

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales:
Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei*
(Coleoptera: Curculionidae)**

Luiz Henrique Costa Mota

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2017**

Luiz Henrique Costa Mota
Engenheiro Agrônomo

**Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales:
Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:
Curculionidae)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JÚNIOR

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Mota, Luiz Henrique Costa

Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) / Luiz Henrique Costa Mota. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. Piracicaba, 2017.

116 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Auto-disseminação 2 Métodos de inoculação 3. Fungos entomopatogênicos 4. Broca-do-café 5 Cotrole microbiano I. Título

A Deus,

AGRADEÇO

Aos meus pais José Luiz e Miraci

Aos meus irmãos Josimar e Verônica

À minha amada noiva Nancy

Pelo apoio e incentivo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Bolsas para Qualificação de Servidores (PBQS) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais (IFNMG), pela concessão de bolsas de estudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Italo Delalibera Jr., pela orientação, atenção, paciência e confiança.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial aos professores e funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia.

Ao IFNMG por conceder o afastamento integral das minhas atividades como Professor, o que permitiu a conclusão desta pesquisa.

À bióloga Solange Aparecida Vieira Barros, técnica do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, pela atenção, paciência e apoio.

À Prof^ª. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias e ao Dr. André Arnosti do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista de Rio Claro pelas contribuições no capítulo 2 desta tese, principalmente com as imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À Prof^ª. Dra. Renata Alcarde pelo auxílio nas análises estatísticas do capítulo 3 desta tese e à Prof^ª. Dra. Clarice Garcia Borges Demétrio e ao Doutorando MSc. Ricardo Klein Sercundes pelo auxílio nas análises estatísticas do capítulo 4 desta tese.

Aos proprietários dos cafezais, Abenito Martins dos Anjos, Adevan Silva Santos, Julivar Farias de Sousa e Paulo Henrique Furlaneto, por gentilmente terem disponibilizado suas áreas para condução dos experimentos.

Aos meus orientados de Iniciação Científica do IFNMG – *campus* Almenara, Victor Rocha Costa, Giovanna Lyssa Lacerda Costa, Ivana Patente Torres, Rodrigo Froes Ganem, Lucas Gonçalves, Gabriel Sousa Santos, Ana Clarolina Silva Oliveira e João Carlos Rocha Alves, pela contribuição nos experimentos de campo conduzidos em Encruzilhada-Ba/Mata Verde-MG.

À empresa Biocontrole pela doação do atraente Bio Broca® e das armadilhas de funil para utilização nos experimentos com armadilhas de auto-inoculação.

Aos amigos Viviane Santos, Paulo Roberto, Ana Beatriz, Vanessa Duarte pelas sugestões na parte escrita da tese, Antônio Augusto Bianchi (pelo *abstract*) e Prof. Igor Costa pela revisão do português.

Ao amigo Prof. Sérgio Lana Moraes pela elaboração do mapa da área experimental do capítulo 4.

Ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento e ao Dr. Weliton Dias da Silva pela disponibilidade e sugestões dadas a esta pesquisa sempre que precisei.

Aos amigos e colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial a toda equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, pelo apoio e convivência.

Aos amigos de república, Giovani Coura, Vitor Beloti, Marcos Conceschi, Gabriel Rugno, Filipe Couto pelos momentos de descontração e experiências compartilhadas.

À minha mãe, Miraci, meu pai, José Luiz, meus irmãos, Verônica e Josimar, e à minha amada noiva, Nancy, pelo constante apoio que me faz buscar meus objetivos.

A Deus por guiar meus passos em todas as etapas de minha vida e, mesmo com as dificuldades encontradas, me dar força para continuar lutando.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
Referências.....	18
2. A MORTALIDADE DE <i>Hypothenemus hampei</i> PELA APLICAÇÃO DE SUSPENSÕES AQUOSAS DE <i>Beauveria bassiana</i> É INFLUENCIADA PELO MÉTODO DE CONTATO E ADJUVANTES.....	25
Resumo.....	25
Abstract	26
2.1. Introdução	26
2.2. Material e métodos.....	28
2.3. Resultados	34
2.4. Discussão.....	44
Referências.....	48
3. MANEJO DE <i>Hypothenemus hampei</i> COM <i>Beauveria bassiana</i> EM ARMADILHA DE AUTO-CONTAMINAÇÃO.....	55
Resumo.....	55
Abstract	56
3.1. Introdução	56
3.2. Material e Métodos.....	58
3.3. Resultados	71
3.4. Discussão.....	80
Referências.....	85
4. MANEJO DE <i>Hypothenemus hampei</i> COM APLICAÇÃO DE <i>Beauveria bassiana</i> COM FERTILIZANTES QUIMÍCOS EM SOLO.....	91
Resumo.....	91
Abstract	92
4.1. Introdução	92
4.2. Material e métodos.....	94
4.3. Resultados	102
4.4. Discussão.....	107
Referências.....	112

RESUMO

Estratégias de utilização de *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) para o manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)

Hypothenemus hampei apresenta aspectos bioecológicos e comportamentais que dificulta o seu controle, como a sua natureza críptica, ficando dentro da semente de café a maior parte de seu ciclo de vida, por apresentar várias gerações por ano. Uma grande quantidade de frutos com *H. hampei* cai ao solo, constituindo uma excelente forma para sobrevivência do inseto na entressafra e como fonte para novas infestações. O controle de *H. hampei* deve então ser efetuado no período em que as fêmeas deixam o fruto onde nasceram até o momento em que colonizam novos frutos para reproduzirem. Biopesticida a base de *Beauveria bassiana* é uma opção disponível para o controle de *H. hampei*, no entanto, existem poucas evidências de sua eficiência em campo. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar estratégias para utilização de *B. bassiana* para manejo de populações de *H. hampei* por: i) pulverização aquosa com adjuvantes, ii) armadilha atrativa para auto-autocontaminação e iii) incorporação do patógeno no solo com fertilizantes químicos. Pulverização direta de suspensões de conídios com o adjuvante Tween 80 resultou em menor mortalidade de *H. hampei* do que suspensões com os demais adjuvantes testados em laboratório. A eficácia dos adjuvantes com o fungo variou com o método de inoculação. As pulverizações diretas dos insetos resultaram em mortalidades reduzidas (23 – 53%), enquanto que a imersão e os métodos que permitiram que os insetos ficassem em contato com os conídios no substrato (fruto ou papel de filtro) após a pulverização resultaram em maiores mortalidades (63 – 98%). As imagens ultramorfológicas de *H. hampei* inoculados por diferentes métodos sugerem que a região ventral do abdome é o principal sítio de infecção do fungo, visto que, diferente dos outros métodos, na pulverização direta que resultou em mortalidades reduzidas, grande quantidade de conídios aderidos e germinados foram observados no élitro em comparação com a região ventral. Três modelos de armadilha de auto-inoculação foram comparadas em cafezal sombreado e a pleno sol e a captura de *H. hampei* foi superior em ESALQ-Hh2. O manejo de *H. hampei* com a armadilha ESALQ-Hh2 foi avaliado em cafezal a pleno sol desde a fase de formação dos frutos até a colheita. Foi constatado em média 6,6% de *H. hampei* infectados por *Beauveria* sp. nas plantas distante 4 e 8 m das armadilhas e nenhum inseto infectado nas parcelas com as mesmas armadilhas, mas sem o fungo. Observou-se redução na concentração e viabilidade do patógeno nas armadilhas ao longo do tempo, porém as mortalidades de *H. hampei* expostos ao fungo foram elevadas (73 – 100%) durante os 148 dias de avaliação. Estudos conduzidos em laboratório revelaram que a capacidade de voo de *H. hampei* não é afetada pela carga de conídios aderidos ao seu corpo quando comparados aos insetos sem exposição ao fungo. Além disso, apenas 5% dos insetos expostos ao fungo conseguiram penetrar na semente de café, indicando baixo potencial de danos. A mistura de conídios de *B. bassiana* com fertilizantes químicos granulados em solo de cafezal resultou em reduções (34 e 50%) da infestação de *H. hampei* quando comparadas às parcelas somente com aplicação dos fertilizantes. Sugere-se que o manejo desta praga com *B. bassiana* apresenta maior potencial a curto prazo por pulverizações apenas no período de trânsito das fêmeas colonizadoras, e, à médio e longo prazo, pela aplicação do patógeno no solo conjuntamente com fertilizantes e com o uso de armadilha de auto-inoculação.

Palavras-chave: Auto-disseminação; Métodos de inoculação; Broca-do-café; Entomopatógenos; Semioquímicos

ABSTRACT

Use strategies of *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) for the management of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae)

Hypothenemus hampei, presents bioecological and behavioral aspects that hinders its control, such as its cryptic nature, remaining inside the coffee bean most of its life cycle and for presenting several generations per year. A large number of coffee beans carrying *H. hampei* drop to the ground, providing an excellent way for insect survival in the off season and as a source for new infestations of berries. The control of *H. hampei* must thus be made in the period when the females leave the beans where they were born until the moment they colonize new fruits to reproduce. Biopesticide based with *Beauveria bassiana* is an option available for the control of *H. hampei*; however, there is little evidence of its effectiveness in the field. The objective of this study was to evaluate strategies to use *B. bassiana* in the management of *H. hampei* in three ways: *i*) aqueous spray with adjuvants, *ii*) attractive trap of autoinoculation and *iv*) inoculation of the pathogen into the soil with chemical fertilizers. Direct spraying of suspensions of fungal conidia with adjuvant Tween 80 resulted in lower mortality of *H. hampei* than suspensions with the other adjuvants tested in the laboratory. The effectiveness of the adjuvant with the fungus varied with the inoculation method. Direct sprays on the insects reduced mortalities (23 – 53%), while immersion and the methods that allowed the insects to have contact with the conidia in the substrate (fruit or filter paper) after spraying, resulted in greater mortality (63 – 98%). Ultramorphological images of *H. hampei*, inoculated by different methods, suggest that the ventral region of the abdomen is the primary site of infection of the fungus since, unlike the other methods, the direct spray that resulted in reduced mortality, large quantity of conidia adhered and germinated were observed in the elytron compared to the ventral region. Three models of autoinoculation traps were compared in a shaded coffee plantation and in the full sun. Capture of *H. hampei* was superior in ESALQ-Hh2. The management of *H. hampei* with trap ESALQ-Hh2 was assessed at a coffee plantation under full sun from fruit formation until harvest. On average, 6.6% of *H. hampei* was infected by *Beauveria* sp. in plants 4 and 8 m distant from the traps and no insect was infected in the plots with the same traps, but without the fungus. There was a reduction in concentration and viability of the pathogen in the traps over time; however, mortality of *H. hampei* exposed to the fungus were high (73 – 100%) during the 148 days of evaluation. Studies conducted in laboratory revealed that the flight capacity of *H. hampei* was not affected by the load of conidia adhered to its body when compared to insects without exposure to the fungus. Furthermore, only 5% of insects exposed to the fungus managed to penetrate the coffee bean, indicating low potential damage. Inoculation of conidia of *B. bassiana*, along with granulated chemical fertilizers in the soil of the coffee plantation, reduced (34 and 50%) the infestation of *H. hampei* compared the plots with only the application of fertilizers. It is suggested that the management of this pest with *B. bassiana* presents greater potential in the short term by spraying only during the period of transit of colonizing females and in the medium and long term through the application of the pathogen to the soil together with fertilizers and autoinoculation traps.

Keywords: Autocontamination; Inoculation methods; Coffee berry borer; Entomopathogens; Semiochemicals

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sobrevivência média de adultos de *Hypothenemus hampei* pulverizadas diretamente com suspensão de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 e diferentes adjuvantes e mantidas em laboratório por 10 dias (25±1 °C e 70±20% UR).....**36**
- Figura 2. Porcentagem de esporulação de *Beauveria bassiana* (Bb) em adultos de *Hypothenemus hampei* pulverizadas com o isolado ESALQ-PL63 (1×10^7 conídios.mL⁻¹) e diferentes adjuvantes do experimento 1 (Fig 1) (P=0,6679).....**37**
- Figura 3. Sobrevivência média de adultos de *Hypothenemus hampei* com pulverização direta sobre os insetos (PD), imersão (I) e pulverização direta + efeito residual (PDR) com suspensão aquosa a 1×10^7 conídios.mL⁻¹ de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 com adjuvantes e mantida em laboratório por 10 dias (25±1 °C e 70±20% UR).**38**
- Figura 4. Porcentagem média (±EP) de esporulação de *Beauveria bassiana* (Bb) em cadáveres de *Hypothenemus hampei* após aplicação de suspensão aquosa a 1×10^7 conídios.mL⁻¹ do isolado ESALQ-PL63 por pulverização direta (PD), imersão (I) e pulverização direta + efeito residual (PDR) com adjuvantes do experimento da figura 3.**39**
- Figura 5. Ultramorfologia da região dorsal e ventral do corpo de adultos de *Hypothenemus hampei* 24h, 48h e 72h após pulverizações de suspensões fúngicas de *Beauveria bassiana* com adjuvante Tween 80 pelos seguintes métodos: pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual) (RF), pulverização direta no inseto seguido de transferência imediata para placas limpas (PD = PDF), pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente exposto no orifício de perfuração do fruto (PIPF). C-K: Detalhes ultramorfológicos dos élitros e L-T região ventral dos segmentos abdominais. A: região dorsal e B: região ventral. Élitros (el), cabeça (he), tórax (t) segmentos abdominais(s), cerdas (c), conídios (círculos) e hifas (h). Barras: A: 250µm; B-S: 15µm.**43**
- Figura 6. Ultramorfologia da região dorsal e ventral do corpo de adultos de *Hypothenemus hampei* 24h, 48h e 72h após pulverizações de suspensões fúngicas de *Beauveria bassiana* com adjuvante Silwet-L77 pelos seguintes métodos: pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual) (RF), pulverização direta no inseto seguido de transferência imediata para placas limpas (PD = PDF), pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente exposto no orifício de perfuração do fruto (PIPF). C-K: Detalhes ultramorfológicos dos élitros e L-T região ventral dos segmentos abdominais. A: região dorsal e B: região ventral. Élitros (el), cabeça (he), tórax (t) segmentos abdominais (s), cerdas (c), conídios (círculos) e hifas (h). Barras: A: 250µm; B-S: 15µm.**44**
- Figura 7. Armadilhas de auto-contaminação contendo o fungo *Beauveria bassiana* para o controle de *Hypothenemus hampei*. “A” modelo ESALQ-Hh1 “B” modelo ESALQ-Hh2 e Armadilha Broca® (Biocontrole) com parte inferior adaptada para auto-inoculação. (Ilustração Patrícia Milano).....**61**

- Figura 8. Área experimental usada para avaliação da eficiência de armadilhas de auto-contaminação contendo o fungo *Beauveria bassiana* para o controle de *Hypothenemus hampei*. “A” Cafezal a pleno sol e “B” Cafezal sombreado **62**
- Figura 9. Recipiente utilizado para teste da capacidade de voo de *Hypothenemus hampei* em laboratório. “A” visão geral externa; “B” visão interna com detalhe ao centro da placa de plástico forrada com papel filtro para liberação dos insetos e “C” Distribuição dos tubos em bancada no laboratório próximo a janela para entrada de luz natural **64**
- Figura 10. “A” esporulação de *Beauveria bassiana* em cadáver de *Hypothenemus hampei* com parte do corpo fora do fruto de café na região da “coroa”. “B” esporulação de *B. bassiana* em cadáver de *H. hampei* fora do fruto do café sem perfuração **66**
- Figura 11. Distribuição das armadilhas de auto-contaminação com fungo *Beauveria bassiana* nas parcelas experimentais **67**
- Figura 12. Médias observadas e curvas ajustadas de *Hypothenemus hampei* capturados por diferentes armadilhas de auto-contaminação contendo o fungo *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 em cafezal a pleno sol (A) e sombreado (B). Piracicaba, São Paulo (05/11/2013 a 18/02/2014) **73**
- Figura 13. Médias observadas e curvas ajustadas de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 em diferentes armadilhas de auto-contaminação em cafezal a pleno sol (A) e sombreado (B). Piracicaba, São Paulo (05/11/2013 a 18/02/2014)..... **74**
- Figura 14. Média (\pm E.P) de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* expostas a tecido com cultura de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 por 5s, que iniciaram o voo durante três horas em laboratório (27 ± 2 °C e $90\pm 10\%$ UR entre 14h e 17h) em câmara de voo. ns: não significativo **75**
- Figura 15. Médias observadas e curva ajustada para a concentração e germinação (viabilidade) de conídios de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 na armadilha de auto-contaminação ESALQ-Hh2 colocadas em cafezal a pleno sol, Encruzilhada-BA (15-01-16 a 11-06-16) **79**
- Figura 16. Sobrevivência média de adultos de *Hypothenemus hampei* expostas por 5s ao tecido com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 das armadilhas ESALQ-Hh2 mantidas em cafezal por até 148 dias (15/01/2016 a 11/06/2016). Obs.: A mortalidade nos controles variou de $7,5\pm 4,1\%$ a $17,5\pm 6,3\%$ (não incluído na análise)..... **80**
- Figura 17. Localização geográfica do cafezal (*Coffea arabica*) utilizado para montagem dos experimentos de aplicação do fungo *Beauveria bassiana* via solo em associação com fertilizantes para manejo de *Hypothenemus hampei* (Elaborado por Sérgio Lana Moraes)..... **95**
- Figura 18. “A” Vista da área experimental com cafezal catuaí, “B” Adubadora pendular Vicon PSPP 603 utilizada para distribuição dos tratamentos, “C” Homogeneização manual dos adubos com o arroz + fungo moído e “D” Adubos e arroz + fungo após distribuição na projeção da copa do cafeeiro..... **97**
- Figura 19. Proporção total média de frutos de café perfurados com *Hypothenemus hampei* (com ou sem o inseto) em cafezal tratado com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-BA (27/11/2014 a 20/06/2015)..... **103**

Figura 20. Proporção de frutos de café perfurados por *Hypothenemus hampei* (com ou sem o inseto) coletados no terço inferior (saia), terço médio (meio) e terço superior (topo) de plantas em cafezal tratado com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-BA (27/11/2014 a 20/06/2015). **104**

Figura 21. Proporção média de frutos de café perfurados com *Hypothenemus hampei* (com ou sem o inseto) em cafezal em cafezal tratado com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-BA (29/01/2016 a 11/06/2016). **105**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Adjuvantes e concentração utilizadas para aplicação de <i>Beauveria bassiana</i> no controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	30
Tabela 2. Mortalidade média (\pm EP) de adultos de <i>Hypothenemus hampei</i> inoculadas com 10^7 conídios.mL ⁻¹ de <i>Beauveria bassiana</i> (Bb) ESALQ-PL63 por diferentes métodos de inoculação e mantidas em laboratório por 10 dias (25 ± 1 °C e $70\pm 20\%$ UR).	40
Tabela 3. Infestação de cerejas de café, local de morte e produção de conídios por adultos de <i>Hypothenemus hampei</i> 10 dias após a exposição a conídios de <i>Beauveria bassiana</i> em tecido sintético	76
Tabela 4. Porcentagem média (\pm E.P) de frutos perfurados por <i>Hypothenemus hampei</i> coletados em plantas de café marcadas em diferentes distâncias da armadilha ESALQ-Hh2 com <i>Beauveria bassiana</i> ESALQ-PL63, Encruzilhada-BA (15/01/2016 a 11/06/2016).....	77
Tabela 5. Porcentagem média (\pm E.P) de frutos com <i>Hypothenemus hampei</i> coletados em plantas de café em diferentes tempos e distâncias da armadilha ESALQ-Hh2 com <i>Beauveria bassiana</i> isolado ESALQ-PL63, Dois Córregos-SP (13/05/2016 a 22/06/2016).....	78
Tabela 6. Porcentagem de infecção (\pm E.P) de <i>Hypothenemus hampei</i> por <i>Beauveria</i> sp. em cafezal tratado com <i>B. bassiana</i> ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo.....	102
Tabela 7. Porcentagem (\pm E.P) de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> mortas por <i>Beauveria</i> sp. quando colocadas em amostras de solo provenientes de cafezal tratado com <i>B. bassiana</i> ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-BA.	106
Tabela 8. Porcentagem de viabilidade (\pm E.P) de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> isolado ESALQ-PL63 em mistura com fertilizantes granulados por diferentes tempos em laboratório à 25 ± 1 °C e fotofase de 12 horas.....	107

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café do mundo e um dos principais exportadores (MAPA, 2015; CONAB, 2016). As espécies de café arábica (*Coffea arabica*) e conilon/robusta (*Coffea canephora*) são exploradas economicamente no Brasil ocupando uma área de 2,2 milhões de hectares em 2016. Desse total, 79% corresponde ao café arábica, com destaque para o estado de Minas Gerais como o maior produtor com 67% da área cultivada. Quanto à produção, essa safra foi estimada em 51,5 milhões de sacas (60 Kg) de café beneficiado, sendo 84,4% da espécie café arábica (CONAB, 2016). Em escala mundial, a produção de café foi estimada para safra 2016/2017 em 152 milhões de sacas, sendo 94 milhões de sacas referente ao café arábica (ICO, 2017).

Diversos fatores contribuem para redução da produtividade do cafeeiro, como as condições climáticas adversas e os problemas fitossanitários, especialmente em decorrência dos danos diretos e indiretos das pragas. Dentre as principais pragas da cafeicultura mundial, está a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), que é considerada uma das mais importantes espécies. Esta praga é originária da África Central e foi introduzida no Brasil em 1913 (INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2014), sendo encontrada em praticamente todas as regiões produtoras de café (VEGA *et al.*, 2009). Só no Brasil, as perdas provocadas por esse inseto em lavouras de café foram estimadas entre 215 a 358 milhões de dólares por ano (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Fêmeas adultas de *H. hampei* constroem galeria na semente de café para reprodução, sendo que é possível chegar a ser encontrar 300 indivíduos em um único fruto (JARAMILLO *et al.*, 2009). Essa praga provoca perdas qualitativas, pela alteração no sabor, e quantitativas, pelo consumo do endosperma devido à alimentação das larvas e pela queda de frutos infestados ao solo antes mesmo do ponto de colheita. Algumas particularidades quanto aos aspectos bioecológicos e comportamentais de *H. hampei* tornam difícil o controle dessa praga. São fatores que contribuem para isso: a sua natureza críptica, ficando dentro da semente de café a maior parte de seu ciclo de vida; seu ciclo multivoltino, podendo ocorrer de quatro a sete gerações por ano; a razão sexual atípica de 10:1 de fêmeas em relação a machos; e também o fato de as fêmeas apresentarem uma alta longevidade que pode

ser superior a 150 dias (BERGAMIN, 1943; MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997; CURE *et al.*, 1998; MATHIEU *et al.*, 2001; ROOBAKKUMAR, *et al.*, 2014).

A cópula ocorre entre irmãos no interior do fruto em que nasceram e somente as fêmeas adultas acasaladas da broca-do-café são capazes de abandonarem o fruto para iniciar novas infestações, sendo chamadas de fêmeas colonizadoras (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997; MATHIEU *et al.*, 2001). Esse processo de abandono é iniciado quando fatores ambientais favoráveis, como aumento de temperatura e umidade relativa do ar superior a 90% ocorrem, especialmente após as chuvas (BAKER *et al.*, 1992; BAKER, 1999; JARAMILLO, CHABI-OLAYE, BORGEMEISTER, 2010), e a condição de luz (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997), que estimulam o surgimento de fêmeas colonizadoras.

Para desenvolver técnicas adequadas para manejo de *H. hampei* deve-se levar em consideração a fenologia do cafeeiro e o deslocamento das fêmeas colonizadoras dentro do cafezal, sendo reconhecida quatro formas de movimentação do inseto: 1) entre as plantas durante a fase de frutificação e colheita; 2) dos frutos da planta para os frutos caídos no solo no final da colheita, ativamente pelo seu voo; 3) entre os frutos caídos ao solo quando os mesmos estão em processo avançado de decomposição à procura de frutos em melhor estado; 4) dos frutos caídos no solo para infestação de frutos da nova frutificação do cafeeiro (VÁZQUEZ, *et al.*, 2012).

O momento em que a *H. hampei* deixa o fruto à procura de novas fontes de infestações é estratégico para adoção de medidas de controle, sendo essas mais efetivas quando realizada entre a entressafra até o início da maturação dos frutos da nova safra, antecedendo o período de multiplicação do inseto (CURE *et al.*, 1998), conhecido como período de “trânsito” da broca. A fêmea colonizadora inicia a infestação em frutos verdes de café com quantidade de água superior a 80%, se alojando no canal de penetração e deixando a porção final do abdome para fora do fruto até que o fruto chegue à condição ideal de umidade para oviposição que ocorre somente quando o fruto atinge peso seco superior a 20%. Este período de crescimento após a floração, que é de aproximadamente 120 dias, é estratégico para adoção de medidas de controle (BAKER, 1999; RUIZ-CÁRDENAS; BAKER, 2010).

O controle de *H. hampei* é baseado quase que exclusivamente na utilização de inseticidas sintéticos. Entretanto, desde a proibição do uso de endossufan, principal inseticida utilizado no controle da broca, no Brasil em 2013, tem sido observado um aumento na taxa de infestação de *H. hampei* nos principais estados produtores de

café, o que levou a decretação de estado de emergência fitossanitária no país (BRASIL 2014; 2015). Diante desse cenário e dos efeitos prejudiciais provocados pelo uso de agroquímicos, como as contaminações ambientais e de humanos, faz-se necessário buscar alternativas de manejo dessa praga que sejam economicamente viáveis e com menor impacto negativo.

Nesse sentido, o controle biológico por entomopatógenos, em especial com o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) (Hypocreales: Cordycipitaceae), que pode ser frequentemente encontrado causando altos níveis de infecção natural da broca-do-café em campo, é uma estratégia com grande potencial e deve ser viabilizada (MONZÓN *et al.*, 2008). Para Varela e Morales (1996), devido ao estilo de vida de *H. hampei*, a transmissão dos fungos entomopatogênicos entre indivíduos doentes e sadios pode incrementar o controle em campo.

O uso de *B. bassiana* para o controle da broca-do-café é feito principalmente via pulverizações aquosas. Contudo, tomando como base alguns trabalhos realizados em laboratório, o controle só seria satisfatório em altas concentrações, o que eleva o custo de controle (VARELA; MORALES 1996; MOTA, 2013). Trabalhos utilizando outras metodologias para inoculação de *B. bassiana* resultaram em alto índice de mortalidade, chegando até 100% por meio do método de imersão (VÉLEZ *et al.*, 1997; POSADA-FLÓREZ, 2008; VLEZ-ARANGO *et al.*, 2001; GERÓNIMO-TORRES *et al.*, 2016), pela inoculação do fungo por meio da contaminação por efeito residual da pulverização (FERNANDES *et al.*, 1985), bem como pela pulverização direta sobre os insetos mais o efeito residual (DALVI *et al.*, 2011). Dessa forma, mesmo com o potencial de *B. bassiana* para controle de *H. hampei*, ainda existem alguns parâmetros que necessitam ser ajustados, visto que não é viável economicamente aplicar grandes quantidades de fungo, e que deve-se levar em conta o momento em que a praga, de hábito críptico, esteja mais vulnerável à aplicação pelo fungo.

Devido à natureza hidrofóbica da superfície dos conídios dos fungos entomopatogênicos, alguns fatores devem ser observados para que o sucesso da pulverização do fungo seja garantido (BOUCIAS *et al.*, 1988). Nessa perspectiva, na suspensão a ser pulverizada, há a necessidade da adição de produtos para aumentar os índices de: deposição, espalhamento, molhamento, adesão, retenção e toxicidade sobre o alvo em questão (COSTA *et al.*, 2003). Assim, uma forma de aumentar a eficiência de *B. bassiana* para manejo de *H. hampei* via pulverização aquosa poderia ser por meio da adição de adjuvantes à calda de aplicação, como desmostrado para

outras pragas, como ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotipo B (MASCARIN *et al.*, 2014).

Além da pulverização como forma de liberação de *B. bassiana* no campo, existem outros métodos que podem ser levados em consideração, como a auto-disseminação ou auto-inoculação do fungo, definida como o uso de insetos para introdução e expansão de entomopatógenos no ambiente (IGNOFFO, 1978). Essa técnica baseia-se no estabelecimento da infecção e na dependência da sobrevivência do inseto para disseminação de patógeno visando atingir sua população em grande escala (SOPER, 1978, citado por VAIL *et al.*, 1993).

Nesse contexto, e diante do conhecimento da eficiência de armadilhas iscadas com diferentes proporções de metanol e etanol para captura de *H. hampei* (VILLACORTA *et al.*, 2001; SILVA, VENTURA; MORALES, 2006; DUFOUR; FRÉROT, 2008), Mota (2013) desenvolveu uma armadilha de auto-contaminação (ESALQ-Hh) com *B. bassiana* impregnado em tecido sintético para o controle de *H. hampei* mostrando-se altamente eficiente para a mortalidade das brocas e conservação da viabilidade do fungo por mais de 150 dias em condições de cafezal sombreado. Entretanto, do ponto de vista da atração dos insetos, foi inferior ao modelo de armadilha IAPAR de uso conhecido (VILLACORTA *et al.*, 2001), mostrando a necessidade de melhoria da atratividade da armadilha de auto-contaminação e estudos mais aprofundados para tentar viabilizar seu uso para o manejo de *H. hampei*.

A aplicação de fungos entomopatogênicos no solo para o manejo de *H. hampei* pode ser justificada pelos fatores apresentados a seguir. Os frutos infestados por *H. hampei* caem ao solo em função do ataque do inseto, constituindo um importante reservatório para iniciar a infestação dos novos frutos que serão formados na safra seguinte (MORENO *et al.*, 2001). Durante o período de frutificação do café, a queda de frutos ocorre continuamente, sendo que a porcentagem de frutos brocados no solo chega a ser de 4 a 20 vezes maior que os frutos na planta (TEIXEIRA; SOUZA; COSTA, 2006). Bustillo *et al.* (1999), por meio da aplicação de *B. bassiana* sobre frutos infestados no solo na concentração de 1×10^9 conídios/copa de árvore de café, observaram infecção de 30% cinco dias após a aplicação e obteve resultado similar 25 dias após aplicação, mostrando uma persistência dos conídios sobre o fruto no solo. Para Jaramillo *et al.* (2015), a utilização do fungo *B. bassiana* para controle de *H. hampei* em frutos infestados no solo é uma técnica vantajosa, pois os conídios permanecem viáveis sobre os frutos caídos e sobre a superfície do solo.

Para controle microbiano de pragas que habitam o solo, é necessário que o inóculo do patógeno seja aplicado na superfície do solo para contaminação dos insetos, podendo ser realizada de forma integrada com muitas práticas agrícolas rotineiras, incluindo a aplicação de fertilizantes e agroquímicos (TOWNSEND *et al.*, 2003). Townsend *et al.* (2003) mostraram que, numa aplicação de uma formulação de *B. bassiana* em sulco no solo e sobre esse distribuídos, os fertilizantes à base de nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre e magnésio incubados em laboratório por 30 dias não apresentaram efeitos negativos dos fertilizantes na sobrevivência do fungo e, em alguns casos, o uso de fertilizantes nitrogenados levou a um aumento do número de unidades formadoras de colônia no solo.

Assim, uma forma de reduzir os custos de manejo de *H. hampei* pela aplicação de *B. bassiana* em solo de cafezal seria sua aplicação conjunta com os fertilizantes aplicados no solo, prática comum realizada no início do período chuvoso, quando inicia a nova floração da cultura (setembro a dezembro), período em que os insetos que estão saindo dos frutos caídos no solo para infestar os frutos novos em formação poderão ser contaminados pelo patógeno.

Por se tratar de uma praga de difícil controle, todas as formas de utilização de *B. bassiana* devem ser melhor compreendidas, buscando uma utilização eficiente do controle microbiano para o manejo da broca-do-café. Dessa forma, esta pesquisa teve como objetivos avaliar três estratégias para utilização do fungo *B. bassiana* para manejo de *H. hampei*: *i*) pulverização aquosa com diferentes adjuvantes, *ii*) armadilha de auto-contaminação e *iii*) Aplicação do patógeno no solo junto com a adubação. Inicialmente, em laboratório, buscou-se melhorar os índices de controle do inseto por meio da pulverização aquosa do patógeno com adição de diferentes adjuvantes em função de diferentes metodologias de contato. Em campo, foi selecionada uma armadilha de auto-contaminação que permitisse maior captura de *H. hampei* comparada à armadilha ESALQ-Hh. Também em condições de campo, por meio da aplicação conjunta do patógeno com alguns fertilizantes de solo utilizados na cultura do cafeeiro, avaliou-se a redução da infestação causada pelo fungo, a porcentagem de infecção de *H. hampei* nos frutos da planta de café e a persistência de *B. bassiana* no solo.

Referências

- BAKER, P. The Coffee Berry Borer in Colombia. DFID-Cenicafé CABI Bioscience IPM for coffee Project (CNTR 93/1536A). **Cenicafé**: Chinchiná, Colombia, 1999. 154 p.
- BAKER, P.S.; LEY, C.; BALBUENA, R.; BARRERA, J.F. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries, Mexico. **Bulletin of Entomological Research**, v. 82, p. 145-150, 1992.
- BERGAMIN, J. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Ipidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 14, p. 31-72, 1943.
- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1795-1805, 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 188 de 12 de março de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 13 mar. 2014. Seção 1, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portarias nº 11 e 12 de 23 de janeiro de 2015. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 jan. 2015. Seção 1 2015.
- BUSTILLO, A.E.; BERNAL, M.G.; BENAVIDES, P.; CHAVES, B. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 82, p. 491-498, 1999.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_04_11_22_44_Boletim_cafe_portugues_-_4o_lev_-_dez.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2017.

