

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

**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**

Luiz Henrique Costa Mota

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2013**

Luiz Henrique Costa Mota
Engenheiro Agrônomo

**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**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JÚNIOR

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2013**

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

Mota, Luiz Henrique Costa

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 / Luiz Henrique Costa Mota. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
84 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Armadilha 2. Broca-do-café 3. Controle biológico 4. Epizootia 5. Fungos entomopatogênicos 6. Semioquímicos I. Título

CDD 632.768
M917d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus ,

AGRADEÇO

Aos meus pais José Luiz e Miraci

Aos meus irmãos Josimar e Verônica

À minha avó Deraldina (In memoriam)

Pelo apoio e incentivo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos em todas as etapas de minha vida.

À minha família pelo apoio que me faz a buscar meus objetivos.

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

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

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

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

Ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento, pelas sugestões dadas a esta pesquisa.

Ao doutorando Weliton Dias da Silva pelas valiosas contribuições dadas a esta pesquisa.

À Prof^a. Dra. Clarice Garcia Borges Demétrio e a Dra. Renata Alcarde, pelo auxílio nas análises estatísticas.

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.

A todos que de alguma forma contribuíram com essa pesquisa, em especial: Gleidyane Mielezrski e Johanna Cuervo (pela ajuda na elaboração das referências), Ana Beatriz Zanardo, Celeste D'Alessandro, Glaucia Moreira e Vanessa Duarte

(pelas contribuições na parte escrita), Odimar Zanardi (pela ajuda na confecção dos gráficos), Antônio Bianchi (pelo abstract) e a Janayne Rezende e Giuliano Pauli (pelas sugestões).

Aos amigos de república, Gabriel Rugno, Giovani Coura, Marcos Conceschi, Claudio Gladenucci e aos amigos Aloisio Coelho, Vitor Beloti, Rízia Andrade, Fernanda Müller, Fernando Consolaro, pelos almoços e momentos de descontração.

A Paulo Barbosa e Danuza Araújo, pelos conselhos e amizade desde a graduação.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Importância de <i>Hypothenemus hampei</i>	17
2.2 Aspectos bioecológicos de <i>Hypothenemus hampei</i>	17
2.2.1 Descrição e ciclo de vida de <i>Hypothenemus hampei</i>	17
2.2.2 Aspectos comportamentais de <i>Hypothenemus hampei</i>	18
2.3 Controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	19
2.3.1 Controle químico	19
2.3.2 Controle por comportamento: uso de armadilhas com atraentes químicos para monitoramento e controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	20
2.3.3 Controle biológico	21
2.4 Utilização de tecidos sintéticos impregnados com entomopatógenos no controle de pragas	23
2.5 Armadilhas de auto-inoculação de insetos praga por entomopatógenos.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Seleção de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> sensu lato para o controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	27
3.1.1 Criação de <i>Hypothenemus hampei</i>	27
3.1.2 Procedência dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e preparo das suspensões	28
3.1.3 Seleção de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> para o controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	29

3.2 Produção e viabilidade de <i>Beauveria bassiana</i> após impregnação em diferentes tecidos têxteis e seu potencial para o controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	30
3.2.1 Seleção de um tecido têxtil para utilização como substrato de produção do fungo <i>Beauveria bassiana</i> após impregnação nos tecidos.....	30
3.2.2 Mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i> após exposição por diferentes períodos a conídios de <i>Beauveria bassiana</i> produzidos após impregnação sobre tecido têxtil.....	32
3.2.3 Influência da luz na viabilidade e concentração de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> produzidos após impregnação em tecido têxtil	33
3.2.4 Viabilidade e concentração de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> produzidos após impregnação sobre tecido têxtil ao longo do armazenamento em diferentes umidades relativas do ar	33
3.3 Eficiência de armadilha de auto-inoculação para o controle de <i>Hypothenemus hampei</i> com <i>Beauveria bassiana</i> em tecido sintético em condições de campo	34
3.3.1 Armadilha de auto-inoculação	35
3.3.2 Delineamento experimental dos estudos de campo com armadilhas.....	37
3.3.2.1 Captura de <i>Hypothenemus hampei</i> pelas armadilhas e avaliação da sua infecção por <i>Beauveria bassiana</i> na armadilha de auto-inoculação.....	39
3.3.2.2 Monitoramento da viabilidade e concentração de <i>Beauveria bassiana</i> produzido após impregnação sobre faixas de tecido na armadilha de auto-inoculação	40
3.3.3 Dados climáticos	42
3.4 Análise estatística.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Resultados.....	45
4.1.1 Seleção de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> para controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	45

4.1.2 Produção e viabilidade de <i>Beauveria bassiana</i> após impregnação em diferentes tecidos têxteis e seu potencial para controle de <i>Hypothenemus hampei</i>	46
4.1.2.1 Seleção de um tecido têxtil para utilização como substrato de produção do fungo <i>Beauveria bassiana</i> após impregnação sobre os tecidos	46
4.1.2.2 Mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i> expostos por diferentes períodos a conídios de <i>Beauveria bassiana</i> produzidos após impregnação sobre tecido têxtil	48
4.1.2.3 Influência da luz na viabilidade e concentração de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> produzidos após impregnação em tecido têxtil	50
4.1.2.4 Viabilidade e concentração de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> produzidos após impregnação sobre tecido têxtil ao longo do armazenamento em diferentes umidades relativas do ar	52
4.1.3 Eficiência de armadilha de auto-inoculação para o controle de <i>Hypothenemus hampei</i> com <i>Beauveria bassiana</i> em tecido sintético em condições de campo	54
4.2 Discussão	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
REFERÊNCIAS	77

