

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

**COLETA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana*  
VISANDO AO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ NO  
ESPÍRITO SANTO**

**LEANDRO PIN DALVI**

**ALEGRE  
ESPÍRITO SANTO - BRASIL  
FEVEREIRO - 2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

**COLETA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E  
SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana*  
VISANDO AO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ NO  
ESPÍRITO SANTO**

**LEANDRO PIN DALVI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Dirceu Pratissoli

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo  
Antônio Polanczyk

**ALEGRE  
ESPÍRITO SANTO - BRASIL  
FEVEREIRO – 2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias da Universidade Federal  
do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

D152c Dalvi, Leandro Pin, 1983-  
Coleta, caracterização molecular e seleção de isolados de Beauveria  
bassiana visando ao controle da broca-do-café no Espírito Santo / Leandro  
Pin Dalvi. – 2008.  
37 f. : il.

Orientador: Dirceu Pratissoli.  
Co-Orientador: Ricardo Antonio Polanczyk.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,  
Centro de Ciências Agrárias.

1. Broca-do-café. 2. Café - Doenças e pragas - Controle biológico 3.  
Pragas agrícolas - Controle biológico - Espírito Santo (Estado). I.  
Pratissoli, Dirceu. II. Polanczyk, Ricardo Antonio. III. Universidade  
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 63

---

# **COLETA, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* VISANDO AO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ NO ESPÍRITO SANTO**

**LEANDRO PIN DALVI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada: 23 de Fevereiro de 2008.

---

Prof. Dr. Anderson Mathias Holtz  
Escola Agrotécnica Federal de Colatina  
- EAFCOL

---

Dr. Cláudio Roberto Franco  
Centro de Ciências Agrárias - UFES

---

Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk  
Centro de Ciências Agrárias - UFES

(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Dirceu Pratisoli  
Centro de Ciências Agrárias - UFES

(Orientador)

## DEDICATÓRIA

À minha família e noiva, o sonho transformado em realidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me ajudado em todos os momentos.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Dirceu Pratissoli, pelos conhecimentos, confiança e amizade.

Aos meus pais Décio Luiz Dalvi e Mariza Martha Pin Dalvi e à minha irmã Aline Pin Dalvi, pelo carinho, dedicação, força e orações.

À minha noiva Nathale Bicalho Corrêa, pela convivência saudável com carinho, amizade e compreensão.

Ao professor Daniel Ricardo Sosa-Gomes, pela co-orientação e auxílio no RAPD.

Aos amigos Leonardo e Hugo, pela companhia e ajuda imprescindível nos trabalhos de campo.

Ao professor Ricardo Antonio Polanczyk, pela co-orientação.

Aos amigos de todos os tempos da República Potrão, Gilson, Marnisson, Ludovico, Daniel, Gilberto, Flávio, Allan e Gabriel, pela convivência agradável.

Aos amigos do futebol, sinuca e das pescarias, pelos momentos de alegria e descontração.

Ao laboratorista Jairo da EMBRAPA-Soja, pela ajuda no RAPD.

Aos meus amigos da turma de mestrado, que são os mesmos da graduação.

Ao amigo e conselheiro Anderson Mathias Holtz, pela sinceridade e consideração.

À funcionaria Dona Carlota, pela ajuda e dedicação.

Ao bolsista Cláudio, pelas valiosas sugestões.

A todos aqueles que não foram citados, porém colaboraram com este trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Leandro Pin Dalvi, filho de Décio Luiz Dalvi e Mariza Martha Pin Dalvi, nasceu a 11 de março de 1983, no município de Cachoeiro de Itapemirim, Estado do Espírito Santo.

Em 2001, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo, graduando-se no ano de 2005.

Em março de 2006, ingressou no curso de Mestrado em Produção Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, defendendo a dissertação em 23 de fevereiro de 2008.



## CONTEÚDO

LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. A Broca-do-café <i>Hypothenemus hampei</i> .....	03
2.2. <i>Beauveria bassiana</i> .....	05
2.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	06
2.4. REFERÊNCIAS.....	08
3. CAPÍTULO 1- CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> COLETADOS SOBRE BROCA-DO-CAFÉ NO ESPÍRITO SANTO.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
3.1. INTRODUÇÃO.....	14
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.2.1. Coleta e isolamento de <i>Beauveria bassiana</i> .....	15
3.2.2. Caracterização molecular de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> .....	15
3.2.2.1. Extração de DNA.....	16
3.2.2.2. Aplicação da técnica RAPD.....	16
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
3.4. CONCLUSÕES.....	22

3.5. REFERÊNCIAS.....	23
4. CAPÍTULO 2- SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> VISANDO AO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ NO ESPÍRITO SANTO.....	24
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
4.1. INTRODUÇÃO.....	27
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.2.1. Criação de broca-do-café <i>H. hampei</i> .....	28
4.2.2. Padronização dos isolados de <i>B. bassiana</i> .....	29
4.2.3. Germinação de <i>B. bassiana</i> .....	29
4.2.4. Seleção inicial.....	29
4.2.5. Estimativa da concentração letal CL <sub>50</sub> .....	30
4.2.6. Estimativa da produção de conídios sobre cadáveres de <i>H. hampei</i> .....	30
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.3.1. Seleção inicial.....	31
4.3.2. Estimativa da concentração letal CL <sub>50</sub> .....	34
4.3.3. Estimativa da produção de conídios sobre cadáveres de <i>H. hampei</i> .....	35
4.4. CONCLUSÕES.....	35
4.5. REFERÊNCIAS.....	35

**LISTA DE TABELAS**

## CAPÍTULO 1

Tabela 1-	Lista de isolados de <i>B. bassiana</i> com os respectivos locais de coleta.....	18
-----------	--	----

## CAPÍTULO 2

Tabela 1-	Mortalidade média $\pm$ EP (%) de adultos da broca-do-café provocada por <i>B. bassiana</i> na concentração $10^5$ conídios/ml ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase 12 Horas).....	32
Tabela 2-	Respostas de dose-mortalidade $\pm$ EP de broca-do-café a diferentes isolados de <i>B. bassiana</i> , IC. 95%.....	34
Tabela 3-	Número de conídios de <i>B. bassiana</i> produzidos, média $\pm$ EP e aumento potencial de produção em cadáveres da broca do café..	35

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Perfis de RAPD dos isolados CCA-UFES/Bb-1, CCA-UFES/Bb-2, CCA-UFES/Bb-3, CCA-UFES/Bb-4, CCA-UFES/Bb-5, CCA-UFES/Bb-6, CCA-UFES/Bb-7, CCA-UFES/Bb-9, CCA-UFES/Bb-10, CCA-UFES/Bb-11, CCA-UFES/Bb-12, CCA-UFES/Bb-13, CCA-UFES/Bb-14, CCA-UFES/Bb-15, CCA-UFES/Bb-16, CCA-UFES/Bb-17, CCA-UFES/Bb-18, CCA-UFES/Bb-19, CCA-UFES/Bb-20, CCA-UFES/Bb-21, CCA-UFES/Bb-22, CCA-UFES/Bb-23, CCA-UFES/Bb-24, CCA-UFES/Bb-25, CCA-UFES/Bb-26, CCA-UFES/Bb-27, obtidos com os “primers” L-12 e B08 respectivamente..... 19
- Figura 2- Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA a partir da matriz de similaridade obtida pelo coeficiente Dice ilustrando a relação entre os 27 isolados de *Beauveria bassiana* e também se relacionando ao padrão CNPSO (28)..... 21

## RESUMO

DALVI, Leandro Pin, M. Sc. Universidade Federal do Espírito Santo, fevereiro de 2008. **Coleta, caracterização molecular e seleção de isolados de *Beauveria bassiana* visando ao controle da broca-do-café no espírito santo.** Orientador: Prof Dr. Dirceu Pratissoli. Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk.

A cafeicultura é a maior geradora de empregos e renda para as famílias do Espírito Santo. Dentre os problemas que esta atividade enfrenta, destaca-se a broca-do-café *Hypothenemus hampei*, uma praga que causa prejuízos em todos os estágios de maturação dos frutos, assim como no pós-colheita. O objetivo do presente trabalho foi coletar, caracterizar molecularmente e selecionar isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* com potencial para utilização em programas de manejo fitossanitário da broca-do-café. O trabalho foi realizado no Setor de Entomologia e Fitopatologia NUDEMAFI, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), e nos laboratórios de Entomologia e Biotecnologia da Embrapa-Soja localizados em Londrina, Paraná. As coletas resultaram em 28 isolados classificados como *B. bassiana*, tendo sido um dos isolados descartado dos testes por apresentar baixo crescimento. As ampliações utilizando 12 “primers” (iniciadores) deram origem a 82 bandas. O coeficiente de similaridade Dice variou de 93 a 51%. Foi evidente, salvo algumas exceções, que o local de coleta foi peça chave na formação de grupos muito relacionados. Ocorreu grande amplitude na virulência. Foram pré-selecionados os isolados CCA-UFES/Bb4, CCA-UFES/Bb11, CCA-UFES/Bb15, CCA-UFES/Bb18 que produziram mortalidade confirmada acima de 60%. Posteriormente, o isolado

CCA-UFES/Bb15 apresentou melhor resposta, diferenciando-se do isolado utilizado como padrão - ESALQ-447 - cujos  $CL_{50}$  foram de  $4,0 \times 10^4$  e  $11,85 \times 10^4$  conídios/mL, respectivamente. Para todos os isolados selecionados, assim como para o padrão, o aumento na concentração representou aumento na mortalidade. A conidiogênese sobre os cadáveres da broca-do-café foi inversamente proporcional à virulência dos isolados, sendo ambas as características importantes para o sucesso de um programa de Manejo Integrado de Pragas (MIP). Os resultados obtidos são promissores, dando subsídio a novas pesquisas preferencialmente a campo.