- COSTA, E.A.D.; ALMEIDA, J.E.M.; LOUREIRO, E.S.; SANO, A.H. Compatibilidade de adjuvantes no desenvolvimento “*in vitro*” dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **STAB**, v.22, p. 38-40, 2003.
- CURE, J.R.; SANTOS, R.H.S.; MORAES, J.C.; VILELA, E. F.; GUTIERREZ, A. P. Fenologia e Dinâmica Populacional da Broca do Café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) Relacionadas às Fases de Desenvolvimento do Fruto. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p.325-335,1998.
- DALVI, L.P.; PRATISSOLI, D.; POLANCZY, R.A.; ANDRADE, G.S. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales) for the control of the coffee borer beetle *Hypothenemus hampei* (Scolytinae) in Brazil. **Biological Lett.**, v.48, p. 39-46, 2011.
- DUFOUR, B.P.; FRÉROT, B. Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col., Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 132, n. 7, p. 591-600, 2008.
- FERNANDES, P.M.; LECUONA, R.E.; ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **Ecossistema**, v.10, p.176-181, 1985.
- ICO, International Coffee Organization. Coffee trade statistics. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: 15 jan. 2017.
- IGNOFFO, C.M. Strategies to increase the use of entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**., v. 31, p. 1-3, 1978.
- INFANTE, F.; PÉREZ, J.; VEGA, F.E. The coffee berry borer: the centenary of a biological invasion in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p.125-126, 2014.
- GERÓNIMO-TORRES, J.D.C.; TORRES-DE-LA-CRUZ, M.; PÉREZ-DE-LA-CRUZ, M.; DE-LA-CRUZ-PÉREZ, A.; ORTIZ-GARCÍA, C.F.; CAPPELLO-GARCÍA, S.

Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 42, p. 28-35, 2016.

JARAMILLO, J.; CHABI-OLAYE, A.; BORGEMEISTER, C. Temperature dependent development and emergence pattern of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) from coffee berries. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1159-1165, 2010.

JARAMILLO, J.; CHABI-OLAYE, A.; POEHLING, H.M.; KAMONJO, C.; BORGEMEISTER, C. Development of an improved laboratory production technique for the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, using fresh coffee berries. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 130, p. 275-281, 2009.

JARAMILLO, J.L.; MONTOYA, E.C.; BENAVIDES, P.; GÓNGORA, C.E.B. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 41, p. 95-104, 2015.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Projeções do Agronegócio – Brasil 2013/14 a 2023/24. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes_do_agronegocio_2025_WEB.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2017.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; QUINTELA, E.D.; ARTHURS, S.P.; DELALIBERA Jr., I. Toxicity of non-ionic surfactants and interactions with fungal entomopathogens toward *Bemisia tabaci* biotype B. **BioControl**, v. 59, p. 111–123, 2014.

MATHIEU, F.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Factors related to native host abandonment by the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Col., Scolytidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 121, p. 175-180, 1997.

- MATHIEU, F.; GAUDICHON, V.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Effect of physiological status on olfactory and visual responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. **Physiological Entomology**, v. 26, p.189-193, 2001.
- MONZÓN, A. J.; GUHARAY.; KLINGEN, I. Natural occurrence of *Beauveria bassiana* in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) populations in unsprayed coffee fields. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 134-141, 2008.
- MORENO V., D.; BUSTILLO P., A.E.; BENAVIDES M., P.; MONTOYA, E.C. Escape y mortalidad de *Hypothenemus hampei* en los procesos de recolección y beneficio del café en Colombia. Chinchiná Colombia. **Revista Cenicafé**, v. 52, p.111-116, 2001.
- MOTA, L.H.C.. **Desenvolvimento de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) em tecido sintético.** 2013. 84p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 1-15, 2013.
- POSADA-FLÓREZ, F. J. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. **Journal of Insect Science**, v. 8, p. 1-13, 2008.
- ROOBAKKUMAR, A.; SAMUEL, S. D.; BALAKRISHNAN, M. M.; SREEDHARAN, K. Release and Establishment of the Parasitoid *Cephalonomia stephanoderis* Betrem Against the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* Ferrari in Pulney Hills, Tamil Nadu, India. **Entomological News**, v. 124, p. 221-223, 2014.

- RUIZ-CÁRDENAS, R.; BAKER, P. Life table of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in relation to coffee berry phenology under Colombian field conditions. **Scientia Agricola**, v. 67, p. 658-668, 2010.
- SILVA, F.C. DA.; VENTURA, U.M.; MORALES, L. Capture of *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera, Scolytidae) in response to trap characteristics. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 567-571, 2006.
- TEIXEIRA, C.D.; SOUZA, O.; COSTA, J.N.M. Frutos de Café “Conilon” Brocados por *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): Qual a Importância de sua Queda no Decorrer da Fase de Frutificação?. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, n.3, p.390-394, 2006.
- TOWNSEND, R.J.; CALLAGHAN, M.O.; JOHNSON, V.W.; JACKSON, T.A. Compatibility of microbial control agentes *Serratia entomophila* and *Beauveria bassiana* with selected fertilisers. **New Zealand Plant Protection**, v. 56, p. 118-122, 2003.
- VAIL, P.V.; HOFFMANN, D.F.; STEVEN TEBBETS, J. Autodissemination of *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) granulosis virus by healthy adults. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 29, p. 71-74, 1993.
- VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of Some *Beauveria bassiana* Isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* .**Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p.147-152 , 1996.

- VÁZQUEZ, L.L.; ALFONSO, J. RAMOS, Y.; MARTÍNEZ, A.; MORENO, D.; MATIENZO, Y. Relaciones de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) con el suelo del cafetal como base para su manejo agroecológico. **Agroecología**, v. 7, p. 81-90, 2012.
- VEGA, F.E.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrestrial Arthropod Reviews**, v. 2, p. 129-147, 2009.
- VELEZ-ARANGO, P.E.; ESTRADA-VALENCIA, M.N.; GONZALEZ-GARCA, M.T.; VALDERRAMA-FONSECA, A.M.; BUSTILLO-PARDEY, A.E. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. **Manejo Integrado de Plagas**, v. 62, p. 38-53, 2001.
- VÉLEZ A, P.E.; POSADA F, F.J.; MARÍN M, P.; GONZÁLEZ G, T.; OSARIO V, E.; BUSTILLO P, A.E. (Ed.). **Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos**. Chinchiná (Colombia): Cenicafé, 1997, p.1-37.
- VILLACORTA, A.; POSSAGNOLO, A.F.; SILVA, R.Z.; RODRIGUES, P.S. Um modelo de armadilha com semioquímicos para o manejo integrado da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) no Paraná. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, Vitória, 2001. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p.2093-2098.

2. A MORTALIDADE DE *Hypothenemus hampei* PELA APLICAÇÃO DE SUSPENSÕES AQUOSAS DE *Beauveria bassiana* É INFLUENCIADA PELO MÉTODO DE CONTATO E ADJUVANTES

Resumo

Hypothenemus hampei é a mais importante praga da cafeicultura em todo mundo, sendo considerada uma praga de difícil controle por permanecer a maior parte do tempo no interior do fruto. Uma das estratégias de controle dessa praga é por meio de biopesticidas a base de *Beauveria bassiana*, entretanto estudos em laboratório revelaram que para um controle satisfatório pela pulverização do fungo seriam necessárias altas concentrações do patógeno. Dessa forma, objetivou-se com este trabalho: *i*) avaliar, em laboratório, o efeito de sete adjuvantes adicionados a suspensões de conídios de *B. bassiana* (ESALQ-PL63) na mortalidade de *H. hampei*; *ii*) determinar o efeito de dois adjuvantes na contaminação de *H. hampei* por diferentes métodos de contato; e *iii*) mapear a adesão e germinação dos conídios de *B. bassiana* no integumento de *H. hampei* para tentar explicar a mortalidade diferencial em função do método de contato. Pulverização direta de suspensões de conídios do fungo com o adjuvante Tween 80 resultou em menor mortalidade de *H. hampei* do que suspensões com os demais adjuvantes testados em laboratório. A mortalidade de *H. hampei*, quando o fungo foi aplicado com Tween 80, foi 3,6 menor em comparação ao patógeno aplicado com Silwet L-77. Mortalidades de *H. hampei* após aplicações de *B. bassiana* com os adjuvantes Silwet L-77 e Tween 80 foram comparadas em função do método de contato: *i*) imersão, *ii*) residual em fruto (RF), *iii*) pulverização direta nos insetos em placas com papel filtro seguido de manutenção dos insetos no papel pulverizado (PDR) e *iv*) pela pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente exposto no orifício de penetração do fruto (PIPF). A eficácia do fungo variou de acordo com o método de contato e adjuvantes. As pulverizações diretas dos insetos resultaram em mortalidades reduzidas (23-53%), enquanto que a imersão e os métodos que permitiram que os insetos ficassem em contato com os conídios no substrato (fruto ou papel de filtro) após a pulverização (efeito residual) resultaram em maiores mortalidades (63-98%). As imagens ultramorfológicas de *H. hampei* inoculados por diferentes métodos sugerem que a região ventral do abdome (especialmente nas dobras interseguimentares) é o principal sítio de penetração do fungo, visto que, diferente dos outros métodos, na pulverização direta que resultou em mortalidades reduzidas, grande quantidade de conídios aderidos e germinados foram observados no élitro em comparação com a região ventral.

Palavras-chave: Contaminação residual; Imersão; Pulverização direta; Broca-do-café

Abstract

Hypothenemus hampei is the most important pest of coffee production worldwide, and its control is considered difficult as it remains most of the time inside the fruit. One of the control strategies of this pest is through biopesticides based on *Beauveria bassiana*; however, laboratory studies have shown that for a satisfactory control by spraying the fungus, high concentrations of the pathogen are required. Thus, the objective of this work were to *i*) evaluate, in the laboratory, the effect of seven adjuvants added to the suspensions of *B. bassiana* (ESALQ-PL63) on mortality of *H. hampei*; *ii*) determine the effect of two adjuvants on contamination of *H. hampei* by different inoculation methods, and *iii*) map the adhesion and germination of conidia of *B. bassiana* on integument of *H. hampei* in an attempt to explain the differential mortality based on the inoculation method. Direct spraying of suspensions of the fungus conidia with adjuvant Tween 80 resulted in lower mortality of *H. hampei* than suspensions with other adjuvants tested in the laboratory. Fungus infection when applied with Tween 80 resulted in infection of *H. hampei* 3.6 less in comparison to the pathogen applied with Silwet L-77. Mortality of *H. hampei*, after applications of *B. bassiana* with adjuvants Silwet L-77 and Tween 80, was compared according to the inoculation method: *i*) immersion, *ii*) residue in fruit (RF), *iii*) direct spraying of insects in paper filter followed by maintenance of insects on sprayed paper (PDR) and *iv*) direct spraying on insect body partially exposed in the penetration hole of the fruit (PIPF). Effectiveness of adjuvants with the fungus varied with the inoculation method. Direct sprays of the insects reduced mortality (23 – 53%), while immersion and the methods that allowed the insects to remain in contact with the conidia in the substrate (fruit or filter paper) after spraying (residual effect), resulted in greater mortality (63 – 98%). Ultramorphological images of *H. hampei*, inoculated by different methods, suggest that the ventral region of the abdomen (especially in the interseguimentary folds) is the primary infection site of the fungus since, unlike the other methods, in the direct spray, which resulted in reduced mortality, a large number of conidia adhered and germinated were observed in the elytron compared to the ventral region.

Keywords: Residual contamination; Immersion; Direct spray; Coffee beery borer

2.1. Introdução

Hypothenemus hampei (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), popularmente conhecida como broca-do-café, tem o comportamento de perfurar as sementes para se alimentar e se reproduzir, o que traz como consequência prejuízos

econômicos devido à redução da produtividade e da qualidade da bebida, (DAMON, 2000; VEGA *et al.*, 2009).

Atualmente, a busca por métodos alternativos ao controle químico para o manejo dessa praga tem se intensificado. Dentre eles, pode ser citado o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Hypocreales: Cordycipitaceae), que tem se mostrado ser um candidato promissor nessa tarefa, visto o mesmo ser frequentemente encontrado em condições de campo, infectando esse inseto. Além disso, é sabido que as condições microclimáticas do agroecossistema cafeeiro beneficiam o microorganismo, com níveis de umidade relativa elevados em alguns períodos do dia e com a maior proteção contra a radiação solar, que é deletéria ao fungo (PARDEY, 2005).

Muito embora *B. bassiana* seja uma excelente alternativa para controle de *H. hampei*, a melhor estratégia de utilização do fungo ainda precisa ser determinada. Por exemplo, quando se faz a pulverização da suspensão aquosa do fungo na concentração de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ com adição do espalhante adesivo Tween, observa-se em, condições de laboratório, índice de mortalidade dos insetos inferior a 50% (VARELA, MORALES, 1996; NEVES, HIROSE, 2005; MOTA, 2013). Esse resultado indica a necessidade de concentrações elevadas do fungo para que se possa obter um resultado satisfatório em campo, o que aumentaria os custos de controle. Por outro lado, em estudos com aplicação do patógeno pelo método de imersão (VÉLEZ *et al.*, 1997; POSADA-FLÓREZ, 2008; VLEZ-ARANGO *et al.*, 2001; GERÓNIMO-TORRES *et al.*, 2016), obteve-se índices de mortalidade de até 100%. Mortalidades elevadas também foram obtidas pela aplicação indireta do fungo, ou seja, pulverização no substrato e posterior transferência dos insetos (FERNANDES *et al.*, 1985), bem como pela pulverização direta dos insetos mais o efeito residual pela manutenção dos insetos no substrato pulverizado (DALVI *et al.*, 2011).

O uso dos fungos entomopatogênicos geralmente se dá via pulverização aquosa (liberação inundativa) e, devido à natureza hidrofóbica da superfície dos seus conídios, alguns fatores devem ser observados para que o sucesso da aplicação seja garantida (BOUCIAS *et al.*, 1988). Nessa perspectiva, há a necessidade da adição de diferentes produtos à calda de pulverização, para aumentar os índices de: deposição, espalhamento, molhamento, adesão e retenção sobre a praga alvo (COSTA *et al.* 2003). Assim, uma forma de aumentar a eficiência de *B. bassiana* para manejo de *H. hampei* por pulverização aquosa, poderia ser a adição de adjuvantes à calda. A

aplicação de suspensão de conídios de *B. bassiana* (10^7 conídios.mL⁻¹), adicionando Silwet L-77 e Break-thru (200 ppm), melhoraram significativamente a eficácia quando aplicados em ninfas de 3º e 4º instares de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotipo B, provocando uma mortalidade aproximadamente de 74 a 78%, respectivamente, maiores do que as mortalidade alcançadas com o uso do Tween 80 em combinação com o patógeno (17%) (MASCARIN *et al.*, 2014).

Sabe-se que os fungos entomopatogênicos infectam os insetos, preferencialmente, pela superfície do seu integumento (BOUCIAS, PENDLAND, 1998). Conseqüentemente, a eficiência da aplicação de um entomopatógeno para controle está diretamente relacionada ao local de adesão e de germinação dos conídios. Mapear esses sítios no corpo do inseto alvo é uma necessidade para entender o funcionamento da estratégia. Nessa direção, o uso de algumas ferramentas torna-se essencial, tal como é o caso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (ASENSIO *et al.*, 2005; NEVES, ALVES, 2004; PEDRINI *et al.*, 2007; ST. LEGER *et al.*, 1991; ARNOSTI *et al.*, 2016; TRAVAGLINI, 2016).

Diante das informações apresentadas e buscando-se novas estratégias de manejo da broca-do-café, o presente trabalho objetivou: i) avaliar, em laboratório, o efeito de sete adjuvantes adicionados à suspensões de *B. bassiana* na mortalidade de *H. hampei*; ii) determinar o efeito de dois adjuvantes na contaminação de *H. hampei* por diferentes métodos de contato; e iii) mapear a adesão e germinação dos conídios de *B. bassiana* no integumento de *H. hampei* contaminados por diferentes métodos de aplicação do patógeno.

2.2. Material e métodos

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) em sala climatizada (25 ± 1 °C, $70\pm 25\%$ UR) e fotofase de 12 horas.

2.2.1. Criação de *H. hampei*

A criação foi realizada em café pergaminho com umidade aproximada de 45%, de acordo com as orientações de Silva *et al.* (2012). Os insetos utilizados tinham entre

10 a 20 dias de idade e foram coletadas após a saída natural dos mesmos do pergaminho.

2.2.2. Produção de *B. bassiana* e preparo da suspensão

Foi utilizado o isolado ESALQ-PL63 de *B. bassiana* proveniente da coleção de patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, da ESALQ/USP. Realizou-se a multiplicação das matrizes do fungo em meio de cultura BDA Difco® (Becton-Dickinson Company, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) + 5 g.L⁻¹ de Pentabiótico + 10 µL.L⁻¹ de Derosal® (Bayer S.A.) e, na sequência, procedeu-se à sua produção, utilizando como substrato arroz parboilizado (LEITE *et al.*, 2003). Após a secagem do arroz + fungo, fez-se a separação dos conídios com auxílio de peneiras vibratórias com malha de 200 mesh. Os conídios foram transferidos para tubos de vidro de 250 mL do tipo Schott e armazenados em freezer a -40° C, onde permaneceram até o momento da sua utilização. A viabilidade dos conídios utilizados nos experimentos foi determinada 24 horas antes da preparação das suspensões seguindo a metodologia de Oliveira *et al.* (2015). A concentração utilizada foi ajustada para 1×10^7 conídios viáveis.mL⁻¹.

2.2.3. Efeitos de adjuvantes na eficácia de *B. bassiana* para o controle de *H. hampei*

Foram realizados dois bioensaios para avaliar o incremento da mortalidade de *H. hampei* quando pulverizado com suspensão de conídios do isolado ESALQ-PL63 de *B. bassiana* (1×10^7 conídios.mL⁻¹) em associação com diferentes adjuvantes (Tabela 1). A escolha dos adjuvantes e suas respectivas concentrações foram baseadas nos resultados obtidos do manejo de *Diaphorina citri*, utilizando o fungo *Isaria fumosorosea* via pulverização de suspensão aquosa, no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP, que mostraram que essas concentrações permitiam um melhor molhamento da superfície (D' Alessandro, informação pessoal).

Tabela 1. Adjuvantes e concentrações utilizadas para aplicação de *Beauveria bassiana* no controle de *Hypothenemus hampei*

Produto	Ingrediente Ativo (grupo químico)	Classificação Agrônômica*	Concentração (%)
Assist®	Óleo mineral (hidrocarbonetos alifáticos)	Acaricida/adjuvante/espalhante adesivo	2
Du Fol®	Óleo vegetal (ésteres de ácidos graxos)	Adjuvante	0,2
Silwet L- 77 AG®	Heptametiltrisiloxano modificado com éter metil aliloxipolietilenoglicol (Silicones)	Espalhante adesivo	0,025
Break Thru®	Copolímero de Poliéter e Silicone (Silicones)	Espalhante adesivo/adjuvante	0,005
KBRAdj	-	-	0,075
Argenfruit RV®	Óleo mineral (hidrocarbonetos alifáticos)	Fungicida/inseticida	1
Tween 80®	Polissorbato (Ésteres de sorbitan etoxilados)	Surfactante não iônico	0,01

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado, com 14 tratamentos, sendo os sete adjuvantes (Tween 80® como controle positivo) com adição de *B. bassiana*. Nos controles, foram utilizadas as soluções dos adjuvantes sem adição do patógeno. Foram usadas quatro repetições com 10 insetos para cada repetição (n=40).

Os grupos de 10 insetos foram transferidos para placas de Petri (com 140 mm de diâmetro) forradas com papel filtro e pulverizados com 2 mL (dos diferentes tratamentos), em Torre de Potter com pressão de 15 libras.pol⁻¹. Os insetos foram então transferidos com um pincel (nº zero) de cerdas macias para placas de Petri (55 mm de diâmetro) forradas com papel filtro limpos. No primeiro experimento, os insetos foram transferidos aproximadamente 1,3 horas após a pulverização e, no segundo experimento, a transferência foi imediatamente após a pulverização. Os insetos foram alimentados com pedaços de aproximadamente 1 mm³ de café pergaminho

hidratados por imersão em água destilada durante cinco dias. As placas contendo os insetos foram cobertas com tecido *Voile* e acondicionadas em sala climatizada.

Diariamente, durante 10 dias, foi contabilizado o número de insetos mortos. Os insetos mortos foram submetidos à desinfestação superficial por meio da imersão em álcool 70% por aproximadamente um minuto e lavagem com água destilada estéril. Esses foram então acondicionados em câmara úmida e incubados em BOD a 25 ± 1 °C por 10 dias, para confirmação da mortalidade pelo fungo através da esporulação do patógeno.

2.2.4. Comparação de metodologias de contato de suspensão aquosa de *B. bassiana* para o controle de *H. hampei*

O objetivo deste estudo foi comparar diferentes métodos de contato *B. bassiana* em *H. hampei*. As suspensões de *B. bassiana* foram feitas com o adjuvante Silwet L-77 AG® (0,025%), que apresentou incremento na mortalidade de *H. hampei* no estudo anterior. Para efeito de comparação, foi utilizado o adjuvante Tween 80® (0,01%), por ser comumente utilizado em bioensaios de laboratório em suspensões de fungos entomopatogênicos. Os adjuvantes também foram utilizados isoladamente.

2.2.4.1. Aplicação por Pulverização Direta (PD), Pulverização Direta + Efeito Residual (PDR) e Imersão (I)

A aplicação direta foi realizada pela pulverização em Torre de Potter em grupos de 10 insetos que foram imediatamente transferidos para placas de Petri forradas com papel de filtro conforme item 2.2.3. No tratamento por pulverização direta + resíduo, o grupo de insetos foi pulverizado em placa de Petri (55 mm de diâmetro) forrada com papel filtro e os insetos foram deixados na placa sobre o papel filtro pulverizado durante todo o período de avaliação. O último método de contato foi por imersão, sendo os insetos transferidos para tubos de vidro de fundo chato contendo 10 mL dos tratamentos e mantidos por 30 segundos. Os insetos foram recuperados por peneiramento (peneira plástica com uma camada dupla de papel filtro) e transferidos para placas de Petri (55 mm de diâmetro), forradas com papel filtro. Após o acondicionamento nas placas, os insetos foram alimentados com pedaços de

endosperma de café (45% de umidade). As placas foram cobertas com filme plástico e, a cada dois dias, eram umedecidos com 200 µL de água destilada estéril para manutenção da umidade. As avaliações foram conduzidas diariamente conforme item 2.2.3. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente aleatorizado com quatro repetições de 10 insetos (n=40).

2.2.4.2. Comparação de mortalidade por pulverização direta e indireta (efeito residual)

2.2.4.2.1. Pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente exposto no orifício de penetração do fruto (PIPF) e pulverização direta nos insetos seguido de transferência imediata para frutos limpos (PDF)

No tratamento referido como PIPF, os insetos foram pulverizados quando estavam com o corpo parcialmente exposto no orifício de penetração do fruto. Para tanto, 24 horas antes da montagem do experimento, 200 insetos aproximadamente foram coletados da criação e colocados em bandeja de plástico (17,5 x 12,5 x 6,5 cm) forrada com papel toalha, onde foram colocados cerca de 100 frutos verdes de café. Posteriormente, essa bandeja foi vedada com tecido “voile” para evitar a fuga dos insetos. Em seguida, o fruto já abrigando o inseto foi colocado em suporte plástico posicionado com a coroa para cima contendo o orifício de penetração com os insetos (10 insetos/repetição), onde foram pulverizados com 2 mL dos respectivos tratamentos. Com auxílio de pinça, os frutos contendo os insetos foram colocados individualmente em tubos de vidro que foram vedados com chumaço de algodão (diariamente umedecido com água destilada) e colocados em prateleiras em sala climatizada (25±2°C, 70±25% UR e fotofase de 12 h). Após 10 dias, contabilizou-se o número de insetos mortos com sinais de esporulação do fungo. Os insetos mortos, porém, sem esporulação foram colocados em câmara úmida (item 2.2.3).

No tratamento PDF, os insetos foram pulverizados diretamente conforme descrito no item 2.2.4.1. Depois da pulverização com a suspensão de conídios de *B. bassiana* (ESALQ-PL63), os insetos foram individualmente alocados em tubos de vidros de fundo chato (85 X 25 mm) contendo no seu interior um só fruto verde de café (acima de 80% de umidade) lavado em água destilada.

Foi utilizado delineamento inteiramente aleatorizado com quatro repetições por tratamento contendo 10 insetos (n=40).

2.2.4.2.2. Pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente exposto no orifício de penetração do fruto (PIPF), pulverização direta nos insetos seguida de transferência imediata para frutos limpos (PDF) e pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual) (RF)

Nesse experimento, foram utilizados os mesmos tratamentos do item 2.2.4.2.1 com a inclusão do tratamento de contato por pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual) (RF). Para tanto, os frutos verdes de café foram lavados em água destilada, secados sobre papel toalha, colocados em suporte plástico com a região da coroa voltada para cima e em seguida pulverizados em torre de Potter. Após a evaporação da suspensão, os frutos foram colocados individualmente em tubo de vidro de fundo chato, para onde foi transferido um inseto não pulverizado por tubo. Os tubos foram mantidos vedados com algodão. Todos os tratamentos foram avaliados conforme o item 2.2.4.2.1.

2.2.5. Microscopia Eletrônica de Varredura de Baixo Vácuo (MEV)

Concomitantemente e da mesma forma do experimento descrito no item 2.2.4.2.2, grupos de insetos que entraram em contato com o patógeno pelos diferentes métodos de aplicação e após 24, 48 e 72 horas foram retirados para observação da adesão e germinação de conídios nos insetos por Microscopia Eletrônica de Varredura. Para cada intervalo de avaliação, 10 adultos de *H. hampei* foram fixadas em paraformaldeído 4% por 48h. Posteriormente foram desidratadas em série crescente de acetona (70%, 80%, 90%, 95% e 2 vezes em 100%, com duração de 10 minutos cada banho). Após secagem em ponto crítico, as amostras foram coladas em *stubs* de alumínio com auxílio de fita dupla-face a fim de se proceder a metalização com ouro em *sputtering* marca Balzers modelo SCD050. Em seguida, realizou-se a análise e fotodocumentação do material em microscópio eletrônico de varredura

Hitachi TM3000, alocado no Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP de Rio Claro, SP, Brasil.

2.2.6. Análise estatística

Os dados de mortalidade diária (total) dos experimentos de efeitos de adjuvantes na eficácia de *B. bassiana* para o controle de *H. hampei* no experimento de Pulverização Direta (PD), Pulverização Direta + Efeito Residual (PDR) e Imersão (I) foram submetidos à análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, utilizando o teste Log Rank (Mantel-Cox) do *software* estatístico IBM SPSS Statistics v. 22.0.0 (2013).

Para os dados de porcentagem de insetos esporulados (mortalidade confirmada) de todos os experimentos e para a mortalidade total dos experimentos descritos nos itens 2.2.4.2.1 e 2.2.4.2.2, que avaliaram o efeito dos métodos de contato, foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (GLM) da família quasibinomial. Nesse caso, a mortalidade dos controles foi excluída da análise por apresentar muitos valores zero. A verificação da qualidade do ajuste foi feita por meio do uso do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (HINDE; DEMÉTRIO, 1998). Quando detectadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* estatístico “R”, versão 2.13.1 (R Development Core Team, 2011).

2.3. Resultados

2.3.1. Efeitos de adjuvantes na eficiência de *B. bassiana* para o controle de *H. hampei*

A associação de adjuvantes, exceto Tween 80, com *B. bassiana* resultou em significativa redução na sobrevivência de adultos de *H. hampei* em comparação aos adjuvantes aplicados isoladamente ($\chi^2=187,589$; $df=13$; $P<0,001$). A aplicação de Tween 80 com o fungo resultou na sobrevivência de 62,5% dos insetos e não diferiu estatisticamente da aplicação de Tween 80 isoladamente. Os tratamentos contendo os outros adjuvantes em associação com o patógeno foram estatisticamente semelhantes, com sobrevivência variando de 17,5% para a adição do Silwet L-77 AG®

a 42,5% para o Du Fol® (Figura 1). A sobrevivência dos insetos pulverizados com os adjuvantes isoladamente variou entre 85% e 97,5%, sendo que Dufol apresentou menor toxicidade aos insetos do que Tween 80, KBRAdj e Silwet. Nenhum dos insetos dos tratamentos sem aplicação do fungo (controles) apresentou sinais de esporulação do patógeno. Nos tratamentos com aplicação de *B. bassiana*, não foi observada diferença significativa na porcentagem de cadáveres esporulados ($P=0,6679$), tendo os valores variado de $72,5\pm 17\%$ no tratamento com Silwet L-77 a $37,5\pm 15\%$ com Tween 80 (Figura 2).

As porcentagens de mortalidades observadas no segundo experimento foram menores do que no primeiro experimento (Figura 1). No segundo experimento, observou-se redução significativa da sobrevivência de *H. hampei* quando pulverizados com *B. bassiana* em associação com os adjuvantes apenas para Break Thru, Silwet e Assist ($\chi^2=60,787$; $df=13$; $P<0,001$) em relação aos adjuvantes pulverizados isoladamente. A mortalidade causada pela pulverização de *B. bassiana* com o espalhante adesivo Tween 80 (87,5% de sobrevivência) foi inferior à mortalidade pela aplicação do fungo com Break Thru e Silwet, confirmando-se a menor eficiência de controle do inseto com esse adjuvante observada no experimento 1. Nos tratamentos com aplicações dos adjuvantes sem o fungo, a sobrevivência foi $\geq 90\%$. Em todos os insetos mortos nos tratamentos com *B. bassiana* observou-se esporulação do fungo nos cadáveres.

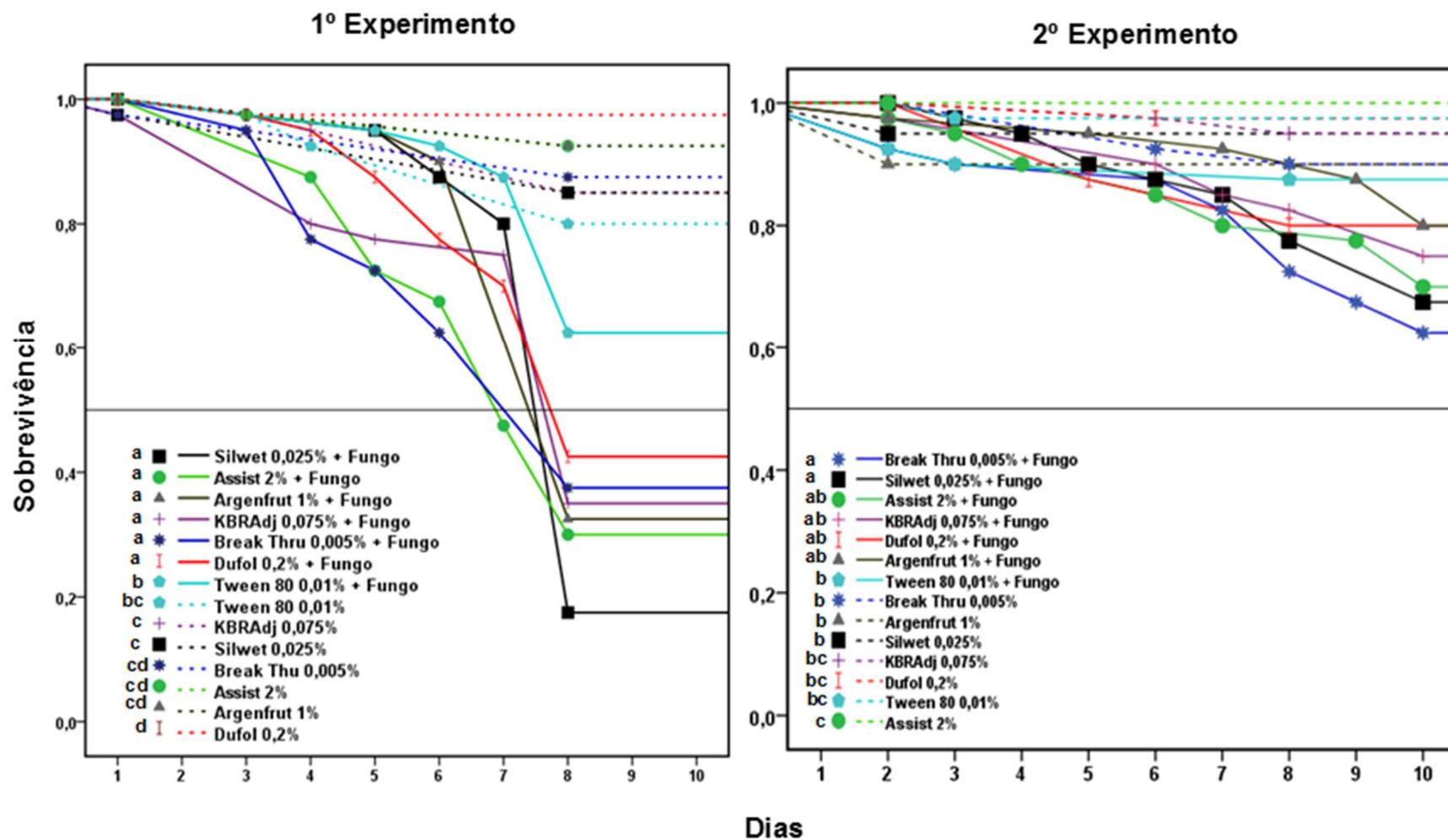


Figura 1. Sobrevivência média de adultos de *Hypothenemus hampei* pulverizados diretamente com suspensão de 1×10^7 conídios.mL⁻¹ de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 e diferentes adjuvantes e mantidas em laboratório por 10 dias (25 ± 1 C° e 70 ± 20 % UR)

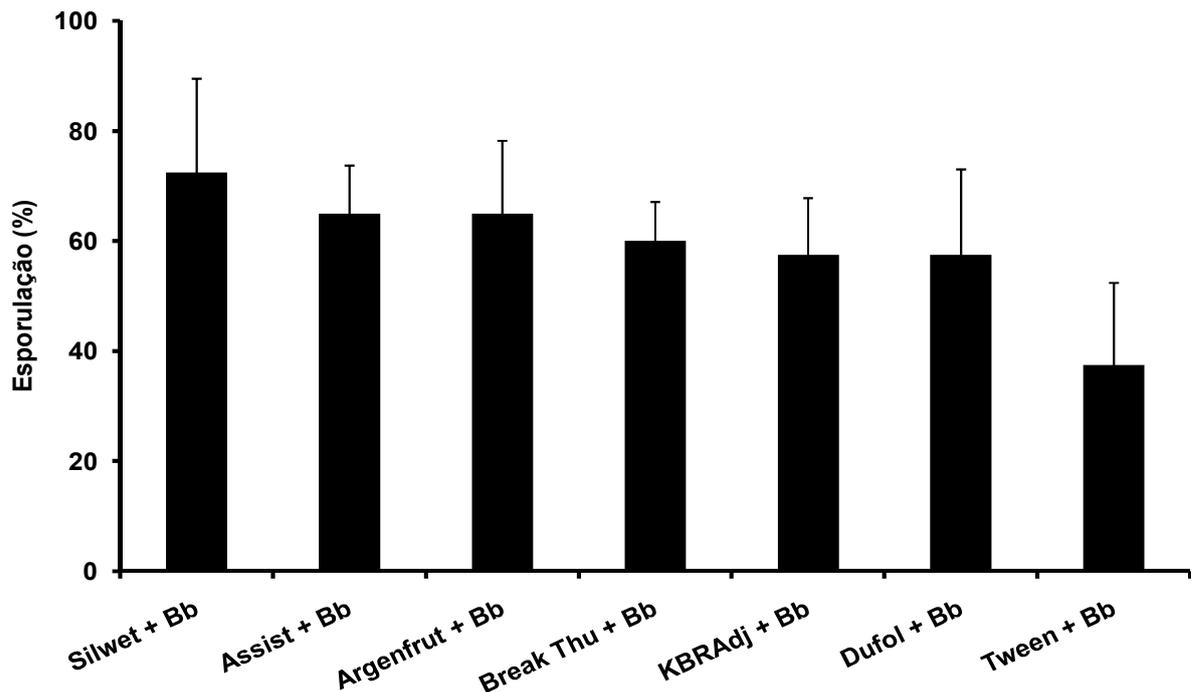


Figura 2. Porcentagem de esporulação de *Beauveria bassiana* (Bb) em adultos de *Hypothenemus hampei* pulverizados com o isolado ESALQ-PL63 (1×10^7 conídios.mL⁻¹) e diferentes adjuvantes do experimento 1 (Fig 1) ($P=0,6679$)

2.3.2. Comparação de difentes métodos de contato de *B. bassiana* aplicada como suspensão aquosa na mortalidade de *H. hampei*

2.3.2.1. Pulverização direta, pulverização direta + resíduo em papel filtro e imersão

Os tratamentos contendo adjuvantes com e sem o fungo, aplicados por diferentes métodos, apresentaram diferenças significativas ($\chi^2=321,702$; $df=9$; $P<0,001$). O efeito dos adjuvantes no aumento da mortalidade quando adicionado ao fungo variou em função do método de contato (Figura 3). No contato por pulverização direta, não foi observada diferenças entre os tratamentos do fungo com Silwet e Tween em relação aos adjuvantes aplicados isoladamente. Já nos dois outros métodos de contato, a aplicação do fungo com adjuvante resultou em menor sobrevivência dos insetos em relação à aplicação do adjuvante isoladamente, exceto para Silwet por imersão. Silwet apresentou toxicidade elevada para os insetos, resultando em rápida mortalidade de todos os insetos por imersão.