RESUMO

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

O controle de *Hypothenemus hampei* é realizado basicamente com uso de inseticidas químicos, especialmente aqueles a base de endossulfan, cuja comercialização será proibida no Brasil a partir de julho de 2013. Diante disso, outras estratégias devem ser integradas buscando-se o controle desta praga com menor impacto ao ambiente. Nesse contexto, o fungo *Beauveria bassiana* destaca-se como um dos agentes de controle biológicos mais promissores. Neste estudo, buscou-se a associação da técnica de impregnação de tecido têxtil com *B. bassiana* associado à armadilha contendo a mistura de alcoóis metanol: etanol (1:1 v/v) como atraentes químicos para *H. hampei*, visando a auto-inoculação e disseminação do fungo pelo inseto, visando o seu controle. Inicialmente foi determinado em laboratório, a virulência de nove isolados de *B. bassiana*, através da pulverização de suspensões de 10^7 conídios.mL⁻¹, diretamente sobre adultos de *H. hampei*. Todos os isolados apresentaram baixa virulência ao inseto, com mortalidade máxima de 38,5%. O isolado ESALQ-PL63 foi escolhido para dar continuidade aos estudos por possuir registro de comercialização. Posteriormente, sete tecidos têxteis sintéticos foram avaliados quanto à produção do isolado selecionado sobre sua superfície em duas condições de luz (fotofase de 0 e 12 horas). O tecido sintético Lã “Sherpa” foi selecionado por permitir uma maior produção de conídios nas duas condições testadas, atingindo até $5,44 \times 10^8$ conídios.cm⁻². A exposição de *H. hampei* ao tecido com o fungo por apenas 5 segundos foi suficiente para causar 88,5% de mortalidade dos insetos. Em área de café sombreado foram conduzidos dois experimentos para avaliar uma armadilha de auto-inoculação contendo o patógeno produzido sobre o tecido. Foram usadas duas armadilhas controle, sendo uma armadilha de auto-inoculação sem fungo e uma armadilha de eficiência reconhecida (modelo IAPAR). A eficiência de coleta da armadilha de auto-inoculação com o fungo foi menor do que a armadilha IAPAR, mas esta se mostrou eficiente na contaminação e mortalidade dos insetos pelo fungo. No primeiro experimento, a mortalidade confirmada pelo patógeno no último dia de avaliação (151 dias) foi de 64,7%. A viabilidade dos conídios passou de 98,3%, logo após a montagem das armadilhas, para 86,9% após 65 dias. Após 160 dias a viabilidade reduziu para 44,0%. No segundo experimento, a última avaliação foi realizada após 40 dias, sendo nesta data observada mortalidade confirmada de 89,9% e viabilidade dos conídios de 78,1%. Em ambos os experimentos a concentração de conídios reduziu-se ao longo do tempo. O sistema de auto-inoculação apresentou resultados promissores, mas sendo necessárias alterações na armadilha para aumentar a captura de insetos e estudos epizootiológicos para avaliar a capacidade de disseminação da doença no campo pelos insetos que passaram pela armadilha.

Palavras-chave: Entomopatógenos; Disseminação; Epizootia; Semioquímico; Broca-do-café

ABSTRACT

Development of self-inoculation trap for controlling *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) in synthetic fabric

The control of *Hypothenemus hampei* is accomplished primarily with the use of chemical insecticides, mainly endosulfan, whose commercialization will be prohibited in Brazil in July 2013. Therefore, other strategies must be integrated seeking control of this pest with less impact on the environment. In this context, the fungus *Beauveria bassiana* stands out as one of the most promising biological control agents. In this study, we associated the technique of fabric impregnated with *B. bassiana* with a trap containing a mixture methanol: ethanol (1:1 v/v) as an attractive chemical for *H. hampei*, aiming the self-inoculation and fungus dissemination by the insect, therefore their control. Initially, we determined in the laboratory, the virulence of nine isolates of *B. bassiana* using a spray suspension of 10^7 conidia.mL⁻¹ directly on adults of *H. hampei*. All isolates showed low virulence to insects, with maximum mortality of 38.5%. The isolate ESALQ-PL63 was chosen to continue the studies for having a market register. Subsequently, seven synthetic fabrics were evaluated for the production of the selected isolate on its surface under two light conditions (photofase of 0 and 12 hours). The synthetic fabric Lã “Sherpa” was selected because it allows greater conidia production under the two conditions tested, reaching 5.44×10^8 conidia.cm⁻². Exposure of *H. hampei* to the fabric impregnated with the fungus for only 5 seconds was enough to cause 88.5% of insect mortality. In an area of shaded coffee, two experiments were conducted to evaluate a self-inoculation trap containing the pathogen. We used two control traps without fungus: one self-inoculation trap without the fungus and a widely recognized efficient trap (IAPAR model). The collection efficiency of the self-inoculation trap with the fungus was lower than that of the IAPAR trap, however, it proved effective in contamination and insect mortality caused by the fungus. In the first experiment, mortality caused by the pathogen at the last evaluation day (151 days) was 64.7%. The viability of the conidia surpassed 98.3% after the assembly of the traps and 86.9%, after 65 days. After 160 days, the viability decreased to 44.0%. In the second experiment, the last evaluation was performed after 40 days, when we observed mortality of 89.9% and conidia viability of 78.1%. In both experiments, the conidia concentration reduced over time. The self-inoculation system showed promising results, but changes are needed to increase insect catches and further epizootiological studies to assess the possibility of disease spread in the field by insects that crossed the trap.

Keywords: Entomopathogens; Dissemination; Epizootics; Semiochemical; Coffee berry borer

1 INTRODUÇÃO

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), é o principal inseto-praga da cafeicultura mundial, causando perdas quantitativas e qualitativas sobre a produção (VEGA et al., 2009).

