

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio**

**Aspectos comportamentais de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera:
Curculionidae) em cana-de-açúcar e ocorrência natural de nematoides
entomopatogênicos na população do inseto**

Alexsandro Casteliani

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental
no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade
no Agroecossistema.

SÃO PAULO

2019

Alexsandro Casteliani

**Aspectos comportamentais de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera:
Curculionidae) em cana-de-açúcar e ocorrência natural de nematoides
entomopatogênicos na população do inseto**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no
Agroecossistema.

Orientador: Professor Dr. Luís Garrigós Leite

SÃO PAULO

2019

Eu, **Alexsandro Casteliani**, autorizo Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ___/___/___

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Alessandro Casteliani

Título: **Aspectos comportamentais de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar e ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos na população do inseto**

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Membros titulares

Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

Instituição: Instituto Biológico/APTA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Mário Eidi Sato

Instituição: Instituto Biológico/APTA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Silvio Rogério Viel Instituição: Central Energética Açúcar e Álcool Ltda.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À mulher da minha vida Ana Gabriele pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comum para quem tenta trilhar novos caminhos!

Dedico também, ao meu filho Theo, que deu um sentido especial a minha existência e me tem proporcionado grandes momentos de alegria!

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço a Ele também por manter a minha esposa e filho ao meu lado, com muita saúde.

Ao Centro Paula Souza e a Secretaria de Desenvolvimento Econômico do estado de São Paulo, pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Ao Instituto Biológico e ao Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de ter sido aluno em uma Instituição de pesquisa qualificada e reconhecida.

O apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**)

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa tornando possível a produção desta dissertação

Ao Dr. Luís Leite Garrigós, pela orientação, acolhimento, confiança e empenho na realização deste trabalho.

A minha amiga Lizandra de Fátima Martins, por suas colaborações, ajuda desde o início nas análises e sugestões no trabalho foram essenciais e indispensáveis.

A Usina de cana-de-açúcar Abengoa Bioenergia, por providenciarem os materiais necessários para os bioensaios, e disponibilizarem as áreas para os estudos e coletas dos insetos.

A todos do CEIB- Centro Experimental Central do Instituto Biológico, em especial aos pesquisadores, alunos e membros do Laboratório de Controle Biológico pela disponibilidade do espaço e materiais, acolhimento, amizade e ensinamentos diários.

RESUMO

CASTELIANI, Alessandro. **Aspectos comportamentais de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar e ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos na população do inseto** 2019. 50 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

Inúmeros insetos podem atacar a cana-de-açúcar, havendo destaque para aqueles conhecidos como pragas de solo que se alimentam do sistema radicular, especialmente para o bicudo da cana, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae). No controle do bicudo, tem sido recomendadas algumas medidas, porém insuficientes para evitar as ressurgências do inseto. Uma medida que pode ser incluída no manejo populacional da praga refere-se ao controle biológico pelo uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*. NEPs vêm sendo testados em campo no período de chuva, quando a população de adultos é maior, proporcionando ganhos de até 17 t de cana/ha. No período da seca, NEPs poderiam ser aplicados juntamente com a vinhaça ou a água residuária visando o controle de larvas e pupas. Entretanto, não está claro se esse inseto deixa abertura no rizoma, que permita a entrada dos NEPs e alcance dos insetos na fase de larva e pupa. Além disso, não existem dados sobre a ocorrência natural de NEPs na população de larvas e pupas do bicudo presentes em cana, e qual a perda na produção esse inseto pode causar na cultura da cana-de-açúcar. Assim, esse estudo teve os seguintes objetivos: estudar os aspectos comportamentais de *S. levis* e determinar os níveis de danos causados pelo inseto para plantas de cana-de-açúcar; avaliar a ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos na população do inseto. Todos os rizomas atacados pelo bicudo tinham pelo menos um orifício externo ligado a galeria interna no rizoma, indicando ser abertura deixada pelo inseto para sua entrada como larva ou saída como adulto. Os orifícios menores estiveram presentes em rizomas contendo o inseto na fase larval, indicando ser deixado pelo adulto na oviposição ou pela larva após a sua eclosão. Orifícios maiores foram encontrados em todos os rizomas contendo pupa e adultos recém emergidos do inseto, respectivamente, sugerindo terem sido realizados pelas larvas antes de empuparem para facilitar a saída dos adultos; mais de 90% dos orifícios foram realizados abaixo da superfície do solo. Os danos causados pelo bicudo nos rizomas das touceiras apresentaram uma correlação positiva com o diâmetro e comprimento desta parte da planta; Porém uma correlação negativa com o peso dos seus colmos e com o número de brotos emitidos pelos seus rizomas após a colheita. Nematoides entomopatogênicos podem penetrar nos orifícios deixados pelo bicudo nos rizomas da cana, e alcançar as fases imaturas e adultos recém emergidos dentro dos rizomas, apresentando-se como importantes inimigos naturais dessas fases do inseto.

PALAVRAS-CHAVE: Bicudo da cana-de-açúcar, Controle biológico, Nível de dano

ABSTRACT

CASTELIANI, Alexsandro. Behavioral aspects of *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera Curculionidae) and natural occurrence of entomopathogenic nematodes in the insect population 2019. 50 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

Numerous insects can attack sugarcane, with emphasis on those known as soil pests that feed on the root system, especially for the cane boll weevil, *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae). In the control of the beetle, some measures have been recommended, but insufficient to avoid the resurgence of the insect. Another measure that can be included in the population management of the pest refers to the biological control by the use of entomopathogenic nematodes (NEPs) of the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema*. NEPs have been tested in the field in the rainy season, when the adult population is larger, providing gains of up to 17 t of cane / ha. During the dry season, NEPs could be applied together with vinasse or wastewater to control larvae and pupae. However, it is not clear whether this insect leaves an opening in the rhizome that allows the entry of NEPs and reach of the insects in these stages of larva and pupa. In addition, there are no data on the natural occurrence of NEPs in the larval and pupal population of the boll weevil and what loss of production this insect can cause in the sugarcane crop. Thus, this study aimed to: - study the behavioral aspects of *S. levis* and determine the levels of damage caused by the insect to sugarcane plants; and - evaluate the natural occurrence of entomopathogenic nematodes in the insect population. The present study has the following conclusions: • All rhizomes attacked by the beetle had at least one external orifice connected to the internal gallery in the rhizome, indicating that it was left by the insect to enter as a larva or as an adult; the smaller orifices were present in rhizomes containing the insect in the larval phase, indicating to be left by the adult in the oviposition or by the larva after their hatching; larger holes were found in all pupae-containing rhizomes and newly emerged adults of the insect, respectively, suggesting that they had been carried out by the larvae before cushioning to facilitate the exit of adults; more than 90% of the holes were made below the surface of the soil; the damage caused by the boll weevil in the rhizomes of the clumps showed a positive correlation with the diameter and length of this part of the plant; the damage caused by the boll weevil in the rhizomes of the clumps showed a negative correlation with the weight of their stems and the number of shoots emitted by their rhizomes after harvest; entomopathogenic nematodes can penetrate the holes left by the beetle in the rhizomes of the cane, and reach the immature and newly emerged adult phases within the rhizomes, presenting themselves as important natural enemies of these phases of the insect.

KEYWORDS: Sugarcane bite, Biological control, Damage leve

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ovos de *Sphenophorus levis*. (A) Ovo no momento da postura. (B) Ovo com 8 dias de incubação (C) Ovo próximo à eclosão da larva. **Fonte:** Elaborado pelo autor. 17
- Figura 2.** Larvas de *Sphenophorus levis*. (A) Larva com cinco dias eclodida. (B) Larva dentro de galeria no rizoma preparando a câmara pupal (C) Larva ressecada. **Fonte:** Elaborado pelo autor. 18
- Figura 3.** Pupa de *Sphenophorus levis*. (A) Pupa escura ventral. (B) Pupa clara lateral.(C) Pupa clara ventral. **Fonte:** Elaborado pelo autor. 18
- Figura 4.** Adulto de *Sphenophorus levis*. (A1) ventral fêmea. (A2)Ventral macho (B) Fêmea e macho.(C) Formato do pigídio fêmea. (D) Formato do pigídio macho. **Fonte:** Elaborado pelo autor..... 19
- Figura 5.** Ciclo biológico de *Sphenophorus levis* **Fonte:** elaborada pelo autor.; 20
- Figura 6. Ciclo de vida de nematoides entomopatogênicos, associados a bactérias simbiotes* **Fonte:** (HINCHLIFFE et al., 2010). 23
- Figura 7.** Frequências dos orifícios causados pelo *Sphenophorus levis* nos rizomas, com diferentes diâmetros (cm) de aberturas. 30
- Figura 8.** A) Rizoma aberto longitudinalmente mostrando duas galerias e inseto adulto de *Sphenophorus levis*. (B) Orifício ligado a galeria interna com inseto adulto de *Sphenophorus levis*. **Fonte:** Elaborado pelo autor 30
- Figura 9.** (A) Rizoma indicando orifício maior. (B) Rizoma indicando orifício menor. **Fonte:** Elaborado pelo autor 31
- Figura 10.** Frequências dos orifícios causados pelo *Sphenophorus levis* nos rizomas da cana, em diferentes distâncias a partir da superfície do solo, acima (2-0 cm) e abaixo (0-14 cm) da superfície. 31

- Figura 11.** Porcentagens de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* em relação aos diâmetros dos rizomas da touceira de cana-de-açúcar. 32
- Figura 12.** Porcentagens de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* em relação aos comprimentos dos rizomas da touceira de cana-de-açúcar. 32
- Figura 13.** Pesos de colmos (Kg) em relação a porcentagem de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* da touceira de cana-de-açúcar. 33
- Figura 14.** Números de brotos emitidos por rizoma em relação a porcentagem de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* da touceira de cana-de-açúcar. 33
- Figura 15.** Incidência natural de nematoide entomopatogênico na população de larvas, pupas e adultos de *Sphenophorus levis* dentro dos rizomas novos (A) e velhos (B) da cana-de-açúcar.. 35
- Figura 16.** Árvore filogenética construída com sequências do gene ribossomal 28S de *Steinernema* IL1 e de espécies relacionadas presentes no GenBank. A árvore foi construída pelo método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1000 replicações. Os valores de bootstrap, em porcentagem, aparecem junto aos ramos da árvore..... 36
- Figura 17.** Árvore filogenética construída com sequências da região ITS de *Steinernema* IL1 e de espécies relacionadas presentes no GenBank. A árvore foi construída pelo método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1000 replicações. Os valores de bootstrap, em porcentagem, aparecem junto aos ramos da árvore. 37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Importância da Cana-de-açúcar	13
3.2 <i>Sphenophorus levis</i>	15
3.3 Distribuição geográfica e dispersão	16
3.4 Bioecologia e Flutuação populacional	17
3.5 Monitoramento e medidas de controle	21
3.6 Uso de nematoides entomopatogênicos	22
4. MATERIAL E MÉTODO	25
4.1 Avaliação de ocorrência de <i>Sphenophorus levis</i> em áreas de cultivo de cana-de-açúcar	25
4.2 Aspectos comportamentais de <i>Sphenophorus levis</i> e danos causados a cana-de-açúcar	26
4.3 Ocorrência natural de nematoides entomopatogenico na população do inseto	27
4.4 Caracterização molecular	28
4.5 Teste de hibridação cruzada	28
4.6 Análise estatística	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Aspectos comportamentais de <i>Sphenophorus levis</i> e danos causados a cana-de-açúcar	29
5.2 Ocorrência natural de nematoides	34
5.3 Teste de hibridização cruzada	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das principais atividades que impulsionam a economia brasileira. Dentre os estados produtores, São Paulo destaca-se com uma produção estimada em 330,06 milhões de toneladas na safra 2018/2019, correspondendo a mais de 54% do total produzido no país (CONAB, 2018). Para alcançar esse patamar, grandes investimentos têm sido feitos em tecnologias usadas no estabelecimento e condução da cultura, incluindo estratégias para o manejo integrado de pragas.

A importância do besouro *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae) como praga de cana-de-açúcar foi conhecida em 1977 e a descrição da espécie ocorreu em 1978 (PRECETTI; ARRIGONI, 1990). Os adultos têm hábitos noturnos e permanecem geralmente abaixo da superfície do solo, sob os torrões ou restos vegetais ou entre os perfilhos na base da touceira. Quando tocados, simulam estar mortos. São bastante longevos: em condições de laboratório, machos e fêmeas vivem cerca de 250 dias (PRECETTI; TERÁN, 1983; DEGASPARI *et al.*, 1987).

Inúmeros insetos herbívoros podem atacar a cana-de-açúcar, havendo um destaque para aquelas conhecidas como pragas de solo que se alimentam do sistema radicular. O bicudo da cana, *Sphenophorus levis* (Vaurie, 1978) (Coleoptera: Curculionidae), é um inseto que vem assumindo grande importância nos últimos anos, principalmente por estar se disseminando em áreas do estado de São Paulo e outros estados onde sua incidência ainda não havia sido registrada (ALMEIDA, 2005). Os principais danos do inseto à cultura ocorrem durante sua fase imatura, quando as larvas broqueiam os internódios basais subterrâneos (geralmente chamados de rizomas) e, algumas vezes, os primeiros entrenós basais, podendo acarretar a morte de 50 a 60% dos perfilhos, perdas na produção de até 30%, e redução na longevidade dos canaviais (PRECETTI; ARRIGONI, 1990). Esse aumento na área infestada pelo bicudo deve-se principalmente ao descuido no transporte de mudas de uma região para outra, sendo estimado a sua presença em mais de 300 mil hectares de cana-de-açúcar.

As cópulas ocorrem em qualquer horário e podem ser múltiplas (BARRETO-TRIANA *et al.*, 2014). Após o acasalamento, as fêmeas perfuram os tecidos sadios do rizoma, com as mandíbulas presentes no ápice do rostró e aí, na base das brotações, abaixo ou ao nível do solo, inserem os ovos até 4 mm no interior dos colmos. Cada fêmea

põe em média 40 ovos, podendo chegar a 70, e 70% deles são colocados na primeira metade do tempo de vida da fêmea. De sete a doze dias depois da postura, nascem as larvas, as quais escavam galerias no interior do rizoma, ao se alimentar. Essas galerias permanecem cheias de serragem fina, característica do ataque da praga. O período larval médio é de 50 dias, findos os quais se passa a fase pupal, que dura cerca de 10 dias, ainda no interior dos colmos. A duração de pupa é de 12 dias em média (PRECETTI; TERÁN, 1983; DEGASPARI *et al.*, 1987). Em condições de laboratório, o ciclo biológico se completa entre 58 e 307 dias, de acordo com Degaspari *et al.*, (1987).