Independentemente do adjuvante utilizado, o contato por pulverização direta + efeito residual e por imersão (< 10% de sobrevivência dos insetos) resultou em maiores mortalidades do que os tratamentos com contato por pulverização direta (77,5% de sobrevivência). A sobrevivência nos controles onde os insetos foram expostos aos adjuvantes isoladamente variou de 82,5 a 95%.

Não foram observados sinais do patógeno nos insetos submetidos aos tratamentos sem o fungo (controle). A esporulação de *B. bassiana* sobre os cadáveres de *H. hampei* nos insetos nos tratamentos por imersão e pulverização direta + efeito residual foram estatisticamente semelhantes ($P>0,05$) para os dois adjuvantes, variando de $87,5\pm 6,3\%$ a $97,5\pm 2,5\%$, diferindo dos tratamentos com pulverização direta ($P<0,001$) que apresentaram esporulação 6 e 6,5 vezes menor para o Silwet L-77 e Tween 80, respectivamente (Figura 4).

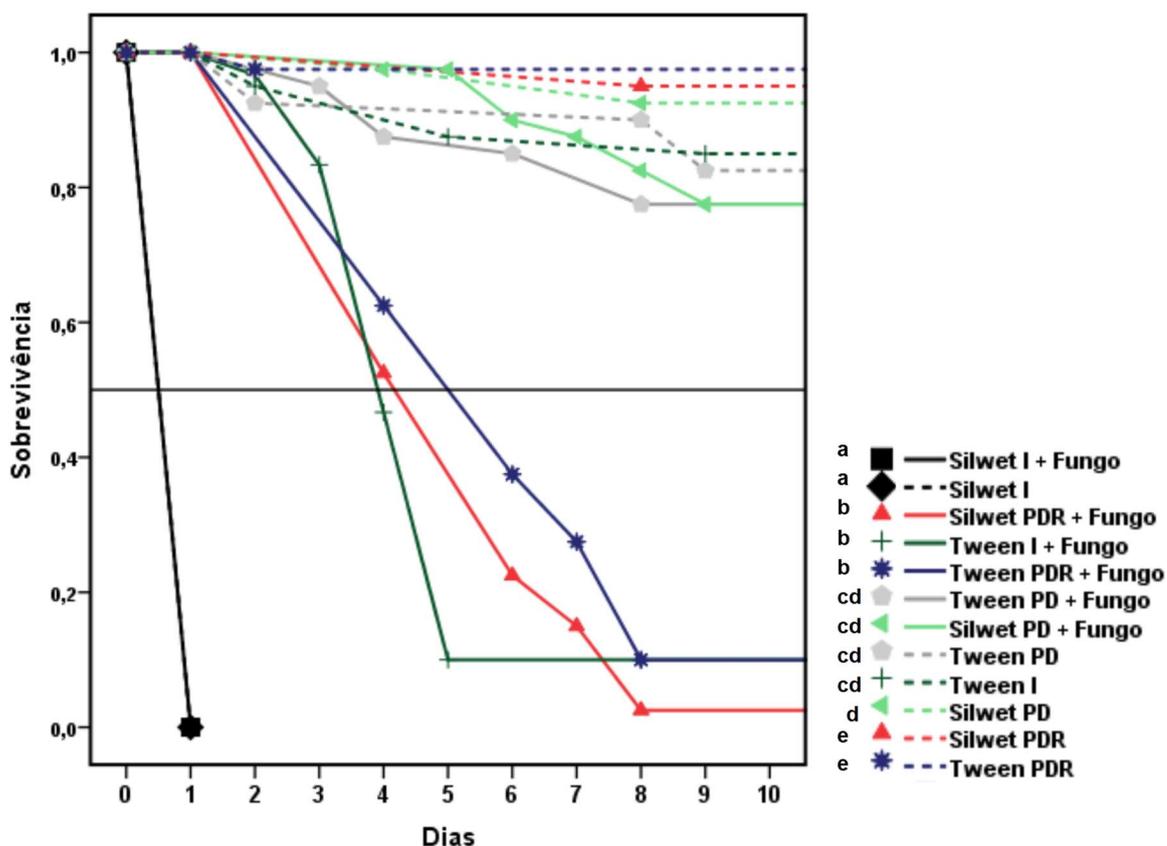


Figura 3. Sobrevivência média de adultos de *Hypothenemus hampei* com pulverização direta sobre os insetos (PD), imersão (I) e pulverização direta + efeito residual (PDR) com suspensão aquosa a 1×10^7 conídios.mL⁻¹ de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 com diferentes adjuvantes e mantida em laboratório por 10 dias (25 ± 1 C° e $70\pm 20\%$ UR).

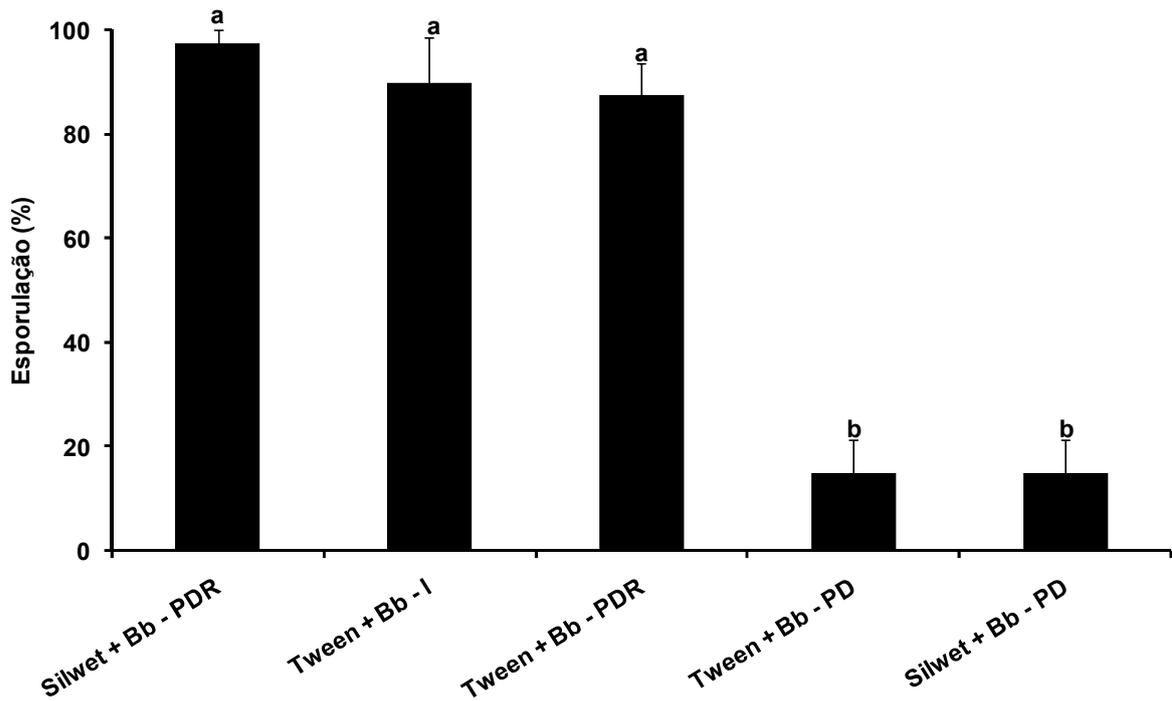


Figura 4. Porcentagem média (\pm EP) de esporulação de *Beauveria bassiana* (Bb) em cadáveres de *Hypothenemus hampei* após aplicação de suspensão aquosa a 1×10^7 conídios.mL⁻¹ do isolado ESALQ-PL63 por pulverização direta (PD), imersão (I) e pulverização direta + efeito residual (PDR) com adjuvantes do experimento da figura 3.

2.3.2.2. Comparação de inoculação por pulverização direta e indireta (efeito residual)

No experimento em que foram comparados os métodos PIPF e PDF, observou-se diferença significativa entre os tratamentos ($\chi^2=321,702$; $df=9$; $P<0,001$). A inoculação por PIPF, para os dois adjuvantes, resultou em maior mortalidade de *H. hampei* (75 e 80%), diferindo estatisticamente do contato por PDF (45 e 52%) (Tabela 2). Não foram observadas diferenças significativas entre Silwet e Tween para nenhum método de contato. Para esse experimento, houve baixas mortalidades nos tratamentos sem fungo, variando de 0 a $2,5 \pm 2,5\%$.

No 2º experimento, em que se avaliou as aplicações por PIPF, RF e PDF, foram observadas diferenças significativas entre os métodos de contato ($\chi^2=321,702$; $df=9$; $P<0,001$). Independentemente do tipo de adjuvante, o método de contato PDF resultou em mortalidade menor dos insetos do que PIPF e RF. O contato por PIPF, para os dois adjuvantes e por RF utilizando Silwet L-77 AG, apresentaram os melhores

resultados, com mortalidade variando de 72,5 a 82,5% e diferiram de PDF para os dois adjuvantes e RF com Tween 80. A mortalidade dos insetos submetido aos tratamentos sem fungo (controles) variaram de $5 \pm 2,3\%$ a $15 \pm 2,3\%$.

Tabela 2. Mortalidade média (\pm EP) de adultos de *Hypothenemus hampei* inoculados com 10^7 conídios.mL⁻¹ de *Beauveria bassiana* (Bb) ESALQ-PL63 por diferentes métodos de inoculação e mantidas em laboratório por 10 dias (25 ± 1 C° e $70 \pm 20\%$ UR)

Tratamentos	Método de Inoculação	Mortalidade (%)	
		1º Experimento	2º Experimento
<i>Bb</i> + Silwet L-77	PIPF	$75 \pm 9,6$ a	$82,5 \pm 4,8$ a
<i>Bb</i> + Silwet L-77	RF	-	$77,5 \pm 2,5$ a
<i>Bb</i> + Tween	PIPF	$80 \pm 5,8$ a	$72,5 \pm 2,5$ a
<i>Bb</i> + Tween	RF	-	$62,5 \pm 2,5$ b
<i>Bb</i> + Tween	PDF	$45 \pm 5,0$ b	$52,5 \pm 2,5$ b
<i>Bb</i> + Silwet L-77	PDF	$52,5 \pm 4,5$ b	$47,5 \pm 7,5$ b
Tween	RF	-	$15 \pm 2,9^1$
Tween	PIPF	$2,5 \pm 2,5^1$	$7,5 \pm 4,8^1$
SilwetL-77	RF	-	$5 \pm 2,9^1$
Tween	PDF	0 ¹	$5 \pm 2,9^1$
Silwet L-77	PDF	$2,5 \pm 2,5^1$	$5 \pm 2,9^1$
Silwet L-77	PIPF	0 ¹	$5 \pm 2,9^1$

PIPF: pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente posicionado no orifício de perfuração do fruto

RF: pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual)

PDF: pulverização direta no inseto seguido de transferência imediata para fruto limpo

- Tratamentos não incluídos no 1º. experimento

¹dados inflados de zero não incluído na análise estatística

2.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura de Baixo Vácuo (MEV)

Foram mapeados os locais de predominância de adesão e germinação dos conídios de *B. bassiana* sobre a superfície externa do integumento nas regiões dorsal (Figuras 5 A e 6 A) e ventral (Figuras 5 B e 6 B) de adultos de *H. hampei* após 24, 48 e 72 horas de contato com o patógeno mais adjuvantes com as diferentes formas de contato. Os resultados mostraram, de forma geral, que, independente do adjuvante e do método de inoculação do patógeno utilizados, houve uma predominância de adesão de conídios próxima à cavidade de inserção das cerdas nos élitros e nos segmentos abdominais da região ventral dos insetos.

2.3.3.1. Contato por pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual) (RF)

Independente do adjuvante utilizado no contato por RF, observou-se, na região dorsal dos insetos (élitro), menor adesão de conídios em relação às demais formas de contato, principalmente nas primeiras 24 horas (Figuras 5 C e 6 C). Maior acúmulo de conídios nos élitros dos insetos foi observado com Tween 80 em relação a Silwet, especialmente 72 horas após aplicação (Figura 5 E). Conídios germinados no élitro foram observados quando utilizado o Tween 80 48 horas (Figura 5 D) e 72 horas (Figura 5 E) após aplicação, situação que não ocorreu com o Silwet L-77 (Figura 6 D e E).

Na região ventral segmentar, verificou-se um acúmulo de conídios aderidos nas dobras intersegmentares quando os insetos entraram em contato com RF com *B. bassiana* e Silwet L-77, especialmente 72 horas após aplicação (Figura 6 N). Entretanto, independente do adjuvante e do período de contato, não foram observados conídios germinados (Figuras 5 L, M e N; 6 L, M e N) nem nas regiões esclerotizadas nem nas áreas intersegmentares.

2.3.3.2. Contato por pulverização direta no inseto seguido de transferência imediata para fruto limpo (PDF)

No contato com *B. bassiana* por PDF, observou-se maior adesão de conídios na superfície dorsal dos insetos (élitro), quando submetidos ao Tween 80 com incremento de 24h até 72 horas após a aplicação (Figura 5 F, G e H), situação essa, não verificada nos insetos pulverizados com Silwet L-77 para os mesmos períodos de análise (Figura 6 F, G e H). Conídios germinados foram observados somente nos insetos pulverizados com Tween 80 nos períodos de 48h e 72 horas (Figura 5 G e H).

Na região ventral segmentar, uma menor adesão de conídios foi detectada (Figuras 5 O, P e Q; 6 O, P e Q) em todos os períodos de tempo, quando comparado com a região dorsal (élitro). Entretanto, destaca-se que germinação de conídios nessa região dos insetos foi observada apenas com Tween 80 no período de 48 h e 72 h após aplicação (Figura 5 P e Q).

2.3.3.3. Contato por pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente posicionado no orifício de perfuração do fruto (PIPF)

As ultramicrografias da região dorsal (élitro) revelaram que quando se utilizou o contato por PIPF com Tween 80, observou-se maior adesão de conídios (sem sinais de germinação) nos períodos de 24h e 48h após aplicação (Figura 5 I e J), quando comparado aos indivíduos do tratamento onde se utilizou Silwet-L77 no mesmo período de análise (Figura 6 I e J). Situação inversa foi constatada na avaliação após 72h, em que os insetos tratados com Tween 80 apresentaram menor adesão de conídios e sem sinais germinação (Figura 5 K), enquanto que os insetos tratados com Silwet-L77 apresentam grande quantidade de conídios germinados (Figura 6 K). Os resultados evidenciaram que, apesar da menor adesão de conídios nos insetos do tratamento com Silwet-L77, os mesmos apresentam-se germinação já a partir de 24 h após aplicação (Figura 6 I, J e K).

Para a região ventral segmentar, as imagens mostraram também menor adesão de conídios (Figuras 5 R, S e T; 6 R, S, e T) quando comparado ao élitro para ambos adjuvantes. Tanto os insetos pulverizados com Tween 80 quanto com Silwet L-77 apresentaram maior número de conídios aderidos 24h em relação a 48h e 72h (Figuras 5 R e 6 R), chegando a apresentar sinais de germinação no tratamento com Tween 80 (Figura 5 R) e grande acúmulo nas dobras intersegmentares nos indivíduos submetidos ao Silwet-L77 (Figura 6 R).

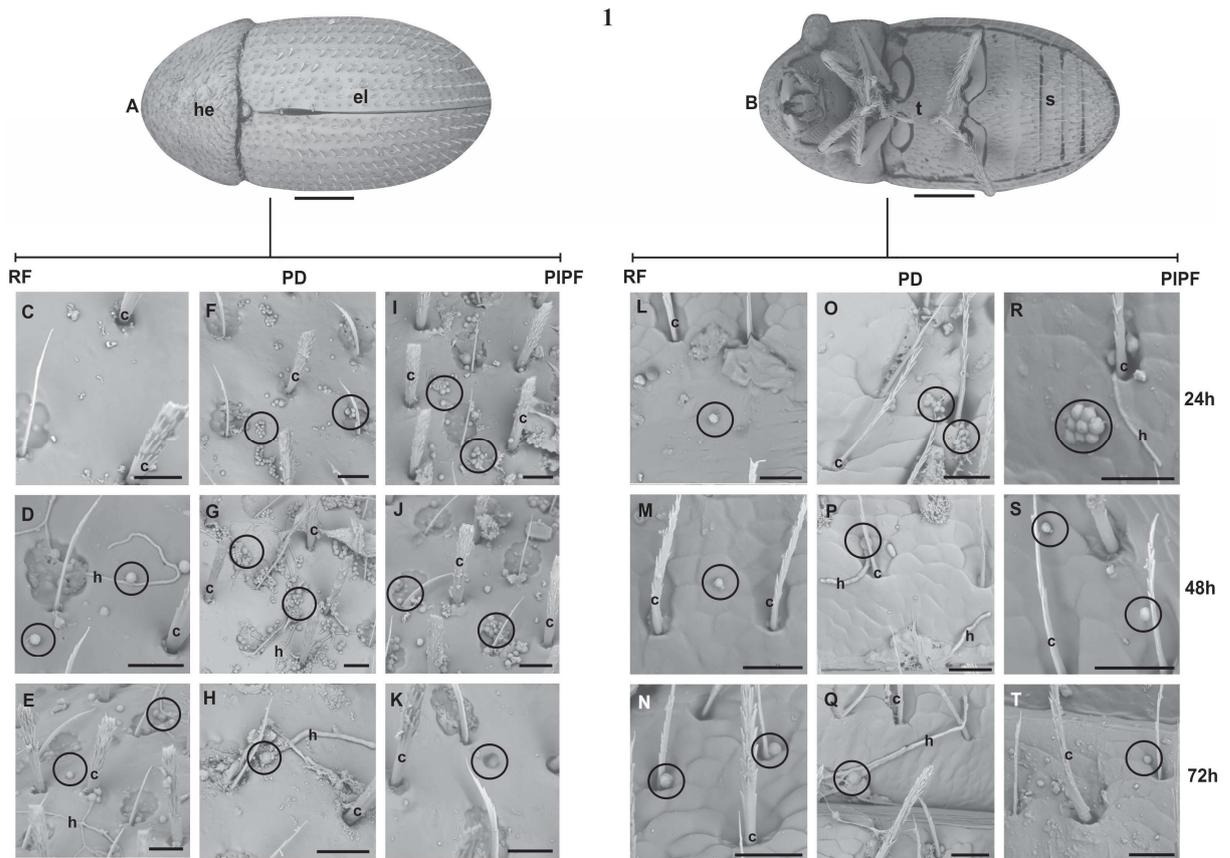


Figura 5. Ultramorfolgia da região dorsal e ventral do corpo de adultos de *Hypothenemus hampei* 24h, 48h e 72h após pulverizações de suspensões fúngicas de *Beauveria bassiana* com adjuvante Tween 80 pelos seguintes métodos: pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual) (**RF**), pulverização direta no inseto seguido de transferência imediata para placas limpas (**PD = PDF**), pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente exposto no orifício de perfuração do fruto (**PIPF**). **C-K**: detalhes ultramorfológicos dos élitros. **L-T**: região ventral dos segmentos abdominais. **A**: região dorsal. **B**: região ventral. Élitros (el), cabeça (he), tórax (t) segmentos abdominais(s), cerdas (c), conídios (círculos) e hifas (h). Barras: **A**: 250µm; **B-S**: 15µm

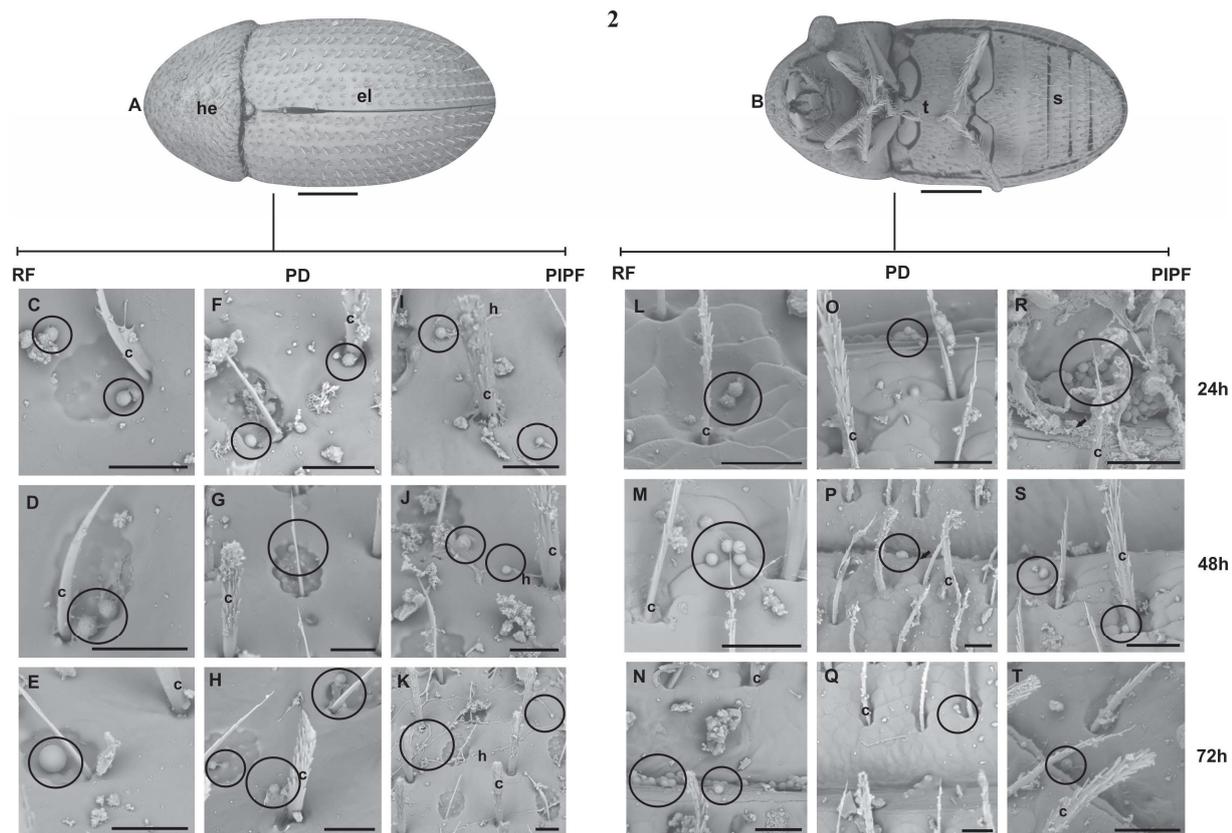


Figura 6. Ultramorfolgia da região dorsal e ventral do corpo de adultos de *Hypothenemus hampei* 24h, 48h e 72h após pulverizações de suspensões fúngicas de *Beauveria bassiana* com adjuvante Silwet-L77 pelos seguintes métodos: pulverização sobre os frutos e transferência dos insetos após secagem da suspensão (efeito residual) (RF), pulverização direta no inseto seguido de transferência imediata para placas limpas (PD = PDF), pulverização direta sobre o corpo do inseto parcialmente exposto no orifício de perfuração do fruto (PIPF). C-K: Detalhes ultramorfológicos dos élitros. L-T: região ventral dos segmentos abdominais. A: região dorsal. B: região ventral. Élitros (el), cabeça (he), tórax (t) segmentos abdominais (s), cerdas (c), conídios (círculos) e hifas (h). Barras: A: 250µm; B-S: 15µm

2.4. Discussão

Estudos de eficiência de *B. bassiana* para o controle de *H. hampei* geralmente resultam em mortalidades inferiores a 50% quando o método de contato é por pulverização direta de conídios (incluindo o isolado ESALQ-PL63 utilizado no presente trabalho) (VARELA, MORALES, 1996; NEVES, HIROSE, 2005; MOTA, 2013). Essa baixa mortalidade dos insetos provavelmente deve ser atribuída à presença de grande quantidade de setas (estruturas quitinosas) presentes na superfície externa dos élitros de *H. hampei* (CONSTANTINO *et al.*, 2011), o que consequentemente causaria a retenção da maioria dos conídios pulverizados.

O uso de adjuvantes associados a suspensões de *B. bassiana* pode ser considerada uma estratégia interessante para incrementar a infecção de *H. hampei*

pelo patógeno, uma vez que aumenta a deposição, espalhamento, molhamento, adesão e retenção dos conídios sobre o inseto alvo (COSTA *et al.* 2003). Nessa direção, as suspensões de *B. bassiana* com o adjuvante Tween 80, amplamente utilizado em suspensões fúngicas, resultou em mortalidades de *H. hampei* 3,6 vezes menores do que o Silwet L-77 no primeiro experimento e apenas 1,4 vezes menor que o Break Thru no segundo experimento. Esses resultados indicaram que o Silwet L-77 e Break Thru podem ter sido mais eficientes no molhamento da superfície do corpo do inseto, o que, conseqüentemente, permitiu a melhor distribuição dos conídios e maiores mortalidades de *H. hampei*. Esses adjuvantes também foram eficientes em pulverização de suspensão de conídios de *B. bassiana* em ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotipo B, resultando em mortalidades de até 78% (MASCARIN *et al.*, 2014). Dessa forma, observa-se que as diferentes respostas dos adjuvantes em calda de pulverização provavelmente sejam em resposta à interação positiva com a cutícula do hospedeiro alvo.

No primeiro experimento de seleção de adjuvantes, a maior mortalidade de *H. hampei* pode ser explicada pelo fato de que, após pulverizados, os insetos ainda permaneceram sobre o resíduo da pulverização por tempo aproximado de 1:30h, enquanto que, no segundo experimento, após a pulverização, os insetos foram imediatamente transferidos para placas limpas. A maior mortalidade aqui observado confirma que a infecção de *H. hampei* por *B. bassiana* está diretamente relacionada com a forma de contato e que, ainda, métodos de inoculação que permitam a contaminação indireta (efeito residual) após a pulverização seriam mais eficientes do que a pulverização direta.

Outros trabalhos realizados em laboratório para o controle de *H. hampei* pelo fungo *B. bassiana* que utilizaram a mesma concentração do patógeno (1×10^7 conídios/mL) mostraram que a inoculação por imersão dos insetos (VLEZ-ARANGO *et al.*, 2001; POSADA-FLÓREZ, 2008; GERÓNIMO-TORRES *et al.*, 2016) ou pelo contato dos insetos com o resíduo da suspensão aplicada em papel de filtro ou fruto de café resultaram em altos índices de mortalidade de *H. hampei*, superiores a 83% (FERNANDES *et al.*, 1985; SAMUELS; PEREIRA; GAVA, 2002).

Quando foram avaliadas as diferentes metodologias de aplicação de suspensão de *B. bassiana* associadas com os adjuvantes Silwet L-77 e Tween 80, observou-se que a eficácia dos adjuvantes com o fungo variou com o método de contato. As pulverizações diretas dos insetos resultaram em mortalidades reduzidas

(23 – 53%), enquanto que a imersão e os métodos que permitiram que os insetos ficassem em contato com os conídios no substrato (fruto ou papel de filtro) após a pulverização (efeito residual) resultaram em maiores mortalidades (63 – 98%). Esses resultados têm grande relevância não somente na condução de bioensaios de laboratório, mas também nas estratégias de utilização em campo e tipo de formulação.

No campo, tem-se demonstrado que a pulverização aquosa de fungos entomopatogênicos é a forma mais comum de contaminação para o controle de insetos praga. Porém, nesse processo, o inseto alvo nem sempre é atingido diretamente, o que não descarta o fato de haver um contato do mesmo com o resíduo da pulverização que permanece sobre o substrato (folha, fruto etc.). Nessa direção, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o sucesso do controle de *H. hampei* com *B. bassiana* estaria diretamente relacionado com a estratégia de contaminação, ou seja, via contato com os conídios no ambiente. Além disso, outro fator que deveria ser considerado seria a determinação do momento mais adequado para se realizar a pulverização, tendo em vista o comportamento críptico de *H. hampei*, pois o inseto passa a maior parte do seu ciclo de vida no interior dos frutos e somente as fêmeas acasaladas saem do interior do fruto para infestar novos frutos (MATHIEU, BRUN, FRÉROT, 1997; MATHIEU *et al.*, 2001). Sabe-se que em frutos com umidade superior a 80%, a *H. hampei* se aloja parcialmente com o seu corpo no orifício de penetração aberto no fruto, permanecendo até atingir o mínimo de 20% de matéria seca (BAKER, 1999; RUIZ-CÁRDENAS; BAKER, 2010). Esse poderia ser considerado um momento ideal para realizar-se a pulverização com suspensões de *B. bassiana*, haja vista os resultados terem revelado altos índices de infecção dos insetos (73-83%) obtidos em laboratório, comprovando as recomendações de Aristizábal, Bustillo, Arthurs (2016), que indicaram pulverizações de *B. bassiana* para controle de *H. hampei* quando a praga atingisse 2% de infestação e com mais de 50% dos insetos alojados parcialmente no orifício de penetração.

A contaminação de *H. hampei* por *B. bassiana* quando esses estão com o corpo parcialmente dentro do orifício de penetração no fruto deve ser devido em grande parte aos conídios depositados sobre o fruto, pois, em alguns casos, essa infecção foi estatisticamente semelhante ao contato pela aplicação direta nos frutos e posterior transferência dos insetos não pulverizados. Esses resultados corroboram observações de Samuels; Pereira; Gava (2002) que pulverizaram *B. bassiana* (1×10^7 conídios/mL) em frutos de café infestados com *H. hampei* posicionadas no orifício de

perfuração com parte do abdome para fora do fruto, mas evitando o contato direto da suspensão com os insetos, e registraram cerca de 62% de mortalidade, sugerindo que a contaminação foi facilitada pelo comportamento do inseto em deixar regularmente o orifício para depositar na superfície do fruto o material escavado do fruto.

