 2016.

EMBRAPA. **Principais pragas do cafeeiro em Rondônia**: Características, infestação e controle. Circular técnica 59, p.7-9, 2002.

FILHO, R. S. et al. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

FOELKEL, E. et al. Virulence of nematodes against larvae of the south-American fruit fly in laboratory using soil from Porto Amazonas, Paraná, Brazil, as substrate. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 405-410, 2016.

FONSECA, A. R.; CARVALHO, C.F.; SOUZA, B. Capacidade predatória e aspectos biológicos das fases imaturas de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) alimentada com *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae) em diferentes temperaturas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 251- 263, 2001.

GERMIDA, J. J.; HEINS, S. H.; MANKER, D. C. *Bacillus subtilis* strain for controlling insect and nematode pests. **United States Patent**, n. 6015553, 2000.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.

GONZÁLEZ-CABRERA, J; MOLLÁ, O.; MONTÓN, H.; URBANEJA, A. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **BioControl**, v. 56, p. 71-80, 2011.

GRAVENA, S. Controle biológico no manejo integrado de pragas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 281-299, 1992.

HECKEL, D. G. et al. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 95, n. 3, p. 192-197, 2007.

LIMA, E.R. **Feromônio sexual do bicho-mineiro do café, *Leucoptera coffeella*: avaliação para uso em programas de manejo integrado**. Universidade Federal de Viçosa, 2001.

MAPA. **Café no Brasil**. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>
Acesso em: 10 Out. de 2019.

MATIELLO, J. B. et al. **Controle da broca-do-café com o inseticida Verismo® em café arábica**. Disponível em:

<<https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/123456789/3288/1/52.pdf>>
Acesso em: 14 de maio de 2020.

MEDEIROS, P.T. et al. Avaliação de produtos a base de *Bacillus thuringiensis* no controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 245-248, 2006.

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

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

PRADO, R. R. et al. O programa certifica minas café e os indicadores de sustentabilidade na cafeicultura brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS, 43., 2017. Poços de Caldas. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2017.

PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Evidência de feromônio sexual de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) em condições de campo. **Solo**, v. 73, p. 7-12, 1981.

OLIVEIRA, I. P. et al. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, p. 1-16, 2012.

REVISTA CAFEICULTURA. **O cafeeiro**. Disponível em:

<<https://revistacafeicultura.com.br/?mat=7016>>. Acesso em: 05 set. de 2019.

RODRIGUEZ, G.I, BAPTISTA, G. C de, TREVIZAN, L.R.P, HADDAD, M.L, NAVA, D.E. **Resíduos de tiametoxam, aldicarbe e de seus metabólitos em folhas de cafeeiro e efeito no controle de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae)**. Neotrop. Entomol. vol.35 no.2 Londrina Mar./Apr. 2006.

REMUSKA, A.C; PRIA, M.D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **UEPG Ciências exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007.

SANTOS, R. S. S. Ação de formulações comerciais de *Bacillus* spp. sobre lagartas de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 8, n. 14; p. 16-22, 2012.

- SABINO, P.H.S. et al. Combined application of entomopathogenic nematodes and insecticides in the control of leaf-miner *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on tomato. **Neotropical Entomology**, v. 48, p. 314-322, 2019.
- SCALON, J. D.; MATEUS, A. L. S. S.; ZACARIAS, M. S. Análise espaço-temporal do nível de infestação do bicho-mineiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Menèville & Perrottet . 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) em cafezal orgânico (*Coffea arabica* L.). **Coffee Science**, v. 8, n. 3. p. 347-353, 2013.
- SILVA, M. A. T. **Controle de *Quesada gigas* (Hemiptera: Cicadidae) pela aplicação de nematoides entomopatogênicos e compatibilidade com alguns produtos fitossanitários em cafeeiro.** Tese (Doutorado em Agronomia). UFLA, 2011.
- SOUZA, J. C. et al. Eficiência de thiamethoxam no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. I - Influência da modalidade de aplicação. **Coffee Science**, v. 1, n. 2, p. 143-149, 2006.
- SOUZA, J.C; REIS, P.R; RIGITANO, R.L.O. **Bicho-mineiro do cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado.** 2. ed. rev., 1998, p.7-20.
- TAVARES, F. M. et al. 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**, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2007.
- TUELHER, E. S. et al. Ocorrência de bicho-mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*) influenciada pelo período estacional e pela altitude. **Acta Scientiarum: Agronomy**, v. 25, n. 1, p. 119-124, 2003.
- WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576, 1986.