No controle desse inseto, tem sido recomendada a destruição mecânica das soqueiras e restos culturais, proporcionando resultados satisfatórios somente no primeiro corte da cana. Após esse período, como o rizoma da cana permanece para a próxima safra, não havendo destruição das soqueiras, a incidência da praga aumenta, sem que haja mecanismos que possam frear o aumento da população do inseto na área. O controle químico pelo uso do fipronil WG 250 g p.c./ha também tem sido recomendado, com desvantagens no elevado custo do produto, riscos de intoxicação e poluição ambiental.

Outra medida que pode ser incluída no manejo populacional da praga refere-se ao controle biológico pelo uso de nematóides entomopatogênicos dos gêneros *Heterorhabditis* e *Steinernema*, os quais vêm se mostrando bastante efetivos no controle de diversas espécies de curculionídeos, inclusive do gênero *Sphenophorus* que se constitui importante praga nos EUA e Japão (SMITH, 1994). Esses nematoides possuem uma relação com bactérias simbiotes que causam a morte rápida do inseto hospedeiro.

Ambos os gêneros de nematoides têm ciclos de vida semelhantes começando com um juvenil infectivo que transporta a bactéria entomopatogênica dentro do seu intestino e introduz dentro do hemocele de um hospedeiro adequado. Os nematoides e as bactérias simbiotes agem em conjunto para vencer o sistema imunológico do inseto (DOWDS; PETERS, 2002). Posteriormente, as bactérias se multiplicam na hemocele do inseto, o inseto é morto e o nematoide se propaga alimentando-se das bactérias. Quando o alimento se esgota, o nematoide é induzido para a forma de juvenil infectivo e deixa o cadáver do inseto se as condições externas no solo estiverem favoráveis, com umidade adequada (BROWN; GAUGLER, 1997). Os juvenis infectivos carregam suas bactérias simbiotes enquanto buscam por um inseto hospedeiro.

Estudos realizados em condições de campo vêm destacando esses nematoides como agentes potenciais para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, proporcionando ganhos de rendimento de até 17 t de cana por hectare. Nesses testes, os NEPs têm sido aplicados

no período de chuva quando a população de adultos é maior (LEITE *et al.*, 2012). No período da seca, NEPs poderiam ser aplicados juntamente com a vinhaça ou a água residuária visando o controle de larvas e pupas. Entretanto, não está claro se esse inseto deixa abertura no rizoma, que permita a entrada dos NEPs e alcance dos insetos nessas fases de larva e pupa. Além disso, não existem dados sobre a ocorrência natural de NEPs na população de larvas e pupas do bicudo e qual a perda na produção esse inseto pode causar na cultura da cana-de-açúcar.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Diante do atual cenário, percebe-se claramente a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas ao campo, visando um controle eficaz do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. Portanto, este trabalho tem como principal objetivo estudar os aspectos comportamentais de *S. levis*, determinar os níveis de danos causados pelo inseto em cana-de-açúcar e buscar possíveis nematoides entomopatogênico com potencial para o controle biológico.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os aspectos comportamentais de *S.levis* no que se refere a locais de oviposição, ocorrência dos diferentes estágios do inseto no rizoma e saída dos adultos para o ambiente;
- Analisar os níveis de danos causados pelo inseto em cana-de-açúcar;
- Avaliar e identificar a ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos na população do inseto;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum L.*) é uma planta que pertence à família das gramíneas (Poaceae), com origem na Ásia Meridional (MIRANDA, 2008), atualmente encontrada em 121 países (VERMA et al., 2014).

O cultivo de cana-de-açúcar é considerado um dos mais importantes no cenário econômico mundial, devido à grande variedade de produtos e subprodutos, representando uma importante fonte de recursos para a população através do açúcar, álcool, vinhaça, melaço e bagaço, podendo estes serem empregados na geração de energia elétrica, produção de combustíveis, entre outros (GONÇALVES, 2008).

A cana-de-açúcar é considerada uma planta semi-perene (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008), com alta eficiência fotossintética e grande acúmulo de sacarose, além de fácil adaptação diante de diferentes condições de intensidade luminosa e temperatura (SEGATO et al., 2006; ALMEIDA et al., 2016).

As plantas de cana-de-açúcar apresentam o hábito de perfilhar, sendo este perfilhamento uma característica muito significativa para a sua produtividade, pois este define a capacidade de rebrota, através da formação de gemas nos colmos cortados, originando assim uma nova planta (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008) e facilitando seu processo de restabelecimento em campo.

O ciclo da cana-de-açúcar normalmente é de cinco anos, sendo que após plantio, o rebrote é cultivado e colhido anualmente enquanto sua produtividade demonstre ser economicamente viável, sendo então realizada a renovação (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

O primeiro plantio do canavial recebe o nome de cana-planta, sendo assim denominado até o momento do primeiro corte, que após a realização deste, passa a ser chamado como cana-soca até completar o ciclo de sucessivos cortes anuais (BOLONHEZI; PEREIRA, 1999).

Como o Brasil apresenta condições climáticas favoráveis, a cana foi trazida ao país na primeira metade do século XVI, sendo assim cultivada desde a época da colonização, se tornando um dos principais produtos agrícolas do país (ROS, 2004). Atualmente, o Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar e seus derivados (VERMA

et.al, 2014). As maiores áreas de cultivo se concentram nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste respectivamente.

De acordo com a CONAB (2018), a produção de cana-de-açúcar prevista para a safra de 2018/2019 deverá apresentar uma redução de 2,8% em relação à safra anterior, com uma estimativa de produção de 615,54 milhões de toneladas, sendo que na safra 2017/2018 foram obtidos 633,26 milhões. Tal redução é efeito direto das condições climáticas adversas enfrentadas nas diferentes áreas de cultivo em todo o país, como altas temperaturas que aceleraram a maturação do colmo acarretando baixo crescimento e falta de peso dos mesmos. Além disso, ocorreu uma diminuição das áreas de cultivo devido à introdução da colheita mecanizada e devolução de terras arrendadas, principalmente na região Sudeste, contribuindo assim com a redução da produção de cana-de-açúcar para este ano.

A cana produzida no Brasil tem como principal destinação a fabricação de açúcar e álcool (etanol), sendo o setor sucro-alcooleiro uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, além de ser referência para os demais países produtores de açúcar e álcool. O Brasil é responsável pelo abastecimento de mais de 40% do mercado mundial de álcool, sendo considerado o maior programa de combustível renovável do planeta (CÍCERO et al., 2009).

De modo a abastecer o mercado mundial e nacional, o Brasil realiza o plantio da cana-de-açúcar normalmente em três épocas, o que resulta em áreas de cultivo com cana-planta de 12 meses, cana-planta de 18 meses e a cana de inverno que é realizada de acordo com a disponibilidade de irrigação; sendo todas estas escolhidas de acordo com as características da variedade a ser utilizada (MIRANDA, 2008). De acordo com a escolha da variedade, técnicas empregadas no manejo do solo e irrigação, e as condições climáticas da região, normalmente é possível se obter de três a seis colheitas consecutivas (BOLONHEZI; PEREIRA, 1999).

Nos últimos anos, o cultivo de cana-de-açúcar realizado no estado de São Paulo tem passado por mudanças nas técnicas empregadas no momento da colheita, deixando de ser realizada a queima e passando a ser retirada do campo a cana crua. Tal mudança está ocorrendo devido a lei estadual nº 11.241/2002 que proíbe a queima do canavial pré-colheita, contribuindo assim para a diminuição da emissão de poluentes prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (RIBEIRO; FICARELLI, 2010), desta maneira, grande

parte da colheita tem sido realizado de maneira mecanizada em diferentes regiões do estado.

O cultivo de cana-de-açúcar é uma das principais atividades que impulsionam a economia brasileira, e para alcançar esse patamar, grandes investimentos têm sido empregados no uso de tecnologias para o estabelecimento e condução da cultura, principalmente diante da alta necessidade do mercado mundial por produtos e subprodutos proveniente da cana (SCARPARI; BEAUCLAIR, 2008).

Entretanto, nos últimos anos, o Brasil vem enfrentando diversos fatores que têm afetado a produtividade ao final das safras, sendo um dos mais impactantes a ocorrência de diferentes pragas agrícolas, que ao se estabelecerem no campo comprometem índices quantitativos como TCH (Tonelada de Cana por Hectare) e índices qualitativos como ATR (Açúcar Total Recuperado) (ALMEIDA, 2005). Ainda de acordo com o autor, o aumento das áreas de cultivo tem favorecido o estabelecimento de pragas, pois ocorre uma maior disponibilidade de alimentos para os diferentes organismos.

Além disso, a não realização da queima na pré-colheita resulta na permanência de restos culturais no campo, como por exemplo a palhada, criando assim, um ambiente propício para o aumento e estabelecimento de diferentes populações de pragas de solo (DINARDO-MIRANDA; FRACASSO, 2013), pois estas se abrigam e multiplicam sob a palhada (MUNDIM et al., 2009). De acordo com Dinardo-Miranda (2008), as pragas de solo são consideradas as de mais difícil controle, pois são encontradas protegidas por camadas de solo ou até mesmo no interior das plantas, tornando difícil sua observação em campo e a aplicação de medidas de controle, sendo assim um grupo de pragas que requer atenção.

3.2 *Sphenophorus levis*

Amplamente distribuído em diferentes continentes, o gênero *Sphenophorus* engloba várias espécies responsáveis por atacarem várias culturas de importância econômica, especialmente do grupo das gramíneas. Originário da América do Norte, onde apresenta setenta e cinco espécies, o gênero está inserido dentro da ordem dos coleópteros, que se apresenta como a maior e mais diversificada da Classe Insecta com 357.899 espécies descritas, que correspondem aproximadamente a 70% desses organismos (LAWRENCE; BRITTON 1991, 1994).

O enorme sucesso na diversidade de espécies se dá, segundo diversos autores, devido as asas do tipo élitro, que permitiu que esses insetos explorassem diversos nichos ecológicos e apresenta alimentação diversa (DALY; et. al., 1998).

Com mais de 65.000 espécies descritas divididas em 4.500 gêneros, os Curculionidae, família a qual pertence *S. levis* é a mais diversificada. Na América Central e América do Sul possuem cerca de 9.046 espécies divididas em 1.010 gêneros. No Brasil, este número sofre uma redução para 5.041 espécies divididas em 648 gêneros (LAWRENCE; BRITTON 1991, 1994).

3.3 Distribuição geográfica e dispersão.

Um dos maiores desafios do setor sucroenergético é a mudança na dinâmica de produção de cultivo em relação a ocorrência de pragas e doenças. Aproximadamente 80 pragas já são descritas para cultura da cana-de-açúcar, com destaque para o *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) (GALLO et al., 1978) popularmente chamado de bicudo da cana-de-açúcar.

Encontrado no Brasil, Paraguai e norte da Argentina (ZARBIN et al., 2003), é uma das mais importantes pragas no Brasil, que pode provocar perdas de até 33% na produtividade da safra (Dinardo-Miranda; Fracasso, 2010). Segundo GALLO et al, (1978), a presença de *S. levis* já havia sido registrada em mais de 40 municípios do estado de São Paulo. Estudos conduzidos por Stingel et al. (2010) em canaviais de diversas usinas paulistas, indicaram que a presença do bicudo em 124 municípios do estado de São Paulo, ou seja, a área de maior produção de cana-de-açúcar do país ocorre nas áreas infestadas pela praga, além disso, estimou-se que no ano de 2014 a ocorrência da praga tenha se expandido para mais 60 municípios.

Apesar da vasta distribuição pela América Latina, incluindo os estados de São Paulo, Paraná (PRECETTI; ARIGONI, 1990), Santa Catarina e Minas Gerais (GIOMETTI et al., 2011) e mais recentemente Mato Grosso do Sul (MORAES; ÁVILA, 2013), Mato Grosso e Goiás (GARCIA, 2013), este inseto não apresenta uma dispersão motora a longas distâncias pois sua capacidade de voo é baixa e pouco comum, sendo seu deslocamento realizado somente por caminamento (PRECETTI; ARRIGONI, 1990).

Segundo Precetti e Terán (1983), a dispersão do inseto é de aproximadamente 3 a 5 m por dia, tanto para macho quanto para fêmea. Tais relatos comprovam que a maior distância percorrida e entre talhões vizinhos, indicando que para distribuição geográfica

em larga escala, o transporte de mudas juntamente com as formas biológicas da praga, é de grande relevância pois, segundo Dinardo-Miranda (2000), os insetos podem ser transportados dentro de colmos e depositados no solo, quando o corte e formação de galerias nos primeiros internódios basais. Ainda segundo a autora um fator importante para o controle e diminuição dos problemas fitossanitários da cultura, seria a sanidade dentro dos viveiros de mudas pré-brotadas.

3.4 Bioecologia e Flutuação populacional

Para Degaspari et al. (1987), o ciclo biológico de *S. levis* varia de 58 a 307 dias, com média de 173,4 dias em condições de laboratório. Entre machos e fêmeas a longevidade pode chegar da 247 e 249 dias respectivamente apresentando até 5 gerações em 12 meses. A fêmea do inseto realiza postura dos ovos na parte interna do rizoma através de um orifício feito com o auxílio do rostró, ovipositando em torno de 60 a 70 ovos ao longo do ciclo biológico (PRECETTI; TERÁN, 1983).

Os ovos possuem uma coloração branco-leitosa no momento da postura e quando estão próximos à eclosão das larvas tornam-se amarelo-escuros. O período de incubação está entre 7 e 12 dias (DEGASPARI et al., 1987; PRECETTI; ARIGONI, 1990) (Figura 1).

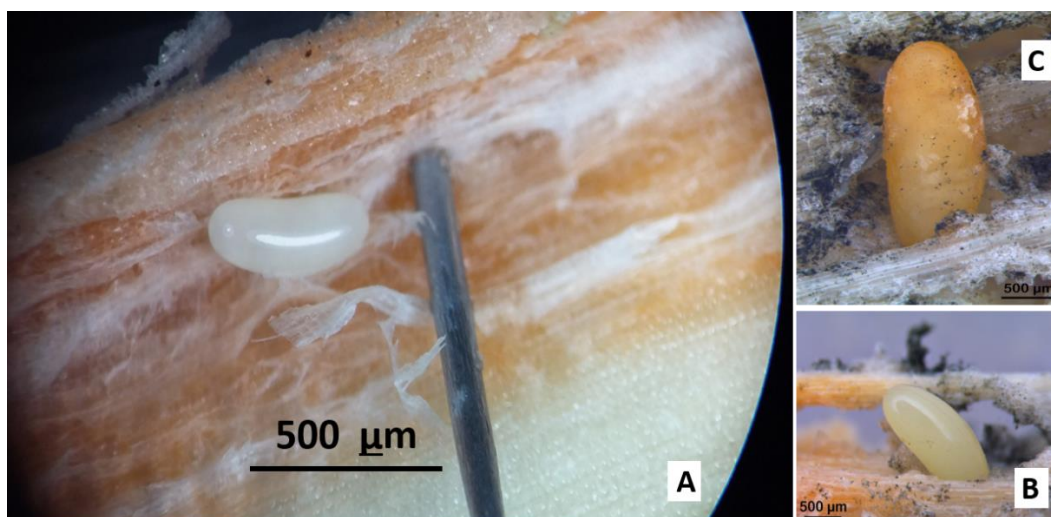


Figura 1. Ovos de *Sphenophorus levis*. (A) Ovo no momento da postura. (B) Ovo com 8 dias de incubação (C) Ovo próximo à eclosão da larva. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A larva apresenta um período de 30 a 60 dias, com aspecto branco leitoso ao eclodir e amarelado com o seu desenvolvimento, cabeça castanho avermelhada, áпода e enrugada, apresenta mancha marrom no primeiro segmento torácico, possui mandíbulas

desenvolvidas e se locomove apoiando nas galerias abertas para se alimentar. Próximo da fase de pupa, a larva amplia a galeria e prepara uma câmara pupal, interrompe seus movimentos e a alimentação (DEGASPARI et al., 1987) Figura 2.