As observações das imagens de MEV analisadas no contexto dos bioensaios de eficiência do fungo permitiram um melhor entendimento das variações na mortalidade de *H. hampei* em função dos diferentes métodos de contato com *B. bassiana*. A menor infecção de *H. hampei* pelo fungo *B. bassiana* aplicado por pulverização direta indica uma baixa contaminação das regiões onde o fungo pode potencialmente penetrar. Nesse sentido, a importância do efeito residual residiria no fato de que os insetos, durante todo o período de avaliação, caminharam sobre os conídios depositados no papel filtro ou no fruto, o que conseqüentemente permitiu a adesão dos mesmos na região ventral, local onde a cutícula tende a ser menos espessa e sofrer menor esclerotização, além do fato de nessa região estarem presentes regiões membranosas intersegmentais, que seria um facilitador para adesão e penetração do patógeno no inseto.

A maior adesão e penetração dos conídios deve se dar pela região ventral do abdome, principalmente nas membranas intersegmentares. O contato por pulverização direta no inseto seguido da transferência imediata do mesmo para o fruto limpo (PDF) não permite uma grande deposição de conídios na região ventral como nos outros métodos. Nesse método de contato, a adesão da maior parte dos conídios se dá na região dorsal (élitro), local muito esclerotizado e com a presença de muitas cerdas. Os resultados corroboraram Vey *et al.* (1982) em estudos com larva de *Oryctes rhinoceros* L. e *Cetonia aurata* L. inoculadas com *Metarhizium anisopliae*, que verificaram que a capacidade de adesão de conídios na cutícula, principalmente nas dobras intersegmentares, seria um facilitador para a posterior penetração das hifas no interior do inseto. No entanto, somente a adesão com persistência de conídios nessas áreas não seria suficiente para assegurar o sucesso da penetração. Da mesma forma, Kumar *et al.* (2015) verificaram que o fungo *Lecanicillium psalliotae* aderiu por toda superfície de *Sciothrips cardamomi*, e a penetração ocorreu preferencialmente via membranas intersegmentais. A adesão dos conídios nessa região, bem como na base das cerdas, poderia estar indicando que esses seriam locais ideais e facilitadores da penetração das hifas, o que viria corroborar os dados de Neves e Alves (2004), em

estudos desenvolvidos com *Metarhizium anisopliae* e *B. bassiana* em operários e soldados de *Cornitermes cumulans* (Kollar).

Observou-se ainda que há grande aglomeração de conídios, principalmente nas regiões das dobras intersegmentares da região ventral de insetos pulverizados com o adjuvante Silwet L-77 e inoculado pelo RF (72h) e PIPF (24h), indicando serem locais mais adequados para o sucesso da infecção, tendo em vista as maiores mortalidades de *H. hampei* por estes métodos de contato.

De forma geral, os resultados aqui obtidos sugerem que o sucesso da pulverização aquosa de *B. bassiana* para o manejo de *H. hampei* depende das estratégias e formulações que permitam a persistência prolongada dos conídios sobre os frutos. Novos estudos para o desenvolvimento de formulações devem ser priorizados, principalmente os que permitam a preservação do patógeno contra as condições adversas do ambiente.

Referências

ARISTIZÁBAL, L. F.; BUSTILLO, A. E.; ARTHURS, S. P. Integrated Pest Management of Coffee Berry Borer: Strategies from Latin America that Could Be Useful for Coffee Farmers in Hawaii. **Insects**, v. 7, p. 2-24, 2016.

ARNOSTI, A.; DELALIBERA JR., I.; CONCESCHI, M. R.; TRAVAGLINI, R. V.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological mapping of the integument of adult females of *Diaphorina citri* Kuwayama, targeting the development of control strategies. **International Journal of Advance Agricultural Research**, v. 4, p. 57-64, 2016.

ASENSIO, L.; LOPEZ-LIORCA, L. V.; LÓPEZ-JIMÉNEZ, J. A. Use of light, scanning electron microscopy and bioassays to evaluate parasitism by entomopathogenic fungi of the red scale insect of palms (*Phoenicococcus marlatti* Ckll, 1899). **Micron**, v. 36, p. 169-175, 2005.

BAKER, P. The Coffee Berry Borer in Colombia. DFID-Cenicafé CABI Bioscience IPM for coffee Project (CNTR 93/1536A). **Cenicafé**: Chinchiná, Colombia, 1999. 154 p.

- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. General properties of fungal pathogens. In: BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. (Ed.). **Principles of insects pathology**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998, p.259-283.
- BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1795-1805, 1988.
- CONSTANTINO, L.M.; NAVARRO, L.; BERRIO, A.; ACEVEDO, F.E.; RUBIO, D.; BENAVIDES, P. Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, p. 173-182, 2011.
- COSTA, E.A.D.; ALMEIDA, J.E.M.; LOUREIRO, E.S.; SANO, A.H. Compatibilidade de adjuvantes no desenvolvimento “*in vitro*” dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **STAB**, v.22, p. 38-40, 2003.
- DALVI, L.P.; PRATISSOLI, D.; POLANCZY, R.A.; ANDRADE, G.S. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales) for the control of the coffee borer beetle *Hypothenemus hampei* (Scolytinae) in Brazil. **Biological Lett.**, v.48, p. 39-46, 2011.
- DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 90, p. 453-465, 2000.
- FERNANDES, P.M.; LECUONA, R.E.; ALVES, S.B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. à broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **Ecosistema**, v.10, p.176-181, 1985.
- GERÓNIMO-TORRES, J.D.C.; TORRES-DE-LA-CRUZ, M.; PÉREZ-DE-LA-CRUZ, M.; DE-LA-CRUZ-PÉREZ, A.; ORTIZ-GARCÍA, C.F.; CAPPELLO-GARCÍA, S. Caracterización de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su patogenicidad

hacia *Hypothenemus hampei*, en Tabasco, México. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 42, p. 28-35, 2016.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 27, p. 151-170, 1998.

IBM CORP. **IBM SPSS statistics for windows**: version 22.0. Armonk, 2013.

KUMAR, C.M.S.; JACOB, T.K.; DEVASAHAYAM, S.; D'SILVA, S.; KUMAR, N.K.K. Isolation and characterization of a *Lecanicillium psalliotae* isolate infecting cardamom thrips (*Sciothrips cardamomi*) in India. **BioControl**, v.60, p. 363-373, 2015.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto, 2003. 92p.

MAPA/Agrofit. 2016. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 28 dez. 2016.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; QUINTELA, E.D.; ARTHURS, S.P.; DELALIBERA Jr., I. Toxicity of non-ionic surfactants and interactions with fungal entomopathogens toward *Bemisia tabaci* biotype B. **BioControl**, v. 59, p. 111–123, 2014.

MATHIEU, F.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Factors related to native host abandonment by the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Col., Scolytidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 121, p. 175–180, 1997.

MATHIEU, F.; GAUDICHON, V.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Effect of physiological status on olfactory and visual responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. **Physiological Entomology**, v. 26, p.189-193, 2001.

- MOTA, L.H.C. **Desenvolvimento de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) em tecido sintético.** 2012. 84p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- NEVES, P.M.O.J.; ALVES, S.B. External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 51–56. 2004.
- NEVES, P.M.O.J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 77-82, 2005.
- OLIVEIRA, D.G.P.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA, I. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.
- PARDEY, A.E.B. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Rev. Acad. Colomb. Cienc.**, v. 29, p. 55-68, 2005.
- PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUARÉZ, M.P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.146, p.124-137, 2007.
- POSADA-FLÓREZ, F.J. Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. **Journal of Insect Science**, v. 8, p. 1-13, 2008.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012.

- RUIZ-CÁRDENAS, R.; BAKER, P. Life table of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in relation to coffee berry phenology under Colombian field conditions. **Scientia Agricola**, v. 67, p. 658-668, 2010.
- SAMUELS, R.I.; PEREIRA, R.C.; GAVA, C.A.T. Infection of the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) by Brazilian Isolates of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Biocontrol Science and Technology**, v. 12, p. 631-635, 2002.
- SILVA, W.D.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; BENTO, J.M.S. Mating Behavior of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v.25, p. 408–417, 2012.
- ST. LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168-179, 1991.
- TRAVAGLINI, R.V.; FORTI, L.C.; ARNOSTI, A.; CAMARGO, R.S.; SILVA, L.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Mapping the Adhesion of Different Fungi to the External Integument of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v.5, p. 2319-1473, 2016.
- VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of Some *Beauveria bassiana* Isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. **Journal Of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.67, p.147-152, 1996.
- VEGA, F.E.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. The coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrestrial Arthropod Reviews**, Washington, v. 2, p. 129-147, 2009.

VÉLEZ A, P.E.; POSADA F, F.J.; MARÍN M, P.; GONZÁLEZ G, T.; OSARIO V, E.; BUSTILLO P, A.E. (Ed.). **Técnicas para El control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos**. Chinchiná (Colombia): Cenicafé, 1997, p.1-37.

VEY, A.; FARGUES, J.; ROBERT, P. Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for scarabeid larvae. **Entomophaga**, v. 27, 387-397, 1982.

VLEZ-ARANGO, P.E.; ESTRADA-VALENCIA, M.N.; GONZLEZ-GARCA, M.T.; VALDERRAMA-FONSECA, A.M.; BUSTILLO-PARDEY, A.E. Caracterización de aislamientos de *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café. **Manejo Integrado de Plagas**, v. 62, p. 38-53, 2001.

3. MANEJO DE *Hypothenemus hampei* COM *Beauveria bassiana* EM ARMADILHA DE AUTO-CONTAMINAÇÃO

Resumo

Diante do potencial do fungo *Beauveria bassiana* para controle de *Hypothenemus hampei* foi desenvolvida uma armadilha de auto-contaminação (ESALQ-Hh) utilizando etanol-metanol como atrativo e conídios do patógeno produzidos sobre um tecido sintético nas saídas laterais para contaminação das brocas ao deixar a armadilha. Apesar da eficiência da armadilha ESALQ-Hh, a atração dos insetos foi inferior à observada com o modelo de armadilha IAPAR, de uso conhecido. Dessa forma, objetivou com este trabalho: *i)* adaptar um modelo de armadilha de auto-contaminação que propicie maior atração de *H. hampei*; *ii)* avaliar a capacidade de *H. hampei* contaminados com *B. bassiana* de voar e de infestar frutos; *iii)* avaliar o potencial da armadilha ESALQ-Hh2 para o manejo de *H. hampei* em cafezal cultivado em sistema a pleno sol (principal forma de cultivo no Brasil); e *iv)* avaliar a viabilidade, concentração e mortalidade a *H. hampei* do fungo presente na armadilha nessas condições, para definição do seu período de substituição. Três modelos de armadilha de auto-inoculação (ESALQ-Hh; ESALQ-Hh1 e ESALQ-Hh2) foram comparadas em cafezal sombreado e a pleno solo, e a captura de *H. hampei* foi superior em ESALQ-Hh2. Em laboratório, estudo de alterações comportamentais de *H. hampei* após exposição a conídios de *B. bassiana* sugere que a mobilidade de *H. hampei* não é afetada pela carga de conídios aderidos ao seu corpo quando comparados aos insetos sem exposição ao fungo. Além disso, dos insetos expostos aos conídios de *B. bassiana*, 47,5% morreram fora do fruto do café, 47,5% morreram aderidos à “coroa” do fruto, externalizando parte do corpo com presença de uma densa esporulação do patógeno, e apenas 5% conseguiram provocar danos aos grãos de café. O manejo de *H. hampei* com a armadilha ESALQ-Hh2 foi avaliado em cafezal a pleno sol desde a fase de formação dos frutos até a colheita. Foi constatado em média 6,6% de *H. hampei* infectados por *Beauveria* sp. nas plantas distante 4 e 8 m das armadilhas e nenhum inseto infectado nas parcelas com as mesmas armadilhas, mas sem o fungo. A concentração dos conídios presentes nas armadilhas caiu de $2,7 \times 10^8$ conídios.cm⁻² e 93,5% de viabilidade no início do experimento para $7,5 \times 10^7$ conídios.cm⁻² e 33% de viabilidade ao final do experimento (148 dias após a instalação). Mesmo com essa redução, foram observados altos níveis de infecção (73 a 100%) nos insetos durante os 148 dias de avaliação. Dessa forma, para recomendação de uso da armadilha ESALQ-Hh2 para o manejo de *H. hampei* se faz necessário avaliações contínuas durante várias safras e em um mesmo cafezal.

Palavras-chave: Auto-disseminação; Broca-do-café; Semioquímicos; Fungos entomopatogênicos

Abstract

Due to the potential of the fungus *Beauveria bassiana* for the control of *Hypothenemus hampei*, it was developed an autoinoculation trap (ESALQ-Hh) using ethanol-methanol as attractive and conidia of the pathogen grown on a synthetic fabric at the side exits for contamination of the borers as they leave the trap. Despite the efficiency of trap ESALQ-Hh, the attraction of insects was lower than that observed with the trap model IAPAR of known use. Thus, the objectives of this work were to *i)* adapt an autoinoculation trap model that allowed greater attraction of *H. hampei*; *ii)* assess the ability of *H. hampei* infected with *B. bassiana* to fly and infest fruits; *iii)* assess the potential of trap ESALQ-Hh2 for the management of *H. hampei* in coffee plantation grown under the full sun (main cultivation system in Brazil); and *iv)* assess the viability, concentration and mortality of fungus *H. hampei* present in trap in these conditions to define the replacement period. Three models of autoinoculation traps (ESALQ-Hh; ESALQ-Hh1 and ESALQ-Hh2) were compared in a shaded coffee plantation and full sun. The capture of *H. hampei* was greater in ESALQ-Hh2. In the laboratory, studies on behavioral changes of *H. hampei* after exposure to conidia of *B. bassiana* suggests that mobility of *H. hampei* is not affected by the load of conidia adhered to its body compared to insects without exposure to the fungus. In addition, of the insects exposed to conidia of *B. bassiana*, 47.5% died outside the coffee berry and 47.5% died adhered to the fruit "crown", showing part of the body with the presence of a dense pathogen sporulation and only 5% caused damage to the coffee beans. The management of *H. hampei* with trap ESALQ-Hh2 was evaluated at a coffee plantation in full sun, from the fruit formation until harvest. On average, 6.6% of *H. hampei* were infected by *Beauveria* sp. in plants 4 and 8 m distant from the traps and no insect was infected in the plots with the same traps, but without the fungus. The concentration of conidia in the traps decreased from 2.7×10^8 conidia.cm⁻² and 93.5% viability at the beginning of the experiment to 7.5×10^7 conidia.cm⁻² and 33% viability at the end of the experiment (148 days after installation). Even with this reduction, high levels of infection (73 to 100%) were observed in insects during 148 days of evaluation. Therefore, to recommend the use of trap ESALQ-Hh2 for the management of *H. hampei*, continuous evaluations are necessary for several harvests and in the same coffee plantation.

Keywords: Self-dissemination; Coffee berry borer; Semiochemicals; Entomopathogenic fungi

3.1. Introdução

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, causa perdas econômicas significativas na cafeicultura mundial, sendo considerada a principal praga dessa

cultura (INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2014), causando prejuízos quantitativos com a queda prematura de frutos e perda de peso dos grãos, e prejuízos qualitativo com a perda de qualidade da bebida (DAMON, 2000).

A broca-do-café é uma espécie críptica, passando o seu ciclo de ovo a adulto dentro do fruto e somente fêmeas acasaladas são capazes de abandonarem o fruto onde nasceu para iniciar novas infestações (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997; MATHIEU *et al.*, 2001). Essa particularidade torna esse inseto de difícil controle por métodos convencionais, como as pulverizações com produtos químicos ou microbiológicos, pois, uma vez no interior da semente de café, ele não fica mais exposto às formas de controle (ROOBAKKUMAR, *et al.*, 2014).

A localização dos frutos no cafezal pela fêmea colonizadora de *H. hampei* é mediada por semioquímicos emitidos pelos frutos (GEORDANENGO, BRUN, FRÉROT, 1993). A identificação dessas substâncias levou ao desenvolvimento de diferentes modelos de armadilhas contendo atraente químico (metanol-etanol) para captura e monitoramento da broca (VILLACORTA *et al.*, 2001; DUFOUR; FRÉROT, 2008; UEMURA-LIMA *et al.*, 2010). Apesar das altas taxas de capturas de *H. hampei* com estas armadilhas, Infante, Pérez e Vega (2014) sugerem que a utilização de armadilha atrativa com etanol-metanol para captura de *H. hampei* não seria uma medida efetiva por capturar uma pequena parte da população de campo.

Uma forma de aumentar a eficiência de armadilhas com semioquímicos para o controle de pragas pode ser por meio da sua associação com microrganismos entomopatogênicos para auto-contaminação dos insetos atraídos para a armadilha contendo o patógeno, técnica, eficientemente utilizada para outras pragas (VEGA, DOWD, BARTELT, 1995; LYONS *et al.*, 2012; GETAHUN *et al.*, 2016).

Recentemente, diante do potencial do fungo *Beauveria bassiana* para controle de *H. hampei*, Mota (2013) desenvolveu uma armadilha de auto-contaminação (ESALQ-Hh), utilizando etanol-metanol como atrativo e colocando conídios do patógeno produzido sobre um tecido sintético em saídas laterais para contaminação das brocas que passaram pela armadilha, ficando aprisionadas em sacos plásticos. Foi verificado que, mesmo com a redução da viabilidade do fungo, a concentração de conídios que aderiam ao corpo do inseto foi suficiente para causar altos índices de mortalidade por até 151 dias em que as armadilhas foram colocadas em cafezal sombreado. Apesar da eficiência da armadilha ESALQ-Hh, a atração dos insetos foi

inferior à observada com o modelo de armadilha IAPAR, de uso conhecido (VILLACORTA *et al.*, 2001).

Nesse contexto, objetivou-se com esse estudo: i) adaptar um modelo de armadilha de auto-contaminação que propicie maior atração de *H. hampei*; ii) avaliar a capacidade de voar e de infestar frutos de *H. hampei* contaminados com *B. bassiana*; iii) avaliar o potencial da armadilha ESALQ-Hh2 para o manejo de *H. hampei* em cafezal cultivado em sistema a pleno sol (principal forma de cultivo no Brasil); e iv) avaliar a viabilidade, concentração e mortalidade a *H. hampei* do fungo presente na armadilha nessas condições.

3.2. Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) sob condições de 25 ± 1 °C, $70\pm 20\%$ UR e fotofase de 12 horas. Os experimentos de campo foram conduzidos em áreas de café arábica, *Coffea arabica* L., localizadas nos municípios de Piracicaba e Dois Córregos, São Paulo, e no município de Encruzilhada, Bahia.

3.2.1. Criação de *H. hampei*

A criação de *H. hampei* foi feita em laboratório, utilizando café pergaminho com umidade em torno de 45% de acordo com a metodologia proposta por Silva *et al.* (2012). Para os bioensaios, foram utilizados *H. hampei* com 10 a 20 dias de idade, coletados da criação após a saída natural do pergaminho.

3.2.2. Produção do fungo *B. bassiana* em tecido sintético

Todos os experimentos foram realizados com o isolado ESALQ-PL63 de *B. bassiana* inoculados sobre o tecido sintético Lã “Sherpa” (tecido não tecido). Tanto o isolado quanto o tecido foram selecionados com base em experimentos preliminares:

o primeiro por se mostrar como promissor para o controle da broca, o segundo por permitir maior produção do fungo dentre sete tecidos avaliados (MOTA, 2013).

A produção do fungo utilizando tecido como substrato de esporulação e determinação do número de conídios.cm⁻² foi realizada de acordo com Mota (2013), enquanto que a viabilidade dos conídios foi determinada de acordo com Oliveira *et al.* (2015), após 24 horas de incubação.

3.2.3. Adaptação de armadilhas para otimizar a auto-contaminação de *H. hampei* por *B. bassiana*

Objetivou-se com esse estudo adaptar modelos de armadilhas de auto-inoculação que propiciassem maior atração das brocas, o que conseqüentemente aumentaria a disseminação do fungo pelos próprios insetos. Os experimentos de campo foram realizados com quatro modelos de armadilhas de auto-contaminação: (i) ESALQ-Hh, usada como controle; (ii) ESALQ-Hh1; (iii) ESALQ-Hh2; e (iv), Broca[®], da empresa Biocontrole.

A armadilha ESALQ-Hh apresenta dois orifícios na parte inferior pelos quais as brocas se contaminam ao deixarem o sistema de auto-inoculação, que consiste em uma faixa de tecido sintético impregnada com conídios de *B. bassiana*, estrategicamente fixada junto aos “orifícios de saída”. Estudos preliminares, entretanto, indicaram que apenas um orifício seria suficiente para que 20 insetos abandonassem a armadilha num intervalo de duas horas, o que contribuiria para simplificar seu processo de confecção. Assim, optou-se por colocar nas armadilhas apenas um orifício de saída e contaminação das brocas pelo fungo, exceto no modelo ESALQ-Hh, que permaneceu sem alterações e foi usado como controle nos experimentos.

O modelo ESALQ-Hh1 (Figura 7 A) foi confeccionado com um tubo cilíndrico de plástico (27,5 cm de altura x 10,2 cm de diâmetro) aberto na parte superior (área de 18,5 x 12,0 cm, como na armadilha IAPAR), para permitir a entrada das brocas, e fechado com um funil na parte inferior, para evitar o escape das mesmas pela abertura de entrada. O sistema de auto-contaminação foi adaptado lateralmente na parte inferior da armadilha, sendo representado por um orifício lateral (2,5 cm de diâmetro) protegido por um tubo de PVC (8,5 cm e 3,7 cm de diâmetro) dotado de uma abertura inferior (5,0 x 3,5 cm), para facilitar a saída dos insetos, e uma faixa de tecido sintético

(1,0 x 11,0 cm) impregnado com o fungo, disposta na parte proximal do tubo de PVC. O modelo ESALQ-Hh2 (Figura 7 B), desenvolvido de forma semelhante ao ESALQ-Hh1, difere desse apenas na abertura para entrada das brocas, nesse caso representadas por três aletas laterais (13,0 x 7,0 cm) espaçadas a 4 cm umas das outras. O modelo de armadilha Broca[®], da empresa Biocontrole e desenvolvida para captura de *H. hampei* (Figura 7 C), foi adaptada na parte inferior com uma câmara (10,0 cm de altura x 8,5 cm de diâmetro), que abrigou o mesmo sistema de auto-inoculação descrito no modelo ESALQ-Hh1. Todas as armadilhas foram protegidas na parte superior com um recipiente plástico para evitar a entrada de água da chuva.

Como atraente químico das brocas na armadilha ESALQ-Hh, utilizou-se 10 mL de uma mistura de metanol:etanol (proporção 1:1), contida em frasco difusor de vidro com tampa de borracha com abertura de 2 mm. Trata-se da mesma metodologia empregada por Silva, Ventura e Morale (2006) e Uemura-Lima *et al.* (2010). As demais armadilhas foram equipadas com o liberador comercial Bio Broca[®], da Biocontrole, que é constituído por um “sache” de plástico contendo a mistura de álcoois de liberação lenta.

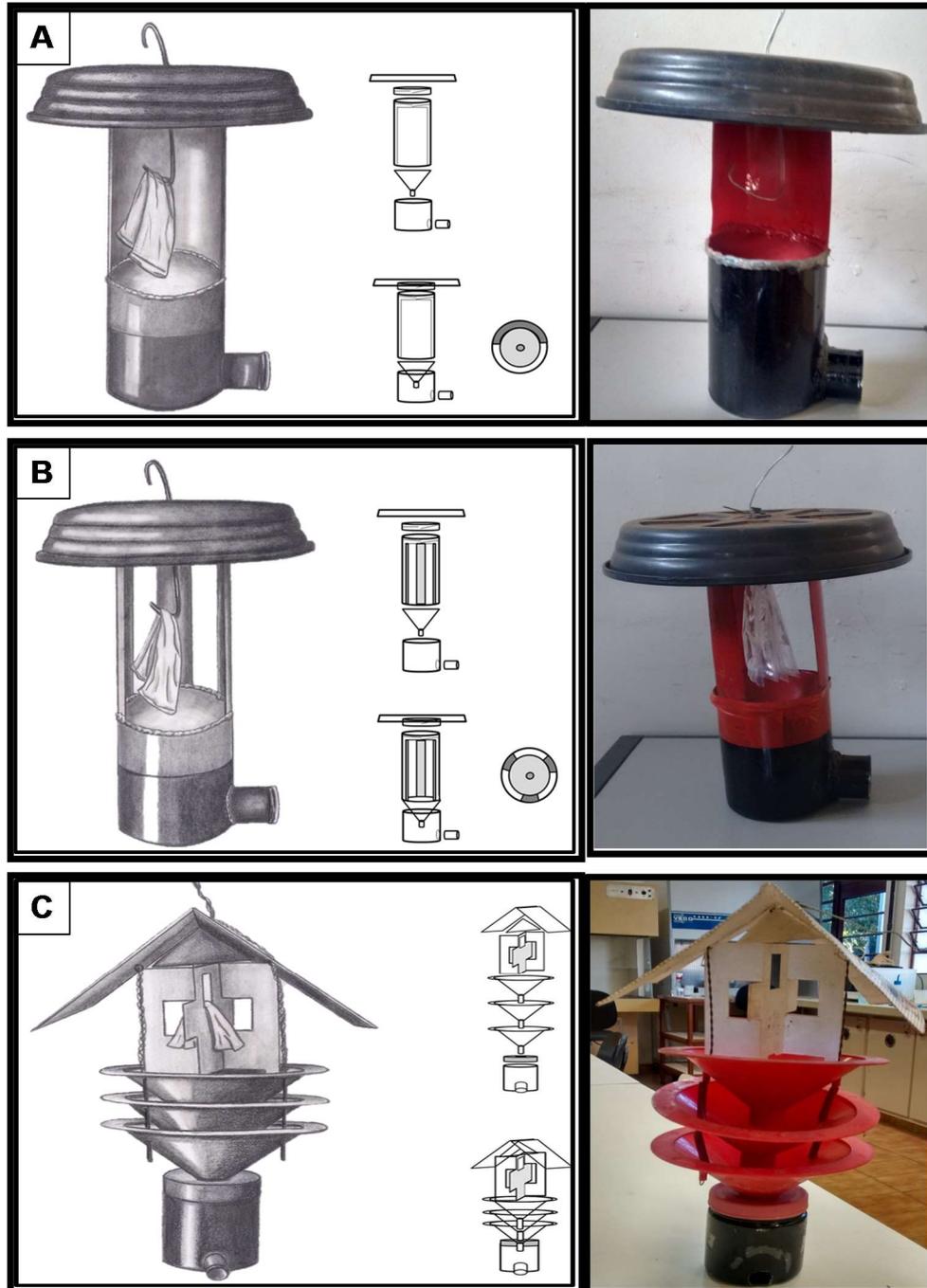


Figura 7. Armadilhas de auto-contaminação de *Hypothenemus hampei* com o fungo *Beauveria bassiana*. "A": modelo ESALQ-Hh1; "B": modelo ESALQ-Hh2; e Armadilha Broca® (Biocontrole) com parte inferior adaptada para auto-inoculação. (Ilustração: Patrícia Milano)

3.2.3.1. Eficiência das armadilhas de auto-contaminação

A eficiência das armadilhas de auto-contaminação na coleta de brocas e na preservação dos conídios de *B. bassiana* foi avaliada simultaneamente em duas áreas de café (Figura 8) no município de Piracicaba, SP. A primeira, de aproximadamente

1,5 ha, localiza-se no campo experimental do setor de fitotecnia na ESALQ/USP e é cultivada com *Coffea arabica* var. Catuaí, no espaçamento de 1,5 × 3,0 m, em sistema convencional (Pleno sol). A outra, de aproximadamente 0,8 ha, localiza-se na Fazenda Areão da ESALQ/USP, sendo cultivada com *C. arabica* var. Catuaí Vermelho e Amarelo no mesmo espaçamento da área anterior, porém em sistema sombreado, por cerca de 500 árvores de eucalipto de 13 anos de idade aleatoriamente espaçadas.



Figura 8. Área experimental usada para avaliação da eficiência de armadilhas de auto-inoculação contendo o fungo *Beauveria bassiana* para o controle de *Hypothenemus hampei*. “A”: Cafezal a pleno sol; “B”: Cafezal sombreado

Os experimentos foram instalados em 05 de novembro de 2013, em delineamento em blocos aleatorizados com 4 tratamentos (tipos de armadilhas) e 4 repetições, sendo cada armadilha uma repetição. As armadilhas foram colocadas seguindo as linhas de cafeeiro sendo que os quatro tipos de armadilhas foram dispostos na mesma linha, consistindo de um bloco. As armadilhas foram fixadas na copa das plantas de café a aproximadamente 1,5 m do nível do solo, sendo espaçadas a 15 m umas das outras. O número de brocas capturadas e a viabilidade do patógeno no interior das armadilhas foram avaliados no momento da instalação do experimento e a cada 15 dias. Os insetos foram recolhidos em sacos plásticos fixados ao tubo de PVC que protege o orifício de saída das armadilhas, enquanto amostras de conídios foram coletadas com auxílio de hastes flexíveis com pontas de algodão para se determinar a viabilidade do fungo seguindo metodologia proposta por Mota (2013). As avaliações de eficiência de captura e de viabilidade dos conídios iniciaram-se ao final da primeira e da terceira quinzena do início dos experimentos respectivamente totalizando, assim, sete avaliações para o primeiro parâmetro e cinco para o segundo.

Para minimizar o efeito da localização, todas as armadilhas foram aleatorizadas dentro do bloco a cada avaliação. O volume de atraentes nas armadilhas ESALQ-Hh foi completado até 10 mL a cada 15 dias. A substituição dos difusores Bio Broca® foi realizada apenas uma vez após 75 dias do início dos experimentos, quando o volume do atraente atingiu aproximadamente 50% e 60% do volume inicial na área de café a pleno sol e sombreado, respectivamente.

3.2.4. Alterações comportamentais de *H. hampei* pela infecção de *B. bassiana*

Para o sucesso da estratégia de auto-contaminação de *H. hampei* pelo fungo nas armadilhas, duas premissas importantes devem ser cumpridas: i) os insetos que passarem pela armadilha com grande quantidade de conídios aderidos ao corpo devem ser capazes de voar e dispersar para permitir a disseminação do fungo na área, ii) mas não devem ser capazes de penetrar no endosperma das sementes de café para não acarretar prejuízos a produção. Assim, dois estudos foram conduzidos para avaliar a interferência do fungo na capacidade de voo de *H. hampei* e na sua capacidade de penetração dos frutos de café.

3.2.4.1. Capacidade de voo de *H. hampei* expostos a conídios de *B. bassiana*

A capacidade de voo de *H. hampei* contaminado com conídios de *B. bassiana* foi avaliada em laboratório, adaptando-se metodologia desenvolvida para mensuração da capacidade de voo de parasitoides (DUTTON, BIGLER, 1995; PREZOTTI *et al.* 2002). Foram utilizadas arenas confeccionadas com cilindros de PVC (19,5 cm de altura x 14,5 cm de diâmetro), forrados internamente com papel preto, apoiados em recipientes plásticos da mesma cor. As dimensões do cilindro foram determinadas em avaliações preliminares com *H. hampei* sem exposição ao fungo. Uma placa de Petri de plástico (5,5 cm de diâmetro) forrada com papel filtro foi colocada na base dos cilindros, servindo como ponto de liberação dos insetos (Figura 9). Para capturar as brocas em voo, fixou-se na parte superior de cada cilindro uma placa de plástico transparente impregnada com cola incolor e inodora. Uma faixa de aproximadamente 1 cm de largura com a mesma cola foi pincelado a 1 cm da base interna dos cilindros para evitar que os insetos atingissem a superfície caminhando pelas laterais.

Esse experimento foi conduzido em delineamento inteiramente aleatorizado com dois tratamentos: brocas expostas por 5 segundos (MOTA, 2013) ao tecido impregnado com conídios de *B. bassiana*, e o controle, sem exposição. Foram utilizadas quatro repetições, sendo cada repetição representada por um grupo de 30 brocas. Essas foram coletadas da criação estoque e liberadas por volta das 14h nas placas de Petri forradas com papel filtro. O horário foi escolhido por compreender o período de maior atividade de voo dos insetos de 14-17h (SILVA, COSTA, BENTO, 2014). Após a liberação dos insetos, os cilindros foram dispostos sobre bancadas localizadas próximo à janela no laboratório (27 ± 2 °C e $90\pm 10\%$ UR) para estimular o voo dos insetos em direção a entrada de luz natural no ambiente (Figura 9 C). As avaliações foram realizadas três horas após a liberação dos insetos, consistindo na contagem do número de brocas aderidas à placa da parte superior de cada cilindro (em atividade de voo) e as que não iniciaram atividade de voo, consistindo daquelas remanescentes no ponto de liberação ou aderidas ao círculo de cola feito na base dos cilindros. Todo o experimento foi replicado por três vezes, totalizando 360 insetos por tratamento ($n = 4$ repetições \times 30 insetos/repetição \times 3 replicações).