**Palavras-chave:** cafeeiro, MIP, fungo entomopatígeno, marcadores moleculares, conidiogênese, *Hypothenemus hampei*.

## ABSTRACT

DALVI, Leandro Pin, M. Sc. Universidade Federal do Espírito Santo, february of 2008. **Collect, molecular characterization and selection of *Beauveria bassiana* strains to control of coffee berry borers in Espírito Santo, Brazil.** Advisor: Prof Dr. Dirceu Pratissoli. Prof. Dr. Co-advisor: Ricardo Antonio Polanczyk.

The coffee plantation is the largest source of jobs and familiar income of the State of Espírito Santo (Brazil). The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, is widely considered one of the most important coffee pests because the losses in all stages of coffee grain as well as in post-harvest in this activity. The objective of this study was the collect, molecular characterization and the select of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* strains, with potential use in integrated pest management in coffe plantations. The work was carried out at NUDEMAFI, located in the Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, in municipality of Alegre, Brazil and the Biotechnology and Biological laboratories in the Embrapa Soja, in municipality of Londrina, State of Paraná, Brazil. A collection of 28 *B. bassiana* strains, isolated from different geographic regions were established. Only one *Bassiana bassiana* strain was discarded for low growth in laboratory. The amplifications using 12 "primers" (initiators) led to 82 bands. Dice's coefficient ranged from 51 to. 93% with few exceptions Groups of *B. bassiana* strains related were forming due to the place colleted and high levels of virulence was observed. The *Beauveria bassiana* strains CCA-UFES/Bb4, CCA-UFES/Bb11, CCA-UFES/Bb15, CCA-UFES/Bb18 were pre-selected which showed confirmed mortality higher than 60Only The LC<sub>50</sub>, of the CCA-UFES/Bb15 strains was better response with

significant difference between the standard, with  $4.0 \times 10^4$  in  $11.85 \times 10^4$  conidia / ml, respectively,. All isolates selected, as well as for the standard, the increase in the concentration resulted an increase of mortality of *H. hampei*. The conidiogenesis on coffee berry borers cadavers was inversely proportional to the virulence of the *B. bassiana* strains, and both this characteristics are important to the success of a program of Integrated Pest Management (IPM).

**Keywords:** coffee, IPM, entomopathogenic fungus, molecular markers, conidiogenesis, *Hypothenemus hampei*.



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde meados do século XIX até os dias de hoje, a cafeicultura é o pilar central da agricultura no Espírito Santo. Principalmente por ser uma atividade diretamente relacionada à agricultura familiar, a cultura destaca-se pela sua capacidade de fixação do homem no campo, gerando empregos, renda e dando suporte econômico a muitos municípios (Schmidt et al., 2004). Atualmente, almejando melhores mercados, os produtores investem na melhoria da qualidade do produto, enfrentando, neste processo, alguns entraves, como o controle de pragas.

A broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae), considerada a principal praga do cafeeiro em escala mundial, está entre as mais importantes no Espírito Santo. A infestação provoca uma série de prejuízos como a queda e apodrecimento dos frutos, perda de peso e qualidade pela depreciação do produto na classificação por tipo e bebida, além de inviabilizar a produção de sementes e limitar a comercialização no mercado externo (Souza & Reis, 1997).

O método cultural impedindo que frutos permaneçam na lavoura após a colheita, juntamente com o controle químico, principalmente com produtos à base endossulfan são as formas de controle mais utilizadas no manejo desta praga. O método químico apresenta muitas limitações causando impactos ambientais e tornando possível a seleção de populações resistentes a inseticida (Silva et al., 2006). Assim, devem ser buscadas alternativas seguras a fim de minimizar os prejuízos causados pela praga.

O fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes), formulado como microinseticida, já vem sendo empregado em

diversos cultivos, em mais de dois milhões de hectares na Europa e 100 mil hectares no Brasil, principalmente em cultivos orgânicos (Darolt, 2001). Dentre as vantagens do uso de entomopatógenos, destacam-se a facilidade de dispersão e a manutenção do inóculo em campo (Alves, 1998).

No estudo de entomopatógenos, um aspecto importante a ser abordado é a variabilidade entre os isolados, que podem apresentar diferentes níveis de similaridade genética e virulência, mesmo em se tratando da mesma espécie. Assim, a caracterização molecular e a seleção de isolados tornam-se etapas imprescindíveis no desenvolvimento de um formulado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Broca-do-café *Hypothenemus hampei*

A broca-do-café *Hypothenemus hampei*, que tem origem na África Equatorial, foi descrita por Ferrari em 1867 em grãos de café comercializados, porém, apenas em 1901, é citada em Gabón na África como praga no campo. Os relatos sobre sua distribuição se sucederam rapidamente: entre 1902-1904 no Congo; em 1908 em Uganda; e em 1909 em Java. Na América, foi introduzida por volta de 1913 no estado de São Paulo onde, a partir de 1924, foram sentidos os prejuízos causados por esta praga, constatando-se então sua gravidade. Posteriormente, a broca-do-café disseminou-se por todas as regiões produtoras do país (Benassi, 1996).

O adulto de *H. hampei* é um coleóptero preto brilhante de tamanho reduzido. As fêmeas medem cerca de 1,7 mm e os machos cerca de 1,2 mm. Possui corpo cilíndrico e ligeiramente recurvado na região posterior. Os élitros são revestidos de cerdas e escamas filiformes. Possui mandíbulas e pernas de coloração castanha. As fêmeas possuem asas normais, possibilitando o vôo. Os machos possuem asas atrofiadas, fazendo com que permaneçam nas sementes de onde se originam (Souza e Reis, 1997).

A razão sexual da broca é de um macho para 10 fêmeas. A fêmea acasalada perfura o fruto geralmente na região da coroa, construindo uma galeria que atinge o interior da semente, onde é realizada a postura. Os ovos são pequenos, brancos, elípticos e com brilho leitoso. A fêmea, cuja longevidade é de 156 dias, põe de 31 a 119 ovos. De quatro a 10 dias após a postura, inicia-se o período larval que é de 14 dias em média. A fase de pupa tem cerca de sete dias. A broca-do-café pode ter até

sete gerações por ano, e devido à sua alta longevidade e fecundidade atravessa facilmente o período de entressafra, causando danos na produção do ano seguinte (Gallo et al., 2002).

A broca-do-café é em escala mundial a praga mais importante do cafeeiro, sendo uma das principais no Brasil. O ataque causa prejuízos quantitativos e qualitativos. Quantitativos devido à perda de peso, queda dos frutos novos brocados e apodrecimento de sementes. Em grandes infestações, a perda de peso pode ser superior a 20%, ou seja, mais de 12 quilos por saca de 60 quilos. Danos qualitativos são devidos à depreciação tanto no tipo dos grãos quanto na qualidade da bebida e pelo aumento no número de defeitos como: grãos brocados, grãos quebrados, preto verde, preto ardido e contaminação por microorganismos (Sousa & Reis, 1997).

Quanto ao controle da praga, basicamente três métodos podem ser utilizados: o cultural, o químico e o biológico. O controle cultural tem como objetivo impedir que frutos de uma safra permaneçam na lavoura após a colheita, sendo os restos de tratos culturais agentes disseminadores da praga. O controle químico é adotado quando se observa de 3% a 5% de frutos brocados, normalmente são realizadas aplicações de Endosulfan, um inseticida de largo espectro, que apresenta uma série de limitações, como o alto custo das aplicações, impacto no agroecossistema e o desenvolvimento de populações resistentes (Brun et al., 1989).

Quanto aos inimigos naturais empregados no controle biológico da broca-do-café, os mais importantes são os parasitóides de origem africana: *Prorops nasuta* (Waterston) (Hymenoptera: Bethilidae), introduzido nas principais áreas produtoras do continente americano, Indonésia e Índia (Infante et al., 2003); *Cephalonomia stephanoderis* (Betrem) (Hymenoptera: Bethilidae), de grande eficiência na regulação desta praga (Lachaud et al., 2002); *Heterospilus coffeicola* (Schneiderknecht) (Hymenoptera: Braconidae); e *Phymastichus coffea* (La salle) (Hymenoptera: Eulophidae), também introduzido no Brasil e demais áreas produtoras das Américas (Castillo et al., 2004). O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, de ocorrência natural em muitas regiões do país, também tem potencial de controle (Bustillo Pardey, 2005).

## 2.2. *Beauveria bassiana*

O fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 1912 pertence à classe Hyphomycetes, família Moniliaceae. O nome da espécie homenageia o entomologista italiano Agostino Bassi que, em 1835, descobriu ser a causa da doença muscardina branca, nome dado devido ao aspecto de mofo branco do micélio constituído sobre os cadáveres dos hospedeiros. Esta doença causava terríveis prejuízos aos produtores de seda devido a epizootias nas criações de bicho-da-seda, *Bombyx mori* L., Lepidoptera: Bombycidae (Rehner & Buckley, 2005).

*B. bassiana* é comumente encontrado no solo onde pode sobreviver como saprófito, sendo uma das espécies mais estudadas no controle de artrópodes, provavelmente em função de sua ampla distribuição geográfica e da variedade de seus hospedeiros, sendo também um dos fatores de mortalidade da broca-do-café, causando enzootias em todas as regiões onde esta praga foi introduzida (Alves, 1998).