O controle de *H. hampei* é realizado de forma diferenciado dependendo do sistema de cultivo do cafeeiro. No Brasil o sistema convencional de produção de café é predominante. Entretanto, nos últimos anos a produção de café orgânico vem apresentando grandes crescimentos por meio da expansão do mercado interno e da conquista de novos nichos de mercado.

Apesar da conjuntura econômica favorável, o segmento apresenta algumas dificuldades, especialmente no manejo fitossanitário da cultura, incluindo o controle de *H. hampei*. A inexistência de técnicas eficientes de manejo e compatíveis com os sistemas orgânicos tem sido uma séria limitação. Por outro lado, o controle dessa espécie-praga nos sistemas convencionais de cultivo é dependente quase que exclusivamente da aplicação de formulações de inseticidas sintéticos tendo como ingrediente ativo o endossulfan (MAPA/Agrofit, 2012). Contudo, devido a sua periculosidade comprovada, tanto para o homem quanto para o meio ambiente, estes inseticidas serão totalmente banidos do Brasil a partir de julho de 2013 (BRASIL, 2010). Neste sentido, alternativas de controle para a broca-do-café que apresentem menor impacto ao homem e ao meio ambiente e que sejam economicamente viáveis fazem-se necessárias no manejo dessa praga.

Apesar de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil (Ascomycota: Hypocreales) apresentar potencial para o controle da broca-do-café e frequentemente causar enzootias neste inseto, até o momento poucos são os estudos que demonstraram a eficácia deste fungo no controle de *H. hampei* em condições de campo. Para viabilizar essas pesquisas, é necessário que sejam desenvolvidos estudos básicos para a seleção de isolados de alta eficiência e técnicas adequadas de liberação deste patógeno.

Como exemplo de método de liberação de fungos entomopatogênicos, tem-se a técnica de impregnação de tecido têxtil com esses patógenos, que pode contribuir para manter o inóculo em campo aumentando assim, sua eficácia. Essa técnica já foi testada no controle de *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae) (HIGUCHI et al., 1997) *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Coleoptera:

Cerambycidae) (DUBOIS et al., 2004a; HAJEK et al., 2006) e *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae) (MARANNINO et al., 2008) e apresentaram resultados promissores. Diferentemente desses coleópteros que caminham nos troncos das plantas hospedeiras após a emergência, *H. hampei* permanece no interior dos frutos durante boa parte do seu ciclo de vida e apenas as fêmeas recém-copuladas e que ainda não ovipositaram, denominadas colonizadoras, é que abandonam o fruto onde se desenvolveram para colonizarem frutos novos (MATHIEU et al., 2001), momento este em que estão expostas a ação dos entomopatógenos.

Outra técnica empregada na captura e monitoramento da broca-do-café é a utilização de armadilhas atrativas contendo mistura de álcoois, tais como o etanol e metanol (UEMURA-LIMA et al., 2010).

A associação desses dois métodos, ou seja, armadilha atrativa mais entomopatógenos, poderia ser útil no manejo integrado de *H. hampei* em cafezais. De acordo com Batista-Filho; Abrahão; Cruz (1988), a aplicação de conídios puros de *B. bassiana* na parede interna de uma armadilha utilizada para o monitoramento da broca-do-café, resultou em infecção de até 100% dos insetos capturados. No entanto, não mostraram informações quanto à persistência deste sistema no campo. Dessa forma, objetivou-se desenvolver um método para viabilizar a disseminação do fungo *B. bassiana* impregnado em tecido têxtil através de armadilhas contendo atraentes químicos para o controle de *H. hampei*. Para tanto, foram realizados estudos de seleção de isolados para utilização nas armadilhas, escolha de um tecido sintético que permitisse a maior produção do fungo, determinar o período de tempo necessário para que os insetos adquirissem a concentração letal de conídios sobre o tecido selecionado, determinar a longevidade dos conídios em tecido quando armazenados em diferentes condições de umidades relativas e luminosidades. Por fim, estudar em campo o uso de tecido contendo conídios do fungo em uma armadilha atrativa ao inseto para o seu controle.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância de *Hypothenemus hampei*

Nas regiões tropicais há aproximadamente 25 milhões de produtores de café sendo que a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), é a principal praga de cafeicultura mundial (JARAMILLO et al., 2011). *H. hampei* foi introduzida no Brasil, pela região de Campinas/SP, em 1913, a partir de sementes infestadas vindas da África, seu local de origem, estando hoje presente em todas as regiões cafeeiras do país (SOUZA; REIS, 1997).

Ao se alimentar das sementes do café, a broca causa prejuízos quantitativos, como a queda prematura de frutos e perda de peso dos grãos, e qualitativos, como a perda do valor comercial do produto devido aos grãos brocados (DAMON, 2000). Além disso, o ataque aos frutos ocorre em qualquer estágio de maturação, desde verdes até maduros (cerejas) ou secos (SOUZA; REIS, 1997). Quando ocorrem 20% de grãos brocados a perda de peso no café beneficiado pode chegar a 6,8% e nos casos mais severos, com 80% de grãos brocados as perdas no peso dos grãos podem alcançar 24,4% (PIMENTA; VILELA, 1999). Adicionalmente, devido ao orifício de entrada da broca no fruto, ocorre à entrada de diversos microrganismos, dentre estes, fungos produtores de toxina que depreciam a qualidade da bebida e podem afetar a saúde humana.