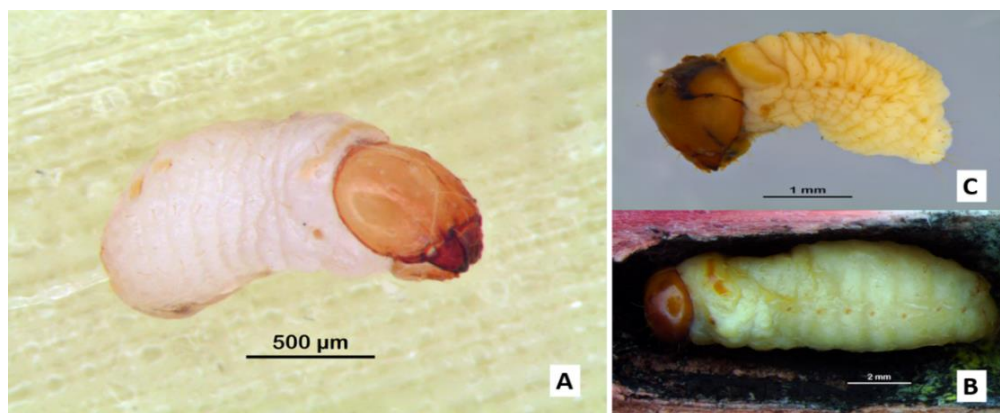


Figura 2. Larvas de *Sphenophorus levis*. (A) Larva com cinco dias eclodida. (B) Larva dentro de galeria no rizoma preparando a câmara pupal (C) Larva ressecada. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

No estágio pupal, logo após sua formação, a coloração é branco-leitosa e torna-se castanha à medida que se aproxima da emergência do adulto, quando adquire uma coloração castanha, podendo ser encontrada em um casulo friável feito com serragem fina. Em condições de laboratório, o período pupal de *S. levis* pode ter uma duração de 5 a 13 dias, com média de 10,5 dias (DEGASPARI et al., 1987), Figura 3.

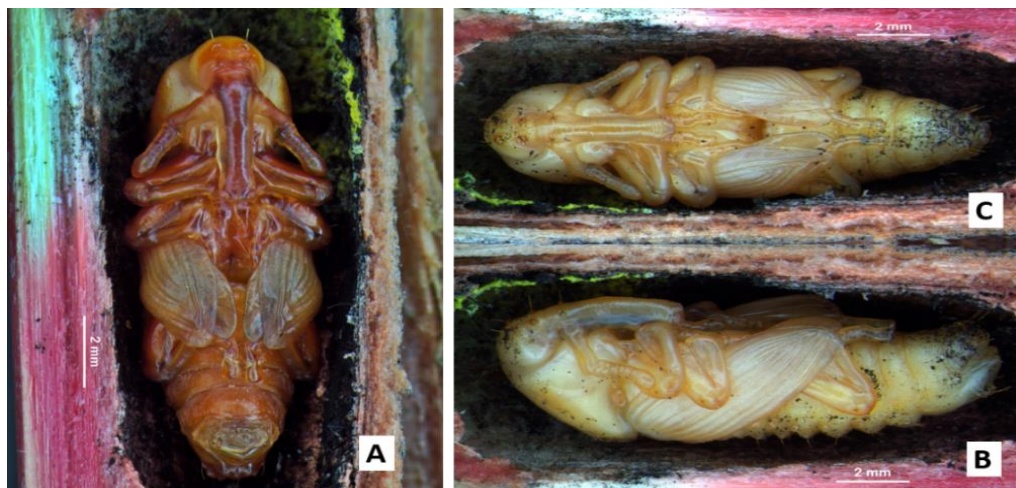


Figura 3. Pupa de *Sphenophorus levis*. (A) Pupa escura ventral. (B) Pupa clara lateral. (C) Pupa clara ventral. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os adultos de *S. levis* apresentam dois picos populacionais no ano, um entre os meses de fevereiro e março, e outro entre os meses de outubro e novembro. Medem de 12 a 15 mm, possuem coloração marrom escuro com manchas pretas sobre o dorso e com a face ventral preta. Porém com hábito noturno, são pouco ágeis e quando tocados, simulam estar mortos (tanatose). Apresentam dimorfismo sexual caracterizado pela

diferença de tamanho corporal e do rostro. Além de menor, os machos possuem a região ventral mais pilosa do que a das fêmeas (PRECETTI; TERAN, 1983).

Em campo, os adultos se encontram abaixo do nível do solo, podendo também permanecer nos restos vegetais ou entre os perfilhos na base da touceira; têm preferência por solos claros, argilosos e com boa umidade (PINTO; et.al, 2016) Figura 4.

Em relação à dispersão no campo, o adulto tem capacidade restrita de voo e pouco comum, apresentando um voo irregular, basicamente o seu deslocamento é realizado por caminhamentos. O deslocamento do macho pode chegar a 3 metros por dia e a fêmea até 5 metros por dia, com capacidade de infestar 167,4 ha/ano (PRECETTI; TERAN, 1983)

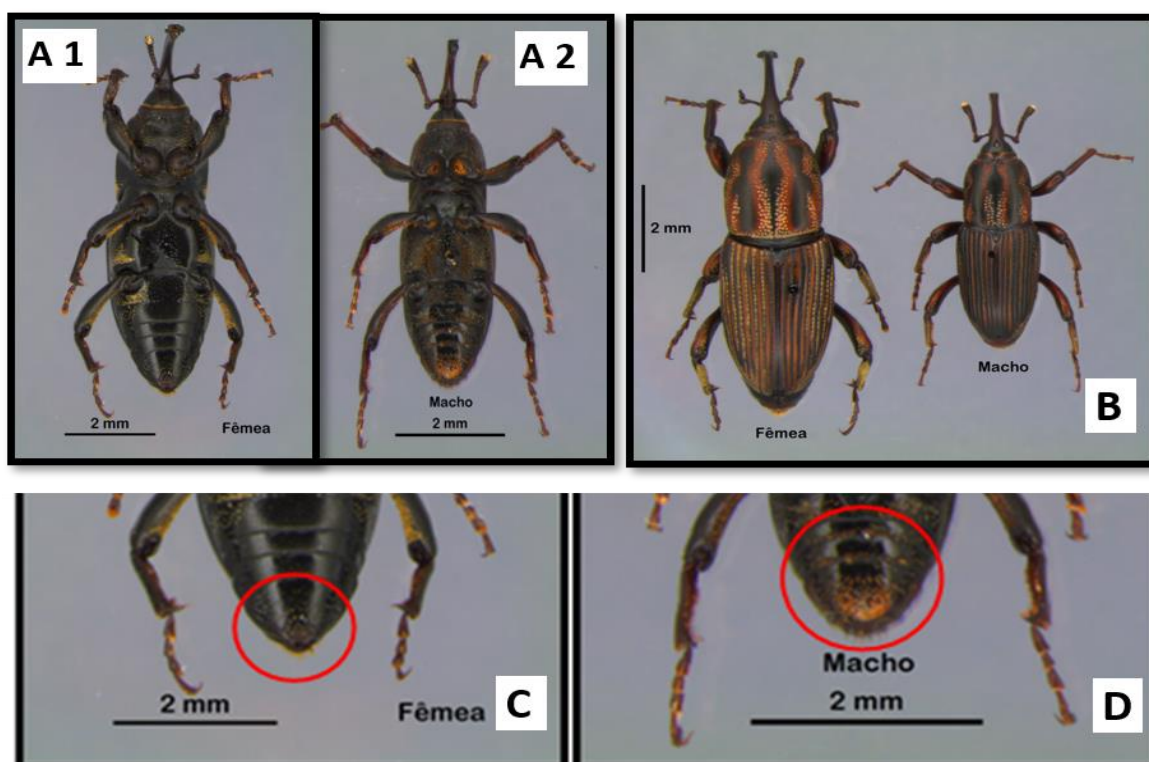


Figura 4. Adulto de *Sphenophorus levis*. (A1) ventral fêmea. (A2) Ventral macho (B) Fêmea e macho. (C) Formato do pigídio fêmea. (D) Formato do pigídio macho. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

O ciclo biológico mostra um período de incubação dos ovos entre 7 e 12 dias até a eclosão da larva, a partir do qual passa a se alimentar formando galerias para locomoção, permanecendo no colmo em média 50 dias, dependendo da variação de temperatura e umidade, já que as mesmas apresentam grande sensibilidade a essas variações (DEGASPARI et al., 1987), Figura 5.

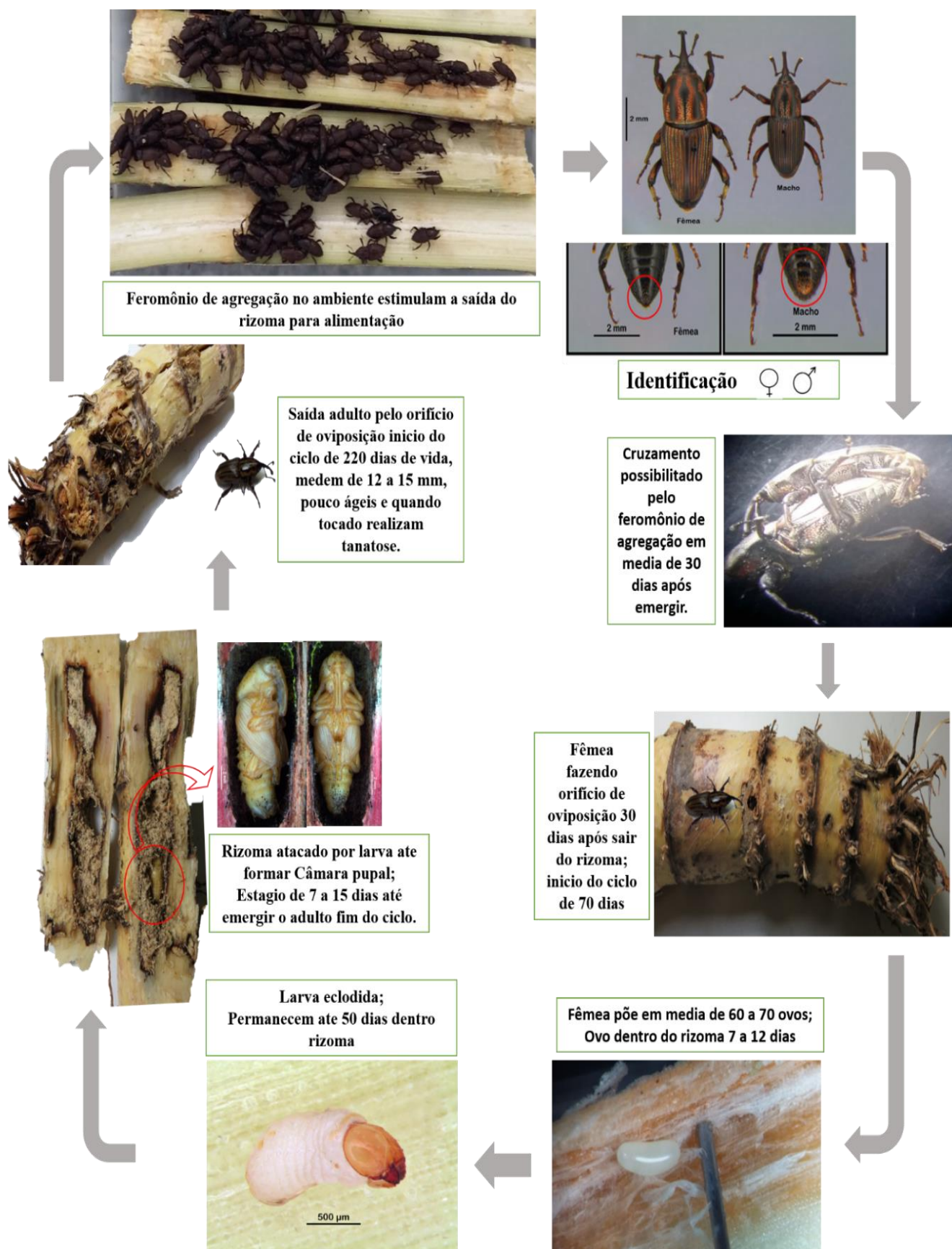


Figura 5. Ciclo biológico de *Sphenophorus levis*.;
Fonte: Elaborado pelo autor

3.5 Monitoramento e medidas de controle

Para o levantamento populacional de larvas, pupas e adultos em uma área com ocorrência da praga, utilizam-se trincheiras de 50 cm² em dois pontos por hectare (ALMEIDA; STINGEL, 2008). O uso de iscas tóxicas, confeccionadas com toletes de cana de 30 cm, rachados ao meio e imersos por 24 horas em solução de inseticida, distribuindo 100 iscas/ha, pode ser empregado para controle de adultos (DEGASPARI et al., 1987; PRECETTI; ARRIGONI, 1990). Porém, devido ao alto custo relacionado a mão de obra as iscas tóxicas com inseticida, muito utilizadas nas décadas de 80 e 90, deixaram de ser usadas e atualmente essa técnica tem sido substituída pelo uso de toletes sem inseticida e empregado para monitoramento da praga (PAVLU, 2012).

Para o controle do inseto algumas medidas são adotadas, como a destruição mecânica da soqueira na época apropriada; a manutenção da área livre de vegetação hospedeira por um período prolongado; e o plantio com aplicação de inseticida registrado (DINARDO-MIRANDA, 2005; DINARDO MIRANDA, 2014). O aumento de novos registros de áreas infestadas, apesar de todas as medidas adotadas, é visível a dificuldade de controle desse inseto, o que demonstra a importância de pesquisas na busca das alternativas mais eficazes (LEITE et al., 2006). A destruição mecânica da soqueira é o método mais utilizado, medida já adotada e relatada por Precetti e Arrigoni (1990), tal prática é utilizada em áreas destinadas a reforma do canavial, com histórico de infestação, e a sua finalidade é destruir larvas e pupas presentes no solo, expor a seus predadores, e causar o secamento dos rizomas.