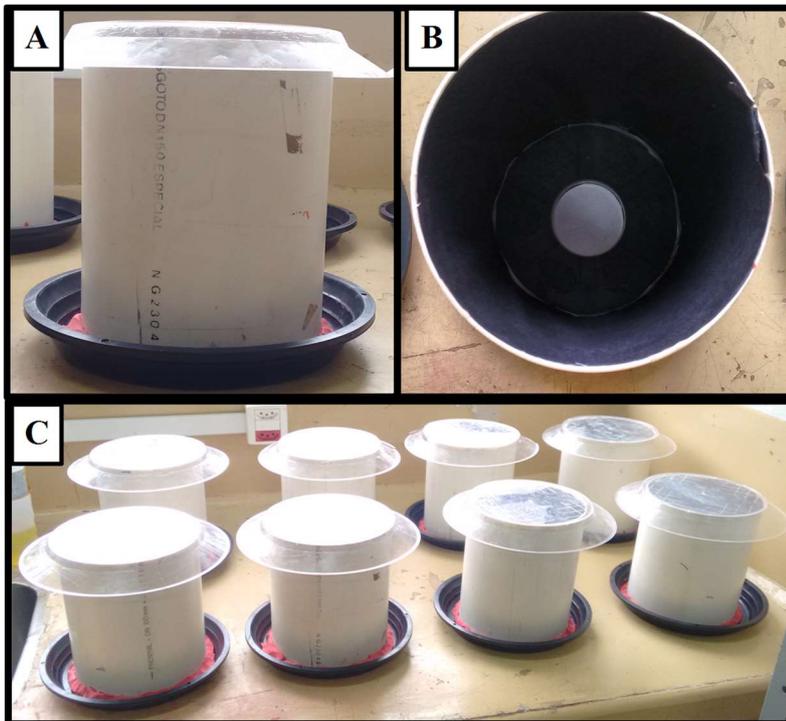


Figura 9. Recipiente utilizado para teste de capacidade de voo de *Hypothenemus hampei* em laboratório. “A”: visão geral externa; “B”: visão interna com detalhe ao centro da placa de plástico forrada com papel filtro para liberação dos insetos; “C”: Distribuição dos tubos em bancada no laboratório próximo a janela para entrada de luz natural

3.2.4.2. Infestação de frutos de café por *H. hampei* contaminados com *B. bassiana*

Além da capacidade de *H. hampei* em infestar frutos de café após contaminação com *B. bassiana* na armadilha de auto-contaminação, avaliaram-se nesse experimento o local onde essas brocas morreram e a quantidade de conídios sobre seus cadáveres. Os bioensaios foram realizados em laboratório em delineamento inteiramente aleatorizado com dois tratamentos: brocas expostas por 5 segundos ao tecido impregnado com conídios de *B. bassiana* (simulando a passagem pela armadilha), e o controle, sem exposição.

Inicialmente, grupos de cinco adultos de *H. hampei* foram expostos aos conídios de *B. bassiana* por 5 segundos e foram então individualizados em tubos de vidro de fundo chato (85 × 25 mm) contendo um fruto de café no estágio cereja. Esse procedimento foi realizado quatro vezes e os 20 insetos consistiram de uma repetição. Foram utilizadas quatro repetições realizadas em dias diferentes, totalizando 80 insetos por tratamento. Os tubos foram vedados com algodão hidrófilo e acondicionados em câmara climatizada (25±2 °C, 60±10% UR e fotofase de 12 h) até o final do experimento. Tanto o local de penetração de *H. hampei* no fruto (exocarpo, mesocarpo e semente), quanto o local onde os insetos morreram (dentro ou fora do fruto) foram verificados diariamente por 10 dias (Figura 10). Todas as brocas mortas foram acondicionadas em tubos de vidro com algodão umedecido para confirmação da mortalidade evidenciada pela esporulação do fungo. O número de conídios produzidos foi quantificado mediante contagem em câmara de Neubauer de cada inseto morto isoladamente.

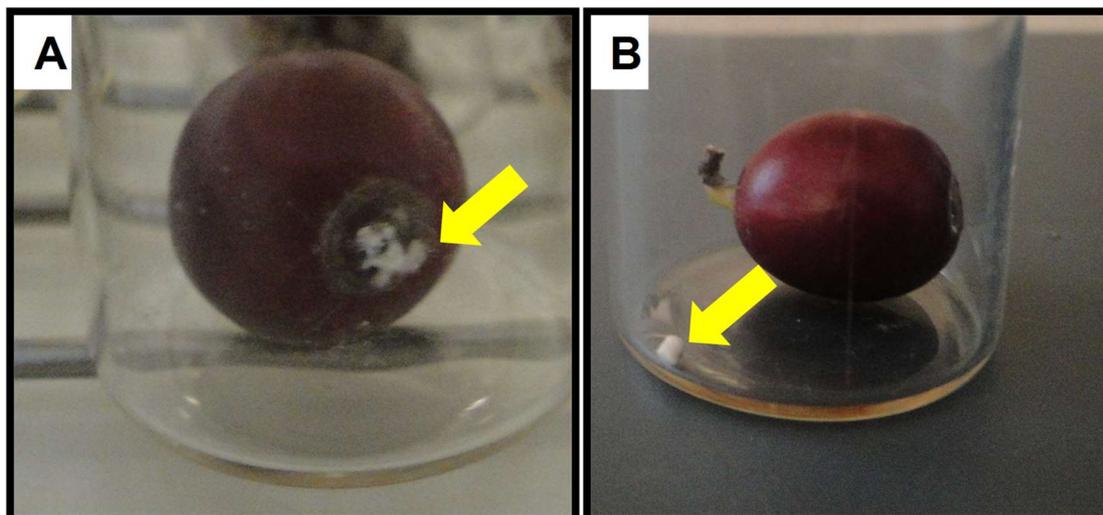


Figura 10. “A”: esporulação de *Beauveria bassiana* em cadáver de *Hypothenemus hampei* com parte do corpo fora do fruto de café na região da “coroa”. “B”: esporulação de *B. bassiana* em cadáver de *H. hampei* fora do fruto do café sem perfuração

3.2.5. Potencial da armadilha ESALQ-Hh2 com *B. bassiana* para o manejo de *H. hampei* no campo

A armadilha de auto-contaminação ESALQ-Hh2, selecionada nos experimentos anteriores, foi avaliada quanto ao seu potencial para manejo de *H. hampei* em condições de campo.

3.2.5.1. Experimento I

Esse experimento foi instalado em 15 de janeiro de 2015 no município de Encruzilhada-BA, em quatro áreas (blocos) cultivadas com *C. arabica* no espaçamento 1,0 x 4,0 m em sistema convencional (Pleno sol). A duração do estudo foi de 148 dias, coincidindo com o início da formação dos frutos até a colheita. Cada área foi manejada de acordo com as práticas comumente realizadas pelos produtores e receberam aplicação de fertilizantes químicos no solo e na parte aérea e controle fitossanitário com aplicação de fungicidas, herbicidas e inseticidas, exceto contra *H. hampei*.

Adotou-se o delineamento em blocos aleatorizados com dois tratamentos: armadilha ESALQ-Hh2 com *B. bassiana* na concentração inicial de $2,7 \times 10^8$ conídios.cm⁻² e 93,5% de viabilidade e o controle, sem fungo. Cada tratamento foi

composto de quatro repetições de uma armadilha cada. As armadilhas foram distribuídas por sorteio na fileira central de cada parcela, sendo instaladas a 1,5 m do nível do solo no terço médio das plantas de café, separadas de no mínimo de 130 m (Figura 11). Essa distância foi adotada com objetivo de evitar a migração de insetos contaminados de um bloco para outro, tendo como base estudos prévios em que a dispersão de *H. hampei* atingiu no máximo 65 m (GIL *et al.*, 2015).

As avaliações consistiram na coleta de 5 frutos de café nos terços inferior (saia), médio e superior de plantas localizadas a 4, 8 e 12 m de distância ao leste, oeste, norte e sul das armadilhas de auto-inoculação. Os frutos brocados foram separados dos demais no laboratório, sendo acondicionados em sacos plásticos com algodão umedecido por um período de 10 dias, quando se contabilizaram o número de adultos de *H. hampei* vivos, mortos e infectados por *B. bassiana*. No total foram realizadas sete avaliações, a primeira no ato da instalação do experimento (dia 0) e as outras após 15, 31, 49, 63, 91 e 148 dias.

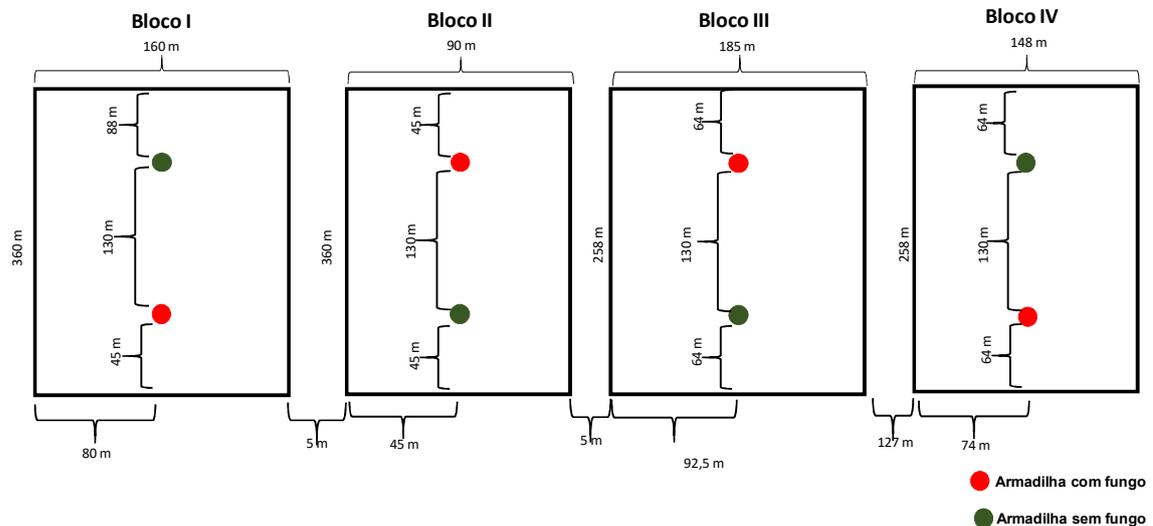


Figura 11. Distribuição das armadilhas de auto-contaminação contendo o fungo *Beauveria bassiana* nas parcelas experimentais

3.2.5.2. Experimento II

Um segundo experimento foi instalado em 13 de maio de 2016 no município de Dois Córregos-SP, numa área de aproximadamente 1,03 ha cultivada com C.

arabica no espaçamento 1,0 x 4,0 m em sistema convencional (a pleno sol). O estudo teve duração de 40 dias, coincidindo com o período de maturação dos frutos até a colheita. Essa área foi dividida em três blocos de diferentes dimensões, sendo o bloco I com 41,3 m x 85 m, o bloco II com 41,3 x 106 m e o bloco III com 41,3 x 59 m. Adotou-se também o delineamento em blocos aleatorizados com dois tratamentos (armadilha com e sem fungo) e três repetições. As armadilhas foram instaladas à mesma altura do solo descrita no experimento anterior. Todos os frutos brocados das plantas contendo a armadilha (ponto zero) foram retirados e quatro ramos na porção mediana (um em cada sentido: leste, oeste, norte e sul) contendo no mínimo cinco frutos não brocados foram marcados para serem monitorados ao longo do tempo. Este mesmo procedimento de remoção de frutos brocados e marcação de ramos a serem monitorados foi realizado em plantas localizadas a 4, 8 e 12 m ao leste, oeste, norte e sul de cada armadilha.

As avaliações foram realizadas após 10, 19, 32 e 40 dias da instalação do experimento e consistiram na coleta de qualquer fruto brocado nos ramos previamente selecionados. Esses frutos foram acondicionados em sacos plásticos com algodão umedecido por 10 dias no laboratório, observando-se quaisquer sinais de contaminação das brocas por *B. bassiana*. A infestação média inicial de *H. hampei* na área foi estimada em 14%, sendo obtida pela amostragem aleatória de 50 frutos coletados na porção mediana de 15 plantas selecionadas em cada bloco. A concentração e viabilidade do fungo nas armadilhas de auto-inoculação no início e no final do experimento foi de $1,4 \pm 0,2 \times 10^8$ conídios.cm⁻² e $98,5 \pm 0,3\%$ e $1,4 \pm 0,3 \times 10^8$ conídios.cm⁻² e $89,3 \pm 2,7\%$, respectivamente.

3.2.6. Determinação do tempo para substituição do fungo *B. bassiana* na armadilha de auto-contaminação para o controle de *H. hampei*

Objetivou-se com esse experimento determinar o período em que *B. bassiana* presente na armadilha de auto-contaminação permanece com viabilidade e concentração suficientes para causar uma mortalidade satisfatória da broca. Esse experimento foi conduzido na mesma área e época do descrito no item 3.2.5.1, adotando-se delineamento em blocos aleatorizados com quatro repetições. Foram utilizadas sete armadilhas de auto-contaminação ESALQ-Hh2 com o patógeno, mas sem atraente químico. As armadilhas foram dispostas a aproximadamente 40 m umas

das outras na terceira fileira a partir da margem de cada bloco (repetição). Após 0 (inicial), 15, 31, 49, 63, 91 e 148 dias da instalação do experimento, uma armadilha de cada bloco foi aleatoriamente selecionada e encaminhada ao laboratório. A cada intervalo, a infectividade do fungo foi avaliada expondo brocas ao tecido retirado de dentro das armadilhas de auto-inoculação, tendo como grupo controle brocas sem contato com o patógeno. Em ambos os casos, utilizaram-se quatro repetições representadas por grupos de 10 insetos cada. Em seguida, o mesmo tecido das armadilhas impregnado com *B. bassiana* foi utilizado para determinar a concentração e viabilidade dos conídios conforme Mota (2013).

No início da instalação do experimento no campo, o fungo presente nas armadilhas apresentou uma concentração de $2,7 \times 10^8$ conídios.cm⁻² e 93,5% de viabilidade.

3.2.7. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software estatístico “R”, versão 2.13.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). Os experimentos de seleção de armadilha, para os dados de captura de *H. hampei* foram ajustados aos modelos bi-segmentado (brokenline), utilizada a biblioteca nlme do R, e os modelos foram comparados fazendo uso do teste da razão de verossimilhanças. Para as armadilhas instaladas em cafezal a pleno, sol o modelo ajustado é dado por:

$$y_{ijk} = \alpha_i + \beta_{1i}(\rho_i - x_k) + \beta_{2i}(x_k - \rho_i) + \varepsilon_{ijk},$$

Em que: $i=1,2,3$ (armadilhas); $j=1,2,3,4$ (repetições); $k=1,2...7$ (dias); α_i : ordenada do ponto de quebra para a i -ésima armadilha; ρ_i : abscissa do ponto de quebra para a i -ésima armadilha; β_{1i} : coeficiente angular da reta para valores de $x_k < \rho_i$, para a i -ésima armadilha; β_{2i} : coeficiente angular da reta para valores de $x_k > \rho_i$, para a i -ésima armadilha; ε_{ijk} : acaso. O modelo selecionado corresponde a um modelo para cada armadilha, com exceção para o parâmetro ρ_i , que foi o mesmo para os três tratamentos, ou seja, os tratamentos são semelhantes apenas quanto ao tempo de ocorrência da mudança de comportamento ($P=0,5582$), as demais características das armadilhas diferem entre si.

Os dados de captura de *H. hampei* nas armadilhas instaladas em cafezal sombreado foi ajustado a um modelo não linear dado por:

$$y_{ijk} = \emptyset_{1i} \{1 - \exp[-\exp(\emptyset_{2i})(x_k - \emptyset_{3i})]\} + \varepsilon_{ijk},$$

Sendo que: \emptyset_{1i} corresponde ao número assintótico de brocas acumuladas para a i -ésima armadilha; \emptyset_{2i} é o logaritmo do número de brocas constante para a i -ésima armadilha; \emptyset_{3i} dia máximo para o qual não se tem inseto para a i -ésima armadilha. O modelo selecionado apresenta o mesmo \emptyset_2 para as três armadilhas ($P=0,8886$) e diferentes \emptyset_{1i} e \emptyset_{3i} por armadilha ($P<0,0001$).

As porcentagens de viabilidade de *B. bassiana* presente nas diferentes armadilhas de auto-inoculação colocadas em cafezal a pleno sol e sombreado foram analisadas utilizando modelos supondo a distribuição betabinomial, devido à superdispersão (YEE, 2013). Nas armadilhas instaladas em cafezal a pleno sol, o modelo ajustado é dado por:

$$y_{\%} = 100 \frac{\exp(2.5238985 - 0.058942x)}{1 + \exp(2.5238985 - 0.0548942x)}$$

E nas armadilhas instaladas em cafezal sombreado o modelo ajustado é dado por:

$$y_{\%} = 100 \frac{\exp(2.00537 - 0.0415673x)}{1 + \exp(2.00537 - 0.041567x)}$$

No experimento de determinação do tempo para substituição de *B. bassiana* na armadilha ESALQ-Hh2 para o controle de *H. hampei*. A interferência do tempo na concentração de *B. bassiana* presente na armadilha ESALQ-Hh2 foi ajustado ao modelo com ajuste "Quasi-Poisson", considerando o tempo como uma variável quantitativa, sendo a curva ajustada por:

$$\mu = \exp(19.4315158 - 0.0134735 * x)$$

A viabilidade do ajuste foi supondo a distribuição "Quasi-Binomial", considerando o tempo como variável quantitativa, sendo o ajuste da curva dado por:

$$\pi = \frac{\exp(2.6105569 - 0.0260929 * x)}{1 + \exp(2.6105569 - 0.0260920 * x)}$$

Os dados de mortalidade diária (total) obtidos com a exposição de *H. hampei* em laboratório ao fungo *B. bassiana* retirada das armadilhas ESALQ-Hh2 instaladas em cafezal foram submetidos à análise de sobrevivência de Kaplan-Meier utilizando o teste Log Rank (Mantel-Cox) do *software* estatístico IBM SPSS Statistics v. 22.0.0, (2013).

Na comparação da interferência dos conídios aderidos ao corpo de *H. hampei* em seu potencial de voo, foram utilizados modelos Lineares Generalizados (GLM) utilizando o modelo binomial e a verificação da qualidade do ajuste foi feita por meio

do uso do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (HINDE, DEMÉTRIO, 1998). Quando detectadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de F ($P < 0,05$).

Os dados de capacidade de infestação de frutos de café por fêmeas de *H. hampei* contaminadas por *B. bassiana*, assim como o número de conídios produzidos por elas, foram expressos em porcentagem considerando os quatro testes juntos ($n = 80$).

Os dados de infestação de *H. hampei* no experimento de eficiência da armadilha de auto-inoculação ESALQ-Hh2 instalado em Dois Córregos-SP foi ajustado ao modelo com distribuição binomial com função de ligação logística. Para os efeitos significativos, foram realizadas comparações das médias pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), utilizando o *software* estatístico SAS (SAS, 2016). As porcentagens de infestações de *H. hampei* no experimento de eficiência da armadilha de auto-inoculação ESALQ-Hh2 obtidos em Encruzilhada-Ba e as porcentagens de infecções do inseto por *Beauveria* sp. apresentaram grande variabilidade. Nesse caso, não foi possível o ajuste de modelos estatísticos, sendo apresentado de forma descritiva com as médias seguida do seu erro padrão.

3.3. Resultados

3.3.1. Adaptação de armadilhas para otimizar a auto-contaminação de *H. hampei* por *B. bassiana*

A armadilha Broca[®], da Biocontrole, foi excluída das avaliações devido à entrada de um grande volume de água proveniente da chuva, o que provocou a remoção do fungo *B. bassiana* do sistema de auto-contaminação. Os outros tipos de armadilhas de auto-contaminação instaladas em cafezal a pleno sol e sombreado apresentaram diferenças estatísticas em relação ao número de *H. hampei* capturado ($P < 0,05$).

Em cafezal conduzido em sistema a pleno sol, as três armadilhas diferiram entre si em relação à captura de *H. hampei*, sendo ajustadas três curvas para explicar a captura ao longo do tempo (Figura 12 A). A captura acumulada ao final das avaliações foi de 120, 92,7 e 54 insetos por armadilha dos tipos ESALQ-Hh2, ESALQ-Hh e ESALQ-Hh1, respectivamente. Quando as armadilhas foram instaladas em

cafezal sombreado, a captura de *H. hampei* foi semelhante ($P=0,996$) entre as armadilhas ESALQ-Hh1 (97,2 brocas/armadilha) e ESALQ-Hh2 (97 brocas/armadilha), sendo ajustada uma única curva para explicar a captura do inseto em função do tempo (Figura 12 B). Ambas as armadilhas diferiram da armadilha ESALQ-Hh (73,3 brocas), que capturou menos insetos.

A viabilidade de conídios de *B. bassiana* nas armadilhas de auto-contaminação instaladas em cafezal a pleno sol foi reduzida significativamente com o tempo de permanência no campo ($P<0,001$), independentemente da armadilha ($P=0,2938$). A viabilidade após 45 dias havia sido reduzida para 47,4%, 43,6% e 30,5% em relação a viabilidade inicial para os modelos ESALQ-Hh1, ESALQ-Hh e ESALQ-Hh2, respectivamente. A redução da viabilidade do fungo *B. bassiana* nas armadilhas ESALQ-Hh1 foi menor ($P=0,00114$) do que nas armadilhas ESALQ-Hh e ESALQ-Hh2, que não diferem entre si ($P=0,7698$) (Figura 13 A).

A redução da viabilidade de *B. bassiana* nas armadilhas instaladas em cafezal sombreado ao longo do tempo foi semelhante nos três tipos de armadilhas ($P<0,001$). Nesse caso, uma única curva foi ajustada para demonstrar a redução da viabilidade ao longo do tempo (Figura 13 B). A viabilidade média dos conídios nas armadilhas avaliadas caiu de 92% no início do experimento para 50% aos 75 dias após a instalação.

A armadilha ESALQ-Hh2 foi escolhida para testes de eficácia na redução da população de *H. hampei* em campo, devido a maior captura de *H. hampei* em cafeeiro a pleno sol e sombreado.

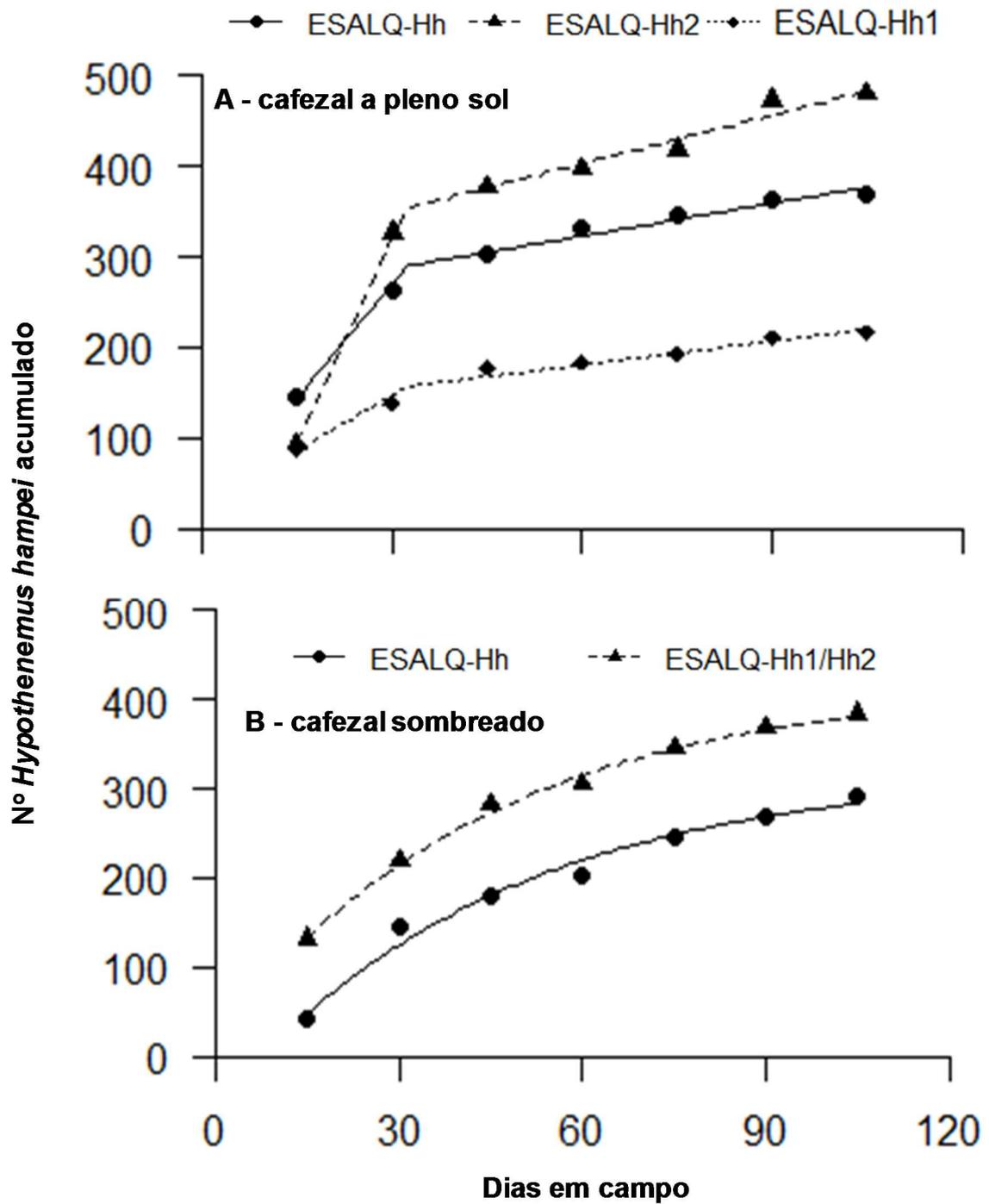


Figura 12. Médias observadas e curvas ajustadas de *Hypothenemus hampei* capturados por diferentes armadilhas de auto-contaminação contendo o fungo *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 em cafezal a pleno sol (A) e sombreado (B). Piracicaba, São Paulo (05/11/2013 a 18/02/2014)

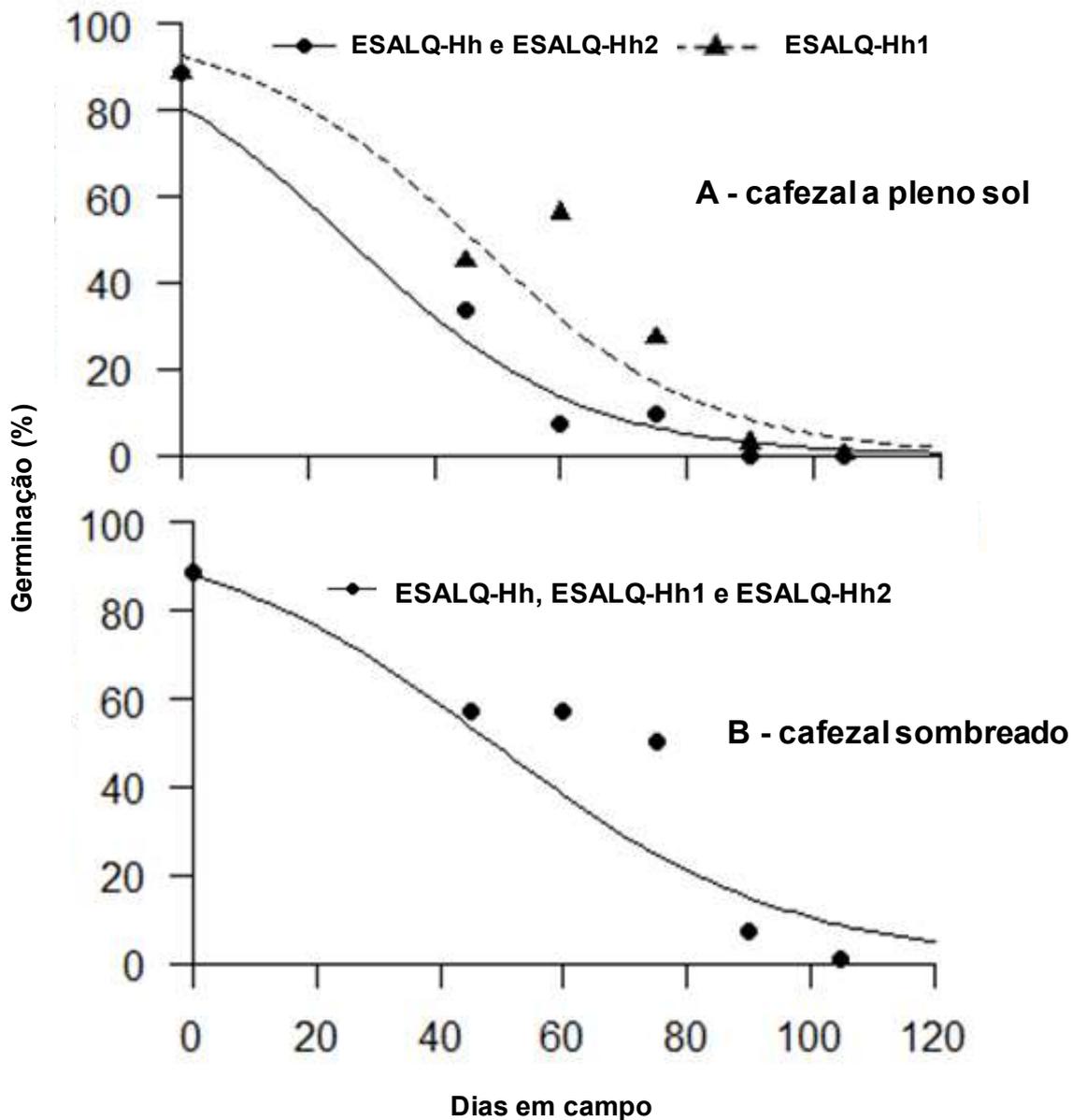


Figura 13. Médias observadas e curvas ajustadas de viabilidade de conídios de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 em diferentes armadilhas de auto-contaminação em cafezal a pleno sol (A) e sombreado (B). Piracicaba, São Paulo (05/11/2013 a 18/02/2014)

3.3.2. Potenciais fatores que interferem na disseminação de *B. bassiana* por *H. hampei*

3.3.2.1. Capacidade de voo de *H. hampei* expostos a conídios de *B. bassiana*

Tanto nos grupos de insetos expostos ao fungo quanto aqueles sem fungo, aproximadamente 50% dos insetos iniciaram o voo durante três horas em câmara de voo e 50% não voaram ($F_{1,22} = 0,03$, $P = 0,8641$), ficando na placa de Petri utilizada

para liberação dos insetos no interior da câmara de voo ou ficaram presos no anel de cola colocada nas paredes internas da câmara, para evitar que os insetos subissem caminhando até a parte superior (Figura 14). Conclui-se que os conídios aderidos ao corpo de *H. hampei* após exposição do inseto a conídios de *B. bassiana* produzido sobre tecido sintético não interferiu na sua atividade de voo.

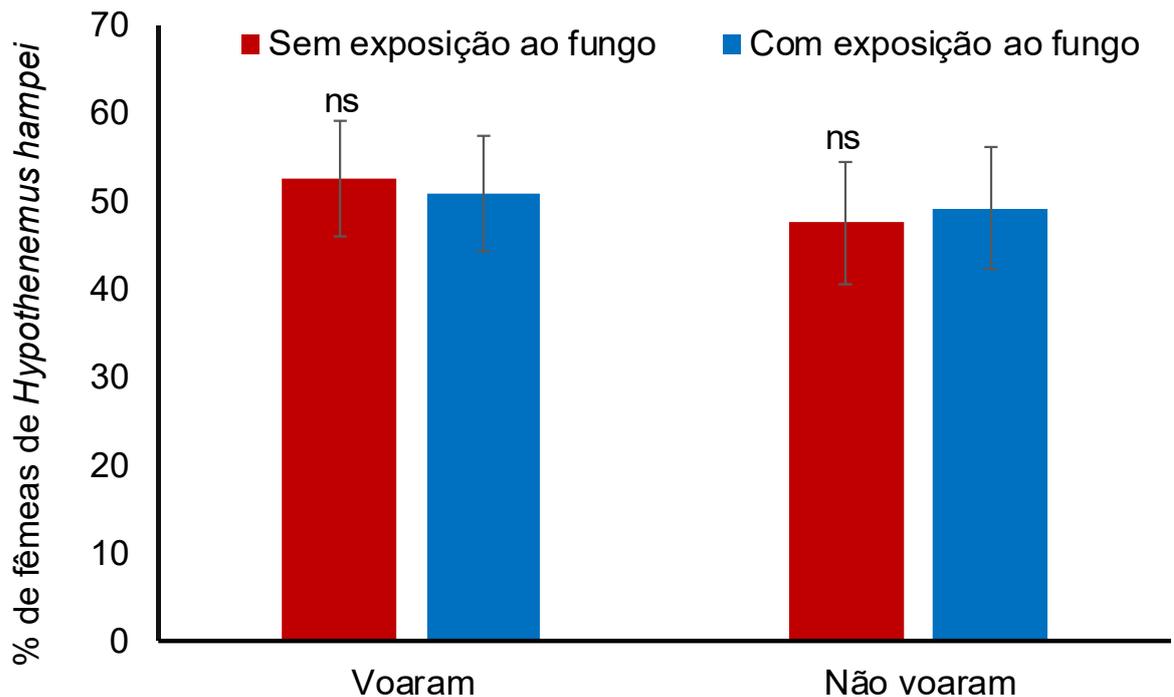


Figura 14. Média (\pm E.P) de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei* expostas a tecido com cultura de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 por 5s, que iniciaram o voo durante três horas em laboratório (27 ± 2 °C e $90\pm 10\%$ UR entre 14h e 17h) em câmara de voo. ns: não significativo

3.3.2.2. Infestação de frutos de café por adultos de *H. hampei* contaminados com *B. bassiana*

Todos os insetos que morreram após exposição aos conídios de *B. bassiana* sobre tecido apresentaram crescimento micelial do fungo. Apenas 5% dos insetos não morreram durante o período de avaliação. Por outro lado, nenhum dos insetos que não foram expostos ao fungo apresentou sinais de infecção e a maioria deles conseguiu penetrar até a semente (85%). Enquanto 32,5% dos insetos expostos ao fungo morreram antes de penetrar no fruto, 62,5% dos insetos iniciaram a perfuração da cereja de café ou atingiram a região do exocarpo, no entanto morreram antes de atingir a semente. A maioria desses insetos morreu próximo à região da “coroa” com

o abdome exposto externamente ao fruto (47,5%). A quantidade de conídios do patógeno em insetos esporulados cuja morte ocorreu fora do fruto ($3,0 \times 10^6$ conídios/inseto) foi maior que os insetos que ficaram parcialmente dentro do fruto ($1,8 \times 10^6$ conídios/inseto) (Tabela 3).