2.2 Aspectos bioecológicos de *Hypothenemus hampei*

2.2.1 Descrição e ciclo de vida de *Hypothenemus hampei*

Os ovos de *H. hampei* são elípticos ou levemente ovóides de coloração leitosa com diâmetro do eixo maior e menor de 0,599 e 0,314 mm, respectivamente (BERGAMIN, 1943). As larvas apresentam cápsula cefálica larga de coloração amarelo-palha com bordos levemente recurvados. As pupas inicialmente são brancas se tornando amareladas com a formação dos apêndices do inseto (FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007). O adulto da broca é um besouro de coloração preta, corpo cilíndrico e ligeiramente recurvado para a região posterior. Os élitros são revestidos de cerdas e escamas piriformes, as fêmeas apresentam 1,75 mm de

comprimento e os machos assemelham morfológicamente com as fêmeas, sendo, entretanto, menores com 1,24 mm de comprimento e com asas rudimentares. A fêmea abre galerias nos frutos, local onde coloca seus ovos, podendo colocar de dois a três ovos por dia com oviposição regular de 15 a 20 dias após o início da postura, decrescendo posteriormente. O número de fêmeas é dez vezes maior que de machos (BERGAMIN, 1943).

A broca-do-café é uma espécie críptica passando o seu ciclo de ovo a adulto dentro do fruto (MATHIEU et al., 2001). Seu ciclo biológico sofre influência direta das condições climáticas e do estágio fenológico do fruto. Fernández e Cordero (2007) estudando a biologia de *H. hampei*, observaram que a 27,1 °C e 65,3% UR obtêm-se uma duração de 4,2 dias para fase de ovo, 11,1 dias para larva, 2,6 dias pré-pupa, 5,3 dias para pupa. Bergamin (1943) observou que a 24,5 °C a duração total do ciclo deste inseto ocorre em 27,5 dias. Nestas condições a longevidade média das fêmeas pode chegar a 156 dias e dos machos, de 78 a 103 dias. Jaramillo et al. (2009) estudaram alguns parâmetros biológicos de *H. hampei* em diferentes temperaturas (15 a 33 °C), determinaram os limites térmicos de desenvolvimento deste inseto, sendo 14,9 °C o limite inferior e 32 °C o limite superior. Para a temperatura de 25 °C o ciclo de ovo-adulto foi de 27 dias onde observaram a maior taxa reprodutiva.

2.2.2 Aspectos comportamentais de *Hypothenemus hampei*

O comportamento deste inseto é bastante peculiar. Fêmeas virgens após a cópula abandonam os frutos nativos para procurarem novos hospedeiros, essas são denominadas fêmeas colonizadoras enquanto os machos permanecem dentro do fruto onde nasceram (MATHIEU et al., 2001). Silva et al., (2012) observaram em laboratório que fêmeas e machos virgens da broca-do-café, acasalam poucas horas após a emergência, possuindo um comportamento de pré-cópula, cópula e pós-cópula, semelhantes a outros Scolytinae. Dentre os principais fatores que mais influenciam o abandono do fruto pela broca é possível citar: o estágio fenológico do fruto, aumento da luminosidade, voláteis emitidos pelos frutos, período chuvoso e o estado fisiológico das fêmeas (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997, FERREIRA et al., 2000).

A localização dos frutos de café pela broca, que é fator chave para o início do processo de alimentação, também pode ser mediado pela emissão de voláteis dos frutos, sendo que a resposta é mais evidente em frutos maduros quando comparados aos verdes e secos (GEORDANENGO; BRUN; FRÉROT, 1993). Mathieu; Malosse e Frérot (1998) identificaram 45 substâncias químicas liberadas pelos frutos, divididas em cinco grupos químicos: os alcoóis, cetonas/aldeídos, acetatos, terpenos, e sesquiterpenos. Mais recentemente seis compostos voláteis eletrofisiologicamente ativos de *Coffea arabica* L foram identificados sendo que quatro destas substâncias mostraram respostas significativas a *H. hampei* (MENDESIL et al., 2009).

A infestação de uma nova safra de café é iniciada por insetos oriundos dos frutos remanescentes da safra anterior e considerando a biologia da praga é possível afirmar que as medidas de controle devem acontecer entre o final de uma safra e o início da maturação de frutos da safra seguinte. Dessa forma o controle de adultos deve ser concentrado previamente ao início das posturas (CURE et al., 1998). Teixeira; Souza e Costa (2006) observaram que 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.

2.3 Controle de *Hypothenemus hampei*

2.3.1 Controle químico

A broca-do-café é notoriamente de difícil controle, por passar quase todo o ciclo de vida dentro da semente do café. O período que o inseto é mais vulnerável ao controle químico é no final da entressafra, quando as fêmeas colonizadoras saem para encontrar novos frutos (DAMON, 2000). Como isso, o sucesso no controle de *H. hampei* depende de uma amostragem correta para determinação dos níveis de infestação. Recomenda-se que a aplicação de inseticidas químicos seja realizada quando a porcentagem de infestação chegar a 5%. Os principais produtos químicos para o controle da broca são à base do ingrediente ativo endossulfan (MAPA/Agrofit, 2012). Novas alternativas de controle devem ser buscadas, pois esta molécula possui elevada toxicidade ao homem e ao meio ambiente e, por esta razão sua

comercialização será proibida no Brasil a parti de julho de 2013 (BRASIL, 2010). Além disso, já foram registrados casos de resistência de *H. hampei* a essa molécula (BRUN et al. 1989; BRUN et al., 1990).