Apesar do alto custo da operação e aumento do risco de erosão do solo, esta tática de controle é de grande eficiência na redução populacional da praga, e deve ser usada sempre que possível (DINARDO-MIRANDA, 2014). O uso de mudas sadias, a rotação de culturas, evitando gramíneas e em especial milho, manutenção da área livre de plantas hospedeiras e a realização do plantio tardio - ciclo de cana de ano e meio, também são recomendadas (BARRETO-TRIANA, 2009).

O controle biológico com nematoides entomopatogênicos (GIOMETTI, 2009) e fungos (BADILLA; ALVES, 1991) se mostra promissor, mas ainda são necessárias pesquisas que demonstrem resultados de campo eficazes.

3.6 Uso de nematoides entomopatogênicos

A fim de se reduzir ou mesmo controlar as populações de *S. levis* em campo, a busca por novas alternativas que proporcionem um controle mais efetivo se faz necessário diante das atuais medidas de controle utilizadas que não apresentam resultados favoráveis.

O termo entomopatogênico pode ser definido como a capacidade de matar ou causar patologia em insetos, sendo constantemente descrito para organismos que liberam toxinas e outras substâncias com potencial inseticida, sendo que os fungos são as formas de vida mais estudadas e aplicadas atualmente em diferentes condições de campo por apresentarem a produção de diferentes compostos de interesse (ORTIZ-URQUIZA et al., 2010). Entretanto, o uso de nematoides entomopatogênicos (NEPs) apresenta-se como uma alternativa viável e promissora devido ao conjunto de atributos e hábitos peculiares apresentados por estes organismos.

Os Neps são encontrados no solo e possuem a capacidade de infectar diferentes pragas, sendo considerados parasitas obrigatórios de insetos, especialmente os que realizam parte do seu ciclo no solo (DOLINSKI, 2006), sendo os gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis* os mais encontrados no solo provenientes de diferentes regiões ao redor do mundo (HOMINICK, 2002).

No solo, são encontrados na fase de juvenis infectivos (JI), sendo esta forma a responsável pela busca e infecção do hospedeiro (GLAZER, 2002). Os NEPs são atraídos pelas atividades fisiológicas do hospedeiro, como por exemplo, a respiração, devido as diferenças de CO₂ (ZUCKERMAN, JANSSON, 1984; GAUGLER et al., 1989). Após localizar o hospedeiro, os nematoides invadem o corpo do inseto através de aberturas naturais, ou até mesmo pelo rompimento da cutícula, característico para determinados gêneros, alcançando assim a hemocele (FERRAZ, 1998).

Estas formas biológicas (JI), carregam em seu trato digestório, bactérias altamente patogênicas a insetos, do gênero *Photorhabdus* e *Xenorhabdus*, sendo estas específicas para cada espécie de nematoide, indicando uma associação mutualística. Após a penetração do juvenil infectivo no hospedeiro, o mesmo libera as bactérias na hemocele e estas bactérias por sua vez, se multiplicam e colonizam rapidamente o interior do inseto, causando septicemia devido à produção de metabólitos secundários, após um período de

24 a 48 horas (POINAR, 1990). Os JIs então passam a se alimentar dos tecidos do hospedeiro e da bactéria, desenvolvendo-se em adultos no interior do inseto e passando por uma ou mais gerações, dependendo do tamanho do hospedeiro. Após esgotar os nutrientes, os nematoides emergem do cadáver como juvenis infectivos para a procura de novos insetos hospedeiros (FERRAZ, 1998), conforme figura 6.

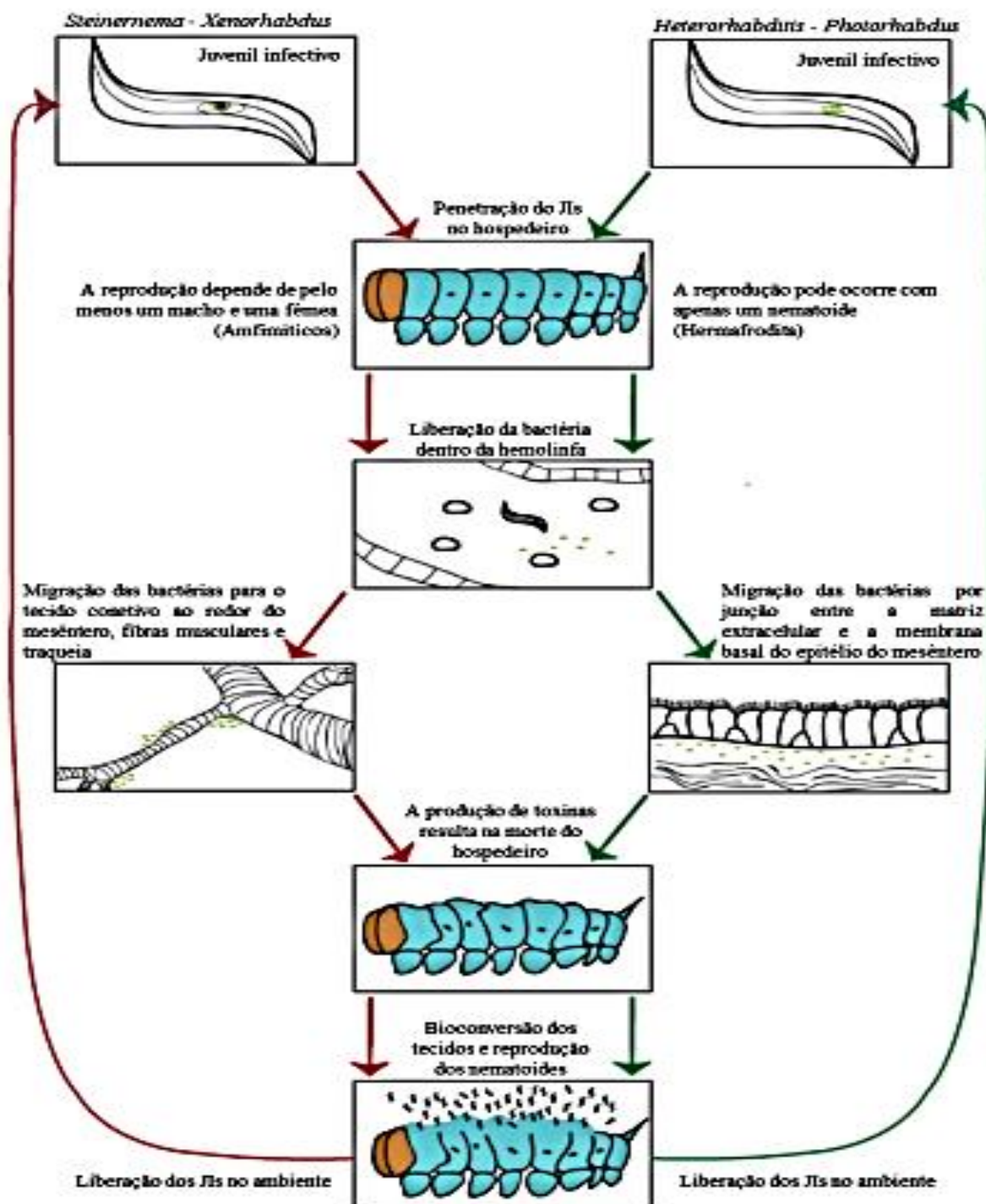


Figura 6. Ciclo de vida de nematoides entomopatogênicos, associados a bactérias simbióticas.
Fonte: (HINCHLIFFE et al., 2010).

Sendo assim, as bactérias são as principais responsáveis pela morte do inseto. Nematoides que apresentam poucas bactérias no interior de seu intestino, ou até mesmo não apresentam, são muitíssimas vezes menos eficientes para ocasionar a morte do seu hospedeiro (HAN ; EHLERS, 2000), indicando assim a importância deste mutualismo para o sucesso do parasita, sendo desta forma capazes de infectar diferentes ordens de insetos e até artrópodes de outras classes, como carrapatos (MONTEIRO et al., 2010).

Diferentes trabalhos já apresentam resultados positivos quanto a utilização de diferentes espécies de nematoides, visando o controle de pragas como: larvas do curculionídeo *Diaprepes abbreviatus* L., 1758, (MCCOY et al., 2000; SHAPIRO-ILAN; MCCOY, 2000) e *Sphenophorus* spp. (SMITH, 1994; SHAPIRO-ILAN et al., 2002). No Brasil já foram descritos os efeitos sobre a broca-do-algodoeiro (*Eutinobothrus brasiliensis*), (POINAR, 1979) e formas biológicas do bicudo-da-cana (*Sphenophorus levis*), (TAVARES et al. 2009; LEITE et al. 2005). Atualmente, diferentes grupos de pesquisa têm se empenhado em encontrar nematoides entomopatogênicos com potencial para utilização na agricultura (LEITE et al., 2005).

Outra característica que tem apresentado grande interesse na utilização destes organismos, é a possibilidade de uso dos nematoides junto a maioria dos produtos químicos aplicados em diferentes áreas de cultivo, apresentando efeitos sinérgicos na mortalidade de insetos. Foi possível observar que uma mistura contendo *Steinernema* sp. com uma concentração de 60 JI/cm² acrescido de 62,5g p.c/ha de fipronil visando o controle de adultos de *S. levis*, apresentou uma taxa de mortalidade igual a 76.6%, sendo estes valores maiores do que os observados quando testados separadamente (TAVARES et al., 2009).

Tais resultados têm despertado o interesse da comunidade científica para a utilização de nematoides entomopatogênicos como agentes de controle biológico de diferentes pragas de solo, principalmente aquelas cujo estágio larvais ocorram no solo (ALMEIDA et al., 2016). A aplicação destes organismos pode apresentar resultados mais favoráveis quanto ao controle de diferentes pragas e colaborar com a redução do uso de agrotóxicos. No entanto, a produção de nematoides ainda é considerada de alto custo o que pode ainda restringir o seu uso a culturas de alto valor comercial (GAUGLER et al., 1989), indicando que são necessários mais estudos com este agente de biocontrole, de modo a tornar este método de controle acessível a todos.

Outro ponto favorável para o emprego de nematoides no controle de pragas do solo é o baixo impacto ecológico que estes podem apresentar, quando comparado com o uso de inseticidas químicos, pois devido a baixa mobilidade dos juvenis infectivos os possíveis impactos negativos ficam limitados a área tratada e dependentes da presença de insetos para continuidade do seu ciclo reprodutivo (ALMEIDA et al., 2016).

Diante destas considerações, a identificação e caracterização de nematoides de ocorrência natural provenientes das áreas de interesse pode se apresentar como promissor devido ao emprego de espécies nativas, favorecendo assim seu potencial de biocontrole e com baixo impacto ecológico sobre a área a ser tratada (TAVARES et al. 2009; LEITE et al. 2005).

4. MATERIAL E MÉTODO

Para o presente estudo, dois experimentos foram realizados de modo a estudar os aspectos comportamentais de *S. levis*; determinar os níveis de danos causados pelo inseto em plantas de cana-de-açúcar; e avaliar a ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos na população de insetos obtidos em áreas de cultivo.

4.1 Avaliação de ocorrência de *Sphenophorus levis* em áreas de cultivo de cana-de-açúcar

A fim de determinar a presença de *S. levis* na área de estudo, duas vezes por semana por um período de nove meses, foram distribuídas 20 iscas formadas por colmo de cana com 30 cm cortados longitudinalmente, sendo cada isca constituída de 2 metades do colmo, colocadas na base das touceiras com a face cortada voltada para o solo e cobertas com palha. As iscas eram mantidas no campo por 3-5 dias, posteriormente, os insetos eram coletados e levados para o Laboratório de Controle Biológico, localizado no Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal (CAPSA) em Campinas- SP, estes eram posteriormente contados, determinado o sexo e mantidos em frascos a 25°C e alimentados por colmos de cana-de-açúcar que eram trocados a cada três dias ficando assim disponíveis para possíveis testes.

4.2 Aspectos comportamentais de *Sphenophorus levis* e danos causados a cana-de-açúcar

O estudo foi realizado em uma área de 10 ha cultivada com cana variedade CTC 4 no segundo/terceiro corte, pertencente à Usina Abengoa Bioenergia, São João da Boa Vista, SP, com o objetivo de conhecer os aspectos comportamentais de *Sphenophorus levis* e os danos causados a cana-de-açúcar. Os aspectos comportamentais e o dano causado pelo inseto foram determinados por meio de observações e avaliações regulares das plantas de cana-de-açúcar, coletadas ao longo dos 56 dias finais antes da colheita da cana (05 de junho a 30 de julho de 2018), e ao longo dos 35 dias iniciais pós-colheita (15 de agosto à 19 de setembro de 2018).

Antes da colheita, foram realizadas 12 coletas e em cada coleta foram retiradas aleatoriamente 6 touceiras distanciadas em 15-25 m uma da outra. As touceiras foram colocadas em sacos plásticos de 100 litros e transportadas ao laboratório para avaliação. No momento da coleta, a parte apical das plantas era desprezada no ponto de ligação do último internódio com a folha cartucho da cana-de-açúcar.

No laboratório, os colmos foram separados dos rizomas, sendo cortados 2 cm acima do nível da superfície do solo. Antes de serem cortados, os colmos e seus respectivos rizomas foram envoltos por fita crepe e marcados com números iguais para identificação e correlação. Os colmos foram então pesados individualmente.

Posteriormente, o rizoma de cada touceira foi lavado para eliminação de todo o resíduo de solo e matéria orgânica, e as radículas foram cortadas para melhor visualização dos orifícios de oviposição e possível saída dos insetos. Finalmente, os rizomas foram cortados longitudinalmente em 4 segmentos e avaliados com base na presença de galerias causadas por *S. levis* no interior do rizoma.

Após a constatação da galeria foi determinada a presença de larvas, pupas e adultos; presença dos orifícios de entrada e saída causados pelo inseto; diâmetros desses orifícios; e suas localizações acima ou abaixo do nível do solo. As localizações dos orifícios nos rizomas foram determinadas com base nas suas distâncias a partir da superfície do solo, podendo ser acima ou abaixo. Os diâmetros dos furos foram determinados em milímetros com auxílio de paquímetro.

Após a colheita da cana (30/07/2018), as coletas continuaram por mais 35 dias com o objetivo de avaliar o efeito dos danos causados pelo *S. levis* na emissão de brotos pelo rizoma. Nesse período, foram realizadas 10 coletas e em cada coleta foram retiradas 12

touceiras sem as partes aéreas que foram colhidas, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. Essas touceiras foram ensacadas e levadas ao laboratório onde foram avaliadas quanto à presença de galerias causadas pelo bicudo nos rizomas e quanto ao número de brotos emitidos no rizoma.