Apesar de *B. bassiana* ser encontrado em regiões de clima adverso, é consenso entre os pesquisadores que sua patogenicidade e virulência estão diretamente relacionadas às condições climáticas, sendo o seu melhor desenvolvimento com umidade de aproximadamente 80%, temperatura entre 23 e 28°C e tempo nublado. Para iniciar o processo, os conídios devem entrar em contato com a cutícula ou ingeridos pelo inseto. Também são imprescindíveis nutrientes, água e oxigênio (Rosas et al., 2001).

A infecção via tegumento é a mais freqüente. O fungo germina num período de 12 a 18 horas, dependendo de fatores nutricionais. Decorridas 72 horas da inoculação, o inseto apresenta-se totalmente colonizado. O tecido gorduroso é o mais atacado, seguido pelo tecido intestinal e demais tecidos, resultando na morte do inseto em função da falta de nutrientes e do acúmulo de substâncias tóxicas. Sobre o cadáver ocorre a formação de grande quantidade de conidióforos e conídios característicos (Alves, 1998).

A formulação e a utilização de bioinseticidas baseados em microorganismos entomopatogênicos vêm crescendo mundialmente como uma solução efetiva e ecológica no controle de pragas, minimizando o impacto provocado pelos inseticidas convencionais. No Brasil, já existem alguns produtos à base de *B. bassiana*

utilizados como agentes no controle de diversas pragas, principalmente em cultivos orgânicos (Bernardi et al., 2006).

### 2.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Até o início da década de 1980, a variabilidade dos entomopatógenos era uma característica expressa principalmente na avaliação da patogenicidade e dos aspectos comportamentais. Atualmente, a melhor forma para determinar os níveis de diversidade e a estrutura genética intra-específica é através do uso de marcadores moleculares, sendo aplicados estudos de isoenzimas, seqüenciamento de RNAr (RNA ribossomal), análises de RFPL (Polimorfismo longitudinal aos fragmentos de restrição), análises AFPL (Polimorfismo longitudinal de fragmentos amplificados), análises RAPD (Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente) com a finalidade de agrupar e identificar os isolados (Sosa-Gomes et al., 1998; Becerra Velasquez et al., 2007).

A técnica RAPD, utilizada no presente trabalho, é uma variação do protocolo de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com duas características diferentes: a primeira utiliza um iniciador único ao invés de um par de iniciadores ("Primers") e a segunda é que este iniciador possui seqüência arbitrária. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio de sua seqüência. Os marcadores RAPD são altamente sensíveis a diferenças de nucleotídeos entre DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores, permitindo a detecção de mudanças em um único nucleotídeo. Tais características tornam estes marcadores ideais para a detecção de diferenças em indivíduos relacionados e em espécies pouco polimórficas (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica de RAPD por ser de fácil execução e de custo relativamente baixo e eficiente na detecção de polimorfismo tem sido utilizada na análise da variabilidade genética de isolados de fungos entomopatogênicos, destacando-se *B. bassiana*, de ampla distribuição, e que pode apresentar diferenciação genética mesmo entre isolados estritamente relacionados, sendo que, através da análise de RAPD é possível diferenciar subespécies, variedades e isolados, além de possibilitar a associação de padrões específicos a índices de patogenicidade (Carneiro et al., 2004; Becerra Velasquez et al., 2007).

Vários pesquisadores têm utilizado a técnica de RAPD em seus estudos, em alguns casos obtendo, por exemplo, o agrupamento dos isolados de acordo com a espécie, local de origem ou hospedeiro. Glare & Inwood (1998), comparando diversos isolados de *Beauveria* spp. provenientes de Nova Zelândia com isolados de outros países, obtiveram formação de grupos homogêneos e heterogêneos quanto à espécie e origem, enquanto Luz et al. (1998) relatam a associação de isolados de *B. bassiana* provenientes de hospedeiros da ordem Hemiptera.

## 2.4. REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Controle Microbiano de Insetos. p.289-382. In Alves, S. B. (ed.), **Fungos entomopatogênicos**. Piracicaba, FEALQ, 1998, 1163p.
- BECERRA VELASQUEZ, V.; PAREDES M.C.; ROJO C.M.; FRANCE. 2007. RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. **Agricultura Técnica (Chile)** v.67, p.115-125.
- BENASSI, V.L. 1996. **Criação massal de vespa de Uganda e vespa da Costa do Marfim, parasitóides da broca-do-café**. Vitória, EMCAPA, 20p.
- BERNARDI, E.; PINTO, D.M.; NASCIMENTO, J.S.; RIBEIRO, P.B.; SILVA, C.I. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* sobre o desenvolvimento de *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, p.127-129, 2006.
- BRUN, L., MARCILLAUD, C. GAUDICHON, V.; SCUKLING, D. **Endosulphan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in Caledonia**. Journal of Economic Entomology, California, v.82, p.1311-1316, 1989.
- BUSTILLO PARDEY, A.E. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, Santafé de Bogotá, V.29, p.55-68, 2005.
- BUSTILLO PARDEY, A.E. Utilización del control biológico clásico en un programa de manejo integrado: El caso de la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia, p.143-148. In: **Manejo Integrado de Plagas**. Instituto Agropecuario, Santa Fé de Bogotá, 1995, 232p.
- CARNEIRO, A.L.; GOMES, E.A.; NONATO, L.F.V.; BRITTO, M.A.; FERNANDES, F.T.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARÃES, C.T.; CRUZ, I. **Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas do**



milho – *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda*. Sete Lagoas, Comunicado Técnico 93, 2004.10p.

CASTILLO, A., F. INFANTE, G. LÓPEZ, & J. TRUJILLO. Laboratory parasitism by *Phymastichus coffea* (Hymenoptera: Eulophidae) upon non-target bark beetles associated with coffee plantations. **Florida Entomologist**, Florida, v.87, p. 274–277, 2004.

DAROLT, M.R. Estado e característica atual da agricultura orgânica no mundo. **Revista Brasileira de Agropecuária**, Brasília, v.9, p. 44-48, 2001.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D.; **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN Documento 20. 220p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; DE BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMI, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. São Paulo: FEALQ, 2002, 920 p.

GLARE T.; INWOOD, A. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, p.250-256, 1998.

INFANTE, F.; MUMFORD, J.; GARCÍA-BALLINAS, A. Predation by native arthropods on the african parasitoid *Prorops nasuta* (Hymenoptera: Bethyridae) in coffee plantations of Mexico. **Florida Entomologist**, Florida, v.86, p.86-88, 2003.

LACHAUD, G.P.; HARDY, I.C.W.; LACHAUD, J.P. Insect gladiators: competitive interactions between three species of bethylid wasps attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Biological Control**, Orlando, v.25, p.231-238, 2002.

LUZ, C.; TIGANO, M.S.; SILVA, I.G.; CORDEIRO, C.M.T.; ALJANABI, S.M. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma*

*infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.93, p.839-846, 1998.

REHNER S.A.; BUCKLEY E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-a sequences:evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, Lawrence, v.97, p.84-98, 2005.

ROSAS, F.H.; ROSAS, R.A.; CASTAÑEDA, G.S.; GAYTON, J.F.B. Respuesta de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a diferentes substratos bajo estrés hídrico, décima cuarta reunion científic – **Tecnología Florestal y Agropecuária**, Vera Cruz., p.04-06. 2001.

SCHMIDT, H.C.; DE MUNER, L.H.; FORNAZIER, M.J. (eds.) 2004. **Cadeia produtiva do café arábica da agricultura familiar no Espírito Santo**. Vitória, ES: Incaper, 52p.

SOSA-GOMES, D.R.; TIGANO, M.S.; ARANTES, O.M.N. 1998. Caracterização de entomopatógenos p. 731-764. in: Alves, S.B. Ed **Controle microbiano de insetos**, 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1163p.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R. **Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle**. Belo Horizonte: EPAMIG, (Boletim técnico n.50), 1997, 40p.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* COLETADOS SOBRE BROCA-DO-CAFÉ NO ESPÍRITO SANTO**

## RESUMO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* figura entre os mais importantes agentes de controle biológico. Dentre as pragas controladas, destaca-se a broca-do-café *Hypothenemus hampei* como das mais importantes da cultura. Para isolados coletados em regiões produtoras de café do estado do Espírito Santo, foi analisada a variabilidade através da técnica de RAPD. As coletas resultaram em 28 isolados, sendo um descartado por baixo crescimento, e os demais caracterizados como *B. bassiana*. As amplificações utilizando 12 “primers” deram origem a 82 bandas. O coeficiente de similaridade Dice variou de 93 a 51%. Foi evidente, salvo algumas exceções, que o local de coleta dos isolados foi peça chave na formação de grupos muito relacionados.

**Palavras-chave:** RAPD, marcador molecular, fungo entomopatógeno, *Hypothenemus hampei*, cafeeiro.

### ABSTRACT

The *Beauveria bassiana* is the most important natural agents for microbial pest control. The coffee berry borers *Hypothenemus hampei* one insect pests controlled for this entonopathogenic fungus between several other arthropods. The variability of the *B. bassiana* strains, collected in the coffee crop producer region in state of Espírito Santo, were analyzed using the technique of RAPD. A collection of 28 *B. bassiana* strains,isolated from different geographic regions were established. Only one *B. bassiana strain* was discarded for low growth in laboratory. The amplifications using 12 "primers" (initiators) led to 82 bands. Dice's coefficient ranged from 51 to. 93% with few exceptions. Groups of *B. bassiana* strains related were forming due to the place colleted.