2.3.2 Controle por comportamento: uso de armadilhas com atraentes químicos para monitoramento e controle de *Hypothenemus hampei*

Mendonza-Moura (1991) foi um dos pioneiros a demonstrar a atração de *H. hampei* por armadilhas contendo metanol: etanol. Posteriormente a constatação de que a atração de *H. hampei* por frutos de café é mediada por voláteis produzidos por estas estruturas, e a identificação dos compostos envolvidos nessa atração (GEORDANENGO; BRUN; FRÉROT, 1993; MATHIEU; MALOSSE; FRÉROT, 1998) despertou ainda mais o interesse para o desenvolvimento de armadilhas iscadas com atraentes químicos para o monitoramento e controle desse inseto, sendo a mistura dos alcoóis metanol e etanol a mais utilizada como atrativo em armadilhas para captura da broca-do-café. Mathieu et al. (1997), estudando o efeito da cor e da taxa de liberação do atraente etanol: metanol (1:1) na captura de fêmeas da *H. hampei* em armadilhas de múltiplos funis, observaram que a cor vermelha exerceu a maior atração visual combinada com a menor taxa de liberação do atraente químico (0,5 g/dia/difusor). Silva, Ventura e Morales (2006) trabalharam com armadilhas adaptadas do modelo IAPAR, constituídas de garrafas plásticas de 2 L contendo uma abertura de 13 × 18 cm, constataram que a proporção metanol: etanol (1:1) colocadas a 1,20 m do nível do solo, foi eficiente para a captura da brocas. Uemura-Lima et al. (2010) trabalhando com o modelo IAPAR e suas modificações na captura de *H. hampei* nos períodos vegetativos e reprodutivos de plantas de café, tiveram para o modelo IAPAR capturas de 22,8 e 118,6 brocas/armadilha, respectivamente. Dufour e Frérot (2008) mostraram que armadilhas iscadas com etanol: metanol, colocadas a 1,20 m do nível do solo aliadas a coloração vermelha aumentou substancialmente a atração da broca-do-café. Esses autores sugerem uma densidade de 22 armadilhas/ha espaçadas a 15 m para monitoramento e controle desse inseto.

Apesar de vários estudos com armadilha contendo atraentes químicos para monitoramento e controle de *H. hampei*, os resultados são conflitantes não havendo uma recomendação adequada de uso.

2.3.3 Controle biológico

A utilização de inimigos naturais como parasitóides, predadores e patógenos é uma alternativa promissora para o controle da broca-do-café do ponto de vista social, econômico e ambiental. Os parasitóides *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethyridae), *Prorops nasuta* Waterston (Hymenoptera: Bethyridae) e *Phymastichus coffea* La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) são as espécies que se encontram comumente associadas a *H. hampei* (DAMON, 2000). Em 1929, o parasitóide *P. nasuta*, vulgarmente denominado vespa-de-Uganda foi introduzido no Brasil para controle da broca, porém sem sucesso (SOUZA; REIS, 1997).

Dentre os inimigos naturais para controle de *H. hampei*, os fungos têm se destacado por possuírem um número variado de espécies que infectam *H. hampei*, tais como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, *Isaria farinosa* (Holmsk), *I. fumosorosea* Wize, *Lecanicillium lecanii* (Zimm), *Nomuraea rileyi* (Farl) Samson e *Ophiocordyceps entomorrhiza* (Dicks) (BUSTILLO et al., 1999; VEGA et al., 1999). Entretanto, De La Rosa et al., (2000) constataram condições de campo que *B. bassiana* é mais eficiente no controle de *H. hampei* do que *M. anisopliae*. O fungo *B. bassiana* também tem sido a espécie mais relatada em todo mundo (VEGA et al., 2009). No Brasil, *B. bassiana* foi relatada ocorrendo naturalmente sobre *H. hampei* no litoral e norte do Paraná (VILLACORTA, 1984), no Espírito Santo (BENASSI, 1995), em Minas Gerais (SOUZA; REIS, 1997), e em Rondônia (COSTA et al., 2002). Quando *B. bassiana* infecta *H. hampei*, os insetos morrem geralmente próximo à coroa do fruto, com o corpo coberto por esporos esbranquiçados o que contribui para disseminação deste agente promovendo outros focos da doença no campo (NEVES; HIROSE, 2005).

Com o propósito de avaliar a ação dos fungos como agentes entomopatogênicos no controle de *H. hampei*, diversos trabalhos foram desenvolvidos em condições de campo e laboratório, utilizando para isso, inúmeras metodologias. Jiménez-Gómez (1992) desinfestou superficialmente a cutícula das brocas com água destilada mais 0,025% de Triton X-100, posteriormente, através da imersão das brocas por 10s nas suspensões 10^7 conídios.mL⁻¹ observaram após 8 dias mortalidade entre 7,1 e 94,4%. González; Posada e Bustillo (1993) avaliaram dois isolados de *B. bassiana* para controle da broca-do-café. Eles desinfestaram a

superfície da cutícula do inseto com 0,5% de hipoclorito de sódio, imergiram as brocas por 2 min em 10^7 conídios.mL⁻¹, obtendo uma mortalidade 88,9 e 100% após 10 dias de incubação dos insetos. Dez dias após a pulverização das brocas com 10^7 conídios.mL⁻¹ de isolados de *B. bassiana*, observou-se uma redução de 75% na sobrevivência com um TL₅₀ de 6,25 dias quando pulverizados com o isolado 8906. Para outros cinco isolados também avaliados a mortalidade variou de 24,1 a 35% (VARELA; MORALES, 1996).