Os resultados foram apresentados com base nas seguintes frequências e correlações:

- Frequências dos orifícios causados pelo *S. levis* nos rizomas da cana, com diferentes diâmetros de aberturas; figura 7.
- Frequências dos orifícios causados pelo *S. levis* nos rizomas da cana, em diferentes distâncias a partir da superfície do solo; figura 10.
- Porcentagens de rizomas atacados por *S. levis* em relação aos diâmetros dos rizomas da touceira de cana; figura 11.
- Porcentagens de rizomas atacados por *S. levis* em relação aos comprimentos dos rizomas da touceira de cana; figura 12.
- Peso dos colmos em relação às porcentagens de rizomas atacados por *S. levis* na touceira de cana; figura 13.
- Números de brotos emitidos por rizoma em relação as porcentagens de rizomas atacados por *S. levis* na touceira de cana. figura 14.

4.3 Ocorrência natural de nematoides entomopatogenico na população do inseto

Esse estudo teve por objetivo avaliar a ocorrência natural de nematoides entomopatogênicos na população de *S. levis* em campo comercial de cana-de-açúcar, porém, restrito aos indivíduos encontrados dentro dos rizomas das touceiras de cana. O estudo foi realizado na usina Abengoa, em uma área cultivada com a variedade CTC 4, usada para despejo de vinhaça. Foram coletadas 55 toucerias ao longo de uma semana (11 a 18 de setembro de 2017). Essas touceiras foram separadas da parte aérea da planta e levadas ao laboratório. No laboratório, rizomas novos (das plantas coletadas no campo) e velhos (das plantas da safra anterior) foram cortados longitudinalmente para avaliação quanto à presença de danos pelo bicudo e formas biológicas (larvas, pupas e adultos) vivas e mortas por nematoide.

Quando encontrados larvas, pupas e adultos mortos, esses eram transferidos para armadilha de White visando à confirmação da causa morte do inseto, eram coletados os

nematoides emergidos, caso pertencentes ao grupo dos entomopatogênicos, seguido do seu armazenamento no banco de nematoides e identificação.

4.4 Caracterização molecular

A extração de DNA dos nematoides foi realizada pelo método do fenol-clorofórmio descrito por Wood (1988). A reação de PCR foi realizada com os iniciadores 502F (5'-CAAGTACCGTGAGGGAAAGTTGC-3') e 536R (5'-CAGCTATCCTGAGGAAAC-3') para o gene ribossomal 28S (NGUYEN et al. 2007), e AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') e TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') para a região ITS (internal transcribed spacer) (JOYCE et al. 1994). Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ e RIESNER, 2006), submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS) e analisados em sequenciador capilar automático 3500 xL (APPLIED BIOSYSTEMS). Árvores filogenéticas, comparando as sequências obtidas com outras semelhantes depositadas no GenBank, foram construídas pelo método de máxima verossimilhança (MAXIMUM LIKELIHOOD) com o modelo de substituição nucleotídica de Hasegawa-Kishino-Yano, utilizando-se o programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

4.5 Teste de hibridação cruzada

A compatibilidade reprodutiva de *Steinernema* n. sp. (ILN 1) com *S. carpocapsae* foi testada pelo o método relatado por Nguyen e Duncan (2002), utilizando a hemolinfa de *Galleria mellonella* L.

4.6 Análise estatística

As frequências dos diâmetros e das distâncias dos orifícios nos rizomas foram transformadas em Arcoseno $\sqrt{\text{proporção}}$ e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 %, utilizando o programa computacional SPSS 16.0. Para isso, cada touceira de cada levantamento foi considerada como uma repetição, totalizando seis repetições por levantamento em 12 levantamentos.

Para os parâmetros relacionados com as porcentagens de rizomas atacados, foram estabelecidas correlações lineares, incluindo o valor do coeficiente de determinação (R^2), para indicar o grau de ajuste da regressão aos valores observados.

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos comportamentais de *Sphenophorus levis* e danos causados a cana-de-açúcar

Na área experimental, uma alta incidência de adultos do bicudo foi constatada no campo antes do início dos estudos, o que contribuiu para os altos índices médios de danos causados pelo inseto nos rizomas em cada levantamento, variando de 8,4% a 42,3% (média de 22,4%) nos 12 levantamentos realizados antes da colheita da cana (5 de junho a 30 de julho de 2018), e de 32,2% a 61,0% (média de 43,6%) nos 10 levantamentos realizados após a colheita (15 de agosto a 19 de setembro de 2018). Nenhuma outra espécie de inseto foi encontrada broqueando os rizomas das plantas de cana.

Todos os rizomas atacados pelo bicudo tinham pelo menos um orifício ligando a galeria interna no rizoma à parte externa da planta. A maioria dos orifícios encontrados apresentaram diâmetros inferiores a 6 mm, sendo 33,7% com 0-2 mm; 26,9% com 2-4 mm; e 25,9% com 4-6 mm, todos diferindo significativamente daqueles orifícios com diâmetros maiores, exceto para aqueles com 4-6 mm em relação aqueles com 6-8 mm ($F=9,22$; g.l.= $P<0,001$) (Figura 17). Os orifícios menores, com média de 2,5 mm ($n=44$), estiveram presentes em rizomas contendo o inseto na fase larval, indicando ser deixado pelo adulto na oviposição ou pela larva após a sua eclosão. Os orifícios maiores, com média de 4,2 mm ($n=10$) e 5,2 mm ($n=14$), foram encontrados em todos os rizomas contendo pupa e adultos recém emergidos do inseto, respectivamente, indicando terem sido realizados pelas larvas antes de empuparem para facilitar a saída dos adultos.

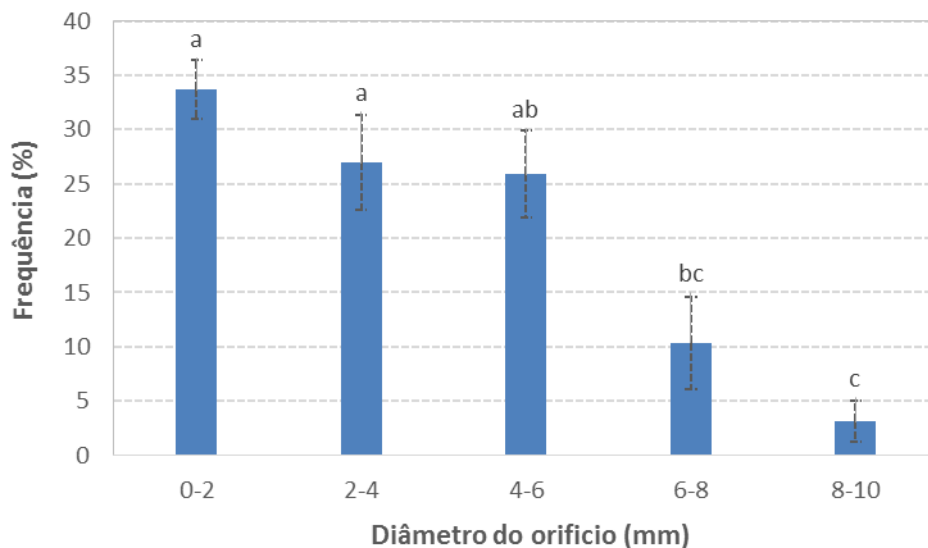


Figura 7. Frequências dos orifícios causados pelo *Sphenophorus levis* nos rizomas, com diferentes diâmetros (cm) de aberturas.

Todos os rizomas avaliados apresentavam pelo menos um orifício ligado à galeria interna, figura 8 (A e B), sugerindo ser uma possível abertura deixada pelo inseto após a oviposição, já que mesmo as galerias que apresentavam o inseto na fase larval e pupal ainda apresentavam orifícios com as mesmas características.

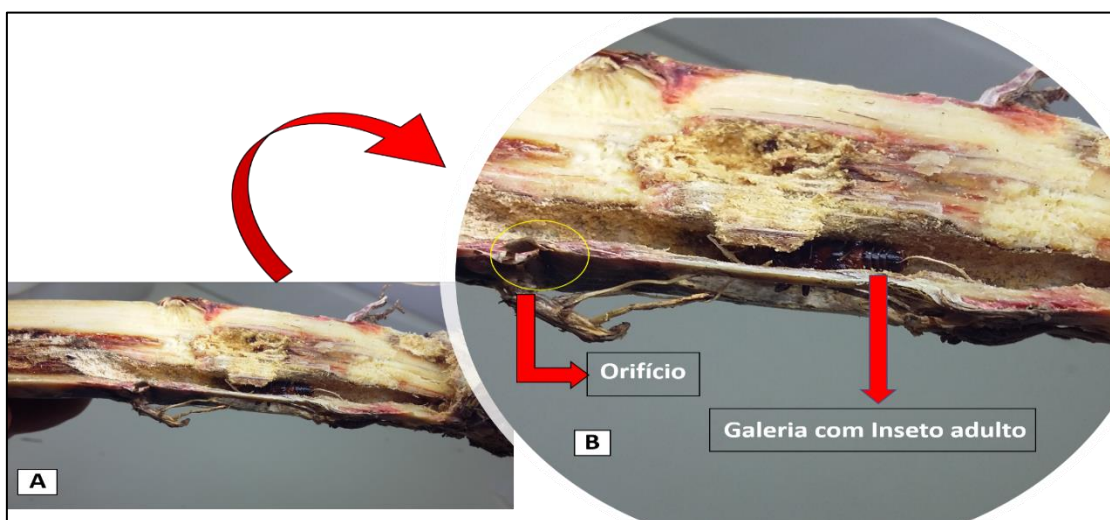


Figura 8. A) Rizoma aberto longitudinalmente mostrando duas galerias e inseto adulto de *S. levis*. (B) Orifício ligado a galeria interna com inseto adulto de *S. levis*. **Fonte:** Elaborado pelo autor

Orifícios maiores foram encontrados em todos os rizomas que continham pupa do inseto, sugerindo terem sido realizados pelas larvas antes de empuparem para facilitar a saída dos adultos, conforme figura 9 (A e B).



Figura 9. (A) Rizoma indicando orifício maior. (B) Rizoma indicando orifício menor. **Fonte:** Elaborado pelo autor

Quase 90% dos orifícios construídos pelo inseto foram realizados no rizoma abaixo da superfície do solo, ocorrendo maior concentração no segmento com até 2 cm de profundidade (35,23%), o qual diferiu significativamente dos demais segmentos do rizoma ($F=6,63$; g.l.= $P<0,001$) (Figura 10).

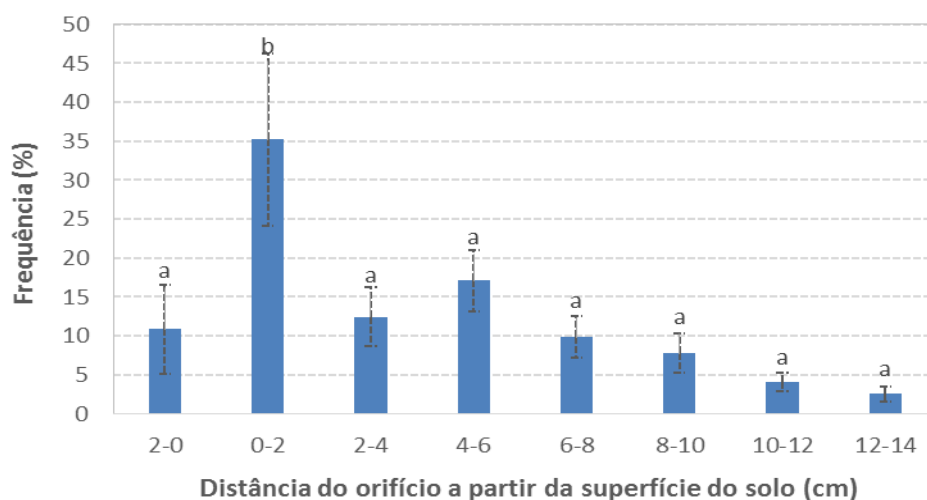


Figura 10. Frequências dos orifícios causados pelo *Sphenophorus levis* nos rizomas da cana, em diferentes distâncias a partir da superfície do solo, acima (2-0 cm) e abaixo (0-14 cm) da superfície.

Antes da colheita da cana, os índices de dano nos rizomas das touceiras apresentaram correlação positiva com o diâmetro e comprimento desta parte da planta (Figura 11 e 12), porém, correlação negativa com o peso dos colmos, havendo uma

redução de 0,318% para cada 1% de rizomas atacados conforme cálculo usando a equação de reta $y = -0,00325x + 10215$, $R^2 = 0,4703$ (Figura 13).

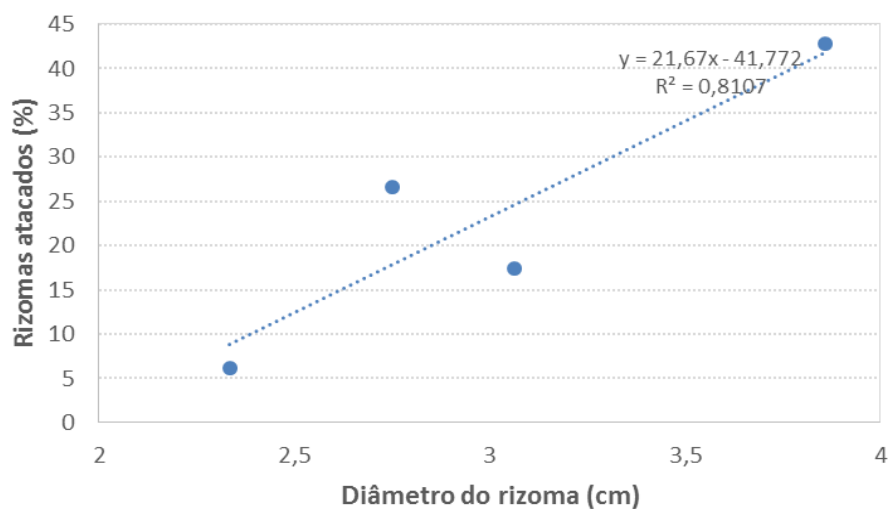


Figura 11. Porcentagens de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* em relação aos diâmetros dos rizomas da touceira de cana-de-açúcar.