**Keywords:** RAPD, molecular marker, entomopathogenic fungus, *Hypothenemus hampei*, coffee.

### 3.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior exportador mundial de café e tem no estado do Espírito Santo sua segunda maior produção, alavancada principalmente pela agricultura familiar. Nos últimos anos, os produtores têm tido necessidade de adaptação às mudanças do mercado que vem se tornando cada vez mais competitivo e exigente em qualidade. A broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) é um dos entraves enfrentados nesse processo, sendo a principal responsável pela depreciação dos grãos (Schmitd et al., 2004).

Como forma segura de controle, estudos relatam o potencial de utilização de entomopatógenos que já ocorrem naturalmente sobre a praga, destacando como mais eficiente e promissor o fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) amplamente distribuído pelos agroecossistemas. *B. bassiana* infecta mais de 700 espécies de insetos, muitas das quais são consideradas pragas de importância econômica. Os isolados geralmente apresentam maior virulência sobre o hospedeiro original ou insetos relacionados, tornando-se importante a busca de isolados coletados sobre a praga alvo, preferencialmente na região onde se pretende utilizar o fungo, pois a adaptação é um ponto chave no sucesso do Manejo Integrado de Pragas - MIP (Feng et al., 1994).

Várias etapas precedem a produção de um bioinseticida na seleção de isolados, sendo importante definir, além das características de virulência, a diferenciação molecular para ter informações consistentes sobre o material utilizado (Sosa-Gomez et al., 1998). No gênero *Beauveria*, existe uma considerável diversidade genética. A metodologia de RAPD, técnica baseada em PCR, tem determinado satisfatoriamente a variabilidade dos isolados, com melhores resultados que a utilização de outras características como as morfológicas, permitindo, inclusive, a associação de certos padrões a índices de mortalidade, hospedeiro e local de origem (Driver & Milner, 1998).

Desta forma, objetivou-se realizar coleta e caracterização molecular de *B. bassiana* sobre a broca-do-café em regiões produtoras do estado do Espírito Santo, para subsidiar pesquisas visando ao controle da praga.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Entomologia e Fitopatologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), e nos laboratórios de Entomologia e Biotecnologia da Embrapa-Soja, em Londrina, Paraná.

### 3.2.1. Coleta e isolamento de *Beauveria bassiana*

Frutos de café *Coffea* spp. contendo orifícios causados pela broca-do-café foram coletados em 53 lavouras, nos municípios de Alegre, Jerônimo Monteiro, Ibitirama, Irupi e Vargem Alta, entre os meses de fevereiro e setembro de 2006.

Foi utilizado caminharmento em zigue-zague, sendo recolhidos aproximadamente 500 frutos em cada lavoura, os quais foram embalados em sacos de papel. No laboratório foram selecionados frutos contendo brocas cobertas por micélio esbranquiçado e esporos.

O material selecionado foi isolado em meio de cultura BDA (batata, dextrose e agar) e levado para a estufa de crescimento onde permaneceu por 10 dias, sendo observado diariamente. Amostras foram examinadas no microscópio e comparadas com a descrição de Sanson (1981).

### 3.2.2. Caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana*

Para facilitar a diferenciação dos isolados, foi adicionado um isolado proveniente da Embrapa-soja como padrão, que participou de todas as etapas.

Obtenção do micélio:

Os isolados foram cultivados em placas de petri contendo meio BDA + L (levedura) (0,1%) e mantidos durante 5 dias em câmara climatizada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotofase de 12 horas para crescimento micelial. Após este período, 3 pedaços de  $0,25 \text{ cm}^2$  de micélio de cada isolado foram transferidos para frascos Erlenmeyer contendo 150 mL de meio líquido BD + L (batata, dextrose + levedura), mantidos em agitação constante de 120 rpm, temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotofase de 12 horas, por cinco dias, para crescimento. O micélio foi recuperado mediante filtragem a vácuo

em câmara de fluxo laminar e armazenado em freezer a - 20°C.

### 3.2.2.1. Extração de DNA

O micélio filtrado e seco foi triturado em nitrogênio líquido. Em seguida, 0,5 g desse material foi colocado em tubos de microcentrífuga de 2 mL em presença de 1 mL de tampão de extração (1 mL de Tris-HCl 1 M pH 8,0, 0,4 mL de EDTA 0,5 pH 8,0, 2,8 mL de NaCl 5 M, 0,1 mL de B-Mercaptoetanol, 4 mL de CTAB 5% e 1,7 mL de água destilada). Os tubos foram incubados em banho maria a 65°C por 60 min com agitação a cada 15 min. As amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 min quando o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foi acrescentado igual volume de álcool isoamílico (24:1) e agitado levemente por 5 min e centrifugado a 14.000 rpm por 15 min, sendo este procedimento repetido em seguida. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de isopropanol gelado (2/3 do volume contido no tubo) e mantidos em descanso noturno “over Night” a 4°C. Após este período, o material foi centrifugado a 14.000 rpm, por 10 min, quando foi descartado o sobrenadante, adicionado 0,5 mL de etanol gelado 70% e agitado levemente. Após 5 min de centrifuga a 14.000 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado para obtenção de um pellet de DNA que foi mantido em estufa a 37°C por 10 min para retirada do excesso de umidade. O pellet foi ressuspensão em 0,4 mL de TE pH 8,0 (10 mM Tris, 1 mM EDTA), à temperatura ambiente por 15 min, quando foi adicionada RNase e quantificado o DNA em gel de agarose corado com brometo de etídio.

### 3.2.2.2. Aplicação da técnica RAPD

Foram testados 12 “primers” comercializados por Operon, Alameda, CA: A-03, B-04, B-05, B-08, C-19, H-07, H-09, H-18, I-14, L-12, M-03, M-05 e N-14.

Para amplificação do DNA dos isolados de *B. bassiana*, foram determinados os seguintes componentes de reação em um volume final de 25 µL: 15,6 µL de água, 2,5 µL de tampão 10 X, 1,2 µL de cloreto de magnésio (150 mM MgCl<sub>2</sub>); 1,0 µL de nucleotídeos (dNTP'S 2,5 mM); 2,5 µL de “primer” (4 µM); 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL ); e 2µL de DNA (10 ng/µL). Como controle negativo foi



utilizada uma amostra contendo todos os reagentes exceto o DNA do fungo. As reações foram feitas em termociclador nas condições de temperatura: 92°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 92°C por 45 s; 39°C por 1,5 min; e 72°C por 2 min. O produto da amplificação foi diluído a 50% em água e separado por eletroforese em gel de agarose (10%) corado com brometo de etídio (2,5 µL) durante aproximadamente 2 horas, quando foi retirado da cuba para visualização em luz ultravioleta (U.V.). A imagem foi registrada através de fotografia e trabalhada com auxílio do programa Photoshop. Em cada gel, foram utilizados dois espaços para o marcador λ. Bandas correspondentes à amplificação de DNA foram diretamente registradas para todos os iniciadores (primers) como presentes (valor 1) ou ausentes (valor 0), com todos os isolados testados. Os dados binários foram analisados utilizando-se o programa NTSYS (Numerical Taxonomy System) (Rohlf, 1993), tendo sido gerado o coeficiente de similaridade Dice. A partir da matriz de similaridade genética entre os genótipos, foi construído um dendrograma pelo critério de agrupamento UPGMA (Unweighled pair group method with arithmetic average).

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As coletas realizadas deram origem a 27 isolados caracterizados como *B. bassiana*, que receberam denominação individual formada pela sigla CCA-UFES, pelas iniciais do entomopatógeno B.b. e por um número de controle do banco de entomopatógenos onde permanecem armazenados (Tabela 1).