Tabela 3. Infestação de cerejas de café, local de morte e produção de conídios por adultos de *Hypothenemus hampei* 10 dias após a exposição a conídios de *Beauveria bassiana* em tecido sintético

Padrão observado	Insetos não expostos ao fungo (%)	Insetos expostos ao fungo (%)	Conídios/inseto ($\times 10^6$)*
Morte com parte do corpo externo ao exocarpo do fruto na região da coroa	0,0	47,5	1,8
Morte antes do início da perfuração do exocarpo	10,0	32,5	2,6
Início da perfuração do exocarpo e morte fora do fruto	0,0	15,0	3,0
Perfuração do mesocarpo (insetos vivos)	5,0	0,0	—
Perfuração da semente (insetos vivos)	85,0	5,0	—

*Dados obtidos somente para os insetos com exposição ao fungo

3.3.3. Potencial da armadilha ESALQ-Hh2 com *B. bassiana* para o manejo de *H. hampei* no campo

No experimento montado em Encruzilhada-BA, foi observado um baixo nível de infestação de *H. hampei* em todas as avaliações. Foram avaliados um total de 5.040 frutos por tratamento considerando todas as amostragens, sendo encontrado apenas 76 (1,5%) frutos perfurados por *H. hampei* nas parcelas com a armadilha ESALQ-Hh2 com *B. bassiana* e 70 (1,4%) nas parcelas com a armadilha controle. A infestação total máxima registrada ocorreu aos 91 dias após a instalação do experimento, atingindo 3,6% e 3,8% para as parcelas com as armadilhas controle e com fungo, respectivamente (Tabela 4).

Foi observada infecção *H. hampei* por *B. bassiana* apenas nas parcelas com instalação das armadilhas ESALQ-Hh2 com o patógeno. Dos 76 frutos infestados com *H. hampei* cinco insetos (6,6%) encontravam-se infectados com *Beauveria* sp., sendo

um coletado a 4 m da armadilha aos 63 dias após instalação do experimento e quatro, (três a 4 m e um a 8 m) aos 148 dias.

Tabela 4. Porcentagem média (\pm E.P) de frutos perfurados por *Hypothenemus hampei* coletados em plantas de café marcadas em diferentes distâncias da armadilha ESALQ-Hh2 com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63, Encruzilhada-BA (15/01/2016 a 11/06/2016)

Dias	Distância das plantas em relação à armadilha							
	Armadilha com fungo				Armadilha sem fungo			
	4 m	8 m	12 m	Total	4 m	8 m	12 m	Total
0	3,8 \pm 0,8	0,8 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,7	0,4 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,4	0,3 \pm 0,2
15	0,8 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2	0,7 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	2,1 \pm 1,3	0,8 \pm 0,5	1,0 \pm 0,5
31	1,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	0,7 \pm 0,4	0,4 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,8 \pm 0,8	0,4 \pm 0,4
49	0,4 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,4 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
63	0,8 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	0,4 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3	1,3 \pm 0,4	2,1 \pm 2,1	0,4 \pm 0,4	1,3 \pm 0,9
91	7,9 \pm 2,7	2,5 \pm 0,6	0,8 \pm 0,3	3,8 \pm 2,9	2,1 \pm 2,1	4,6 \pm 4,6	4,2 \pm 4,2	3,6 \pm 2,8
148	1,7 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3	5,4 \pm 1,5	3,1 \pm 2,0	3,8 \pm 1,8	2,5 \pm 1,4	3,3 \pm 2,4	3,2 \pm 1,7
Média	2,4\pm0,9	1,0\pm0,3	1,2\pm0,7	1,5\pm0,5	1,1\pm0,5	1,6\pm0,6	1,4\pm0,6	1,4\pm0,5

No 2º experimento montado em Dois Córregos-SP, de um total de 2.329 frutos marcados nas parcelas com a armadilha ESALQ-Hh2 com *B. bassiana* apenas 186 foram perfurados por *H. hampei* (8,0%). Nas parcelas com armadilhas sem fungo, foram observados apenas 223 frutos infestados (10,2%) por *H. hampei* dos 2.184 frutos marcados. Foram observadas diferenças significativas das porcentagens de frutos brocados em relação às distâncias das armadilhas ($P=0,0153$) e ao longo do tempo ($P<0,0001$) sem efeito das armadilhas ($P=0,5609$) e das interações armadilha com o tempo ($P=0,1054$) e do tempo com as distâncias ($P=0,1973$) no entanto. Dessa forma, para efeito de comparação da influência do tempo e da distância, as médias dos dois tipos de armadilhas foram agrupadas para essas variáveis (Tabela 5). Em relação à distância, a infestação foi maior nas plantas nas quais as armadilhas foram instaladas (3,4%), diferindo significativamente das demais distâncias que tiveram as menores infestações (2,5-2,3%) e que não diferiram entre si. O mesmo comportamento foi observado para a infestação ao longo do tempo, sendo que aos 10 dias da instalação do experimento a infestação foi de 5,3%, diferindo dos demais tempos que tiveram infestações semelhantes (2,4-1,7%).

Tabela 5. Porcentagem média (\pm E.P) de frutos com *Hypothenemus hampei* coletados em plantas de café em diferentes tempos e distâncias da armadilha ESALQ-Hh2 com *Beauveria bassiana* isolado ESALQ-PL63, Dois Córregos-SP (13/05/2016 a 22/06/2016)

Porcentagem média (\pm E.P) de frutos perfurados			
Distância (m)	Armadilha com fungo	Armadilha sem fungo	Média Geral
0	2,7 \pm 0,6	4,2 \pm 1,2	3,4 \pm 0,7 a
4	2,3 \pm 0,5	2,8 \pm 1,0	2,5 \pm 0,6 ab
8	2,5 \pm 0,7	2,6 \pm 0,8	2,5 \pm 0,5 ab
12	1,7 \pm 0,6	2,8 \pm 1,3	2,3 \pm 0,7 b
Tempo (dias)	Armadilha com fungo	Armadilha sem fungo	Média Geral
10	3,8 \pm 0,8	6,8 \pm 1,5	5,3 \pm 0,9 a
19	2,2 \pm 0,6	2,5 \pm 0,7	2,4 \pm 0,5 b
32	1,6 \pm 0,4	1,2 \pm 0,5	1,4 \pm 0,3 b
40	1,5 \pm 0,4	2,0 \pm 0,5	1,7 \pm 0,3 b

Médias (\pm E.P) seguidas por mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação à infecção por *B. bassiana*, dos 186 frutos coletados com *H. hampei* nas parcelas com as armadilhas ESALQ-Hh2 com o patógeno, apenas três insetos (1,6%) estavam infectados por *Beauveria* sp., sendo dois insetos encontrados nas plantas nas quais as armadilhas estavam instaladas aos 32 e 40 dias e um a 4 m da armadilha na avaliação após 40 dias. Nas parcelas com a armadilha sem fungo, dos 223 frutos coletados com *H. hampei*, apenas um (0,45%) estava infectado por *Beauveria* sp., observado a 12 m de distância da armadilha após 32 dias da instalação do experimento.

3.3.4. Determinação do tempo para substituição de *B. bassiana* na armadilha ESALQ-Hh2 para o controle de *H. hampei*

No início do experimento, a viabilidade dos conídios de *B. bassiana* presente nas armadilhas ESALQ-Hh2 foi de 93,5% com uma concentração de $2,7 \times 10^8$ conídios.cm⁻². Gradualmente, foi observada uma redução da viabilidade e concentração do fungo em função do tempo de permanência no campo ($P < 0,0001$), sendo que, ao final do experimento, 148 dias após a instalação, a concentração de conídios era de $7,5 \times 10^7$ conídios.cm⁻² e apenas 33% de viabilidade (Figura 15).

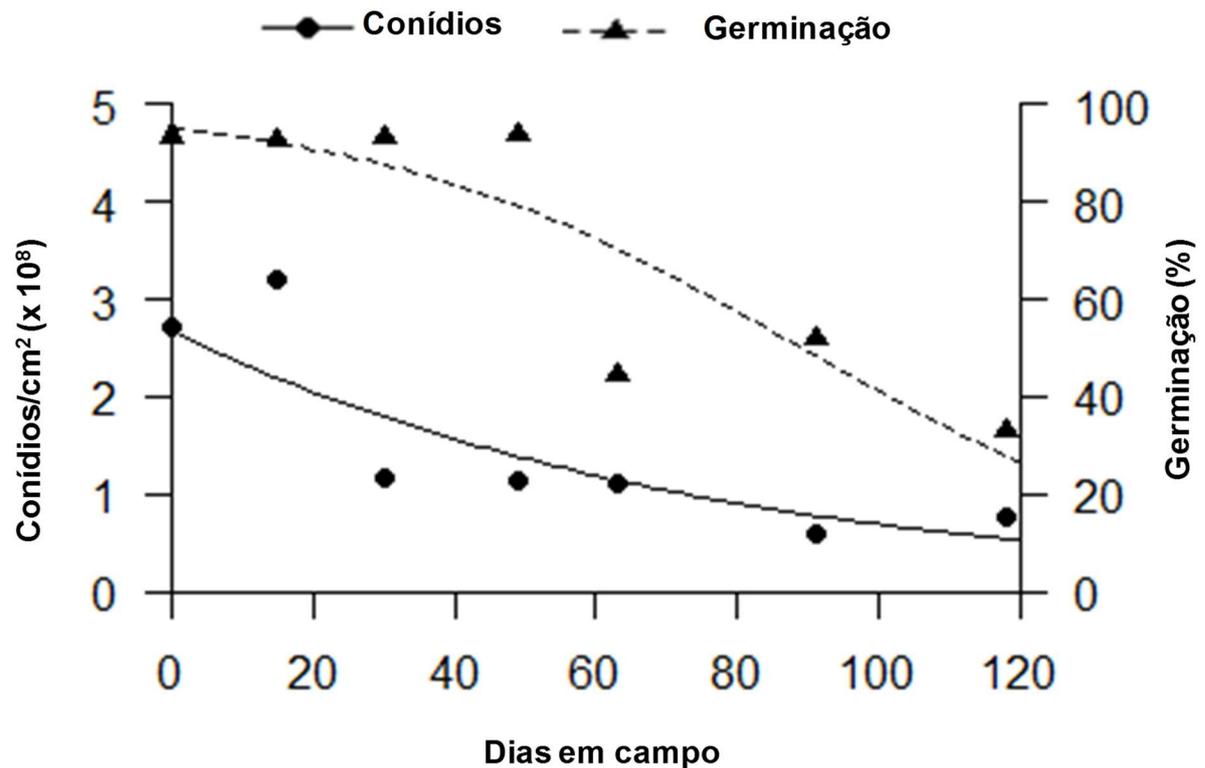


Figura 15. Médias observadas e curva ajustada para a concentração e germinação (viabilidade) de conídios de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 na armadilha de auto-inoculação ESALQ-Hh2 colocadas em cafezal a pleno sol, Encruzilhada-BA (15/01/16 a 11/06/16)

As faixas de tecido contendo conídios de *B. bassiana* presentes nas armadilhas ESALQ-Hh2 colocadas em cafezal a pleno sol foram retiradas em diferentes períodos e levadas ao laboratório. Antes da contagem da concentração e viabilidade (Figura 15), os *H. hampei* obtidos da criação foram expostos por 5 segundos aos conídios do patógeno, resultando em uma redução significativa da sobrevivência do inseto em relação ao tempo de permanência do fungo no campo ($\chi^2=48,9$; $df=6$; $P<0,001$). Os insetos expostos ao fungo no tempo inicial e com 31 e 63 dias após instalação das armadilhas provocaram as mais rápidas reduções da sobrevivência de *H. hampei* em relação aos demais tempos (Figura 16). A menor redução da sobrevivência do inseto (27,5%) ocorreu quando os mesmos foram expostos ao patógeno retirados com 91 dias da instalação do experimento. No início do experimento, a exposição de *H. hampei* a *B. bassiana* presente no tecido resultou em 95% de mortalidade de *H. hampei* e, aos 148 dias da instalação, a mortalidade dos insetos ainda era de 90%, mesmo com o fungo com 33% de viabilidade. Para cada período de exposição, foi utilizado um controle com *H. hampei* sem exposição

ao patógeno. Dessa forma, os controles não foram inseridos na análise, sendo que, nesse caso, a mortalidade do inseto variou de $7,5\pm 4,1\%$ a $17,5\pm 6,3\%$.

Todos os insetos mortos apresentaram esporulação de *B. bassiana*, exceto aqueles expostos ao fungo após 31 ($95,0\pm 5,0\%$) e 49 ($80,0\pm 14,0\%$) dias da instalação do experimento, não havendo diferença estatística ($P>0,05$) para tal parâmetro. Não foi observada esporulação nos insetos mortos no tratamento controle.

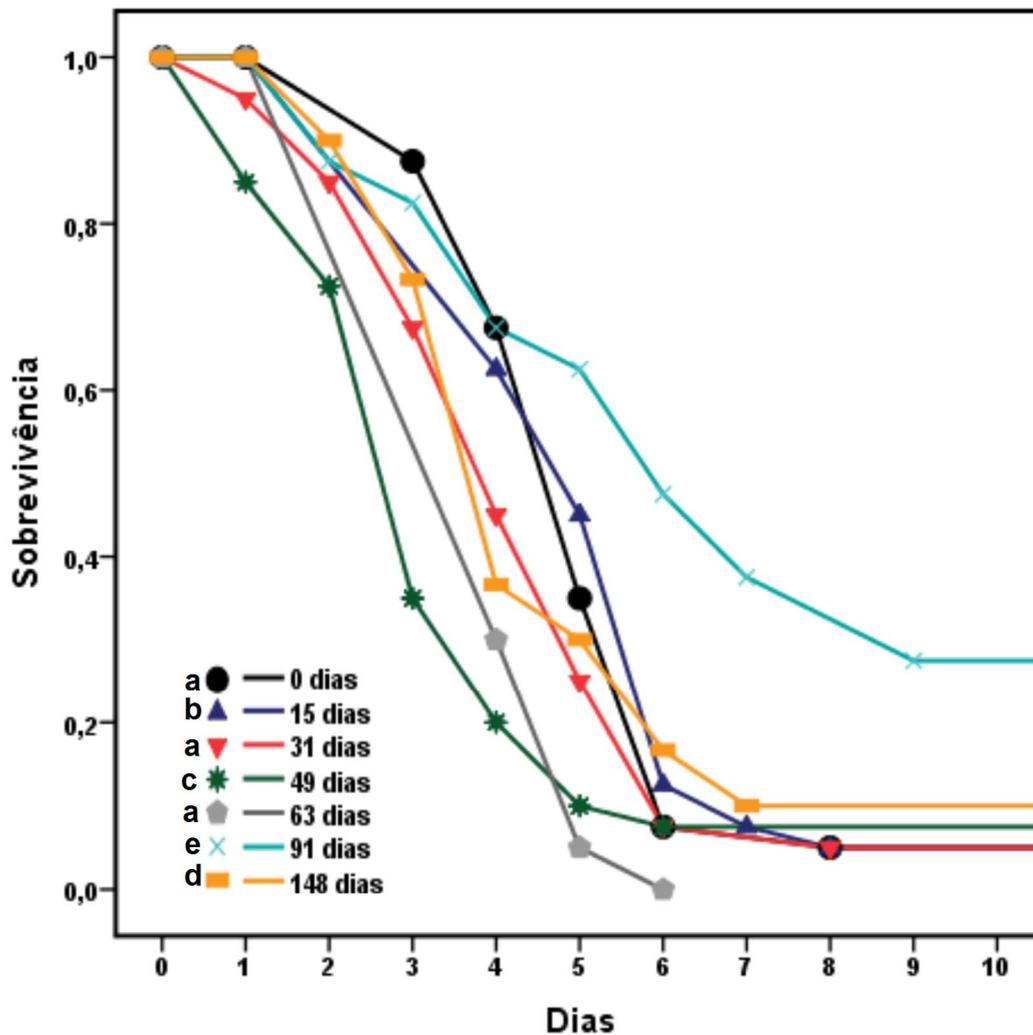


Figura 16. Sobrevivência média de adultos de *Hypothenemus hampei* expostos por 5s ao tecido com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 das armadilhas ESALQ-Hh2 mantidas em cafezal por até 148 dias (15-01-2016 a 11-06-2016). Obs.: A mortalidade nos controles variou de $7,5\pm 4,1\%$ a $17,5\pm 6,3\%$ (não incluído na análise)

3.4. Discussão

Devido ao ciclo multivoltino e do hábito críptico de *H. hampei*, passando a maior parte do seu ciclo de vida no interior do fruto de café, seu controle por meio de

pulverização de produtos químicos ou microbiológicos tem sido um desafio. Diante dessa dificuldade, desenvolvemos armadilha de auto-contaminação (ESALQ-Hh) contendo *B. bassiana* para o manejo de *H. hampei* (MOTA, 2013). Apesar da eficiência da armadilha ESALQ-Hh, a atração dos insetos foi inferior à observada com o modelo de armadilha IAPAR, confeccionado com garrafa do tipo Pet de 2 L de uso conhecido (VILLACORTA *et al.*, 2001).

Nesse sentido, mostramos que, com modificações do sistema de auto-inoculação da armadilha ESAQ-Hh, foram desenvolvidos dois novos modelos de armadilhas, dos quais foi selecionada a armadilha ESALQ-Hh2, em que, independentemente do sistema de condução do cafeeiro (pleno sol e sombreado), a captura de *H. hampei* foi superior à armadilha ESALQ-Hh, chegando a capturar 2,2 vezes mais quando instaladas em cafezal a pleno sol. Essa maior eficiência de captura, em parte, pode estar relacionada à maior área de abertura (273 cm²) e das aletas, sendo nove vezes maior do que a armadilha ESALQ-Hh. Além disso, foi utilizado na armadilha ESALQ-Hh2 o atraente comercial Bio Broca[®], contendo etanol mais metanol em um sachê disponível comercialmente para liberação gradual dos atraentes. Na armadilha ESALQ-Hh, a mistura dos atraentes foi colocada em um frasco de vidro com tampa de borracha com um orifício de 2 mm para liberação dos voláteis. Por essa razão, a taxa de liberação dos atraentes, provavelmente, foi diferente entre as armadilhas. Aliado a isso, a maior abertura da armadilha ESALQ-Hh2 pode ter facilitado a maior captura de *H. hampei*. Nesse contexto, trabalhos mostraram que a captura de *H. hampei* pode ser significativamente influenciada pelos modelos e cores de armadilhas e pela variação nas taxas de liberação dos atraentes etanol e metanol (SILVA, VENTURA, MORALES, 2006; UEMURA-LIMA *et al.* 2010).

Foi observado ainda, que a captura de *H. hampei* pela armadilha ESALQ-Hh2 foi estável em comparação aos dois sistemas de condução do cafezal (pleno sol e sombreado), diferente da armadilha ESALQ-Hh1, que, quando instalada em cafezal sombreado, teve a captura do inseto 1,8 vezes maior em relação ao sistema a pleno sol. Esse resultado foi semelhante ao sugerido por Dufour (2004), que relata que as armadilhas iscadas com álcoois para captura de *H. hampei* em cafezal a pleno sol pode ter sua eficiência de captura reduzida quando comparadas às capturas em cafezal sombreado.

A armadilha selecionada, além de realizar uma boa captura dos insetos, deve proteger os conídios de *B. bassiana* das condições adversas, diminuindo a redução

drástica da viabilidade dos conídios ao longo do tempo, aumentando as chances de infecção dos *H. hampei* que passarem pela armadilha. Nesse sentido, a viabilidade dos conídios nas armadilhas instaladas em sistema sombreado não diferiu entre si. Por outro lado, no sistema a pleno sol, a conservação da viabilidade do patógeno foi maior na armadilha ESALQ-Hh em relação aos demais modelos. Esse fato pode ter se agravado devido à condição do cafezal no momento do experimento, em que as plantas apresentavam pouca folhagem, expondo ainda mais o fungo às condições adversas do ambiente.

Dessa forma, mesmo com maior redução da viabilidade do fungo colocado na armadilha ESALQ-Hh2, quando comparada à armadilha ESALQ-Hh1, a armadilha ESALQ-Hh2 foi escolhida para verificar sua eficiência para o manejo de *H. hampei* em cafezal a pleno sol, principal sistema de condução de cafezal no Brasil, devido à alta estabilidade de captura de *H. hampei*. Além disso, considerando a condição atípica do cafezal, acreditamos que a instalação da armadilha em plantas mais enfolhadas levaria a uma maior sobrevivência do fungo.

De fato, essa hipótese foi comprovada, pois observou-se que, em cafezal a pleno sol, a concentração dos conídios passou de $2,7 \times 10^8$ conídios.cm⁻² e 93,5% de viabilidade no início do experimento para $7,5 \times 10^7$ conídios.cm⁻² e 33% de viabilidade ao final do experimento (148 dias após a instalação). Surpreendentemente, a exposição de *H. hampei* aos conídios do fungo retirado das armadilhas do campo resultou em elevados níveis de infecção dos insetos, variando de 73 a 100%, sendo que, ao final do experimento, a infecção dos insetos por *B. bassiana* ainda era de 90%. Os altos níveis de mortalidade de *H. hampei* exposto ao patógeno podem ser atribuídos à elevada taxa de germinação e concentração dos conídios presente nas armadilhas mesmo diante das condições adversas do ambiente, como chuva e radiação ultravioleta.

Foi observada uma variação significativa de mortalidade de *H. hampei* exposto ao patógeno das armadilhas durante o período amostrado por meio da comparação das curvas de sobrevivência. A variação no tempo de mortalidade de *H. hampei* pode estar relacionada à possibilidade de produção contínua dos conídios no substrato contendo o patógeno, resultando em diferenças na qualidade do fungo ao longo do tempo (LYONS, *et al.* 2012). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Mota (2013) em cafezal sombreado, que observaram que mesmo após 151 dias da instalação da armadilha ESALQ-Hh com *B. bassiana* a mortalidade dos insetos que

passaram por elas ainda era de 70% mesmo com 44% de viabilidade do patógeno. Estes resultados sugerem que os conídios de *B. bassiana* presente na armadilha ESALQ-Hh2 permaneceram infectivos à *H. hampei* por todo o período avaliado (frutificação a colheita), mostrando que não há a necessidade de substituição do patógeno nas armadilhas.

A avaliação do potencial da armadilha ESALQ-Hh2 com *B. bassiana* para o manejo de *H. hampei* em cafezal a pleno sol não resultou em redução significativa da infestação do inseto em comparação as parcelas com a armadilha sem o patógeno. Quando as armadilhas foram avaliadas durante da fase de formação do fruto até a colheita (janeiro a junho), mesmo com a baixa infestação natural de *H. hampei* (1,5%) nas parcelas com a armadilha com fungo dos 76 frutos com o inseto 6,6% (4 a 8 m da armadilha) estavam infectados pelo fungo *Beauveria* sp. e nenhum inseto infectado foi encontrado nas parcelas com a armadilha sem o fungo. Quando a armadilha ESALQ-Hh2 foi instalada em um cafezal na fase de maturação dos frutos, em uma área com infestação de *H. hampei* de ~14%, dos 186 frutos coletados com *H. hampei* nas parcelas com a armadilha ESALQ-Hh2 com o patógeno, 1,6% (0 a 8 m da armadilha) estava infectados por *Beauveria* sp. Para as parcelas com a armadilha sem fungo, apenas um inseto (0,45%) foi encontrado infectado (12 m da armadilha).

Resultados semelhantes foram obtidos por Lyons *et al.* (2012), quando instalaram em floresta uma armadilha de auto-contaminação contendo *B. bassiana* para o controle de *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) e recapturaram os insetos que passaram pela armadilha por meio de armadilhas adesivas colocadas nas árvores ao longo das parcelas. Dos 2.532 insetos coletados nas armadilhas adesivas, 165 (6,5%) tiveram o crescimento fúngico semelhante a *B. bassiana* e, por meio de testes moleculares, comprovaram que apenas 25 (1%) foram confirmados como sendo do isolado fúngico presente nas armadilhas de auto-contaminação.

Melhores índices de infecção foram obtidos por Tinzaara *et al.* (2015) utilizando a técnica de liberação de insetos marcados e posterior recaptura. Nesse estudo, os autores avaliaram a disseminação de *B. bassiana* por *Cosmopolites sordidus* colocando o fungo em torno de rizomas de bananeira intactas (controle) e de rizoma com uma incisão ao nível do solo (armadilha atrativa). Foi observado 26% de infecção dos insetos nas parcelas com armadilha de incisão combinada com o fungo, em comparação com 16% quando o fungo foi colocado na base da planta sem incisão,

sendo que os insetos com sinais de infecção recuperados foram os liberados a 6 e 9 m das armadilhas.

Nesse contexto, a baixa infecção de *H. hampei* observada nos nossos experimentos pode estar relacionada com a baixa infestação natural do inseto na área em que a armadilha foi avaliada por maior período de tempo (janeiro a junho). A baixa infestação do inseto significa uma baixa disseminação de fungo no ambiente. Devemos considerar, também, a reduzida probabilidade de que os *H. hampei*, ao passarem pela armadilha de auto-inoculação e saírem contaminados com o patógeno, iniciem a infestação nas plantas marcadas para a avaliação. Nesse sentido, Gil *et al.* (2015), durante seu estudo de movimentação de *H. hampei* em cafezal na Colômbia por meio da liberação de uma população polimorfa identificadas por marcador de microssatélites utilizando a técnica de liberação-recaptura, observaram, a partir de uma liberação de 5 mil *H. hampei*, uma taxa de recuperação de 27%. Deve-se levar em consideração nesses estudos que a infestação nos frutos apresenta distribuição agregada do inseto, pois a dispersão depende dos ventos e que as fêmeas colonizadoras de *H. hampei* podem voar até 65m.

A movimentação do inseto é um fator importante quando utilizamos a técnica da auto-contaminação para disseminação de um agente infeccioso, sendo que a redução da mobilidade do inseto após a contaminação com o entomopatógeno é indesejável. Nesse contexto, os resultados de testes de voo realizado em laboratório sugerem que a mobilidade de *H. hampei* não é afetada pela carga de conídios aderidos ao seu corpo quando comparados aos insetos sem exposição ao fungo. Diferentemente, os resultados obtidos por Lacey *et al.* (1995) sugerem que a *Popillia japonica* quando exposta a conídios de *M. anisopliae*, tiveram uma pequena redução na capacidade de voar quando comparados com os insetos sem o fungo.

Os resultados revelaram ainda que, dos insetos expostos aos conídios de *B. bassiana*, 47,5% morreram fora do fruto do café, e 47,5% morreram aderidos à “coroa” do fruto com parte do corpo fora do fruto, apresentando densa esporulação do patógeno.

As tentativas de utilização de armadilha atrativa contendo etano e metanol para monitoramento e para controle de *H. hampei* (VILLACORTA *et al.* 2001; SILVA, VENTURA, MORALES, 2006; UEMURA-LIMA *et al.* 2010; PEREIRA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2015), mesmo com a utilização 30 armadilhas por hectare, não foram suficientes para manter os níveis de infestação abaixo do recomendado para

controle (FERNANDES *et al.*, 2014). Dessa forma, ainda não existe uma recomendação para utilização eficiente de armadilhas como medida de controle desse inseto.

Baseado nos resultados das primeiras tentativas de uso da armadilha de auto-inoculação e dos resultados de outros autores com armadilhas de captura, consideramos que a utilização da armadilha ESALQ-Hh2 com o fungo *B. bassiana* pode ser uma medida viável apenas no manejo de *H. hampei* a médio e longo prazo, por meio do aumento do inóculo do fungo na área ao longo das safras utilizando a armadilha. Contribuem para esta afirmação o fato de que apenas 5% dos insetos que passarem pela armadilha serão capazes de perfurar o grão de café e que a infectividade do patógeno a *H. hampei* é mantida durante toda a safra do café. Além disso, a não interferência na mobilidade do inseto após a contaminação com o patógeno colocado na armadilha contribuirá para disseminação do fungo no cafezal. Entretanto, são necessários estudos de longo prazo para determinar a eficiência da armadilha ESALQ-Hh2 durante safras seguidas em um mesmo cafezal para melhores recomendações de seu uso no manejo de *H. hampei*.

Referências

- DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 90, p. 453-465, 2000.
- DUFOUR, B.P. Condiciones de uso de las trampas en el control de la broca del café. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DA BROCA-DO-CAFÉ, Londrina, 2004. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2004. p.7.
- DUFOUR, B.P.; FRÉROT, B. Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col., Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 132, n. 7, p. 591-600, 2008.
- DUTTON, A.; BIGLER, F. Flight activity assessment of the egg parasitoid *Trichogramma brassicae* (Hym.:Trichogrammatidae) in laboratory and field conditions. **Entomophaga**, v.40, p.223-233, 1995.

FERNANDES, F.L.; PICANÇO, M.C.; FERNANDES, M.E.S.; DÂNGELO, R.A.C.; SOUZA, F.F.; GUEDES, R.N.C. A new and highly effective sampling plan using attractant-baited traps for the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Journal of Pest Science**, v. 88, p. 289–299, 2015.

FERNANDES, F.L.; PICANÇO, M.C.; SILVA, R.S.; SILVA, I.W.; FERNANDES, M.E.S.; RIBEIRO, L.H. Controle massal da broca-do-café com armadilhas de garrafa Pet vermelha em cafeeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 49, p. 587-594, 2014.

GEORDANENGO, P.; BRUN, L.O.; FREROT, B. Evidence for allelochemical attraction of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, by coffee berries. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 4, p. 763-769, 1993.

GETAHUN, M.N.; BIASAZIN, T.D.; WOLDE-HAWARIA, Y.; BENGTSSON, J.M.; HILLBUR, Y.; SEYOUM, E. *Metarhizium* sp. isolated from dead *Pachnoda interrupta* (Coleoptera: Scarabaeidae) as a potential entomopathogenic fungus for the pest insect: proof-of-concept for autodissemination. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 36, p. 1–9, 2016.

GIL, Z. N.; BENAVIDES, P.; DE SOUZA, O.; ACEVEDO, F.E. LIMA, E. Molecular markers as a method to evaluate the movement of *Hypothenemus hampei* (Ferrari). **Journal of Insect Science**, v. 15, p. 1-8, 2015.

HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Overdispersion: models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 27, p. 151-170, 1998.

IBM CORP. **IBM SPSS statistics for windows**: version 22.0. Armonk, 2013.

INFANTE, F.; PÉREZ, J.; VEGA, F.E. The coffee berry borer: the centenary of a biological invasion in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p.125-126, 2014.

LACEY, L.A.; AMARAL, J.J.; COUPLAND, J.; KLEIN, M.G.; SIMOES. Flight activity of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) after treatment with *Metarhizium anisopliae*. **Biological control**, v. 5, p. 167-172, 1995.

- LYONS, D.B.; LAVALLÉE, R.; KYEI-POKU, G.; FRANKENHUYZEN, K.V.; JOHNY, S.; GUERTIN, C.; FRANCESE, J.A.; JONES, G.C.; BLAIS, M. Towards the Development of an Autocontamination Trap System to Manage Populations of Emerald Ash Borer (Coleoptera: Buprestidae) with the Native Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, p. 1929-1939, 2012.
- MATHIEU, F.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Factors related to native host abandonment by the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Col., Scolytidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 121, n. 3, p. 175-180, 1997.
- MATHIEU, F.; GAUDICHON, V.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Effect of physiological status on olfactory and visual responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. **Physiological Entomology**, Oxford, v.26, n.3, p.189-193, 2001.
- MOTA, L.H.M. **Desenvolvimento de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) em tecido sintético**. 2013. 84p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
- OLIVEIRA, D.G.P.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA, I. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.
- PEREIRA, A.E.; VILELA, E.F.; TINOCO, R.S.; LIMA, J.O.G. FANTINE, A.K.; MORAIS, E.G.F.; FRANÇA, C.F.M. Correlation between numbers captured and infestation levels of the Coffee Berry-borer, *Hypothenemus hampei*: A preliminary basis for an action threshold using baited traps. **International Journal of Pest Management**, v. 58, p. 183-190, 2012.

PREZOTTI, L.; PARRA, J. R. P.; VENCOSKY, R.; DIAS, C. T. S.; CRUZ, I.; CHAGAS, M. C. M. Teste de Vôo como Critério de Avaliação da Qualidade de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae): Adaptação de Metodologia. **Neotropical Entomology**, v.31, p.411-417,2002.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012.

ROOBAKKUMAR, A.; SAMUEL, S.D.; BALAKRISHNAN, M.M.; SREEDHARAN, K. Release and Establishment of the Parasitoid *Cephalonomia stephanoderis* Betrem Against the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* Ferrari in Pulney Hills, Tamil Nadu, India. **Entomological News**, v. 124, p. 221-223, 2014.

SAS Institute Inc (2016) The GLIMMIX Procedure (Experimental) (Cary, NC: SAS Institute).

SILVA, W.D.; COSTA, C.M.; BENTO, J.M.S. How old are colonizing *Hypothenemus hampei* (Ferrari) females when they leave the native coffee fruit? **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 27, n. 6, p. 729-735, 2014.

SILVA, F.C. da; VENTURA, M.U.; MORALES, L. Capture of *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera, Scolytidae) in response to trap characteristics. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 567-571, 2006.

SILVA, W.D.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; BENTO, J.M.S. Mating Behavior of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Journal of insect behavior**, New York, v.25, p. 408–417, 2012.

TINZAARA, W.; EMUDONG, P.; NANKINGA, C.; TUSHEMEREIRWE, W.; KAGEZI, G.; GOLD, C. S.; DICKE, M.; VAN HUIS, A.; KARAMURA, E. Enhancing dissemination of *Beauveria bassiana* with host plant base incision trap for the management of the banana weevil *Cosmopolites sordidus*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, p. 3878-3884, 2015.