Quando *H. hampei* foi inoculado por imersão em concentração de 10^6 conídios.mL⁻¹ de isolados de *B. bassiana* e alimentados com café pergaminho durante oito dias de incubação a mortalidade foi de 18,8 a 93% (HARAPRASAD et al., 2001). Quando a mesma concentração foi aplicada em plantas de café em campo após 24 dias observaram uma mortalidade superior a 70%. De La Rosa et al. (2000) fizeram pulverizações de *B. bassiana* e *M. anisopliae* para controle da broca-do-café em cafezais de diferentes altitudes na dose de 10^9 conídios por planta. As porcentagens de mortalidade variaram de 14,3 a 40,6% para *B. bassiana* e 6,3 a 22,1% para *M. anisopliae*. A pulverização de *B. bassiana* em grãos de café em terreiro de secagem na concentração 10^{11} conídios/mL resultou em 50% de infecção da população emergente (OKUMURA et al., 2003).

Neves e Hirose (2005) selecionaram isolados de *B. bassiana* para controle da *H. hampei*, aplicando 0,1 mL da suspensão fúngica de 10^7 conídios.mL⁻¹ diretamente com pulverizador “Pasche” sobre os insetos mantidos em tubos de vidro, e obtiveram uma mortalidade corrigida de 23,6 a 68% em cinco dias após a inoculação. Mortalidades de 100% dos insetos foram obtidas para 47 isolados inoculados por imersão por 2 min em suspensões de 10^7 conídios.mL⁻¹ (0,1% de Tritonx X-100) de *B. bassiana*, após 17 dias (POSADA; VEGA, 2005).

Quando mistura de isolados de *B. bassiana* com baixa virulência individual a *H. hampei* foram aplicados resultou em mortalidade elevada chegando a 93% (CRUZ; GAITAM; GONGORA, 2006). Pulverizações com suspensão de 10^9 conídios de *B. bassiana* por cafeeiro diretamente sobre frutos de café infestados artificialmente com *H. hampei* colocadas sobre o solo na base das plantas resultaram em redução de até 74% dos insetos presentes no interior das bagas, após 30 dias da aplicação (VERA et al., 2011). A aplicação de 10^7 conídios.mL⁻¹ de isolados de *B. bassiana* em disco de papel de filtro, resultou em mortalidade de 53 a 95,7% da broca-do-café (SAMUELS; PEREIRA; GAVA, 2010).

A aplicação do fungo em campo pode ser realizada pulverizando toda a planta, durante o período de “trânsito da broca”, e quando a infestação atingir entre 1% e 2% de frutos atacados. As concentrações a serem usadas variam entre $1,0 \times 10^{12}$ a $2,0 \times 10^{12}$ conídios/hectare devendo ser aplicados em 200 a 400 litros de calda, sempre em constante agitação (NEVES; SANTORO; SILVA, 2006).

2.4 Utilização de tecidos sintéticos impregnados com entomopatógenos no controle de pragas

Baseados no conhecimento do comportamento de alguns cerambicídeos que apresentam o hábito de andarem no tronco de árvores após emergirem foram desenvolvidos estratégias de uso de tecidos têxteis impregnados com fungos entomopatogênicos e colocadas em torno dos troncos de árvores para infecção desses coleópteros e disseminação do patógeno no ambiente. Stand et al., (1991) inocularam o fungo *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch em tecido, resultando em sua esporulação na superfície deste material. Este tecido foi colocado em volta de troncos de árvores o que resultou em até 100% de mortalidade de *Semanotus japonicus* (Coleoptera: Cerambycidae). Shimazu et al., (1995) utilizaram tecido impregnados com *B. bassiana* colocados também em troncos de árvores para controle de larvas de *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae), alcançando 100% de mortalidade das larvas. Posteriormente, novos estudos foram conduzidos com o fungo *B. brongniartii* impregnado em fibra de tecido onde foi possível a constatação de 70% de infecção do coleóptero *Psacotha hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) em condições de campo (HIGUCHI et al., 1997). Os mesmos autores constataram ainda que, quando tecidos impregnado com o fungo foram armazenadas por 400 dias a 5°C em sacos de polietileno e também por 30 dias a 37°C, o fungo não mostrou perda significativa da sua infectividade, o que resultou no produto comercial Biolisa Kamikiri®.

O uso de fibra de tecido inoculado com os fungos *B. brongniartii*, (Biolisa Kamikiri®), *B. bassiana* e *M. anisopliae* foi estudado no campo e em laboratório por vários autores no controle de *Anoplophora glabripennis* Motschulsky (Coleoptera: Cerambycidae), obtendo resultados satisfatórios (DUBOIS et. al., 2004a; 2004b; HAJEK et. al., 2006; SHANLEY; HAJEK, 2008; SHANLEY et. al., 2009). Shanley et. al (2009) observaram que tecido impregnado com *M. anisopliae* expostas a

condições de campo, permaneceram virulentas a adultos de *A. glabripennis* por 112 dias. Shanley e Hajek (2008) observaram que a dispersão de conídios de *M. anisopliae* presentes em tecidos, após serem colocadas em troncos de árvores possui potencial para controle de *A. glabripennis*.

A utilização de tecido têxtil de poliéster impregnados com *B. bassiana* resultou em 32% de mortalidade de *Agilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) (LIU; BAUER, 2008). Marannino et. al. (2008) estudando em laboratório o efeito de fibra de tecidos impregnado com conídios de *M. anisopliae* para o controle de *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae) observaram mortalidade de até 100% dos insetos. Tecido impregnado com *M. anisopliae* em troncos de *Carya illinoensis* (Wangenh.) resultou em aproximadamente 50% de mortalidade de *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) (SHAPIRO-ILAN et al., 2009a) e posteriormente usando metodologia similar com fibra de tecido contendo de *M. anisopliae*, encontrou mortalidade superior a 80% de *C. caryae* (SHAPIRO-ILAN et al., 2009b). Esses resultados mostram que esta técnica é eficiente, permanecendo infectivo a estes insetos alvo por vários dias em condições de campo e merecem ser estudadas para o controle de outras pragas.