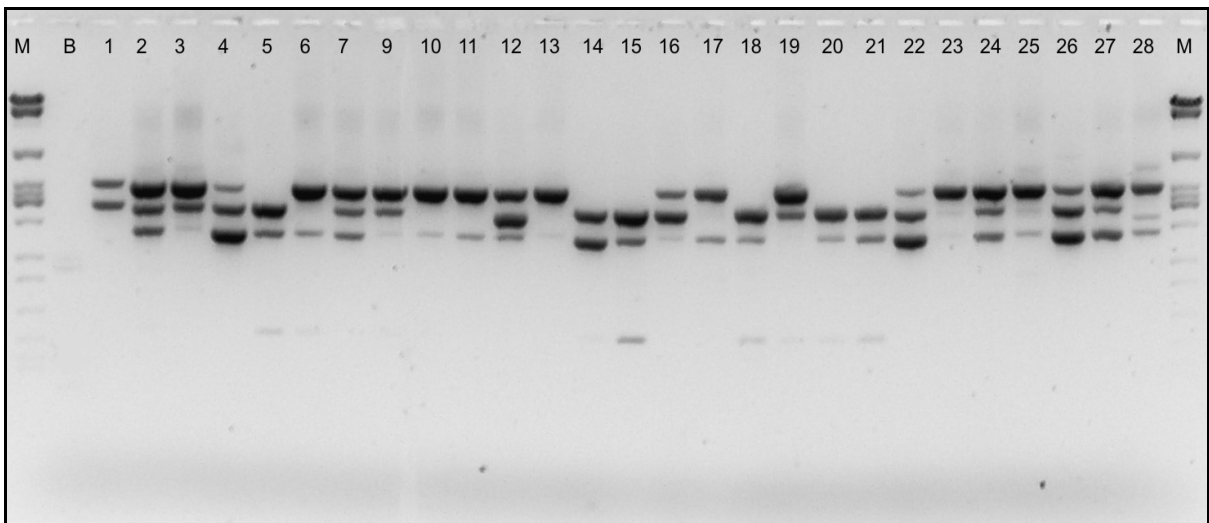
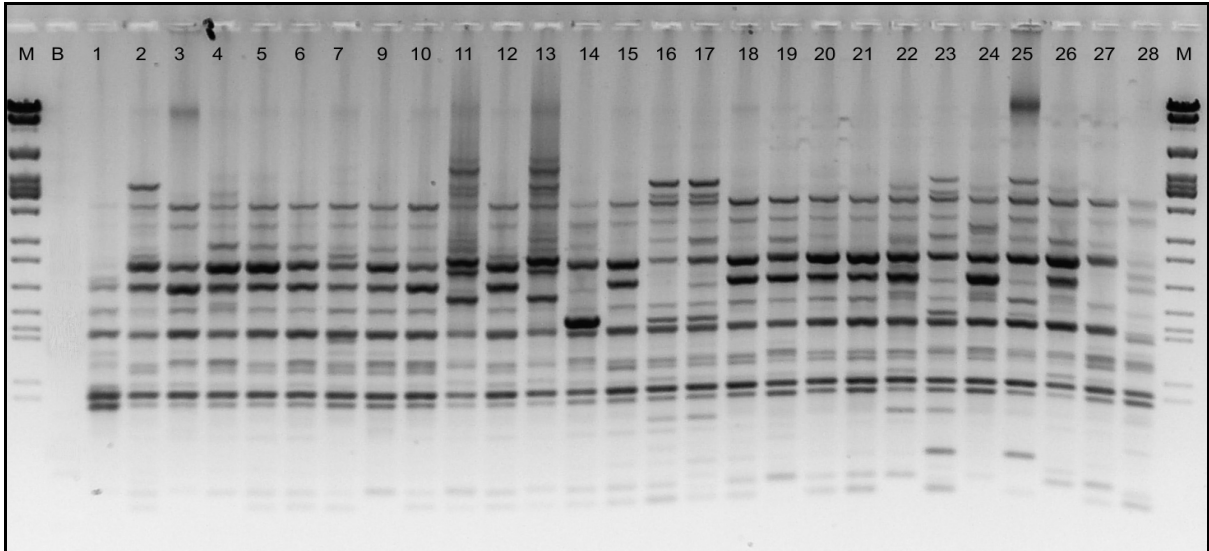
Dos isolados, apenas o número 08 não foi utilizado na caracterização molecular, por apresentar potencial de crescimento muito baixo em meio de cultura em relação aos demais.

**Tabela 1-** Lista de isolados de *B. bassiana* com os respectivos locais de coleta.

Local de coleta		
Município	Distrito	Isolados
Alegre	Anutiba	CCA-UFES/Bb-06
Alegre	Anutiba	CCA-UFES/Bb-10
Alegre	Café	CCA-UFES/Bb-14
Alegre	Celina	CCA-UFES/Bb-04
Alegre	Celina	CCA-UFES/Bb-05
Alegre	Celina	CCA-UFES/Bb-15
Alegre	Celina	CCA-UFES/Bb-18
Alegre	Celina	CCA-UFES/Bb-19
Alegre	Celina	CCA-UFES/Bb-20
Alegre	Celina	CCA-UFES/Bb-21
Alegre	Rive	CCA-UFES/Bb-01
Alegre	Rive	CCA-UFES/Bb-03
Ibitirama	Calçado	CCA-UFES/Bb-26
Ibitirama	Figueira	CCA-UFES/Bb-25
Irupi	Bom Destino	CCA-UFES/Bb-23
Irupi	Bom Destino	CCA-UFES/Bb-24
Irupi	São Quirino	CCA-UFES/Bb-22
Irupi	São Quirino	CCA-UFES/Bb-27
Jerônimo Monteiro	Divisa	CCA-UFES/Bb-09
Jerônimo Monteiro	Divisa	CCA-UFES/Bb-11
Jerônimo Monteiro	Divisa	CCA-UFES/Bb-12
Jerônimo Monteiro	Divisa	CCA-UFES/Bb-13
Vargem Alta	Fruteiras	CCA-UFES/Bb-02
Vargem Alta	Fruteiras	CCA-UFES/Bb-07
Vargem Alta	Fruteiras	CCA-UFES/Bb-08
Vargem Alta	Fruteiras	CCA-UFES/Bb-16
Vargem Alta	Fruteiras	CCA-UFES/Bb-17

As ampliações utilizando os 12 “primers” deram origem a 82 bandas. Os maiores produtos de amplificação foram as 12 bandas com o “primer” L-12, seguidos

de A-03, H-07 e N-14, todos com nove bandas. O menor número de bandas foi obtido com o “primer” B-08 com três bandas , seguido por B-04, I-14, e M-03 com quatro bandas (Figura 1).



**Figura 1** - Perfis de RAPD dos isolados CCA-UFES/Bb-1, CCA-UFES/Bb-2, CCA-UFES/Bb-3, CCA-UFES/Bb-4, CCA-UFES/Bb-5, CCA-UFES/Bb-6, CCA-UFES/Bb-7, CCA-UFES/Bb-9, CCA-UFES/Bb-10, CCA-UFES/Bb-11, CCA-UFES/Bb-12, CCA-UFES/Bb-13, CCA-UFES/Bb-14, CCA-UFES/Bb-15, CCA-UFES/Bb-16, CCA-UFES/Bb-17, CCA-UFES/Bb-18, CCA-UFES/Bb-19, CCA-UFES/Bb-20, CCA-UFES/Bb-21, CCA-UFES/Bb-22, CCA-UFES/Bb-23, CCA-UFES/Bb-24, CCA-UFES/Bb-25, CCA-UFES/Bb-26, CCA-UFES/Bb-27, obtidos com os “primers” L-12 e B-08, respectivamente.

O menor nível de similaridade foi de 51% para os 27 isolados e o maior, de 93%, foi para os isolados CCA-UFES/Bb-20 e CCA-UFES/Bb-21 coletados no

distrito de Celina, município de Alegre (Figura 2). O isolado CCA-UFES/Bb-01 foi o mais próximo do isolado CNPSO utilizado como padrão com 57% de similaridade, destacando-se em relação aos demais isolados que formaram um grande grupo com 64% de similaridade.

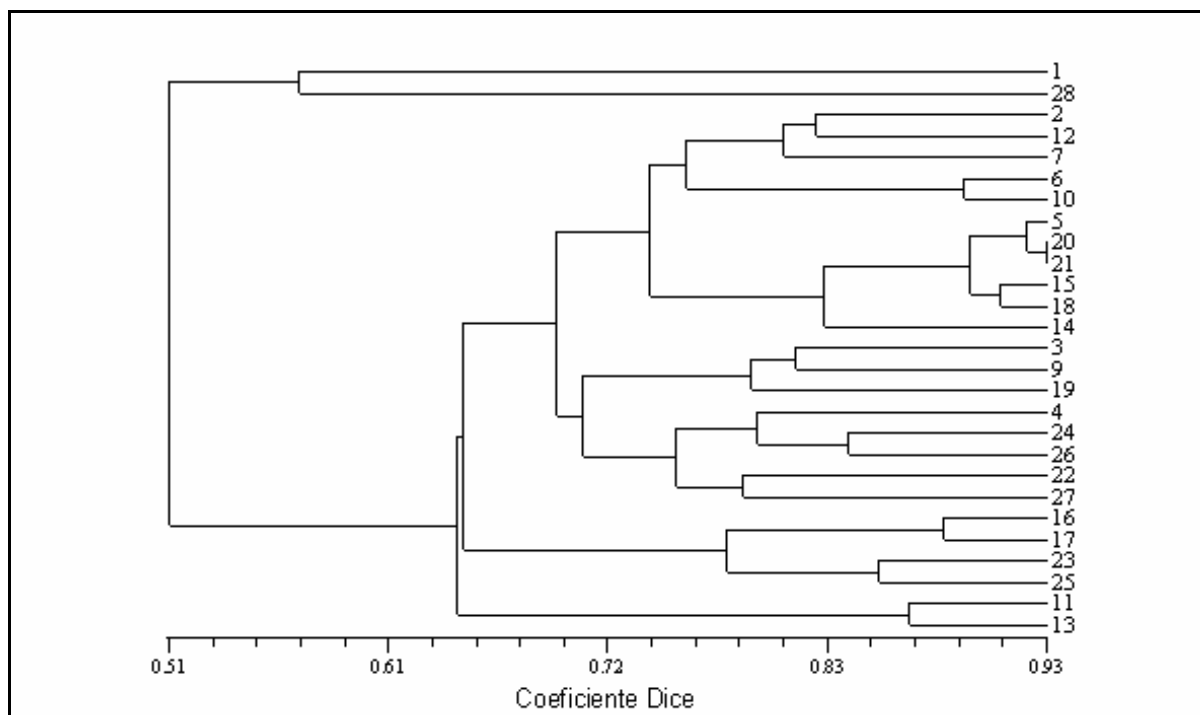
Dos isolados provenientes de Jerônimo Monteiro, CCA-UFES/Bb-11 e CCA-UFES/Bb-13 foram muito próximos entre si com 86,5% de similaridade e distantes do grupo principal, enquanto CCA-UFES/Bb-9 e CCA-UFES/Bb-12 não se agruparam pela mesma característica.

Dos 12 isolados coletados no município de Alegre, nove formaram um grupo com 75% de similaridade, em que os cinco provenientes do distrito de Celina foram os mais próximos, com 88% de similaridade.