- UEMURA-LIMA, D.H; VENTURA, M.U.; MIKAMI, A.Y.; SILVA, F.C da; MORALES, L. Responses of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera: Scolytidae), to vertical distribution of methanol: ethanol traps. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, p 930-933, 2010.
- VEGA, F.E.; DOWD, P.F.; BARTELT, R.J. Dissemination of microbial agents using an autoinoculating device and several insect species as vectors. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 545-552, 1995.
- VILLACORTA, A.; POSSAGNOLO, A.F.; SILVA, R.Z.; RODRIGUES, P.S. Um modelo de armadilha com semioquímicos para o manejo integrado da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) no Paraná. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, Vitória, 2001. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p.2093-2098.
- YEE, T. W. VGAM: Vector Generalized Linear and Additive Models. R package version 0.9-2. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=VGAM>>. Acesso em: 2016.

4. MANEJO DE *Hypothenemus hampei* COM APLICAÇÃO DE *Beauveria bassiana* COM FERTILIZANTES QUÍMICOS EM SOLO

Resumo

Durante a safra do café, uma grande quantidade de frutos infestados por *Hypothenemus hampei* cai ao solo, constituindo uma excelente forma para sobrevivência do inseto na entressafra que serve como fonte para novas infestações dos frutos na próxima safra. Dessa forma, a aplicação do fungo *Beauveria bassiana* no solo, na projeção da copa da planta, poderá contribuir para o controle de *H. hampei* que emergem dos frutos. Objetivou-se com esse trabalho *i)* avaliar o potencial de manejo de *H. hampei* em frutos infestados no solo, pela aplicação do fungo *B. bassiana* com fertilizantes químicos granulados em solo de cafezal; *ii)* verificar a persistência do inóculo no solo após a aplicação conjunta com os fertilizantes químicos; e *iii)* verificar em laboratório a viabilidade dos conídios de *B. bassiana* quando em contato direto com os fertilizantes químicos utilizados nas aplicações do fungo. A aplicação de 2×10^{12} conídios.ha⁻¹ de *B. bassiana* conjuntamente com fertilizantes químicos granulados em solo foi realizada em um mesmo cafezal nas safras de 2015 e 2016, resultando em reduções de 34 e 50%, respectivamente, da infestação de *H. hampei*, quando comparadas às parcelas somente com aplicação dos fertilizantes. A porcentagem de *H. hampei* infectado por *Beauveria* sp. foi de 1,2% nas parcelas com aplicação do patógeno (0 a 5,1%) e 0,04% para as parcelas controle (0 a 0,2%). A persistência de *B. bassiana* no solo do cafezal foi verificada por meio da técnica "Insect bait" com larvas de *Tenebrio molitor*. A porcentagem média de inseto recuperado com infecção de *Beauveria* sp. foi de 14 e 4% em 2015 e 2016, respectivamente, nas parcelas com a aplicação do patógeno, e de 7 e 1% nas parcelas sem aplicação do fungo. A viabilidade dos conídios de *B. bassiana* em mistura com quatro fertilizantes químicos foi verificada a cada duas horas por 10h e, somente após 6 e 10h do contato direto com o fertilizante YaraBela™ + Enxofre, a germinação de conídios reduziu de 93% para 86%. Esses resultados indicam que a aplicação conjunta de *B. bassiana* com fertilizantes químicos pode ser uma alternativa viável para o manejo de *H. hampei* a médio e longo prazo e estudos futuros deverão determinar o número de aplicação do patógeno para um manejo dessa praga.

Palavras-chave: Fertilizantes; Broca-do-café; Entomopatógenos; Métodos de aplicação

Abstract

During the coffee harvest, many fruits infested with *Hypothenemus hampei* drop to the ground, providing an excellent way for survival of the insect in the off-season that serves as the source for new infestations of the fruits in the next harvest. Therefore, the application of the fungus *Beauveria bassiana* to the soil, in the projection of the plant crown, may contribute to the control of *H. hampei* that emerge from the fruit. This work aimed to *i)* assess the potential for management of *H. hampei* in infested fruit in the soil by the application of the fungus *B. bassiana* along with granulated chemical fertilizers in coffee plantation; *ii)* investigate the persistence of inoculum in the soil after the joint application with chemical fertilizers; and *iii)* verify, in the laboratory, the viability of conidia of *B. bassiana* when in direct contact with the chemical fertilizers used in the application of the fungus. The application of 2×10^{12} conidia.ha⁻¹ of *B. bassiana* in conjunction with granulated chemical fertilizers in the soil was held in a coffee plantation in the 2015 and 2016 crops, resulting in reductions of 34 and 50%, respectively, of the infestation of *H. hampei* compared the plots only with applications of fertilizers. The percentage of *H. hampei* infected by *Beauveria* sp. was 1.2% in plots with application of pathogen (0 to 5.1%) and 0.04% for the control plots (0 to 0.2%). The persistence of *B. bassiana* in the soil of the coffee plantation was verified through the technique insect bait with larvae of *Tenebrio molitor*. The average percentage of recovered insects with infection of *Beauveria* sp. was 14 and 4% in 2015 and 2016, respectively, in the plots with the application of pathogen and 7 and 1% in plots without the application of the fungus. The viability of conidia of *B. bassiana* in mixture with four chemical fertilizers was checked every 2 h for 10 h and only after 6 and 10 h of direct contact with fertilizer YaraBela™ + Sulphur, germination of conidia reduced from 93% to 86%. These results indicate that the joint application of *B. bassiana* with chemical fertilizers can be a viable alternative for the management of *H. hampei* in the medium and long term. Further studies should determine the number of pathogen applications for the management of this pest.

Keywords: Fertilizers; Coffee berry borer; Entomopathogens; Application methods

4.1. Introdução

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), é considerada a espécie mais devastadora da cafeicultura mundial (INFANTE; PÉREZ; VEGA, 2014). Durante sua reprodução e desenvolvimento no interior dos frutos do café, podem levar à queda de frutos ao longo de todo período de frutificação do cafeeiro, sendo que a porcentagem de frutos com o

inseto no solo chega a ser de 4 a 20 vezes maior que os frutos na planta (TEIXEIRA, SOUZA, COSTA, 2006).

Nesse contexto, os frutos de café de uma nova safra são infestados pela população de *H. hampei* remanescente da colheita anterior, principalmente dos frutos caídos no solo, que constitui um importante reservatório para sobrevivência de *H. hampei* na entressafra (MORENO *et al.*, 2001). Assim, as medidas de controles serão mais efetivas quando realizadas desde a entressafra até o início da maturação dos frutos da nova safra, antecedendo o período de multiplicação do inseto que ocorre nos frutos em processo de maturação (CURE *et al.*, 1998).

Entre as formas alternativas de controle de *H. hampei*, o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) (Hypocreales: Cordycipitaceae) apresenta grande potencial, sendo considerado um dos principais fatores de mortalidade natural dessa praga (PARDEY, 2005), incluindo a infecção de *H. hampei* por *B. bassiana* presente no solo (VÁZQUEZ *et al.*, 2012). Nesse sentido, a eficiência da pulverização de *B. bassiana* sobre frutos infestados com *H. hampei* localizados no solo foi demonstrada em condições de campo resultando em 30% (BUSTILLO *et al.*, 1999) e 51% (BENAVIDES-MACHADO, ARÉVALO-MARTÍNEZ, 2002) de infecção dos insetos localizados na parte aérea da planta. Para Jaramillo *et al.* (2015), a utilização de *B. bassiana* para controle de *H. hampei* em frutos infestados no solo é uma técnica vantajosa, pois os conídios permanecem viáveis sobre os frutos caídos e sobre a superfície do solo.

Assim, para utilização do controle microbiano de pragas que habitam o solo ou que tenha contato com esse ambiente em algum momento do seu ciclo de vida, é necessário que o inóculo do patógeno seja aplicado na superfície do solo para contaminação dos insetos, podendo ser realizada de forma integrada com muitas práticas agrícolas rotineiras, incluindo a aplicação de fertilizantes e agroquímicos (TOWNSEND *et al.*, 2003). A compatibilidade de fertilizantes à base de nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre e magnésio com *B. bassiana* em solo foi demonstrada em condições de laboratório, mostrando que mesmo após 30 dias de incubação em laboratório não afetou o número de unidades formadoras de colônias (UFC) e, em alguns casos, os fertilizantes nitrogenados aumentaram a quantidade de UFC (TOWNSEND *et al.*, 2003).

Dessa forma, uma maneira interessante de redução de custos de manejo de *H. hampei* pela aplicação de *B. bassiana* em solo de cafezal seria a aplicação conjunta

do fungo com fertilizantes distribuídos no solo. As adubações dirigidas ao solo é uma prática comum realizada nos cafezais, iniciando as aplicações no período chuvoso e começo da nova floração da cultura (setembro a dezembro). Assim, a inoculação do patógeno com os adubos permitiria a contaminação de *H. hampei* no momento em que os insetos estão saindo dos frutos caídos no solo para infestar os frutos novos em formação.

Na busca por estratégias economicamente viáveis para utilização de *B. bassiana* no manejo de *H. hampei*, objetivou-se com esse trabalho i) avaliar o potencial de manejo de *H. hampei* em frutos infestados no solo, pela aplicação do fungo *B. bassiana* com fertilizantes químicos granulados em solo de cafezal; ii) verificar a persistência do inóculo no solo após a aplicação conjunta com os fertilizantes em cafezal; e iii) verificar, em laboratório, a viabilidade dos conídios de *B. bassiana* quando em contato direto com os fertilizantes aplicados em campo.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Produção de *B. bassiana*

Foi utilizado o isolado ESALQ-PL63 de *B. bassiana* proveniente da coleção de patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, da ESALQ/USP. Realizou-se a multiplicação das matrizes do fungo em meio de cultura BDA Difco® (Becton- Dickinson Company, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) + 5 g.L⁻¹ de Pentabiótico + 10 µL.L⁻¹ de Derosal® (Bayer S.A.) e, na sequência, procedeu-se a sua produção utilizando como substrato arroz parboilizado (LEITE *et al.*, 2003). Para utilização nos experimentos, após a produção de conídios sobre o arroz e a adequada secagem, o arroz + fungo foi triturado em liquidificador por aproximadamente 5 minutos e, em seguida, a concentração de conídios por grama de arroz moído foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade aferida segundo Oliveira *et al.* (2015).

4.2.2. Manejo de *H. hampei* com aplicação de *B. bassiana* com fertilizantes químicos em solo de cafezal

Foram instalados dois experimentos em um cafezal (*Coffea arabica*), conduzido em sistema a pleno sol com plantas espaçadas de 1 x 4 m, localizado entre os municípios de Encruzilhada, Bahia, e Mata Verde, Minas Gerais (Figura 17). Os dois experimentos foram instalados na mesma área em anos agrícola consecutivos, 2014/2015 e 2015/2016. Em toda área experimental, foi adotado o manejo da cultura utilizando o sistema convencional de produção de café, de acordo com o manejo do produtor, com aplicação de fertilizantes químicos no solo e na parte aérea, e o controle fitossanitário com aplicação de fungicidas, herbicidas e inseticidas (exceto para o controle de *H. hampei*). Dessa forma, as inoculações de *B. bassiana* em associação com fertilizantes foram realizadas utilizando os mesmos fertilizantes e maquinários comumente adotados na propriedade.

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados com quatro repetições e dois tratamentos, aplicação de fertilizantes em solo conjuntamente com *B. bassiana* ESALQ-PL63 (arroz + fungo moído) e no controle foram aplicados somente os fertilizantes. Cada parcela (repetição) experimental consistiu de aproximadamente 0,3 ha, sendo distribuídas na área por meio de sorteio, totalizando 2,4 ha. A área útil das parcelas usadas nas avaliações consistiu da área central, desconsideradas 2 linhas de café em todos os lados de cada parcela (bordaduras).

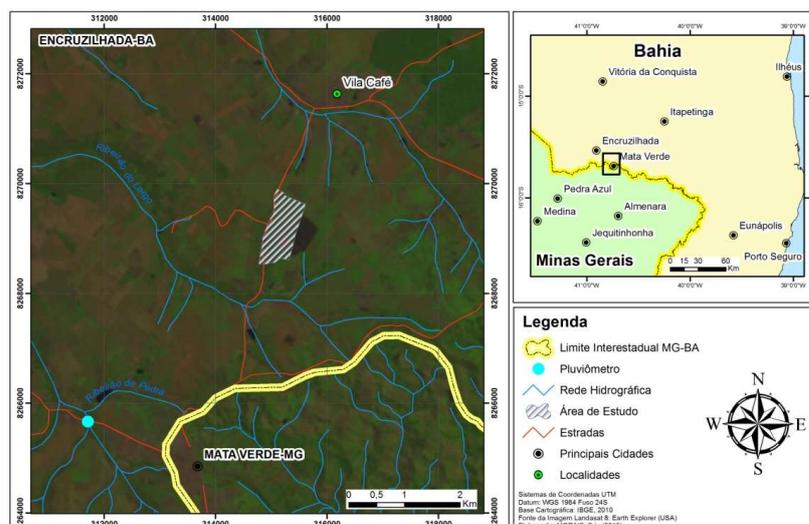


Figura 17. Localização geográfica do cafezal (*Coffea arabica*) utilizado para montagem dos experimentos de aplicação do fungo *Beauveria bassiana* via solo em associação com fertilizantes para manejo de *Hypothenemus hampei* (Elaborado por Sérgio Lana Morais)

4.2.2.1. Experimento I

O experimento foi instalado em 27/11/2014 (safra 2014/2015) com a aplicação dos fertilizantes granulados YaraBela™ 27-00-00 + S (27% N, 5% Ca e 3,7% S) e Topmix™ 09-46-00 (9% N, 46% P₂O₅, 3% Ca, 1,3% S, 0,03% B, 0,05% Mn e 0,1% Zn), todos fabricados pela empresa Yara Brasil Fertilizantes. Estes fertilizantes foram aplicados na proporção de 6:1 (YaraBela: Topmix) na projeção da copa da planta de café com uma adubadora pendular Vicon PSPP 603 (Distribuidor/Espalhador) (Figura 18 B).

Os 350 kg de fertilizantes necessários para para adubar toda as parcelas do tratamento com inoculação do fungo foram misturados com 1,6 kg de arroz + fungo moído de forma a obter 2×10^{12} conídios viáveis.ha⁻¹. A homogeneização do fungo e adubo foi realizada inicialmente distribuindo camadas dos fertilizantes e do arroz com o fungo sobre uma lona colocada no solo. Por fim, com auxílio de enxada, a mistura foi intensamente revolvida e posteriormente adicionada ao tanque do equipamento para aplicação de uma única vez (Figura 18 C).

Posteriormente, o equipamento foi regulado para que cada planta recebesse aproximadamente 117g da mistura distribuída na projeção da copa da planta (Figura 18 D). As aplicações dos fertilizantes nas parcelas sem inoculação do patógeno (controle) foram realizadas antes das aplicações das parcelas com o patógeno, para evitar contaminação, utilizando os mesmos equipamentos e quantidades descritas anteriormente.

Um segunda aplicação de *B. bassiana* foi realizada no dia 14/02/2015 (82 dias após a primeira aplicação), utilizando os adubos YaraBela™ 27-00-00 + S e uma formulação de KCl na proporção de 6:1 (YaraBela:KCl), procedendo da mesma forma da primeira adubação.

Os parâmetros avaliados foram a proporção de frutos perfurados por *H. hampei* (infestação) e a infecção por *B. bassiana*. Concomitantemente, foi avaliado a persistência de *B. bassiana* no solo utilizando a técnica "Insect bait", conforme detalhado nos itens a seguir.

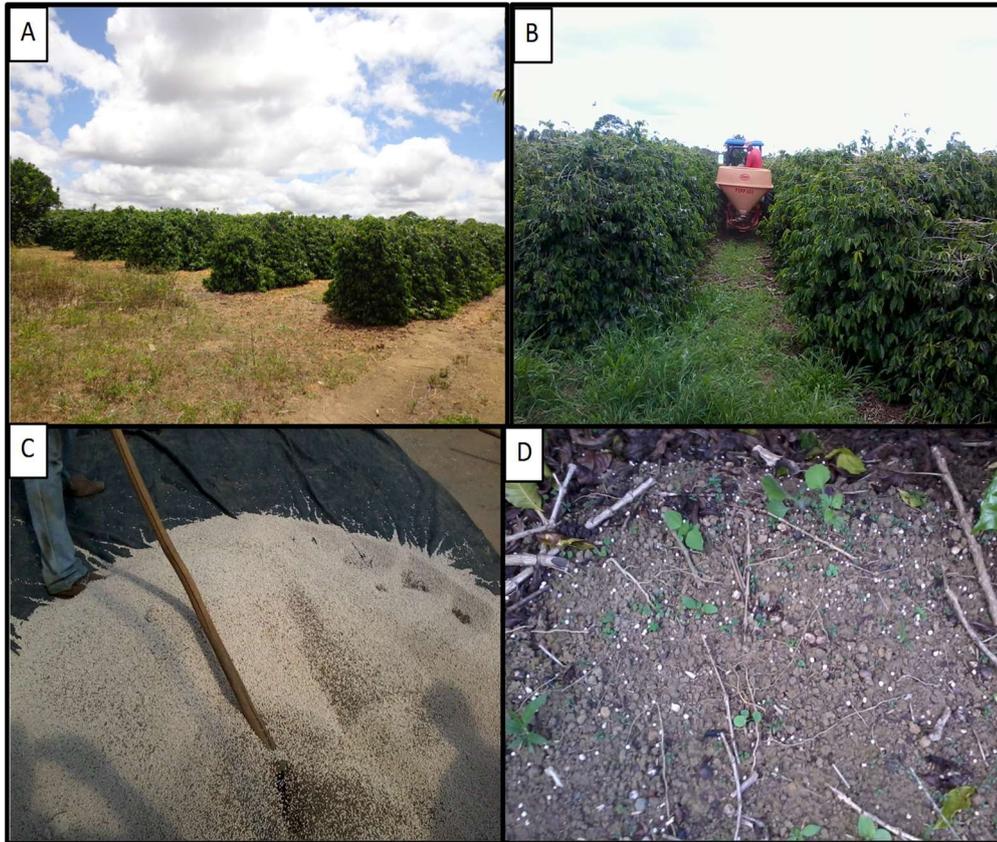


Figura 18. “A”: Vista da área experimental com cafezal catuaí; “B”: Adubadora pendular Vicon PSPP 603 utilizada para distribuição dos tratamentos; “C” Homogeneização manual dos adubos com o arroz + fungo moído; “D”: Adubos e arroz + fungo após distribuição na projeção da copa do cafeeiro

4.2.2.1.1. Infestação de *H. hampei* e infecção por *B. bassiana*

As amostragens da infestação de *H. hampei* e de sua infecção por *B. bassiana* foram realizadas com base em adaptações das recomendações para monitoramento desse inseto em cafezal proposto por Souza *et al.* (2011). Para isso, as avaliações da infestação foram feitas por observações visuais em 20 plantas escolhidas aleatoriamente dentro da área útil de cada parcela. O número de frutos perfurados por *H. hampei* (com ou sem a presença do inseto) e os frutos com presença de *H. hampei* com sinais de esporulação de *B. bassiana* foram determinados a partir de 10 frutos da porção mediana por ramo selecionado em três partes da planta (base, meio e topo) nas faces norte e sul, totalizando 60 frutos/planta. Os insetos com sinais do patógeno foram levados para o laboratório para identificação do fungo por meio de observação em microscópio. Posteriormente, o fungo foi isolado em meio de cultura e os conídios puros armazenados em freezer (-40 °C). As avaliações foram conduzidas nos dias

10/01/2015, 27/01/2015, 28/02/2015, 04/04/2015, 25/04/2015, 29/05/2015 e 20/06/2015.

4.2.2.1.2. Recuperação de *Beauveria* sp. do solo

Na linha central de cada parcela experimental, foram marcadas 5 plantas de café distanciadas 15 metros entre plantas. A cada avaliação o solo presente na projeção da copa da planta foram retiradas 4 amostras, tomadas aleatoriamente, do horizonte-A em uma profundidade de aproximadamente 0-5 cm, utilizando uma espátula metálica que foi desinfestada a cada amostragem, utilizando álcool 70%. Das 4 sub-amostras de solo de cada planta, foi formada uma amostra composta (totalizando 5 amostras compostas por parcela). As amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e mantidas dentro de isopor durante o transporte até o laboratório onde foram processadas (adaptada de GOETTEL, INGLIS, 1997). As coletas ocorreram horas antes da primeira aplicação de *B. bassiana* na área (27-11-2014), e as demais coletas realizadas nos dias 10/01/2015, 27/01/2015, 28/02/2015, 04/04/2015, 25/04/2015 e 20/06/2015.

Para o isolamento de *B. bassiana* do solo, foi utilizada a técnica “Insect bait” com larvas de *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) (MEYLING, EILENBERG, 2006), conforme descrito a seguir. Amostras compostas de solo foram homogeneizadas manualmente para quebrar possíveis torrões. Posteriormente, cerca de 80g foram transferidas para potes plásticos transparentes (140 mL), deixando um espaço livre até a tampa, cerca de 2cm para permitir ventilação (adaptado de MEDO, CAGÁN, 2011). Em seguida, 10 larvas de *T. molitor* entre o 3º e 4º ínstar foram transferidas para cada pote contendo amostras de solo. Os potes foram armazenados em bancada no laboratório a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de luz e invertidos diariamente durante a primeiros cinco dias para induzir o movimento das larvas e aumentar a chance de contato com o fungo. O solo foi umedecido sempre que necessário. A partir do 5º dia, foram realizadas as inspeções das larvas mortas, sendo esse procedimento realizado a cada três dias por um período de 20 dias.

As larvas mortas foram removidas, esterilizadas superficialmente em álcool 70% por 1 minuto e, então, imersas em água destilada estéril três vezes. Posteriormente, foram colocadas em câmara úmida por 10 dias para confirmação da mortalidade pelo patógeno. Após esse período, as larvas com sinais característicos

de *Beauveria* sp., com auxílio de uma alça de platina, pequenas quantidades dos conídios foram transferidas para o meio de cultura BDA Difico + 5 g.L⁻¹ de Pentabiótico, para isolamento e posterior purificação dos isolados.

Havendo mais de uma larva com *Beauveria* sp. oriunda de uma mesma amostra de solo, foram considerados como isolados diferentes as colônias que apresentaram aspectos morfológicos distintos quando crescida nas placas, nesse caso, todos os isolados foram preservados. Os isolados de *Beauveria* sp. foram preservados em tubos criogênicos com glicerol 10% em forma de pó e mantidos em freezer -80°C na Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Prof. Sérgio Batista Alves”, do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba/SP.

4.2.2.2. Experimento II

Na mesma área do experimento anterior (item 4.2.2.1), foi instalado um segundo experimento para avaliar o efeito da aplicação de *B. bassiana* no solo em associação com fertilizantes para o manejo de *H. hampei*. Para isso, o fungo foi aplicado seguindo a mesma metodologia e delineamento do experimento anterior. Dessa vez, no entanto, foi realizada uma única adubação no dia 29/01/2016, utilizando os fertilizantes YaraBela™ 27-00-00 + S e YaraBela™ 18-00-18 (18% N, 18% K, 3,5% Ca e 2,5% S), na proporção de 5:1, respectivamente. Nesse caso, a quantidade dos fertilizantes utilizados para ajuste da concentração de 2×10^{12} conídios/ha de *B. bassiana* isolados ESALQ-PL63 necessária para aplicação nas parcelas com inoculação do patógeno, totalizou 300 kg/tratamento equivalente a 100 g da mistura por planta de café.

A recuperação de *B. bassiana* das amostras de solo foi realizada por meio da técnica “Insect bait” com larvas de *T. molitor*, conforme experimento anterior.

Diferentemente do experimento anterior, as avaliações da infestação e infecção de *H. hampei* pelo fungo foram realizadas por meio da coleta de 5 frutos retirados da porção mediana de ramos localizados nos terços basal, mediano e superior da planta, sendo selecionadas aleatoriamente 20 plantas/repetição. Posteriormente, no laboratório, os frutos com perfuração de *H. hampei* foram contabilizados e deixados em sacos plásticos por 10 dias para confirmação de uma possível mortalidade pelo fungo *B. bassiana*. As avaliações foram realizadas nos dias

29/01/16 (anterior a aplicação), 15/02/16 (17 dias após a aplicação), 04/03/16 (35 dias após a aplicação), 18/03/16 (49 dias após a aplicação), 15/04/16 (77 dias após a aplicação) e 11/06/16 (134 dias após a aplicação).

4.2.3. Viabilidade de conídios de *B. bassiana* em mistura com fertilizantes

Os fertilizantes aplicados nos experimentos anteriores foram avaliados quanto à sua interferência na germinação dos conídios de *B. bassiana* após diferentes períodos de contato direto com os adubos. Foi avaliada a mistura do fungo com os fertilizantes minerais mistos YaraBela™ 27-00-00 + S, YaraBela™ 18-00-18, Topmix™ 09-46-00 e fertilizante a base de KCL, todos fabricados pela empresa Yara Brasil Fertilizantes.

O experimento foi montado com delineamento inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 4 x 5, sendo quatro adubos e cinco períodos de contato do fungo com os fertilizantes (2, 4, 6, 8 e 10 horas), com quatro repetições em cada tempo de avaliação. Como controle, foi utilizado fungo (em arroz moído) sem contato com os fertilizantes e a viabilidade verificada com 2 e 10 horas após a incubação. Inicialmente, foram adicionados 10g do fertilizante granular e arroz moído com o fungo (item 4.2.1 com 93% de viabilidade) em tubo de vidro de fundo chato (85 x 25 mm), de forma a obter a concentração de 1×10^8 conídios viáveis.g⁻¹ de fertilizante. Posteriormente, os tubos foram tampados com filme plástico e a mistura homogeneizada em aparelho Vortex. Após os períodos de incubação correspondente aos tempos de avaliação, a viabilidade dos conídios foi determinada de acordo com metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2015).

4.2.4. Análises de dados

Os dados de proporção de frutos brocados considerando as diferentes unidades observacionais, tratamentos e posições de coleta do 1º experimento com aplicação de *B. bassiana* com os fertilizantes foram analisados utilizando modelos Lineares Generalizados Mistos com *splines* penalizados (VERBYLA *et al.*, 1999; RUPPERT, WAND, CARROLL, 2013; WAND, 2003; MOLENBERGHS, VERBEKE,

2005). No modelo, é pressuposto que a variável resposta segue uma distribuição binomial, com função de ligação logito dada por:

$$\text{logito}(\pi_{ijkl}) = \mu + \text{bloco}_i + \text{trat}_j + \text{pos}_k + \text{dia}_l + \text{spl}_{ijk}(\text{dia}_l),$$

em que μ é o efeito de intercepto, bloco_i é o efeito do i -ésimo bloco ($i = 1, \dots, 4$), trat_j , o efeito do j -ésimo tratamento ($j = 1; 2$), pos_k , o efeito da k -ésima posição de coleta ($k = 1; 2; 3$), dia_l , o efeito do l -ésimo dia de avaliação após o início do experimento ($l = 44; 61; \dots; 205$), e $\text{spl}_{ijk}(\cdot)$, a função suavizadora com *splines* penalizados de efeito aleatório aplicados aos dias de avaliação. Foram utilizados B-*splines* de terceiro grau com 2 nós para a suavização das curvas obtidas. A estimação dos parâmetros foi realizada pelo método da máxima verossimilhança, utilizando-se a aproximação de Laplace para as integrais dos efeitos aleatórios. As comparações entre os efeitos de interesse foram realizadas por contrastes e testes de razão de verossimilhanças, sendo todas as análises geradas pelo procedimento GLIMMIX do *software* SAS 9.4. (SAS, 2016).

A infestação total de *H. hampei* do 2º experimento foi analisada de forma semelhante ao 1º experimento. Nesse caso, o modelo escolhido segue uma distribuição binomial, com função de ligação logito dada por:

$$\text{logito}(\pi_{ijk}) = \mu + \text{bloco}_i + \text{trat}_j + \text{dia}_k + (\text{trat} \times \text{dia})_{jk} + b_{1ij} + b_{2ijk},$$

em que μ é o efeito de intercepto, bloco_i é o efeito do i -ésimo bloco ($i = 1, \dots, 4$), trat_j , o efeito do j -ésimo tratamento ($j = 1; 2$), dia_k , o efeito do k -ésimo dia ($k = 1, \dots, 134$), $(\text{trat} \times \text{dia})_{jk}$, o efeito da interação entre tratamento e dias, b_{1ij} , o efeito aleatório que explica a variação entre medidas tomadas em um mesmo tratamento e bloco, e b_{2ijk} , o efeito aleatório para o nível observacional para modelar a superdispersão (R CORE TEAM, 2016).

Os dados de infecção de larvas de *T. molitor* e *H. hampei* apresentaram grande variabilidade não sendo possível a adequação de modelos estatísticos. Nesse caso, os dados foram apresentados de forma descritiva com as médias seguidas do seu erro padrão.

A viabilidade de *B. bassiana* em mistura com os fertilizantes foi analisada utilizando modelo pressupondo que a variável resposta segue uma distribuição binomial, considerando o tempo (horas) como um fator qualitativo, para que as médias de viabilidade fossem comparadas. As análises foram realizadas no *software* SAS 9.3.

4.3. Resultados

4.3.1. Manejo de *H. hampei* com aplicação de *B. bassiana* com fertilizantes químicos em solo

4.3.1.1. Experimento I

Em todo o período do 1º experimento, dos 33.600 frutos/tratamento observados, foram encontradas 6,7% (2.248 frutos) de infestação no tratamento sem aplicação de *B. bassiana* e 4,4% (1.480 frutos) nas parcelas com aplicação do patógeno (Tabela 6). Isso representa uma redução de 34% em relação ao controle. Foi observada uma baixa infecção de *H. hampei* pelo fungo *Beauveria* sp. ao longo de todo o experimento. Dos 1.480 frutos com *H. hampei* observados nas parcelas com a aplicação de *B. bassiana*, apenas 1,2% estavam infectados com o patógeno, sendo a infecção máxima encontrada de 5,1% na avaliação de 28/02/2015. Nas parcelas sem a aplicação do fungo, foi observado que 0,04% dos 2.248 frutos com *H. hampei* observados estavam infectados, sendo a infecção observada em uma única avaliação (0,2%), índices inferiores quando comparados aos obtidos nas parcelas com inoculação do patógeno.

Tabela 6. Porcentagem de infecção (\pm E.P) de *Hypothenemus hampei* por *Beauveria* sp. em cafezal tratado com *B. bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo

Avaliação	Fertilizantes		Fertilizantes + <i>B. bassiana</i>	
	Frutos atacados	% Infecção	Frutos atacados	% Infecção
10/01/2015	67	0	36	0
27/01/2015	84	0	69	0
28/02/2015	214	0	176	5,1 \pm 0,4
04/04/2015	346	0	242	1,9 \pm 0,8
25/04/2015	493	0,2 \pm 0,2	295	1,7 \pm 0,6
29/05/2015	225	0	189	0
20/06/2015	819	0	473	0
Total	2248	0,04	1480	1,22

A aplicação de *B. bassiana* conjuntamente com fertilizantes granulados em solo de cafezal reduziram significativamente as porcentagens de frutos de café infestados por *H. hampei* nas diferentes partes da planta (terço inferior, médio e superior) em relação ao tratamento sem inoculação do patógeno ($P < 0,0001$), sendo também influenciada, pelo período de avaliação ($P < 0,0001$). Nas parcelas com

aplicação do fungo, as infestações encontradas variaram de 1 a 14% no terço inferior (saia), de 1 a 12% no terço médio (meio) e de 0,2 a 3% no terço superior (topo). Por outro lado, para as parcelas sem aplicação do patógeno, as infestações de *H. hampei* variaram de 2 a 26% na saia, de 2 a 20% para o meio e de 0,3 a 6% no topo da planta (Figura 20). De maneira geral, as maiores infestações de *H. hampei* ocorreram nas partes inferior e mediana da planta, não diferindo entre si ($P= 0,2791$) e ambas diferiram da infestação encontrada na parte superior da planta ($P<0,001$), que tiveram as menores infestações. Por outro lado, a comparação realizada considerando a infestação total de *H. hampei* por planta de café ao longo do tempo de observação não diferiu estatisticamente ($P>0,05$), variando 1 a 10% nas parcelas com aplicação do fungo no solo e de 1 a 17% nas parcelas sem aplicação do patógeno (Figura 19).