2.5 Armadilhas de auto-inoculação de insetos praga por entomopatógenos

O uso de armadilhas iscadas com atraentes químicos em associação com agentes entomopatogênicos para o controle de insetos praga já foi estudada por diversos autores (VEGA; DOWD; BARTELT, 1995). Maniania (1998) testou dispositivos para atrair as moscas tsé-tsé *Glossina pallidipes*, *G. longipennis*, *G. fuscipes fuscipes* (Diptera: Muscidae) e após contato com os conídios de *M. anisopliae* colocados sobre malha de náilon em uma armadilha atrativa alcançaram 80% de infecção e com eficiência de mais de 21 dias no campo.

Armadilha para auto-inoculação de *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) por *M. anisopliae*, por meio de conídios puros espalhados sobre um tecido aveludado colocado na região central de uma armadilha tubular, resultaram em mortalidade de 100% para os insetos atraídos pela cor amarela que passaram pelo dispositivo em condições de laboratório, (MIGIRO et al., 2010). Niassy et al. (2011) testaram um dispositivo de auto-inoculação de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) com *M. anisopliae* espalhado sobre um pano

de veludo colocado dentro da armadilha. Estes autores obtiveram resultados promissores alcançando mortalidade superior a 77%.

Conídios puros de *B. bassiana* foram colocados na parede interna de armadilha utilizada para monitoramento de *H. hampei*, alcançando 100% de infecção de *H. hampei* capturadas (BATISTA-FILHO; ABRAHÃO; CRUZ, 1988). No entanto não se tem relato da duração deste tipo de controle no campo, levando em consideração o tempo em que o patógeno fica infectivo a esse inseto e merecendo estudos mais aprofundados para tentar uma forma de viabilizar esse tipo de controle para broca-do-café.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia e na Fazenda Areão da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.1 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* sensu lato para o controle de *Hypothenemus hampei*

3.1.1 Criação de *Hypothenemus hampei*

Os insetos foram obtidos da criação estoque do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos da ESALQ/USP. A população inicial desta criação foi oriunda de área de café (*Coffea arabica* L. var. Catuaí Vermelho) produzido organicamente, localizado na cidade de Dois Córregos, São Paulo. No laboratório (23 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas) as brocas foram mantidas em recipientes plásticos ($17,5 \times 12,5 \times 6,5$ cm) forrados com papel toalha e sobre estes, disposta uma camada dupla de café pergaminho hidratado em água por volta de cinco dias para que a umidade ficasse em torno de 45%. As tampas dos recipientes foram furadas e vedadas com tecido “voile” preto para circulação de ar. Esse procedimento foi realizado com fêmeas colonizadoras que saíam naturalmente dos pergaminhos infestados em busca de outros frutos, para induzir novas infestações e continuidade da criação (SILVA, et al., 2012).

Nos bioensaios foram utilizadas fêmeas “colonizadoras” de *H. hampei* com 1 a 10 dias de idade apresentando cutícula totalmente melanizada. As coletas das brocas, para realização dos bioensaios, foram realizadas após a saída natural desses insetos do pergaminho, a qual ocorre no período vespertino. Ao observar as revoadas no interior dos recipientes de criação, estes foram transferidos para gaiolas maiores e as brocas que encontradas nas paredes da gaiola foram coletadas com auxílio de tubos de vidro.

3.1.2 Procedência dos isolados de *Beauveria bassiana* e preparo das suspensões

Isolados de *B. bassiana* (Tabela 1) foram multiplicados em placas de Petri (90 × 15 mm) contendo Meio de cultura de Esporulação (ME: 0,36 g de KH₂PO₄; 1,05 g de Na₂HPO₄ 7H₂O; 0,60 g de MgSO₄ 7H₂O; 1,00 g de KCL; 10,0 g de glucose; 1,58 g de NaNO₃; 5,00 g de extrato de levedura; 20,0g de Agar e; 1000 mL de água destilada) estéril. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar, a partir da transferência de pequena quantidade de inóculo que foi posteriormente espalhado por toda a área da placa, utilizando uma alça de Drigalski. As placas contendo os diferentes isolados do fungo foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) por um período de 10 dias, a 26 ± 1 °C e 12 horas de fotofase para esporulação. Os isolados encontram-se armazenados em freezer (-40 °C) na forma de conídios puros e pertencem ao banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ/USP.

Tabela 1 - Procedência dos isolados de *Beauveria bassiana* sensu lato utilizados para avaliação da virulência a fêmeas "colonizadoras" de *Hypothenemus hampei*

Isolados	Origem	Procedência
ESALQ-PL63	<i>Atta</i> sp.	Piracicaba, SP
ESALQ-252	<i>Hypothenemus hampei</i>	Piracicaba, SP
ESALQ-1456	Solo de cafezal	Guaxupé, MG
ESALQ-1457	Solo de cafezal	Guaxupé, MG
ESALQ-1081	Solo de cafezal	Piracicaba, SP
ESALQ-1436	<i>H. hampei</i>	Piracicaba, SP
ESALQ-1451	<i>H. hampei</i>	Piracicaba, SP
ESALQ-1455	<i>H. hampei</i>	Campinas, SP
CB-66	<i>H. hampei</i>	São José do Rio Pardo, SP

Para o preparo das suspensões fúngicas que foram aplicadas sobre as brocas, os conídios desenvolvidos sobre o meio de cultura foram desagregados das placas através da adição de 20 mL de água destilada mais espalhante adesivo Tween 20[®] (0,05%) e raspagem com espátula estéril. Esta suspensão foi filtrada em tubo de fundo chato (85 × 25 mm) com uma gaze e após a filtragem a mesma foi

homogeneizada em aparelho Vortex[®]. Após diluições seriadas sua concentração foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer e posteriormente as suspensões foram padronizadas para 10^7 conídios viáveis.mL⁻¹ para aplicação sobre as brocas. Visando determinar a concentração de conídios viáveis.mL⁻¹ utilizou-se a metodologia proposta por Oliveira (2009), sendo feita duas placas para cada isolado.