Do município de Vargem Alta, os quatro isolados dividiram-se em pares, primeiro com os mais próximos entre si CCA-UFES/Bb-16 e CCA-UFES/Bb-17, com 88% de similaridade e segundo, dois e sete, com 81%, e entre os pares houve 64,5% de similaridade.

Coletados em Irupí, os isolados CCA-UFES/Bb-22, CCA-UFES/Bb-24, CCA-UFES/Bb-27 tiveram 75% de similaridade, contra 64,5% quando incorporado ao grupo o isolado 23 do mesmo município.

Os isolados vindos de Ibitirama tiveram 64,5% de similaridade, não apresentando a característica de proximidade como os demais.



**Figura 2-** Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA a partir da matriz de similaridade obtida pelo coeficiente Dice ilustrando a relação entre os 27 isolados de *Beauveria bassiana* e também relacionando ao padrão CNPSO (28).

Neste estudo evidencia-se, salvo algumas exceções, que o local de coleta foi peça chave na formação de grupos de isolados muito relacionados. Este resultado pode ser devido ao fato de todos os isolados serem provenientes do mesmo hospedeiro, a broca-do-café, visto que, geralmente, hospedeiros diferentes compõem uma importante fonte de variabilidade devido à capacidade de adaptação do entomopatógeno ao hospedeiro.

Estudos visando a associar a região de coleta com a diferenciação genética dos isolados são muito divergentes, pois alguns trabalhos evidenciam esta expectativa, enquanto outros não encontram nenhuma relação.

Comparando diversos isolados de *Beauveria* spp. provenientes de Nova Zelândia com isolados de outros países, Glare e Inwood (1998) realizaram uma análise RAPD utilizando 10 “primers”, tendo obtido 330 bandas que permitiram classificar os isolados em 4 grandes grupos: um grupo heterogêneo de *B. bassiana*/*B. brongniartii* procedentes da Nova Zelândia e de outros países; um segundo grupo contendo apenas isolados de *B. bassiana* de Nova Zelândia; um terceiro grupo contendo apenas isolados de *B. brongniartii* de Nova Zelândia e

outros países; e um quarto grupo formado por outras espécies de *Beauveria* (*B. velata*, *B. caledonica*, *B. amorpha* e *B. vermiconia*). Estes autores demonstraram desta forma que podem existir, ou não, isolados relacionados pela origem geográfica, principalmente os da mesma espécie deste entomopatógeno. Becerra Velasquez et al. (2007), estudando a diversidade molecular de populações chilenas de *Beauveria bassiana* através de RAPD e ITS (Internal Transcribed Spacer), detectaram variabilidade entre os isolados, porém não houve associação entre isolados provenientes de uma mesma região.

### 3.4. CONCLUSÕES

As coletas determinaram a ocorrência de *B. bassiana* sobre a broca-do-café no Espírito Santo.

Através da técnica RAPD, foi detectada variabilidade molecular entre os isolados de *Beauveria bassiana* provenientes do Espírito Santo.

Houve relação entre a origem geográfica e a proximidade genética da maioria dos isolados.

### 3.5. REFERÊNCIAS

BECERRA VELASQUEZ, V.; PAREDES, M.; ROJO, C.; FRANCE, I. RAPD e ITS detectan variación molecular en poblaciones chilenas de *Beauveria bassiana*. **Agricultura Técnica**, Santiago de Chile, v. 67, p.115-125, 2007. ( Falta algo nesta citação)

DRIVER, F.; MILNER, R.J. PCR Applications to the taxonomy of entomopathogenic fungi. IN: Bridge, P.D.; Arora, D.K.; Reddy, C.A.; Elander, R.P.; (ed.) **Applications of PCR in mycology**. Cab International, USA, 1998, 384p.

FENG, M.G.; POPRAWISK, T.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control. Current status, Review. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.4, p.3-34, 1994.

GLARE T.; INWOOD, A. Morfological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, p.250-256, 1998.

RHOLF, F.J. NTSYSpc: **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**, version 2.0 j Exeter Software Setauket, New York, 1993, 31p.

SANSON, R.A. Identification of entomopathogenic deuteromycetes. In: Burges H.D. (Ed) **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. Academic Press, London, 1981, p. 93-106.

SCHMIDT, H.C.; DE MUNER, L.H.; FORNAZIER, M.J. (eds.) 2004. **Cadeia produtiva do café arábica da agricultura familiar no Espírito Santo**. Vitória, ES: Incaper, 52p.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; TIGANO, M.S. ARANTES, O.M.N. Caracterização de Entomopatógenos. Capítulo 22. In: **Controle microbiano de Insetos**. Ed. Sérgio B. Alves. ESALQ, USP, Piracicaba, 1998, p.731-764.

## 4. CAPÍTULO 2

### SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* VISANDO AO CONTROLE DA BROCA-DO-CAFÉ NO ESPÍRITO SANTO



## RESUMO

A broca-do-café *Hypothenemus hampei* é uma das principais pragas da cultura, responsável pela maior parte dos defeitos durante a classificação do produto. *Beauveria bassiana* é um agente de controle biológico que causa enzootias naturalmente na população da praga. O presente estudo almejou selecionar dentre 27 isolados coletados sobre broca-do-café no Espírito Santo aquele(s) com melhores características para utilização no controle biológico da praga. Como padrão, foi utilizado o isolado ESALQ-447. Apesar de todos os isolados serem do mesmo tipo de inseto, ocorreu grande amplitude na virulência. Inicialmente foram selecionados os isolados que produziram mortalidade confirmada acima de 60%, são eles: CCA-UFES/Bb4, CCA-UFES/Bb11, CCA-UFES/Bb15, CCA-UFES/Bb18. Posteriormente, na determinação da  $CL_{50}$ , o isolado CCA-UFES/Bb15 teve melhor resposta, diferenciando-se do isolado padrão, com  $4,0 \times 10^4$  e  $11,85 \times 10^4$  conídios/ml, respectivamente. Os demais isolados não apresentaram diferenças entre si. O aumento na concentração da suspensão representou aumento na mortalidade. Na conidiogênese sobre os cadáveres da broca-do-café, o isolado padrão teve o melhor desempenho. Os resultados obtidos são promissores, dando subsídio a novas pesquisas, preferencialmente a campo.

**Palavras-chave:** cafeeiro, MIP, *Hypothenemus hampei*, conidiogênese, fungo entomopatígeno.

## ABSTRACT

The coffee berry borers *Hypothenemus hampei* is the main insect pest of coffee for to qualitative and quantitative losses in the grain. *Beauveria bassiana*, is a biological control agent with natural epizootics in population of the this insect pest. This study selected *B. bassiana* strain to potential to microbial control of coffee berry borers between 27 *B. bassiana* strains collected in the state of Espírito Santo. The *B. bassiana* ESALQ-447 strain was used as standard. The work was conducted in the Division of Entomology and Fitopathology of the Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI), located in the Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, in municipality of Alegre, Brazil Despite of the all strains were from *H. hampei*, there were high variability of the virulence. The strains CCA-UFES/Bb4, CCA-UFES/Bb11, CCA-UFES/Bb15, CCA-UFES/Bb18 showed confirmed mortality over 60% initial. Only The LC<sub>50</sub>, of the CCA-UFES/Bb15 strains was better response with significant difference between the standard, with  $4.0 \times 10^4$  in  $11.85 \times 10^4$  conidia / ml, respectively. There were proportional mortality with the increase in the concentration of the suspension for all strains. The *B. bassiana* as standard had the best performance in conidiogenesis on coffee berry borers cadavers.

**Keywords:** coffee, IPM, *Hypothenemus hampei*, conidiogenesis, entomopathogenic fungus.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

O Espírito Santo tem grande tradição na produção de café. O estado é o segundo maior produtor do país e tem a cafeicultura como principal geradora de empregos e renda no setor agrícola. Almejando mercados bem mais remunerados, porém muito exigentes, os produtores têm investido muito em melhorias na produtividade e principalmente na qualidade do produto (Schmitd et al., 2004).

A broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), inseto endêmico originário da África Central, é a praga mais importante da cultura em todo o mundo, causando a queda de frutos novos, perda de peso e a maior parte dos defeitos na classificação quanto ao tipo dos grãos e qualidade da bebida (Bustillo Pardey, 2005).

O controle químico é amplamente utilizado, visando à redução de danos provocados por este inseto, principalmente com aplicações de Endosulfan, um inseticida de largo espectro que apresenta uma série de limitações, como o alto custo das aplicações, impacto no agroecossistema e o desenvolvimento de populações resistentes (Brun et al., 1989). Desse modo, são necessários estudos básicos visando a desenvolver alternativas de controle, dentre as quais, destaca-se o controle biológico através da utilização de inimigos naturais (Santoro et al., 2005).

No Brasil, o fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) ocorre sobre a broca-do-café enzooticamente (baixa prevalência) em diversas regiões do país (Alves, 1998), sendo considerado o mais eficiente agente de controle microbiano desse inseto-praga (La Rosa et al. 1997).

Estudos em laboratório e em campo indicam que esse fungo tem potencial para ser utilizado desde que exista suficiente quantidade de inóculo para induzir o processo de doença (La Rosa, 2000). Na Colômbia, são relatadas taxas de infecção da broca-do-café em campo por *B. bassiana* variando de 20% a 90% (Bustillo Pardey, 2005). Vários autores têm demonstrado a capacidade infectiva da *B. bassiana* e seu potencial como agente de controle da broca-do-café (La Rosa et al., 1997; La Rosa, 2000).