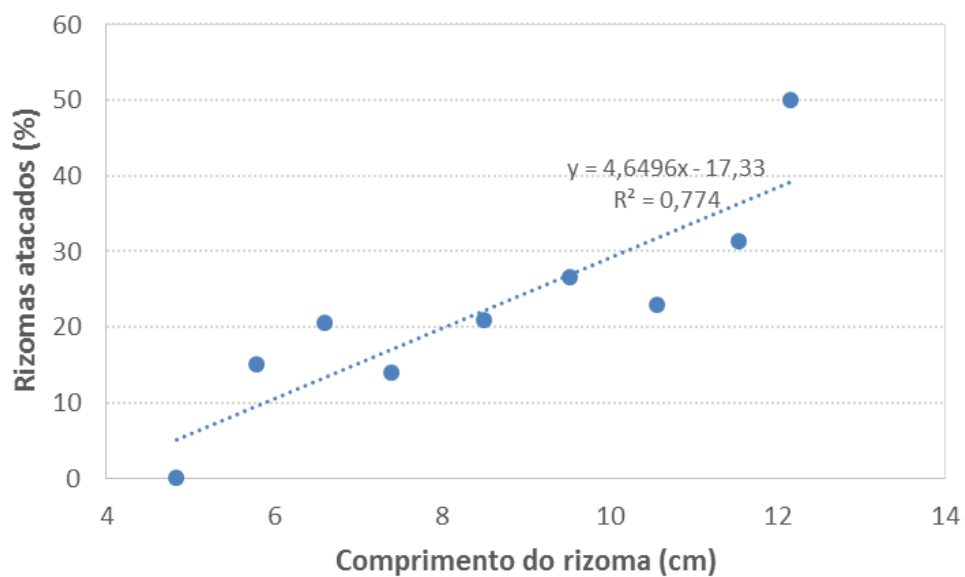


Figura 12. Porcentagens de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* em relação aos comprimentos dos rizomas da touceira de cana-de-açúcar.

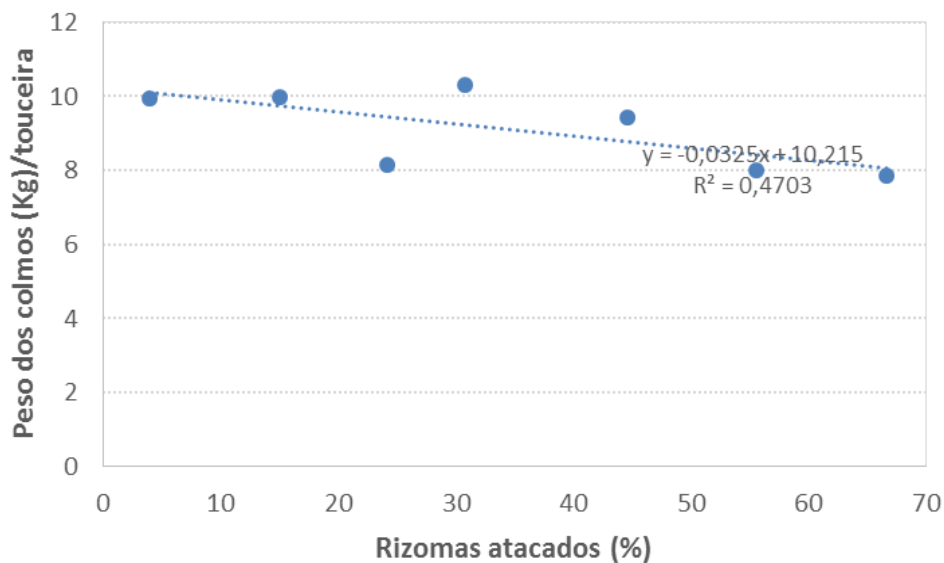


Figura 13. Pesos de colmos (Kg) em relação a porcentagem de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* da touceira de cana-de-açúcar.

Após a colheita da cana, os índices de dano nos rizomas velhos (das plantas da safra anterior) apresentaram correlação negativa também com número de brotos gerados por rizoma, havendo uma redução na brotação de 0,68% para cada 1% de tocos atacados conforme calculo usando a equação da reta $y = -0,0189x + 3,1559$, $R^2=0,8617$ (Figura 14).

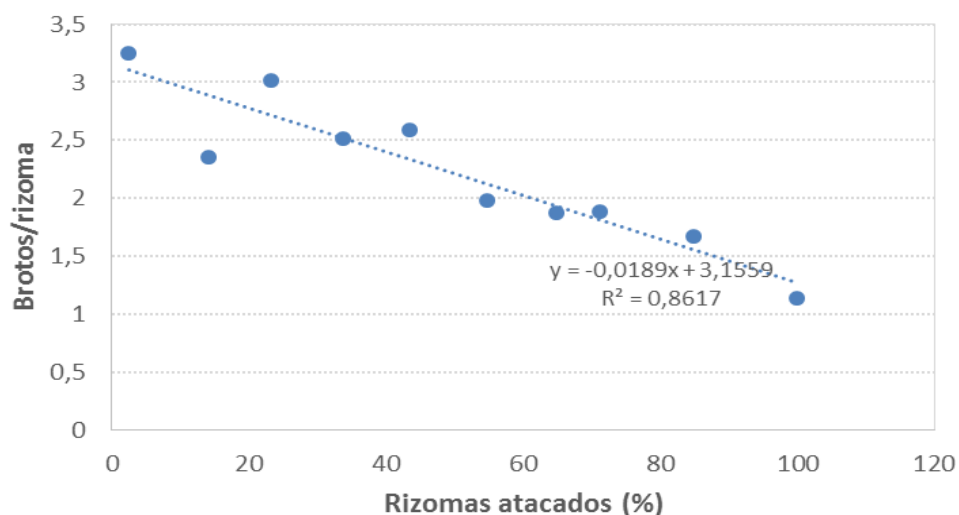


Figura 14. Números de brotos emitidos por rizoma em relação a porcentagem de rizomas atacados por *Sphenophorus levis* da touceira de cana-de-açúcar.

5.2 Ocorrência natural de nematoides

Em outra área de cana-de-açúcar da Usina Abengoa, foi avaliada a ocorrência natural de NEPs na população de *S. levis* em campo comercial de cana de açúcar, porém restrito aos indivíduos encontrados dentro dos rizomas das touceiras de cana. As touceiras avaliadas apresentaram 66,1 % e 68,3% de danos para os respectivos rizomas novos (das plantas coletadas no campo) e velhos (das plantas da safra anterior) encontrados em cada touceira. Dos insetos encontrados nos rizomas novos, 21% das larvas (n=12), 40% das pupas (n=10) e 20% dos adultos (n=10) estavam infectados por nematoides entomopatogênicos, enquanto que nos rizomas velhos esses índices foram de 18% para larvas (n=11), aumentando para 60% e 40% para pupas (n=5) e adultos (n=10), respectivamente Figura 15(A e B).

O sequenciamento de parte do gene ribossomal 28S e da região ITS dos nematoides encontrados no presente estudo indicaram similaridade com as espécies *Steinernema carpocapsae* e *Steinernema websteri*. Para o gene 28S, a identidade foi de 99,4% (*S. carpocapsae* UNPR73, GenBank MH231233 e *S. websteri* Alcazar, GenBank GU569058) e para a região ITS foi de 98,8% (*S. carpocapsae* Az20, GenBank GQ421607) (figuras 16 e 17). Não há sequências da região ITS da espécie *S. websteri* disponíveis no GenBank, portanto não foi possível realizar esta comparação. De acordo com Hunt e Nguyen (2016), a espécie *S. websteri* Cutler & Stock, 2003 é considerada como sinônimo júnior de *S. carpocapsae* segundo figura 16 e 17.

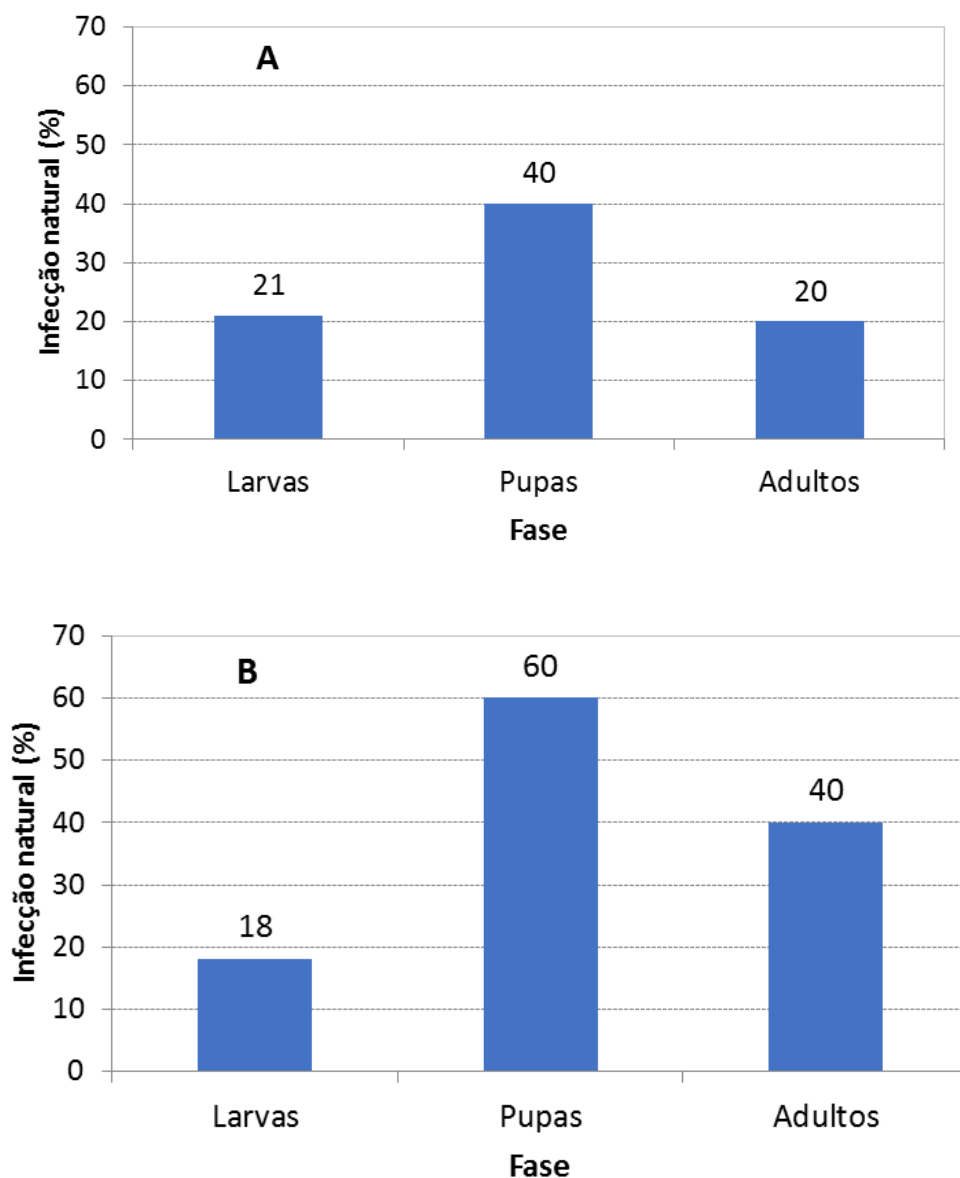
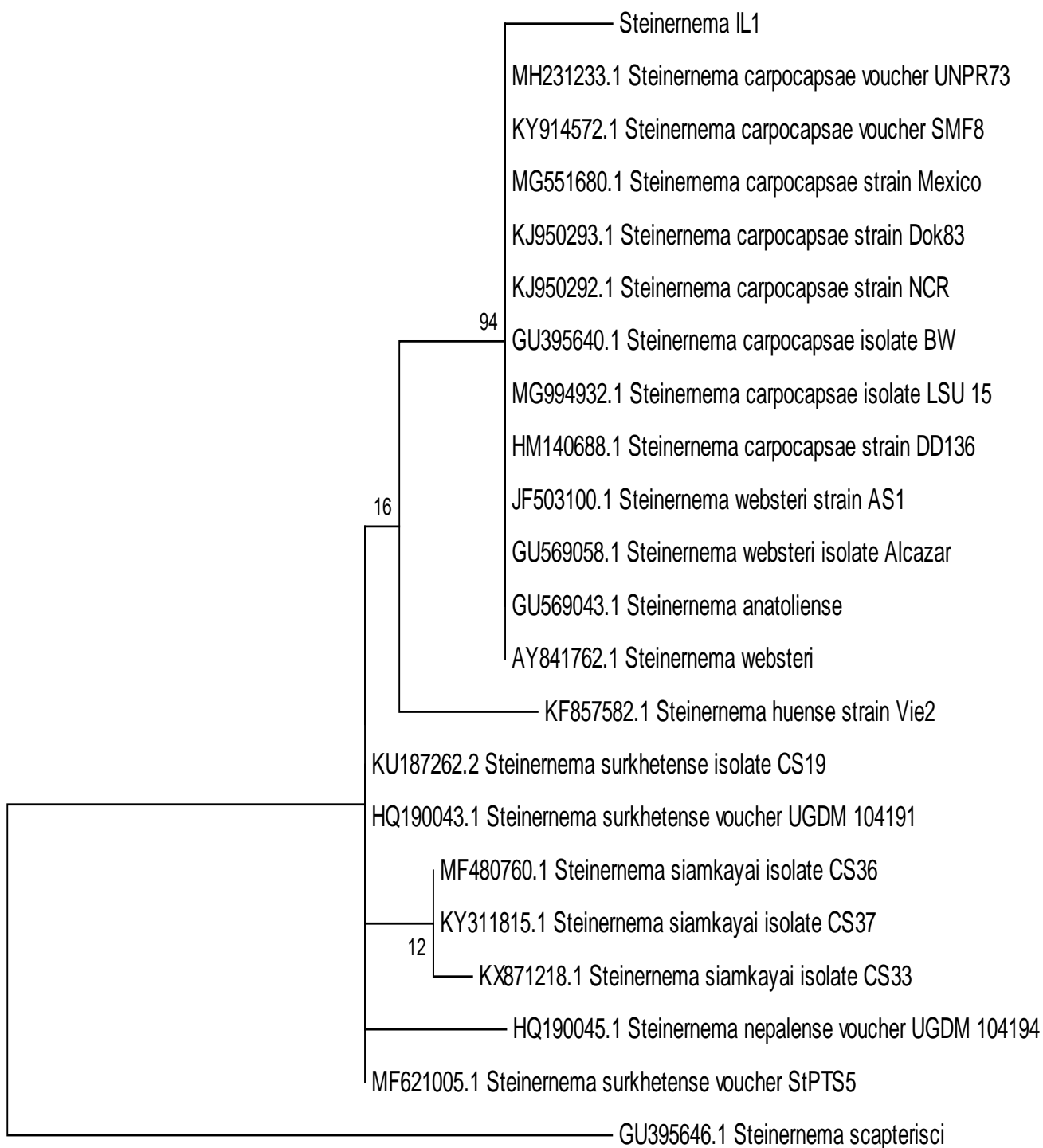


Figura 15. Incidência natural de nematoide entomopatogênico na população de larvas, pupas e adultos de *Sphenophorus levis* dentro dos rizomas novos (A) e velhos (B) da cana-de-açúcar.

5.3 Teste de hibridização cruzada

O teste de hibridização cruzada (cross hybridization test) desse nematoide com a espécie *S. carpocapsae* armazenada no banco de NEPs do Instituto Biológico não apresentou cruzamento, indicando pertencer a uma nova espécie, sendo denominado *Steinernema* sp. IL 1.