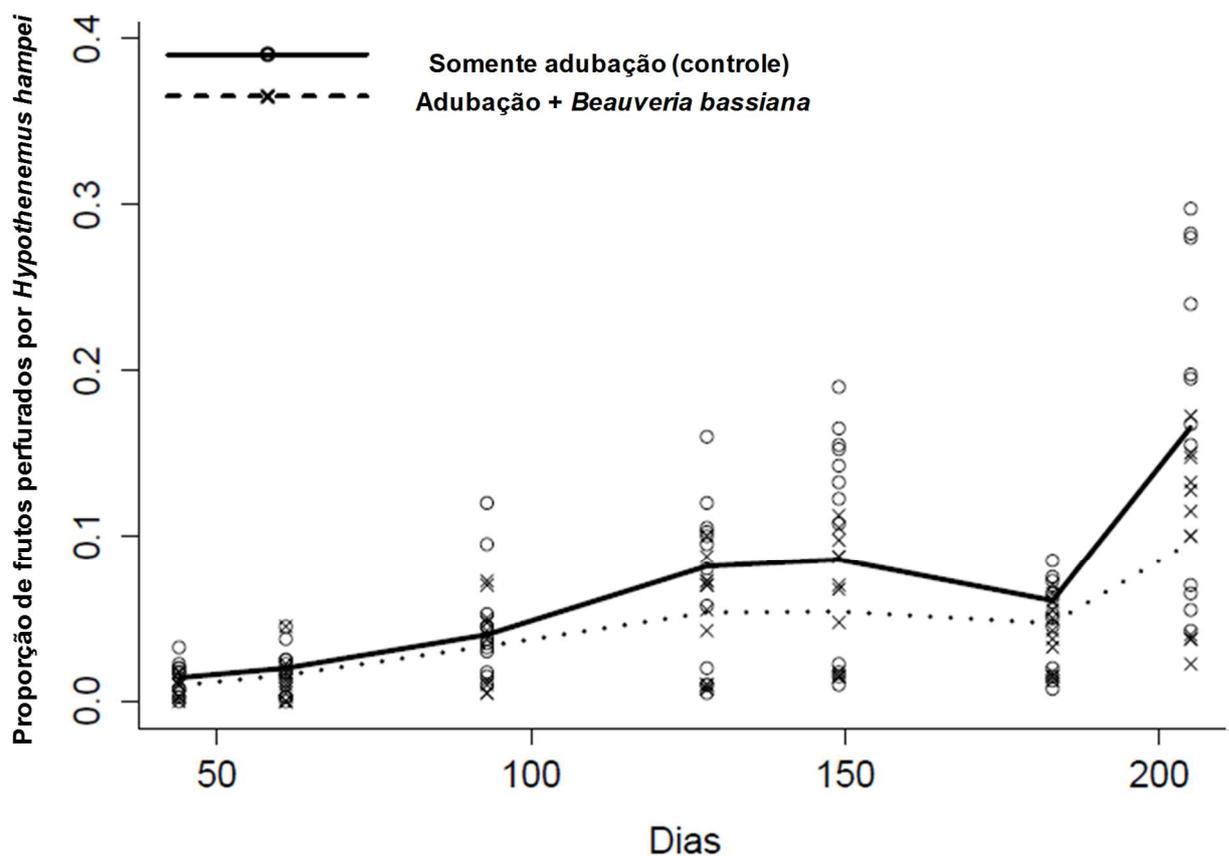


Figura 19. Proporção total média de frutos de café perfurados com *Hypothenemus hampei* (com ou sem o inseto) em cafezal tratado com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-BA (27/11/2014 a 20/06/2015)

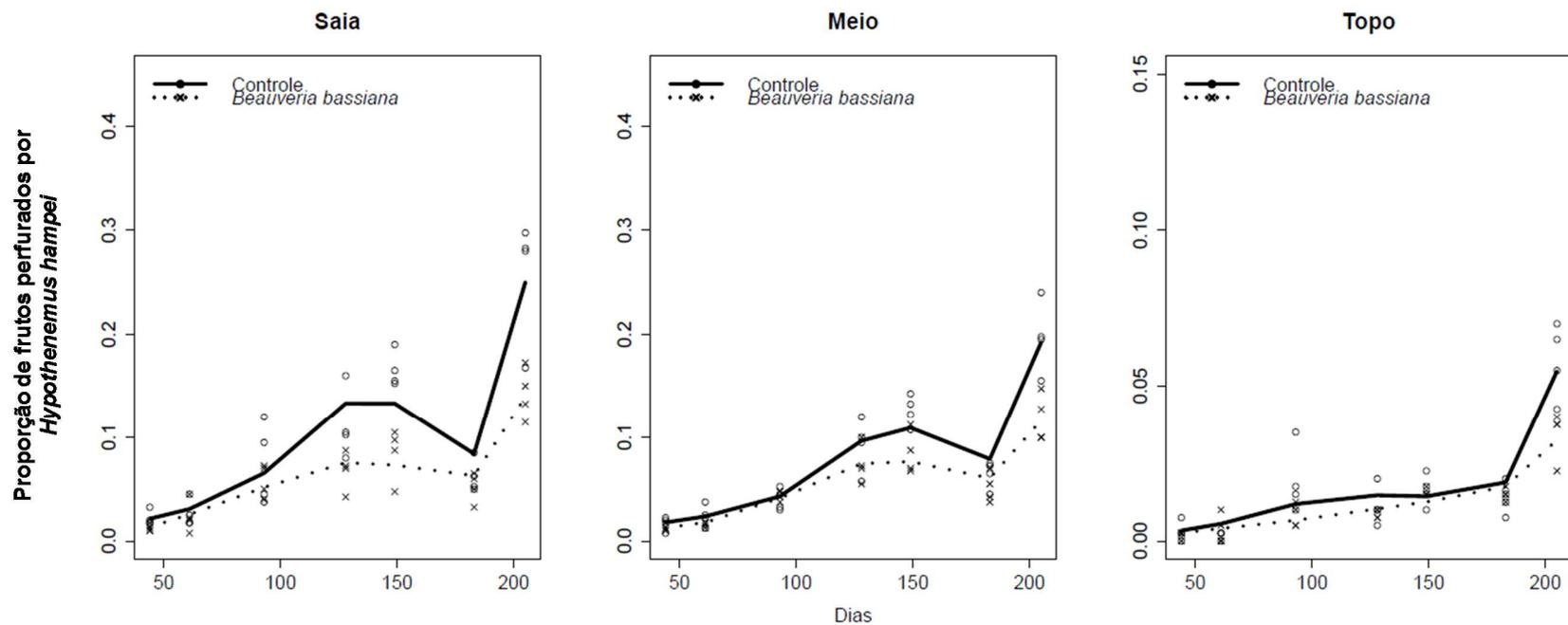


Figura 20. Proporção de frutos de café perfurados por *Hypothenemus hampei* (com ou sem o inseto) coletados no terço inferior (saia), terço médio (meio) e terço superior (topo) de plantas em cafezal tratado com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-BA (27/11/2014 a 20/06/2015)

4.3.1.2. Experimento II

Em todo o período do 2º experimento, dos 7.200 frutos/tratamento avaliados, foi encontrado 1,4% (103 frutos) de infestação no tratamento controle e 0,7% (52 frutos) nas parcelas com aplicação de *B. bassiana*. Não foi detectado efeito significativo da aplicação do patógeno com fertilizantes no solo na redução da infestação de *H. hampei* em comparação com as parcelas sem aplicação do fungo ($P>0,05$). A infestação máxima registrada foi de 3,3% nas parcelas do controle aos 49 dias da instalação do experimento e, para as parcelas com aplicação do patógeno, a infestação foi inferior a 1% em todas as avaliações (Figura 21). Não foram observadas infecções por *Beauveria* sp. durante o período experimental.

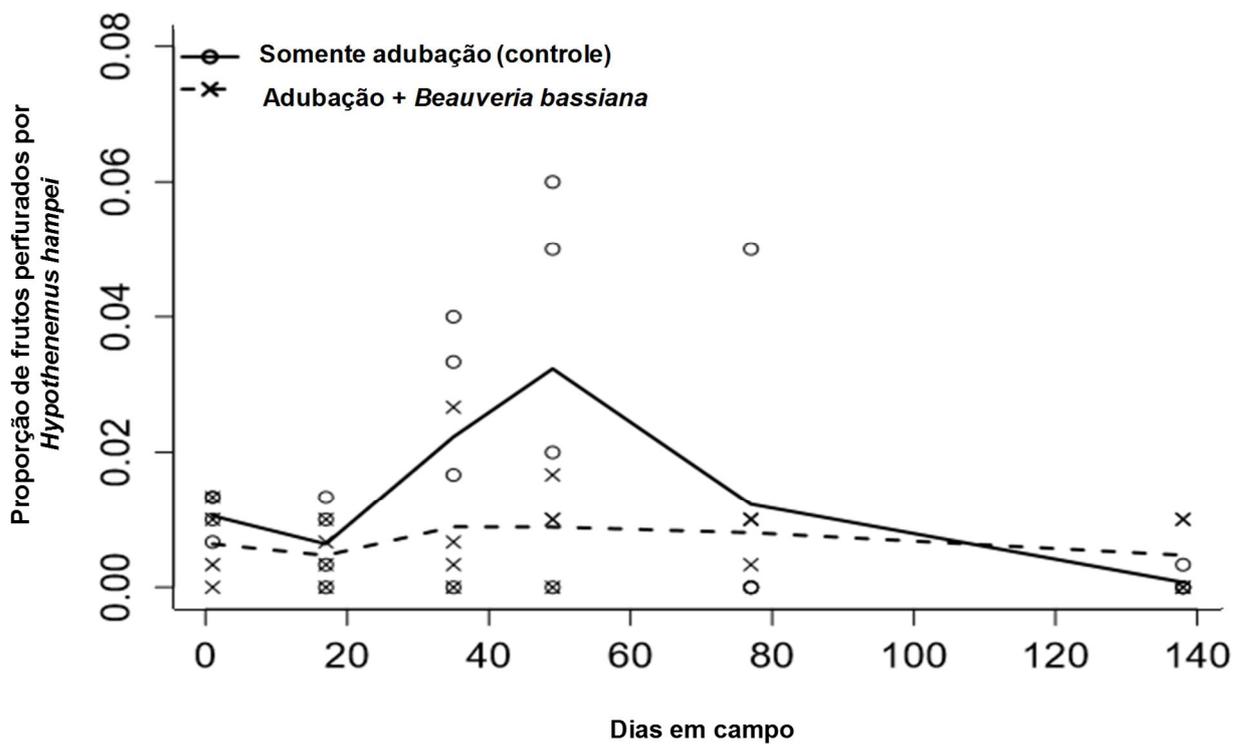


Figura 21. Proporção média de frutos de café perfurados com *Hypothenemus hampei* (com ou sem o inseto) em cafezal em cafezal tratado com *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-BA (29/01/2016 a 11/06/2016)

4.3.2. Recuperação de *Beauveria* sp. do solo de cafezal com aplicação de *B. bassiana* com fertilizantes químicos em solo

Das 1.400 larvas de *T. molitor* colocadas nas amostras de solo das parcelas com aplicação de *B. bassiana*, 13,6% (190 larvas) foram infectadas por *Beauveria* sp em todo o período do 1º experimento. As infecções ocorreram em todas as coletas realizadas após a primeira aplicação do fungo nas parcelas em que o fungo foi inoculado com índices variando de 1,5 a 40%. Por outro lado, a média de infecção de *T. molitor* por *Beauveria* sp. nas amostras das parcelas sem inoculação do fungo foi de 6,9% (97 larvas) variando de 0 a 30%. Nessas parcelas, a recuperação do patógeno só ocorreu a partir da terceira coleta (Tabela 7). Para o 2º experimento, das 1.200 larvas de *T. molitor* colocadas nas amostras de solo das parcelas com aplicação de *B. bassiana*, 3,8% (46 larvas) foram infectadas por *Beauveria* sp. Nesse caso, exceto na terceira coleta, foram observadas infecção de *Beauveria* sp. nas larvas colocadas em solo de todas as coletas (2 a 8%). Nas parcelas sem inoculação de *B. bassiana*, foram encontradas apenas sete larvas infectadas (0,6%), sendo recuperado o fungo em duas das seis avaliações realizadas.

Tabela 7. Porcentagem (\pm E.P) de larvas de *Tenebrio molitor* mortas por *Beauveria* sp. quando colocadas em amostras de solo provenientes de cafezal tratado com *B. bassiana* ESALQ-PL63 aplicado com fertilizantes químicos em solo, Encruzilhada-Bahia

Experimento I			Experimento II		
Avaliações	F+Bb*	Controle	Avaliações	F+Bb	Controle
27/11/2014	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	29/01/2016	2,0 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0
10/01/2015	1,5 \pm 0,5	0,0 \pm 0,0	15/02/2016	5,0 \pm 2,9	2,5 \pm 0,5
27/01/2015	1,0 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0	04/03/2016	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
28/02/2015	2,5 \pm 1,5	1,0 \pm 0,6	18/03/2016	5,0 \pm 2,4	0,0 \pm 0,0
04/04/2015	37,0 \pm 6,2	14,0 \pm 3,6	15/04/2016	8,0 \pm 4,1	1,0 \pm 0,6
25/04/2015	13,5 \pm 3,4	3,0 \pm 1,3	11/06/2016	2,5 \pm 2,5	0,0 \pm 0,0
20/06/2015	40,0 \pm 8,5	30,0 \pm 4,2	-	-	-
Média	13,6 \pm 6,7	6,9 \pm 4,3	Média	3,8 \pm 1,5	0,6 \pm 0,4

Experimento I recebeu duas aplicações de *B. bassiana* em associação com fertilizantes (F+Bb) uma em 27/11/2014 e a segunda em 14/02/2015. O experimento II recebeu uma aplicação do fungo em 29/01/2016. F+B – fertilizante + *B. bassiana*.

4.3.3. Viabilidade de conídios de *B. bassiana* em mistura com fertilizantes

A viabilidade de conídios de *B. bassiana* misturados diretamente nos fertilizantes químicos utilizados para inoculação do patógeno em cafezal variou em

função da interação do tratamento com o tempo de contato ($F_{12,60} = 2,15$, $P = 0.0263$). O desdobramento da interação revelou que o fertilizante YaraBela™ + S foi o único em que a viabilidade dos conídios reduziu significativamente com o tempo de contato direto com os fertilizantes ($F_{4,60} = 6,19$, $P = 0.0003$), reduzindo de 93% no início do experimento para 86,3% e 86,6% após 6 e 10 horas de incubação, respectivamente (Tabela 8). Esses valores foram semelhantes entre si e diferindo dos demais tempos em que a viabilidade foi superior a 90%. Na comparação entre a toxicidade dos fertilizantes a *B. bassiana*, observou-se a viabilidade menor em YaraBela™ + S do que nos demais fertilizantes apenas nos tempos de 6 ($F_{3,60} = 7,8$, $P = 0.0002$) e 10 horas ($F_{3,60} = 9,3$, $P = 0.0003$) de contato direto, não havendo diferenças entre os outros fertilizantes e tempos. A viabilidade no controle (fungo sem fertilizante) foi verificada apenas nos tempos de 2 e 10 horas, sendo de $93,6 \pm 0,7\%$ e $91,4 \pm 0,7\%$, respectivamente (dados não incluídos na análise).

Tabela 8. Porcentagem de viabilidade (\pm E.P) de conídios de *Beauveria bassiana* isolado ESALQ-PL63 em mistura com fertilizantes granulados por diferentes tempos em laboratório à 25 ± 1 °C e fotofase de 12 horas

Fertilizantes	Tempo de exposição em horas				
	2	4	6	8	10
¹ YaraBela™	92,2 \pm 0,4 aA	91,7 \pm 1,3 aA	92,7 \pm 0,6 aA	93,0 \pm 0,9 aA	91,7 \pm 0,4 aA
² KCL Yara	91,5 \pm 0,2 aA	91,4 \pm 2,2 aA	91,7 \pm 0,4 aA	92,3 \pm 0,2 aA	93,0 \pm 0,9 aA
³ Topmix™	92,8 \pm 0,8 aA	91,5 \pm 0,5 aA	91,5 \pm 1,3 aA	90,5 \pm 0,5 aA	93,9 \pm 0,9 aA
⁴ YaraBela™ + S	91,0 \pm 0,7 aA	92,2 \pm 0,7 aA	86,3 \pm 0,7 bB	90,2 \pm 0,7 abA	86,6 \pm 0,7 bB

Médias (\pm E.P) seguidas por mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). A viabilidade no controle (fungo sem fertilizante) foi verificada apenas nos tempos de 2 e 10 horas sendo de $93,6 \pm 0,7\%$ e $91,4 \pm 0,7\%$, respectivamente, não incluídas na análise.

4.4. Discussão

A infestação dos frutos de café no solo por *H. hampei* pode ser de 4 a 20 vezes maior em comparação aos frutos presentes nas plantas (TEIXEIRA, SOUZA, COSTA, 2006), sendo esta uma importante fonte de novas infestações em cafezais. Nesse sentido, a aplicação do fungo *B. bassiana* direcionado para os frutos presentes no solo infestados para o controle de *H. hampei* é uma estratégia com grande potencial. Essa estratégia foi testada por Bustillo *et al.* (1999), Vera *et al.*, (2011), e Jaramillo *et al.* (2015), por meio de pulverização direcionadas a projeção da copa da

planta. No nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que buscou a aplicação do fungo *B. bassiana* em mistura com os fertilizantes aplicados em solo de cafezal para o manejo de *H. hampei*. Uma vantagem de utilizar essa associação é a redução nos custos com a aplicação, já que a fertilização é uma prática realizada de uma a quatro vezes no ano e coincidem com o período de trânsito do inseto.

Resultados promissores foram observados quando os conídios de *B. bassiana* foram mantidos em contato direto com os fertilizantes utilizados no cafezal. Somente após 6 e 10h do contato direto do fungo com os fertilizantes, apenas em um tratamento (YaraBela™ + S), dos quatro adubos avaliados foi observado uma pequena redução na germinação do patógeno.

O contato direto dos fertilizantes com o fungo no período entre a mistura e a aplicação foi de menos de 2h, não sendo constatada redução significativa da germinação dos conídios nesse período de exposição. É provável que muitos conídios fiquem aderidos aos grânulos de fertilizantes por mais de 10 horas no solo, mas espera-se que, após a aplicação de uma porcentagem grande, os conídios se desprendam dos grânulos e misturem com o solo. Deve-se levar em consideração que as fertilizações são realizadas no período chuvoso, quando o solo apresenta-se na capacidade de campo e essa umidade irá dissolver os grânulos de fertilizantes gradualmente. Nesse sentido, Rosin, Shapiro, Lewis (1996) comprovaram que após mistura de conídios de *B. bassiana* em solo autoclavado com os fertilizantes de ureia (45% de N) e composto orgânico não ocorreu redução na viabilidade do fungo mesmo após sete dias de incubação. Da mesma forma, Townsend, *et al.* (2003) verificaram que a adição de fertilizantes constituídos de nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre e magnésio sobre uma formulação granular de *B. bassiana* aplicada em solo não reduziu a sobrevivência e estabelecimento do fungo, e, em alguns casos, o uso de fertilizantes nitrogenados levou a um aumento do número de unidades formadoras de colônia no solo.

A aplicação de *B. bassiana* conjuntamente com fertilizantes resultou em uma redução significativa da porcentagem de infestação de *H. hampei* dos frutos localizados no terço inferior (34%), médio (30%) e superior (29%) da planta de café, em relação às infestações observadas nas parcelas sem liberação do patógeno durante a safra obtida em 2015. Quando foram analisados os dados dos três terços da planta (saia, meio e topo) conjuntamente, não se detectou diferenças estatísticas. Isso é devido à variação na infestação da planta sendo encontrados níveis menores

na parte superior (topo) em ambos os tratamentos. Em 2016, também não foram detectadas diferenças estatísticas quando os três terços da planta foram analisados conjuntamente. Como nesse ano as amostras dos terços da planta não foram avaliadas separadamente, não foi possível confirmar se houve variação entre os tratamentos. Nessa mesma safra, foi observada uma menor infestação de *H. hampei* em relação à safra anterior, com apenas 0,7% para as parcelas com inoculação do patógeno, correspondendo a 50% do valor observado nas parcelas controle.

Reduções das infestações de *H. hampei* com a inoculação de *B. bassiana* em solo de cafezal foram também obtidas por Vera *et al.* (2011), quando pulverizaram suspensão de *B. bassiana* (1×10^9 conídios/árvore) em solo na projeção da planta de café em fase produtiva. Trinta dias após, verificaram que a infestação dos frutos localizados na parte aérea da planta na área com inoculação do patógeno reduziram de 13 a 55% em comparação ao controle. Jaramillo *et al.* (2015) pulverizaram uma mistura de três isolados de *B. bassiana* (1×10^9 conídios/planta) sobre frutos infestados com *H. hampei* colocados no solo na projeção da copa de planta de café em fase de produção, repetindo esse procedimento a cada 20 dias por um período de 4 meses e observaram uma redução da infestação de apenas 18% em relação ao controle.

H. hampei mortas com *B. bassiana* foram encontradas somente no 1º experimento, com uma média de 1,2% na área com inoculação do patógeno e apenas 0,04% no controle. A primeira constatação de infecção de *Beauveria* sp. nos insetos ocorreu aos 14 dias após a segunda aplicação do patógeno (safra 2014/2015), o que pode ter contribuído para a maior infecção (5,1%) observada nessa data. Considerando que o intervalo entre a aplicação do patógeno e as demais avaliações foram superiores a 30 dias, esses resultados sugerem uma redução do inóculo do patógeno no solo. Após essa primeira infecção observada, houve registro de *H. hampei* com sinais de esporulação do patógeno apenas nas duas avaliações subsequentes. Esses resultados vão ao encontro com os obtidos por Bustillo *et al.* (1999), que demonstram que, após 5 dias da pulverização de *B. bassiana* em solo de cafezal, o número de *H. hampei* infectados nos frutos nas plantas reduz rapidamente, ocorrendo um novo pico de infecção 25 dias (24%) após a pulverização e posteriormente reduz novamente, sugerindo que o inóculo tem uma baixa persistência no solo.

As condições ambientais adversas (baixa umidade do solo, alta radiação ultravioleta, alta temperatura do solo, etc.) podem ter contribuído para o baixo percentual de infecção de *H. hampei* observado em campo prejudicando a esporulação do patógeno sobre o inseto. Outra hipótese que pode ter contribuído com o baixo percentual de infecção no campo é a migração de *H. hampei* infectados pelo patógeno para outros locais, longe das plantas, impedindo o contato com os frutos presentes na parte aérea das plantas (BUSTILLO *et al.*, 1999). Nesse sentido, experimentos de laboratório mostraram que, dos adultos de *H. hampei* contaminados com *B. bassiana*, apenas 47,5% iniciaram a perfuração superficial do fruto e morreram na região da “coroa” com o abdome exposto para parte externa, apresentando, após alguns dias, uma densa esporulação do patógeno, e a outra parte morreu fora do fruto (ver capítulo 3). Dessa forma, o local de morte (fora do fruto) de *H. hampei* infectado pode ter contribuído para baixa taxa de infecção observada, mesmo após a aplicação do fungo na área, já que foram contabilizados somente os insetos mortos com esporulação de *Beauveria* sp. localizado nos frutos de café na planta.

Estudos observaram que, 30 dias após pulverização de suspensão de *B. bassiana* no solo na projeção da copa de plantas de café e sobre este distribuídos frutos de café infestado artificialmente com *H. hampei* em fase de emergência, os níveis de infecção do inseto pelo patógeno chegaram a 29% (BUSTILLO *et al.*, 1999) e 50% (VERA *et al.*, 2011), índices maiores que os observados em nosso trabalho. Entretanto, a infestação artificial realizada por esses autores pode ter contribuído para o melhor resultado. Nesse sentido, como nem sempre é possível visualizar *H. hampei* infectados por *B. bassiana* nos frutos de café em campo, é recomendado que a avaliação da eficiência do fungo para o controle *H. hampei* leve em consideração tanto o levantamento da infecção quanto da infestação do inseto na área (JARAMILLO *et al.*, 2015).

Devido à bienalidade na produção do cafeeiro, que consiste na alternância de grandes e pequenas produções ao longo do tempo (DAMATTA *et al.*, 2007), é comum o maior cuidado com o cafezal pelos produtores nos anos de maiores produções. Nesse caso, os tratamentos culturais como o uso de agroquímicos, fertilizações e a realização do repasse (coleta dos grãos que ficaram após a colheita na planta e caídos no chão) são intensificados. No caso específico do repasse, essa prática cultural contribui significativamente para redução da infestação de *H. hampei* na nova safra (FERREIRA *et al.*, 2003). Nesse contexto, levando em consideração que a safra de

2015/2016 foi o ano de maior expectativa de produção em relação ao ano anterior, pode explicar em parte a baixa infestação de *H. hampei* e a ausência de infecção de *B. bassiana* observada nessa safra. Além disso, testes “*in vitro*” de compatibilidade de fungicidas e inseticida com *B. bassiana* ESALQ-PL63 mostraram que os fungicidas Nativo[®], Cercobin[®] e Sphere Max[®] foram considerados tóxicos ao patógeno e o inseticida Nativo[®] como moderadamente tóxico (COSTA *et al.*, 2016). Sendo esses produtos comumente utilizados pelos produtores da região, o contato deles com o fungo pode ter contribuído para a ausência de infecção observada em 2016.

A persistência do *B. bassiana* no solo após a aplicação é um fator importante para verificar as necessidades de novas aplicações, aumentando o sucesso de infecção dos *H. hampei* que emergem dos frutos caídos no solo. Nossos resultados revelaram que a porcentagem de infecção por *Beauveria* sp. das larvas de *T. molitor* colocadas no solo das amostras retiradas das parcelas com aplicação do fungo foi de 2 a 6 vezes maior em comparação às parcelas controle nas safras de 2015 e 2016, respectivamente. Esses resultados são superiores aos observados por Zanardo (2015), que, em levantamento da abundância de fungos entomopatogênicos em solo da mata atlântica durante a estação úmida com a técnica do “insect bait”, registraram apenas 1,2% de larvas de *T. molitor* mortas por *Beauveria* sp. Considerando ser o mesmo bioma e estação em que se encontrava o cafezal do nosso experimento, essa infecção foi 6 vezes menor que a encontrada nesse trabalho nas parcelas sem aplicação do patógeno e 11 vezes menor em comparação às parcelas com aplicação do fungo.

Dessa forma, considerando que no cafezal utilizado nos experimentos nunca tinha sido aplicado o fungo *B. bassiana* anteriormente e que, na primeira avaliação anterior à inoculação do patógeno, não foi encontrada presença do fungo em nenhuma das amostras, é possível sugerir que houve um leve incremento do inóculo de *Beauveria* sp. na área após a aplicação do patógeno. Entretanto, esta confirmação da porcentagem de *B. bassiana* que corresponde ao isolado liberado (ESALQ-PL63) só seria possível com auxílio de técnicas moleculares, porém, neste trabalho, foi realizada somente a identificação morfológica ao nível de gênero.

A alta porcentagem de infecção das larvas de *T. molitor* colocadas nas amostras de solos a partir da quinta coleta durante a safra de 2014/2015 pode ser um indicativo de uma possível disseminação do inóculo das parcelas com liberação do patógeno para as parcelas controle, tendo em vista a proximidade das parcelas que

foram distribuídas em uma área de 2,4ha. Essa disseminação pode se dar por diversos fatores, como, por exemplo, trânsito de homens, animais, maquinários, vento, chuva e atividade de insetos, em que os insetos infectados pelo patógeno após a sua morte e produção de conídios poderá novamente incrementar o inóculo no solo (MEYLING, EILENBERG, 2007). Nesse sentido, Castro *et al.* (2016) demonstraram que os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* (ESALQ-1037) e *M. robertsii* (ESALQ-1426) dispersaram no solo das parcelas com aplicação do patógeno para as sem aplicação após a aplicação de suspensão dos patógenos em solo no entorno de plantas de morango em Minas Gerais. Constataram também a persistência dos patógenos no solo e na rizosfera por até 12 meses após a aplicação com 25% de frequência de haplótipos semelhantes ao isolado ESALQ-1037 e 87,5% de haplótipos semelhantes ao isolado ESALQ-1426.

Após a aplicação de *B. bassiana* no solo, é comum a redução do inóculo aplicado com o passar do tempo, resultando em diminuição da infecção (SWIERGIEL *et al.*, 2015), sugerindo a necessidade de constantes aplicações do patógeno para um controle mais efetivo e duradouro de *H. hampei* presente nos frutos infestados no solo.

Os resultados revelam que a aplicação de *B. bassiana* no momento da fertilização é uma estratégia promissora no manejo de médio e longo prazo de *H. hampei*. Entretanto, ainda são necessários estudos para determinar o número de aplicações e a concentração necessária para manter a densidade populacional abaixo do nível de controle dessa praga.

Referências

- BENAVIDES-MACHADO, P.; ARÉVALO-MARTÍNEZ, H. Manejo integrado: uma estratégia para el control de la broca del café em colombia. **Cenicafé**, v. 53, p. 39-48, 2002.
- BUSTILLO, A.E.; BERNAL, M.G.; BENAVIDES, P.; CHAVES, B. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 82, p. 491-498, 1999.

- CASTRO, T.; MAYERHOFER, J.; ENKERLI, J.; EILENBERG, J.; MEYLING, N.V.; MORAL, R.DE.A. DEMÉTRIO, C.G.B.; DELALIBERA, I.J. Persistence of Brazilian isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. robertsii* in strawberry crop soil after soil drench application. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 233, p. 361–369, 2016.
- COSTA, V.R.; COSTA, G.L.L.; GANEM, R.F.; TORRES, I.P.; MOTA, L.H.C. Compatibilidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com agroquímicos utilizados na cultura do cafeeiro. In: 5º Seminário de Iniciação Científica do IFNMG, Montes Claros-MG, 2015. **Anais...** Montes Claros: IFNMG, 2015. p.1-3.
- CURE, J.R.; SANTOS, R.H.S.; MORAES, J.C.; VILELA, E.F.; GUTIERREZ, A.P. Fenologia e Dinâmica Populacional da Broca do Café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) Relacionadas às Fases de Desenvolvimento do Fruto. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p.325-335,1998.
- DAMATTA, F.M.; RONCHI, C.P.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 485-510, 2007.
- FERREIRA, A.J.; MIRANDA, J.C.; BUENO, V.H.P.; ECOLE, C.C.; CARVALHO, A. Bioecologia da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (coleoptera: scolytidae), no agroecossistema cafeeiro do cerrado de minas gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, p.422-431, 2003.
- GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D. Fungi: Hyphomycetes. In: L. LACEY, L. (Ed.), **Manuals of Technique in Insect Pathology**. New York: Academic Press, 1997. p. 213-249.
- INFANTE, F.; PÉREZ, J.; VEGA, F.E. The coffee berry borer: the centenary of a biological invasion in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p.125-126, 2014.
- JARAMILLO, J.L.; MONTOYA, E.C.; BENAVIDES, P.; GÓNGORA, C.E.B. *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de broca del café en frutos del suelo. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 41, p. 95-104, 2015.

LEITE, L.G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: Alexandre de Sene Pinto, 2003. 92p.

MEDO, J.; CAGÁŇ, Ľ. Factors affecting the occurrence of entomopathogenic fungi in soils of Slovakia as revealed using two methods. **Biological Control**, v. 59, n. 2, p. 200–208, nov. 2011.

MEYLING, N. V.; EILENBERG, J. Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 113, n. 1-4, p. 336–341, abr. 2006.

MEYLING, N.V.; EILENBERG, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. **Biological Control**, v.43, p. 145–155, 2007.

MOLENBERGHS, G.; VERBEKE, G. Models for Discrete Longitudinal Data. Springer: New York, 2005.

MORENO V., D.; BUSTILLO P., A. E.; BENAVIDES M., P.; MONTOYA, E. C. Escape y mortalidad de *Hypothenemus hampei* en los procesos de recolección y beneficio del café en Colombia. Chinchiná Colombia. **Revista Cenicafé**, v. 52, p.111-116, 2001.

OLIVEIRA, D.G.P.; PAULI, G.; MASCARIN, G.M.; DELALIBERA, I. A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 44-52, 2015.

PARDEY, A.E.B. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Rev. Acad. Colomb. Cienc.**, v. 29, p. 55-68, 2005.

- R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2006. Disponível em: <<http://www.Rproject.org>>. Acesso em: 07 nov. 2016.
- ROSIN, F.; SHAPIRO, D.I.; LEWIS, L.C. Effects of Fertilizers on the Survival of *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p.194–195, 1996.
- RUPPERT, D.; WAND, M.P.; CARROLL, R.J. Semiparametric regression. Cambridge University Press. 2013.
- SAS Institute Inc (2016) The GLIMMIX Procedure (Experimental) (Cary, NC: SAS Institute).
- SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; SILVA, A. R.; MACHADO, L. J.; GOMES, R. A.; ANDRADE, V. T. **Cafeicultor**: saiba como monitorar e controlar a broca-do-café com eficiência. Belo Horizonte (Brasil): EPAMIG, 2011. 3p. (EPAMIG. Circular Técnico, 67).
- SWIERGIEL, W.; MEYLING, N.V.; PORCEL, M.; RAMERT, B. Soil application of *Beauveria bassiana* GHA against apple sawfly, *Hoplocampa testudinea* (Hymenoptera:Tenthredinidae): Field mortality and fungal persistence. **Insect Science**, v. 00, p. 1–15, 2015.
- TEIXEIRA, C.D.; SOUZA, O.; COSTA, J.N.M. Frutos de Café “Conilon” Brocados por *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae): Qual a Importância de sua Queda no Decorrer da Fase de Frutificação?. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, n.3, p.390-394, 2006.
- TOWNSEND, R.J.; CALLAGHAN, M.O.; JOHNSON, V.W.; JACKSON, T.A. Compatibility of microbial control agents *Serratia entomophila* and *Beauveria bassiana* with selected fertilisers. **New Zealand Plant Protection**. v. 56, p. 118-122, 2003.

- VÁZQUEZ, L.L.; ALFONSO, J. RAMOS, Y.; MARTÍNEZ, A.; MORENO, D.; MATIENZO, Y. Relaciones de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) con el suelo del cafetal como base para su manejo agroecológico. **Agroecología**, v. 7, p. 81-90, 2012.
- VERA, J. T.; MONTOYA, E.C.; BENAVIDES M., P.; GÓNGORA, C. E. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as a control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) emerging from fallen, infested coffee berries on the ground'. **Biocontrol Science and Technology**, v. 21, p. 1 – 14, 2011.
- VERBYLA, A.P.; CULLIS, B.R.; KENWARD, M.G.; WELHAM, S.J. The analysis of designed experiments and longitudinal data by using smoothing splines, **Applied Statistics**, v. 48, p. 269-311, 1999.
- WAND, M.P. Smoothing and mixed models. **Computational Statistics**. v. 18, p. 223-49, 2003.
- ZANARDO, A.B.R. **Abundância de fungos entomopatogênicos da ordem Hypocreales e diversidade genética de *Metarhizium* spp. isolados de amostras de solo de áreas representativas de cinco biomas brasileiros**. 2015. 153p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.