No entanto, para o desenvolvimento de um programa de controle microbiano, a grande variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos deve ser explorada para que sejam utilizados isolados mais virulentos e adaptados ao inseto

e à região onde futuramente se pretende utilizar o isolado como bioinseticida (Alves, 1998). Sendo assim, o presente estudo almejou selecionar dentre isolados coletados sobre *H. hampei* no Espírito Santo aquele(s) com melhores características para utilização no controle biológico da broca-do-café.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Setor de Entomologia e Fitopatologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI) localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES). Os bioensaios foram montados em câmara de fluxo laminar. Foram utilizados os isolados de *B. bassiana* CCA-UFES/Bb-1, CCA-UFES/Bb-2, CCA-UFES/Bb-3, CCA-UFES/Bb-4, CCA-UFES/Bb-5, CCA-UFES/Bb-6, CCA-UFES/Bb-7, CCA-UFES/Bb-9, CCA-UFES/Bb-10, CCA-UFES/Bb-11, CCA-UFES/Bb-12, CCA-UFES/Bb-13, CCA-UFES/Bb-14, CCA-UFES/Bb-15, CCA-UFES/Bb-16, CCA-UFES/Bb-17, CCA-UFES/Bb-18, CCA-UFES/Bb-19, CCA-UFES/Bb-20, CCA-UFES/Bb-21, CCA-UFES/Bb-22, CCA-UFES/Bb-23, CCA-UFES/Bb-24, CCA-UFES/Bb-25, CCA-UFES/Bb-26, CCA-UFES/Bb-27. Como padrão foi utilizado o isolado ESALQ-447 por ser referência em estudos com *B. bassiana* (Habib et al., 1998).

### 4.2.1. Criação de broca-do-café *H. hampei*

Foram utilizados na alimentação da broca-do-café frutos de café verdes e maduros da espécie *Coffea canephora*. Os frutos foram coletados aleatoriamente em lavouras do Estado e encaminhados ao NUDEMAFI, onde foram selecionados e eliminados aqueles que visualmente apresentaram contaminação por microorganismos. Para assepsia dos frutos, os mesmos foram lavados em hipoclorito de sódio a 5%, enxaguados em água corrente e expostos em ambiente ventilado, sem o contato direto com luminosidade solar, por 24 horas. Transcorrido este tempo, aproximadamente 300 frutos foram acondicionados em gaiolas constituídas por tubo de PVC de 100 mm de diâmetro por 25 cm de altura e tampados com filó escuro por aproximadamente 7 dias, ou até o desaparecimento do excesso de umidade na tampa inferior. Após este período, os tubos foram

fechados também na parte superior com tampa de PVC. Os frutos permaneceram isolados da tampa inferior através de um tule preso por elástico que só permitia a passagem das brocas para a região inferior, de acordo com Hirose (2002).

Insetos sadios das gaiolas antigas foram transferidos para gaiolas com frutos novos para nova infestação. A coleta dos insetos foi realizada agitando-se as gaiolas manualmente, separando as brocas para a tampa inferior do tubo.

#### **4.2.2. Padronização dos isolados de *B. bassiana***

Inicialmente, os isolados de *B. bassiana* armazenados em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  no banco de entomopatógenos do NUDEMAFI foram repicados para placas de petri contendo meio de cultura BDA + levedura 10% e reativados com aspersão de conídios sobre adultos sadios de broca-do-café, causando infecção. Após 10 dias, utilizando os insetos que apresentaram conidiogênese, o material foi reisolado em novas placas contendo meio de cultura BDA + levedura 10%. Estas placas foram incubadas em câmara climatizada com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas, por 10 dias. Após este período, com auxílio de alça de platina, os conídios foram coletados e semeados novamente em meio de cultura por toda a placa, permanecendo por 10 dias, para então ser utilizado nos experimentos. Este processo de repicagem permite a utilização dos isolados sem a diminuição de sua virulência.

#### **4.2.3. Germinação de *B. bassiana***

Para determinar o índice de germinação dos isolados, foram preparadas suspensões de conídios dos isolados previamente padronizados e inoculados em placas de Petri com água/ágar, mantidos com temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e fotofase de 12 horas, por um período de 20 horas. Logo após, com o auxílio de um microscópio e de um hemacitômetro, foi feita a avaliação dos esporos germinados e não germinados para cálculo da porcentagem de germinação.

#### **4.2.4. Seleção inicial**

Foram utilizadas placas de petri (8cm) contendo na parte inferior um disco de

papel absorvente. Na parte superior da placa, foi colado, por pressão, um chumaço de algodão embebido em água destilada para manutenção da umidade. A cada placa (repetição), foram adicionados 30 adultos jovens de *H. hampei*. Para cada isolado (tratamento), com o auxílio de um pulverizador manual, foi aplicado 0,5mL da suspensão de conídios em água estéril e espalhante (Tween 80 a 0,02%) na concentração de  $1 \times 10^5$  conídios/ml sobre estes insetos. Para alimentação dos insetos, foram depositados 250 mg de café cru moído no interior de cada placa. Como testemunha, foi aplicado 0,5 mL de água estéril e espalhante (Tween 80 a 0,02%) sobre os insetos.

Os recipientes foram acomodados em bandejas plásticas e mantidos em câmara climatizada com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotofase de 12 horas, por 6 dias.

No sexto, dia foi feita a avaliação que consistiu em contar e separar os indivíduos mortos. Para confirmação da causa da morte, os cadáveres foram lavados em água estéril e transferidos para câmara úmida por um período de 4 dias, quando foi realizada a contagem dos que apresentaram conidiogênese.

Determinou-se a mortalidade corrigida em relação à testemunha utilizando a fórmula de Abbott (1925) e a mortalidade confirmada utilizando a porcentagem de insetos mortos que apresentaram conidiogênese. Para cada tratamento, foram feitas 5 repetições. O delineamento foi o inteiramente casualizado, e as médias submetidas ao teste de Scott Knott a 5%, adaptado de Neves & Hirose (2005).

#### **4.2.5. Estimativa da concentração letal $CL_{50}$**

O teste de concentração letal foi efetuado utilizando como base a metodologia empregada na seleção inicial, porém, utilizando apenas os isolados pré-selecionados. Foram testadas as concentrações de  $1 \times 10^5$ ,  $7,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$  e  $1 \times 10^3$  conídios/ml. Os dados de mortalidade confirmada foram submetidos à análise de Probit para estimar a  $CL_{50}$ , utilizando o programa POLO-PC (LeOra Software, 1987).

#### **4.2.6. Estimativa da produção de conídios sobre cadáveres de *H. hampei***

Dos insetos que apresentaram conidiogênese na concentração de  $1 \times 10^5$  conídios/ml, pelos isolados pré-selecionados, foram coletados aleatoriamente

50 cadáveres, que foram divididos em 5 grupos iguais (repetições). Cada grupo foi colocado em um tubo de ensaio contendo 10 mL de água mais Tween 80 a 0,02% e agitado. Em seguida, foi realizada a contagem dos conídios em hemacitômetro para estimativa da produção. Os dados foram submetidos ao teste de tukey a 5%.

### **4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1. Seleção inicial**

Na fase inicial, optou-se por selecionar os materiais com maior capacidade de causar mortalidade em adultos da broca-do-café na concentração de  $10^5$  conídios/ml (Tabela 1), pois esta concentração é bem próxima da recomendada pelos fabricantes de bioinseticidas à base *B. Bassiana* como o formulado comercial Boveril<sup>®</sup>, que tem como princípio ativo o isolado ESAQ 447 (Garcia & Alves, 2005).

**Tabela 1-** Mortalidade média  $\pm$  EP (%) de adultos da broca-do-café provocada por *B.bassiana* na concentração  $10^5$  conídios /ml ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase 12 Horas).

Isolados	Mortalidade	
	Corrigida	Confirmada
CCA-UFES/Bb-15	89,32 $\pm$ 4,55 A	70,83 $\pm$ 4,10 A
CCA-UFES/Bb-11	85,06 $\pm$ 4,11 A	67,77 $\pm$ 4,09 A
CCA-UFES/Bb-18	82,96 $\pm$ 1,85 A	64,23 $\pm$ 1,13 A
CCA-UFES/Bb-4	80,17 $\pm$ 1,01 A	62,43 $\pm$ 1,28 A
CCA-UFES/Bb-17	63,70 $\pm$ 1,72 B	49,25 $\pm$ 1,12 B
CCA-UFES/Bb-5	62,83 $\pm$ 0,86 B	48,42 $\pm$ 1,16 B
CCA-UFES/Bb-3	61,67 $\pm$ 4,37 B	47,49 $\pm$ 2,85 B
CCA-UFES/Bb-6	55,45 $\pm$ 2,39 C	43,63 $\pm$ 3,30 B
CCA-UFES/Bb-1	55,26 $\pm$ 4,09 C	41,24 $\pm$ 1,83 C
CCA-UFES/Bb-10	53,47 $\pm$ 4,39 C	40,11 $\pm$ 3,13 C
CCA-UFES/Bb-28	53,33 $\pm$ 2,35 C	47,33 $\pm$ 2,98 B
CCA-UFES/Bb-9	52,79 $\pm$ 2,25 C	38,86 $\pm$ 1,39 C
CCA-UFES/Bb-16	52,58 $\pm$ 5,85 C	40,30 $\pm$ 3,76 C
CCA-UFES/Bb-2	51,02 $\pm$ 3,18 C	36,10 $\pm$ 3,76 C
CCA-UFES/Bb-24	50,90 $\pm$ 4,79 C	29,03 $\pm$ 4,65 D
CCA-UFES/Bb-13	49,21 $\pm$ 3,77 C	34,14 $\pm$ 3,59 C
CCA-UFES/Bb-20	44,05 $\pm$ 6,87 D	29,33 $\pm$ 5,07 D
CCA-UFES/Bb-25	43,19 $\pm$ 5,24 D	27,76 $\pm$ 3,84 D
CCA-UFES/Bb-14	41,20 $\pm$ 1,79 D	29,07 $\pm$ 1,42 D
CCA-UFES/Bb-7	40,77 $\pm$ 4,01 D	25,66 $\pm$ 2,90 D
CCA-UFES/Bb-22	40,69 $\pm$ 2,93 D	28,66 $\pm$ 1,59 D
CCA-UFES/Bb-12	40,65 $\pm$ 2,69 D	28,31 $\pm$ 1,80 D
CCA-UFES/Bb-26	40,14 $\pm$ 5,06 D	31,11 $\pm$ 4,81 D
CCA-UFES/Bb-23	36,28 $\pm$ 7,37 D	24,88 $\pm$ 4,83 D
CCA-UFES/Bb-27	34,76 $\pm$ 2,59 D	21,81 $\pm$ 1,40 D
CCA-UFES/Bb-21	31,68 $\pm$ 4,21 D	21,92 $\pm$ 3,62 D
CCA-UFES/Bb-19	27,21 $\pm$ 5,63 D	18,48 $\pm$ 5,19 D

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott knott a 5%.