0.005

Figura 16. Árvore filogenética construída com sequências do gene ribossomal 28S de *Steinerema* IL1 e de espécies relacionadas presentes no GenBank. A árvore foi construída pelo método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1000 replicações. Os valores de bootstrap, em porcentagem, aparecem junto aos ramos da árvore

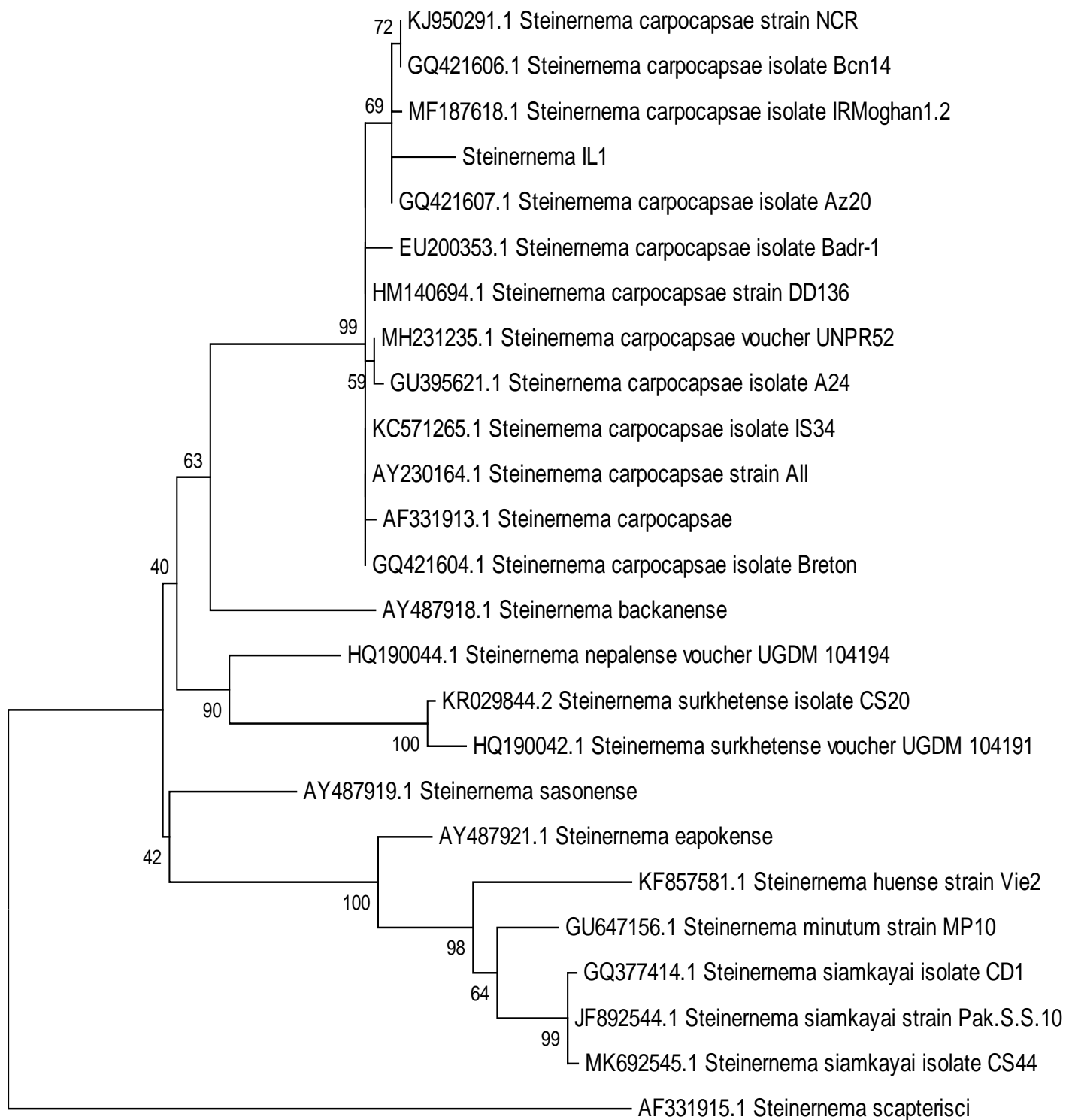


Figura 17. Árvore filogenética construída com sequências da região ITS de *Steinerema* IL1 e de espécies relacionadas presentes no GenBank. A árvore foi construída pelo método de máxima verossimilhança com bootstrap de 1000 replicações. Os valores de bootstrap, em porcentagem, aparecem junto aos ramos da árvore.

6. DISCUSSÃO

Todos os rizomas atacados pelo bicudo tinham pelo menos um orifício ligando a galeria interna no rizoma a parte externa da planta, sugerindo ser abertura deixada pelo inseto para oviposição, penetração das larvas ou saída dos adultos. Esses orifícios apresentavam-se preenchidos com solo ou serragem fina deixada pelas larvas, dificultando ou impedindo a entrada de inimigos naturais como formigas da espécie *Solenopsis invica*, bastante comuns nos canaviais (ROSSI & FOWLER, 2000). Segundo Dinardo-Miranda (2018), as galerias deixadas pelas larvas do bicudo são preenchidas com serragem fina resultante da sua alimentação, conforme o inseto e adentra no rizoma.

De acordo com a distribuição desses orifícios no rizoma da planta, nota-se maior preferência do inseto para oviposição ou para saída do adulto, pela parte do rizoma abaixo da superfície do solo já que 89,11% dos orifícios foram realizados nessa região. Abaixo da superfície do solo, o segmento do rizoma preferido pelo inseto para oviposição ou saída do adulto foi o segmento com até 2 cm de profundidade que compreende parte do colo da planta, apresentando a maior concentração de orifícios (35,23%). Segundo Koppenhöfer (1993), o curculionídeo *Cosmopolites sordidus* prefere ovipositar na região do colo da bananeira, sendo 78% dos ovos colocados no rizoma e 22% na base do pseudocaule. Os curculionídeos do gênero *Sphenophorus*, importante pragas de gramado, milho, arroz e outras gramíneas nos EUA, colocam seus ovos também no colo da planta, no nível do solo ou abaixo do nível, e as larvas broqueiam internamente descendo em direção ao rizoma. As larvas, quando maiores, podem deixar as plantas para permanecerem no solo onde se alimentam do colo, rizoma, radículas e esporões das plantas, até empuparem. (VITTUM et al. 1999; RICHMOND 2016).

Os orifícios encontrados acima da superfície do solo (10,8%) indicam que uma pequena parte da população do inseto pode alcançar o colmo e ser disseminado através dos toletes usado no plantio. Segundo De Gaspari et al. (1987), a dispersão da praga a longas distâncias ocorreu principalmente por meio de mudas retiradas de local infestado, já que os adultos voam muito pouco (raramente são vistos voando), e têm capacidade de dispersão pelo solo de cerca de 9,6 m por mês. Embora Precetti e Terán, (1983) tenham estimado que a dispersão de adultos possa ser maior, de 3 m por dia para machos e de 5 m por dia para fêmeas, a dispersão de adultos pelo solo é ainda assim, bastante lenta, o que explica a dispersão do inseto somente de um talhão para talhões vizinhos. As mudas podem transportar larvas e pupas no interior dos colmos, visto que em alguns casos as

galerias podem atingir os primeiros entrenós basais, e também podem transportar adultos entre os colmos depositados no solo, após o corte (DINARDO-MIRANDA, 2018).

Os danos causados pelo bicudo nos rizomas apresentaram uma correlação positiva com o diâmetro e comprimento desta parte da planta (Figuras 11 e 12), sendo uma provável explicação para isso o acúmulo de danos nas plantas mais velhas e maiores, ocorridos ao longo do seu desenvolvimento, já que as galerias apresentavam diferentes estágios de desenvolvimento, com a presença ou não do inseto. O bicudo pode atacar as plantas de cana já a partir do seu brotamento (DINARDO-MIRANDA, 2018), aumentando em população e gerando maiores danos na cana a medida que o canavial envelhece (DINARDO-MIRANDA, 2014; IZEPPI, 2015). Portanto, o estabelecimento do inseto no campo tem total relação com a idade do canavial.

Para cada 1% de rizomas atacados pelo inseto, houve redução de 0,318% no peso de colmos antes da colheita, e de 0,68% no número de brotos gerados por rizoma após a colheita dos colmos, o que resultou em um total de perda de 0,917% a partir do primeiro corte. Essa perda de 0,9% encontra-se dentro da faixa de redução da produtividade de colmos determinada em experimentos conduzidos em soqueiras infestadas, que foi de 0,6 a 1% para cada 1% de colmos atacados ou internódios basais danificados (1% de rizomas danificados), segundo Dinardo-Miranda (2018).

O inseto pode causar reduções de produção ainda maiores se atacar a planta nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, podendo causar até mesmo a sua morte se atacarem os perfilhos novos. Segundo Dinardo (2018), ataques do inseto podem causar amarelecimento de folhas, seca e morte de perfilhos, que podem ser facilmente destacados da touceira. Quando há infestações severas, a touceira toda seca e morre, e são observadas muitas falhas na rebrota, reduzindo drasticamente a produtividade e a longevidade do canavial. Embora as populações geralmente sejam mais elevadas em canaviais mais velhos (socas), o ataque pode ocorrer já na cana-planta, com acentuada destruição dos perfilhos.

As informações obtidas no presente estudo podem contribuir para o estabelecimento do nível de controle que ainda não está bem definido. Atualmente, devido aos danos causados pela praga e à baixa eficiência das medidas de controle, estas são adotadas em praticamente todo plantio feito em áreas onde formas biológicas do inseto e/ou seus danos tenham sido registrados. Obviamente, além do nível de dano na área, o estado geral do canavial também deve ser considerado quando se pretende adotar medidas de controle em soqueira: em canaviais com muitas falhas, mato e estimativa de

baixa produtividade, dificilmente o tratamento na soqueira dará retorno econômico (DINARDO-MIRANDA, 2018).

A colheita de cana crua é outro fator que tem interferido significativamente nas populações de *S. levis*. De acordo com Dinardo-Miranda e Fracasso (2013), quando se colhia cana queimada, muitos adultos da praga morriam por causa do fogo. Com a colheita de cana crua, além de não haver morte de adultos pelo fogo, a palha em campos serve de abrigo. Outrossim, a presença de palha contribui para manter a umidade do solo e a temperatura mais amena, condições mais favoráveis ao inseto. Assim, com a cana crua, as populações aumentam rapidamente e, em algumas regiões, os canaviais estão sendo dizimados após um ou dois cortes, como relatado por Dinardo-Miranda (2000; 2011) e Arrigoni (2011).

A maior incidência do nematoide na fase de pupa do inseto (60%) em comparação a fase de larva (40%) pode ter sido possibilitado pelas maiores aberturas deixadas pelas larvas antes de empuparem visando permitir a saída dos adultos, facilitando a entrada dos juvenis infectivos e alcance das pupas, já que ambas as fases de larva e pupa são bem suscetíveis (SMITH 2005; TAVARES et al., 2007, GIOMETTI et al., 2011). A menor incidência em adultos recém emergidos deve-se provavelmente à maior resistência dos adultos em relação às pupas, já que os orifícios relacionados a presença de ambas as fases nos rizomas tiveram diâmetros médios mais próximos entre si (5,2 e 4,2 mm, respectivamente) comparados ao diâmetro médio dos orifícios relacionados à presença das larvas (2,5 mm).

Esse estudo evidencia a capacidade dos NEPs de entrarem no rizoma pelas aberturas deixadas pelos insetos, e de alcançarem as larvas, pupas e adultos, mesmo havendo preenchimento dessas aberturas com solo ou serragem. No período do estudo (setembro), o nematoide nativo foi favorecido pela presença de umidade no solo decorrente de aplicações de vinhaça nos dois meses anteriores, pela presença de palha cobrindo o solo, e pelas maiores populações de larvas e pupas. Segundo Precetti e Arrigoni (1990), as larvas foram mais abundantes na época seca do ano, com pico populacional em junho-julho e um pico menor em dezembro. Conseqüentemente, os picos populacionais de pupas ocorreram em dezembro-janeiro e outro em agosto-setembro, enquanto em adultos o pico foi menor em outubro-novembro e um pico principal em março.

Considerando que as larvas e pupas ocorrem em maiores densidades no período seco, pode-se sugerir a aplicação do NEP junto com a vinhaça ou com a água residuária, ou logo após as aplicações dos resíduos. A aplicação da vinhaça exerce grande influência

positiva sobre as populações de *S. levis*. As razões não estão bem claras, mas, provavelmente, o aumento de umidade no solo, decorrente das aplicações de vinhaça, deve exercer papel importante na sobrevivência do inseto e em suas populações (DINARDO-MIRANDA, 2018). Além disso, os voláteis liberados pela vinhaça são bastante atrativos para os adultos (MARTINS, 2017). Assim, a vinhaça pode servir de atrativo para o inseto e fornecer condições favoráveis para a atuação do NEP.

7. CONCLUSÕES

- Todos os rizomas atacados pelo bicudo tinham pelo menos um orifício externo ligado a galeria interna no rizoma, indicando ser abertura deixada pelo inseto para sua entrada como larva ou saída como adulto.
- Os orifícios menores estiveram presentes em rizomas contendo o inseto na fase larval, indicando ser deixado pelo adulto na oviposição ou pela larva após a sua eclosão.
- Orifícios maiores foram encontrados em todos os rizomas contendo pupa e adultos recém emergidos do inseto, respectivamente, indicando terem sido realizados pelas larvas antes de empuparem para facilitar a saída dos adultos.
- Quase 90% dos orifícios foram realizados abaixo da superfície do solo.
- Os danos causados pelo bicudo nos rizomas das touceiras apresentaram uma correlação positiva com o diâmetro e comprimento desta parte da planta.
- Os danos causados pelo bicudo nos rizomas das touceiras apresentaram uma correlação negativa com o peso dos seus colmos e com o número de brotos emitidos pelos seus rizomas após a colheita.
- **Para cada 1% de rizomas atacados pelo inseto, houve redução de:**
0,318% no peso de colmos antes da colheita
0,68% no número de brotos gerados por rizoma após a colheita dos colmos,
O que resultou em perda total de 0,917% a partir do primeiro corte.
- Nematoides entomopatogênicos podem penetrar nos orifícios deixados pelo bicudo nos rizomas da cana, e alcançar as fases imaturas e adultos recém emergidos dentro dos rizomas, apresentando-se como importantes inimigos naturais dessas fases do inseto.

- O gene ribossomal 28S e da região ITS dos nematoides *Steinernema* sp. IL1 indicaram similaridade de 99,4% com as espécies *Steinernema carpocapsae* e *Steinernema websteri* e para a região ITS foi de 98,8% (*S. carpocapsae* Az20)
- Não há sequências da região ITS da espécie *S. websteri* disponíveis no GenBank, portanto não foi possível realizar esta comparação. De acordo com Hunt & Nguyen (2016), a espécie *S. websteri* Cutler & Stock, 2003 é considerada como sinônimo júnior de *S. carpocapsae*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. C. Bicudo da cana-de-açúcar: boletim técnico C.T.C. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005.