Foi detectada grande variabilidade entre os isolados, mesmo sendo todos provenientes do mesmo inseto. Foram obtidas mortalidades confirmadas entre 70,83



e 18,48% para CCA-UFES/Bb15 e CCA-UFES/Bb19, respectivamente e, corrigida entre 89,32 e 27,21 para estes mesmos isolados (Tabela 1). La Rosa et al. (1997) e Neves & Hirose (2005), testando outros isolados de *B. Bassiana* para o controle da broca-do-café, também observaram grande amplitude na taxa de mortalidade. De maneira geral, não houve muita discrepância entre os valores de mortalidade corrigida e confirmada para um mesmo isolado, indicando coerência nos resultados (Tabela 1).

Foram pré-selecionados os isolados CCA-UFES/Bb-4, CCA-UFES/Bb-11, CCA-UFES/Bb-15, CCA-UFES/Bb-18 com base na mortalidade confirmada, pois a ocorrência de esporulação é importante e necessária para manutenção e disseminação do patógeno no campo após sua aplicação, contribuindo para a ocorrência de epizootias, importante característica do controle biológico por fungos (Oliveira et al., 2002). Foi adotado o nível de seleção de 60% de mortalidade, que pode ser considerado satisfatório em relação aos trabalhos realizados anteriormente, além de que os isolados que superaram esta meta se diferenciaram estatisticamente dos demais (Tabela 1).

#### **4.3.2. Estimativa da concentração letal $CL_{50}$**

Os dados se adaptaram ao modelo de Probit, mostrando um  $\chi^2$  não significativo e baixa heterogeneidade. Os intervalos de confiança determinaram diferenças significativas entre os isolados (Tabela 2).

**Tabela 2-** Respostas de dose-mortalidade  $\pm$  EP de broca-do-café a diferentes isolados de *B. bassiana*, IC. 95%.

Isolado	n <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (x10 <sup>4</sup> conídios/ml)	Coeficiente angular	g.l. <sup>b</sup>	$\chi^2$
ESALQ-447	150	11,85 (8,71-17,80)	0,86 $\pm$ 0,08	5	3,60
CCA-UFES/Bb-4	150	6,90 (5,05-10,40)	1,00 $\pm$ 0,08	5	5,95
CCA-UFES/Bb-11	150	5,75 (4,03-9,25)	1,05 $\pm$ 0,08	5	9,74
CCA-UFES/Bb-15	150	4,00 (2,81-6,08)	0,95 $\pm$ 0,07	5	8,78
CCA-UFES/Bb-18	150	7,90 (5,23-14,46)	1,01 $\pm$ 0,08	5	10,20

<sup>a</sup> Número de brocas testadas

<sup>b</sup> Graus de liberdade

O isolado CCA-UFES/Bb15 apresentou a melhor resposta de CL<sub>50</sub> diferindo do padrão, isolado ESALQ 447, que necessitou de maior concentração (Tabela 2).

Para todos os isolados selecionados, assim como para o padrão, o aumento na concentração representou aumento na mortalidade, mostrando que a quantidade de inóculo teve influência direta na mortalidade, indicando que a maior quantidade de conídios em contato com o inseto possibilitou mais eficiência durante a colonização. De acordo com Neves & Hirose (2005), que observaram o mesmo comportamento durante estudos envolvendo *B. bassiana* e *H. hampei*, altas concentrações tornam a colonização mais rápida, evitando a proliferação de microorganismos competidores que possam prejudicar o entomopatógeno.

As diferenças na virulência dos isolados, refletidas tanto na seleção inicial quanto na determinação da CL<sub>50</sub>, são características naturais dos fungos entomopatogênicos. A espécie *B. bassiana*, especialmente, pode apresentar alta variabilidade genética natural como demonstrado por Carneiro et al. (2004).

#### 4.3.3. Estimativa da produção de conídios sobre cadáveres de *H. hampei*

O isolado ESALQ 447 teve o melhor desempenho na conidiogênese sobre os cadáveres da broca-do-café, superando os demais. Desta forma, nota-se que a virulência não está diretamente relacionada com a produção de conídios, visto que a menor produção foi a dos isolados mais eficientes na mortalidade (Tabela 3).

**Tabela 3-** Número de conídios de *B. bassiana* produzidos, média  $\pm$  EP e aumento potencial de produção em cadáveres da broca-do-café.

Isolados	n	Número de conídios/broca x 10 <sup>6</sup>	APP <sup>a</sup>
ESALQ-447	150	8,54 $\pm$ 0,20 a	2,12
CCA-UFES/Bb18	150	5,07 $\pm$ 0,13 b	1,26
CCA-UFES/Bb11	150	4,46 $\pm$ 0,14 bc	1,11
CCA-UFES/Bb15	150	4,16 $\pm$ 0,14 c	1,03
CCA-UFES/Bb4	150	4,02 $\pm$ 0,19 c	-

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

<sup>a</sup> Aumento potencial de produção = conídios produzidos pelo isolado/conídios produzidos pelo isolado CCA-UFES/Bb4.

Estes resultados concordam com os obtidos por Neves e Hirose (2005) que também tiveram ESALQ 447 como o maior produtor de conídios, mesmo não sendo este o mais virulento dos isolados testados. Assim, demonstra-se não haver relação entre a produção de conídios e a virulência dos isolados.

#### 4.4. CONCLUSÕES

Ocorreu grande amplitude na virulência, apesar do hospedeiro em comum.

Os isolados CCA-UFES/Bb4, CCA-UFES/Bb11, CCA-UFES/Bb15, CCA-UFES/Bb18 tiveram ótimos resultados, apresentando CL<sub>50</sub> baixa, equiparando-se ou até mesmo superando o padrão ESALQ 447.

A mortalidade causada pelos isolados foi inversamente proporcional à sua produção de conídios.

Os resultados obtidos são promissores, dando subsídio a novas pesquisas, preferencialmente a campo.

#### 4.5. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, p. 265-266, 1925.

ALVES, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos. p.289-382. In Alves, S. B. (ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

BRUN, L., C. MARCILLAUD, V. GAUDICHON & D. SCUKLING. **Endosulphan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in Caledonia**. *Journal of Economic Entomology*, California, v.82, p.1311-1316, 1989.

BUSTILLO P.A.E. El papel del control biológico en el manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, Santafé de Bogotá, V.29, p.55-68, 2005.

CARNEIRO, A.L.; GOMES, E.A.; NONATO, L.F.V.; BRITTO, M.A.; FERNANDES, F.T.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARÃES, C.T.; CRUZ, I. 2004. **Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas do milho – *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda***. Sete Lagoas, Comunicado Técnico 93, 10p.

GARCIA, M.O.; Alves, S.B. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga*. **Revista Laranja**, Cordeirópolis, v. 26, p.1-10, 2005.

HABIB, M.E.M.; ALVES, S.B.; ALVES, L.F.A. Padronização de inseticidas microbianos. p.779-797. In Alves, S. B. (ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1998, 1163p.

HIROSE, E.; NEVES, P.M.O.J. . Técnica para criação e manutenção da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 161-164, 2002.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC: An user's guide to Probit or Logit analysis.** LeOra Software, Berkely, CA, 1987.

NEVES, Pedro 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, p. 77-82, 2005.

OLIVEIRA, R.C.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J. Suscetibilidade de *Oligonychus yothersi* (Acari: Tetranychidae) ao fungo patogênico *Beauveria bassiana*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p. 187-189, 2002.

ROSA, W. DE LA, ALATORRE, R.; TRUJILLO, J.; BARRERA, J.F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham v.90, p.1534-1538, 1997.

ROSA, W. DE LA, ALATORRE, R.; BARRERA, J.F.; TORIELLO, C. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. **Journal of Economic Entomology**. Lanham, v.93, p.1409-1414, 2000.

SANTORO, P.H.; NEVES, P.M.O.J. ; SILVA, R.Z. ; CAVAGUCHI, S.A. ; ZORZETTI, J. Produção de esporos de *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill. num processo bifásico utilizando diferentes meios líquidos . **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, p. 313-320, 2005.

SCHMIDT, H.C.; DE MUNER, L.H.; FORNAZIER, M.J. (eds.) 2004. **Cadeia produtiva do café arábica da agricultura familiar no Espírito Santo**. Vitória, ES: Incaper, 52p.