ALMEIDA, L. S. De; FERREIRA, V. A. S.; FERNANDES, L. A.; FRAZÃO, L. A.; OLIVEIRA, A. L. G. Indicadores de qualidade do solo em cultivos irrigados de cana-de-açúcar. Pesquisa Agropecuária brasileira, v.51, n.9, p.1539–1547, 2016.

ARRIGONI, E. B. New pests of the new system. **Revista Opiniões**, v.28, p. 65-67, 2011.

BADILLA, F.; ALVES, S. Control de picudo de la caña de azúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col: Curculionidae) com *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii* em condiciones de laboratorio y campo. Manejo integrado de Plagas, San José, v. n. 20/21, p. 34-38, 1991.

BARRETO-TRIANA, N. C. Comportamento sexual e reprodutivo de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em Cana-de-açúcar. 2009. 95f. Tese (Doutorado em Ciências/Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2009.

BARRETO-TRIANA, N., DIAS, C. T. S., BENTRO, M. J. Comportamiento reproductivo del picudo de la caña, *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) en laboratorio. **Revista Colombiana de Entomología**, v.40, n.2, p. 265-271, 2014.

BROWN, I. M.; GAUGLER, R. Temperature and humidity influence emergence and survival of entomopathogenic nematodes. **Nematologica** 43, p. 363-375, 1997.

BOLONHEZI, D.; PEREIRA, J. C. V. N. A. Plantio direto na Alta Mogiana. **O Agrônomo**, Campinas, v. 51, p. 12-15, 1999.

CÍCERO, E. A. S.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F. Identificação de genes *Cry* de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Sphenophorus levis*, o Bicudo da Cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v.68, n.4, p.817-823, 2009.

CONAB (Companhia Nacional De Abastecimento). Acompanhamento da safra

brasileira: Cana-de-Açúcar, Safra 2018/19. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2489-safra-de-cana-estimada-em-635-milhoes-de-t-tera-producao-de-30-bilhoes-de-litros-de-etanol>> Acesso em 31 de Janeiro de 2018.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL, A. H. Introduction to insect biology and diversity. Oxford: Oxford University Press, 1998. 680p.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S. M.; ALMEIDA, L. C.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 22, n. 6, p. 553-558, 1987.

DINARDO-MIRANDA, L. L. **Nematoides e pragas da cana-de-açúcar**. 2. Ed.rev.atual. Campinas: Instituto Agrônômico, 2018. 444p.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V. Effect of insecticides applied at sugarcane planting on *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Cuculionidae) control and on the yield of first two harvests. **Proceedings Internacional Society of Sugar Cane Technology**, Boston, v. 27, p. 1-5, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Ocorrência de *Sphenophorus levis* em 2000. Stab – Açúcar, Álcool e Subprodutos. v.19, n.1, p.26, 2000

DINARDO-MIRANDA, L. Cana. Revista Cultivar Grandes Culturas. Pelotas, n.80, 2005.10p. Caderno técnico cultivar.

DINARDO-MIRANDA, L.L.; FRACASSO, J.V. Sugarcane straw and the populations of pests and nematodes. **Scientia Agricola**, v.70, n.5, September/October 2013.

DINARDO MIRANDA, L. L. Nematoides e pragas da cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico, 2014.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. Cana-de-açúcar. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p. 349–404.

DOLINSKI, C. Tecnologia de produção e formulação de nematoides entomopatogênicos. In: OLIVEIRA FILHOS, E. C.; MONNERAT, R. G.; **Fundamentos para regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**, 1 ed., p. 197-218, 2006.

DOWDS, B. C. A.; PETERS, A. Virulence Mechanisms. In: Gaugler, R. (ed). **Entomopathogenic Nematology**. CABI Publishing, New York, p. 79-98, 2002.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides Entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 541-569, 1998.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO S.; CARVALHO, S. R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI- FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Ed. Agrícola Ceres Ltda. 1978. 649 p.

- GARCIA, J. F. **Manual de identificação de pragas da cana**. Campinas: FMC, 2013, 219 p.
- GIBLIN-DAVIS, R. M.; PEÑA, J. E.; DUNCAN, R. E. Lethal pitfall trap for evaluations of semiochemical-mediated attraction of *Metamasius hemipterus serecius* (Coleoptera: Curculionidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 77, n. 2, p. 247-255, 2002.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., McGuire, T.R. Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54: 363 – 372, 1989.
- GIOMETTI, F. H. C.; LEITE, L. G.; TAVARES, F. M.; SCHMIT, F. S.; BATISTA FILHO, A.; DELLAACQUA, R. Virulência de nematóides entomopatogênicos (Nematoda: Rhabditida) a *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae), v. 70, n.1, p. 81-86, 2011.
- GIOMETTI, F. H. C. Avaliação De nematoides entomopatogênicos para o controle de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae). 2009. 41 f. (Dissertação, Mestrado em Sanidades vegetal, Segurança alimentar e o ambiente.) - Instituto Biológico, São Paulo, 2009.
- GLAZER, I. Survival Biology. In: GAUGLER, R. (Ed). *Entomopathogenic Nematology*. New Jersey: Rutgers University, p. 169-187, 2002.
- GONÇALVES, E. R. Fotossíntese, osmorregulação e crescimento inicial de quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. 2008. 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal), Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo, 2008.
- Han, R.C.; Ehlers, R.U. (2000). Pathogenicity, development and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic *in vivo* conditions. *Journal of Invertebrate Pathology*. 75, 55-58.
- HOMINICK, W. M. Biogeography. In: GAUGLER, R. (Ed). *Entomopathogenic Nematology*. Rutgers University: New Jersey, p. 115-143, 2002.
- HUNT, D.J.; NGUYEN, K.B. *Advances in Entomopathogenic Nematode Taxonomy and Phylogeny*. Brill, Boston, 454 p. 2016.
- IZEPPI, T. S. **Distribuição espacial e dinâmica populacional de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar**. 2016. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015. 74 p.
- JADOSKI, C.J.; TOPPA, B.E.V.; JULIANETTI, A.; HULSBOF, T.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Physiology development in the vegetative stage of sugarcane. *Pesquisa aplicada e agrotecnologia*, [S.l.], v. 3, n. 2, maio/ago. 2010.
- JOYCE, S.A., REID, A., DRIVER, F. CURRAN, J. (1994) Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes. pp. 178–187 in Burnell, A.M., Ehlers, R.U. & Masson, J.P. (Eds) *Biotechnology: genetics of entomopathogenic nematode bacteria complexes*. Luxembourg, DG XII, European Commission.

KOPPENHÖFER, A. M. Egg predators of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Col., Curculionidae) in western Kenya. **Journal of Applied Entomology**, 116(1-5), 352–357, 1993.

LAWRENCE, J.F.; BRITTON, Y E.B. Australian beetles. Carlton: Melbourne University, 1994.192 p.

LAWRENCE, J.F.; BRITTON, Y E.B. Coleoptera (Beetles). In: CSIRO DIVISION OF ENTOMOLOGY (ed.). The insects of Australia. A textbook for students and research workers. Carlton: Melbourne University, 2 ed., v. 2, 1991. p. 543-683.

LEITE, L. G.; BATISTA FILHO, A.; TAVARES, F. M.; GINARTE, C. M. A.; BOTELHO, P. S. M.; ALMEIDA, L. C. Alternativa de controle. *Revista Cultivar*, p. 30 - 33, 2006.

LEITE, L. G.; BATISTA, A. F.; GINARTE, A. M. A.; TAVARES, F. M.; ALMEIDA, L. C.; BOTELHO, P. S. M. Alternativa de controle: bicudo da cana-de-açúcar. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, n. 83, 2005.

LEITE, L. G.; TAVARES, M. T.; BOTELHO, P. S. M.; BATISTA FILHO, A.; POLANCZYK, R. A.; SCHIMDT, F. S. Eficiência de nematoides entomopatogênicos e inseticidas químicos contra *Sphenophorus levis* e *Leucothyreus* sp. em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 40-48, 2012.

MIRANDA, J.R. História da cana-de-açúcar – History of sugarcane. Campinas: Komedi, 2008. p.1-20.

MIRANDA, E. M.; JÚNIOR, O. J. S.; DA SILVA, E. M. R. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para o amendoim forrageiro consorciado com braquiária. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 9, p. 1185–1191, 2008.

MONTEIRO, C.M.; PRATA. M.C.; FURLONG, J.; FAZA. A.P.; MENDES, A.S.; ANDALO, V.; MOINO-JUNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 106, 821-826, 2010.

MUNDIM, D. A.; PELISSARI, H. N. T.; PEREIRA, F. J. S. Panorama da colheita mecanizada de cana-de-açúcar e seu impacto no manejo da cultura. *Nucleus*, Ituverava, edição especial, p. 79-94, 2009.

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

MORAES, G. C.; ÁVILA, C. J. *Sphenophorus levis* detected in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Agricultura Science Research Journals**, v. 3, n. 1, p. 36-37, 2013.

NGUYEN, K.B., DUNCAN, L.W. *Steinernema diaprepesi* n. sp. (Rhabditida: Steinematidae) a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Nematology* 34, 159–170, 2002.

- NGUYEN, K.B., MALAN, A.P., GOZEL, U. *Steinernema khoisanæ* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. *Nematology* 8, 157–175, 2006.
- NGUYEN, K.B., MARUNIAK, J., ADAMS, J.B. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. *Journal of Nematology* 33, 73–82, 2001.
- NGUYEN, K.B., QIU, L., ZHOU, Y., PANG, Y. *Steinernema leizhouense* sp. n. Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China. *Russian Journal of Nematology* 14, 101–118, 2006.
- NGUYEN, K.B., SHAPIRO-ILAN, D., MBATA, G. *Heterorhabditis georgiana* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Georgia, USA. *Nematology* 10, 433–448, 2008.
- ORTIZ-URQUIZA, A.; RIVEIRO-MIRANDA, L.; SANTIAGO-ALVAREZ, C.; QUESADA-MORAGA, E. (2010). Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- PAVLU, F. A. Plano de amostragem e distribuição espacial visando o controle localizado de *Sphenophorus levis* na cultura da cana-de-açúcar. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado Ciências/ Máquinas Agrícolas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.
- POINAR JR., G.O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, pp. 23–62. Edited by R. Gaugler & H. K. Kaya. Boston: CRC Press.25, 1990.
- POINAR, G. O., JR. **Nematodes for biological control of insects**. Florida: Boca Raton, 1979, 277 p.
- POLANCZYK, R. A.; ALMEIDA, L. C.; PADULLA, L.; BATISTA ALVES, S. Pragas de cana-de-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista de biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, p. 14-17, 2004.
- PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. B. Aspectos biológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. *Boletim Técnico Copersucar – Edição Especial*, 1990. 15p.
- PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. B. Aspectos biológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar. São Paulo: *Boletim Técnico Copersuca*, 1990. 15p. Edição Especial.
- PRECETTI, A. A. C. M.; TERAN, F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978, e *Metamasius hemipterus* (I. 1765) (Col., Curculionidae). In: REUNIÃO TÉCNICA AGRONÔMICA: PRAGAS DA CANA-DE-AÇÚCAR, 1., 1983, Piracicaba, Anais... Piracicaba: Copresuca, 1983. p. 32 – 37.

RIBEIRO, H.; FICARELLI, T. R. A. Queimadas nos canaviais e perspectivas dos cortadores de cana-de-açúcar em Macatuba, São Paulo. **Saúde e Sociedade**. São Paulo, v.19, n.1, p.48-63, 2010.

RICHMOND, D. S. **Managing billbugs in turfgrass**, E-266-W. 2016. Disponível em: <<https://extension.entm.purdue.edu/publications/E-266/E-266.html>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

ROS, P.B. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por *Leifsonia xyli* 20 subsp. *Xyli***. 2004. 58f. Dissertação de Mestrado, Piracicaba/SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP, 2004.

ROSSI, M.N.; FOWLER, H.G. Ant predation of larval *Diatraea saccharalis* Fab. (Lep., Crambidae) in new sugarcane in Brazil. **Journal of Applied Entomology**, 124: 245-247, 2000.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e Botânica. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 47–56, 2008.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO et al. Atualização em produção de cana-de-açúcar. Piracicaba-SP: Editora Prol, p.19-36, 2006.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, 354:311-313, 2006.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; MCCOY, C. W. Effects of culture method and formulation on the virulence of *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Nematology**, v. 32, n. 3, p. 281-288, 2000.

SHAPIRO-ILAN, D. I.; GOUGE, D. H.; KOPPENHÖFER, A. M. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. In: GAUGLER, R. (Ed). **Entomopathogenic Nematology**. Rutgers University: New Jersey, p. 333-355, 2002.

SMITH, K. A. Control of insect pests with entomopathogenic nematodes.1994. Disponível em: <<http://www.ffc.agnet.org/library/article/tb139a.html> >. Acesso em: 08 jan. 2019.

STINGEL, E.; ALMEIDA, L. C.; ARRIGONI, E. B.; BONANI, J.P. Distribuição Geográfica de *Sphenophorus levis* (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar, evolução dos registros de ocorrência e estimativa de área infestada, por município, em 2009. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010. Natal. **Anais...** Sociedade Entomológica do Brasil, 2012, p. 1.

TAMURA. K., STECHER. G., PETERSON D., FILIPSKI A., AND KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*30: 2725-2729, 2013.

TAVARES, F. M.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, A. C.; AMBRÓS, C. M. 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, p.12-19, 2007.

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

TINZAARA, W., DICKE, M., VAN HUIS, A., CLIFFORD, G. Use of infochemicals in pest management with special reference to the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). *Ins Sci Appl* 22: 241-261, 2002.

VERMA, D.; GOPE, P. C.; SINGH, I.; JAIN, S. Processing and properties of bagasse fibers. In: HAKEEM, K. R.; JAWAID, M.; RASHID, U. *Biomass and Bioenergy: Processing and Properties*. Springer, pg 63-76, 2014.

VITTUM, P. J.; VILLANI, M. G.; TASHIRO, H. Turfgrass insects of the United States and Canada. **Cornell University Press**, 1999. 496p.

WOOD, W.B., 1988. *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

ZARBIN, P. H. G.; ARRIGONI, E. D. B.; RECKZIEGEL, A.; MOREIRA, J.; BARALDI, P.T.; VIEIRA, P. C. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. **Journal of chemical Ecology**, New York, v. 29, n. 2, p. 377-386, 2003.

ZUCKERMAN, B.M., JANSSON, H-B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host-prey recognition. *Annual Review of Phytopathology* 22: 95 – 113, 1984.