3.1.3 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Hypothenemus hampei*

Para os bioensaios de seleção foi adotado o delineamento experimental inteiramente aleatorizado, composto por nove isolados de *B. bassiana* (Tabela 1) e o tratamento controle, totalizando 10 tratamentos com quatro repetições de 13 brocas cada (n=52). Este experimento foi repetido duas vezes no tempo.

Grupos de 13 brocas foram coletados da criação (item 3.1.1) com auxílio de tubos de vidro e transferidos para placas de Petri (40 mm de diâmetro). Estas placas foram colocadas no centro de placas de Petri maiores (140 mm de diâmetro) e em seguida procedeu-se a pulverização das brocas com alíquotas de 1 mL da suspensão fúngica (item 3.1.2) utilizando Torre de Potter com pressão de 15 libras.pol⁻¹. No tratamento controle, os insetos receberam igual quantidade de água destilada mais espalhante adesivo Tween 20[®] (0,05%) estéril. Após a pulverização, com auxílio de pincel (n^o zero) de cerdas macias os insetos foram individualizados em placas de poliestireno, sendo uma placa de 24 poços para cada repetição, em seguida os insetos foram alimentados com pedaços de aproximadamente 1 mm³ de café pergaminho, hidratados por cinco dias através da imersão em água destilada. As placas contendo as brocas foram acondicionadas em câmara climatizada tipo B.O.D com 26 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ UR e 24 h de escotofase.

As avaliações foram realizadas diariamente, durante um período de 10 dias contabilizando o número de brocas mortas. Detectada a mortalidade, a superfície externa dos insetos foi desinfestada por meio da imersão em álcool 70% por aproximadamente um minuto e lavagem com água destilada estéril. As brocas desinfestadas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente, por um período de 10 dias, para confirmação da mortalidade através da esporulação do patógeno.

3.2 Produção e viabilidade de *Beauveria bassiana* após impregnação em diferentes tecidos têxteis e seu potencial para o controle de *Hypothenemus hampei*

O isolado ESALQ-PL63 selecionado no experimento anterior (item 3.1) foi utilizado para comparar a produção de conídios viáveis sobre diferentes tecidos têxteis bem como para verificar a eficiência do tecido selecionado e impregnado com o fungo no controle de *H. hampei*, em condições de laboratório. Posteriormente, foi desenvolvido um estudo utilizando o tecido selecionado e impregnado com o fungo associado a uma armadilha de auto-inoculação para o controle de *H. hampei* no campo.

3.2.1 Seleção de um tecido têxtil para utilização como substrato de produção do fungo *Beauveria bassiana* após impregnação nos tecidos

O isolado ESALQ-PL63 foi produzido em meio ME conforme descrito no item 3.1.2. Dois discos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados com auxílio de um vazador estéril e inoculados em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido Sabouroud Dextrose e Extrato de Levedura (SDY: 40 g de dextrose, 10 g de peptona, 10 g de extrato de levedura para 1000 mL de água destilada). Os frascos foram mantidos sob agitação contínua em “shaker”, a 170 rpm, 26 ± 1 °C e com fotofase de 12 horas por um período de cinco dias.

Tecidos têxteis de 30 × 30 mm (referidos também como tecidos não tecido ou tecidos sintéticos e artificiais descritos na Tabela 2) foram fixados em quadrados plásticos utilizando cola do tipo adesiva de contato tradicional Cascola[®] e após 24 horas de secagem foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Para impregnação do tecido com o meio contendo o patógeno, 150 mL do meio líquido contendo células fúngicas conforme descrito anteriormente, foram misturados a 500 mL de meio Sabouroud Dextrose Ágar e Extrato de Levedura (SDAY: 40 g de dextrose, 10 g de peptona, 10 g de extrato levedura, 20 g de ágar para 1000 mL de água destilada) com uma temperatura de aproximadamente 45 °C. Tanto no meio líquido usado para crescimento do patógeno, quanto no meio sólido morno, foram acrescentados 0,5 g.L⁻¹ de antibiótico (Pentabiótico Veterinário Reforçado, Fort Dodge[®] Saúde Animal Ltda). Em câmara de fluxo laminar, os tecidos foram

submersos nesta mistura em um Becker com capacidade para 2 L (um por repetição), e retirados em seguida com o auxílio de uma pinça sendo o excesso de meio escorrido. Posteriormente os tecidos foram dispostos em bandejas plásticas estéreis, forradas com papel alumínio e vedadas com filme plástico de PVC (Magipack[®]) com pequenos furos para permitir a troca de ar com o ambiente. As bandejas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D a 25 ± 1 °C, $60 \pm 10\%$ UR por um período de 10 dias para esporulação do patógeno (adaptado de SHANLEY et al., 2009).

Tabela 2 - Especificações dos tecidos têxteis utilizados para avaliação do melhor substrato para impregnação do fungo *Beauveria bassiana*

Tecidos Têxteis*	Gramatura (g.m⁻²)	Composição
Lã "Sherpa"	180	100% Poliéster
Sofit	-	100% Poliéster
Jade 100	100	50% Poliéster e 50% Viscose
Jade 200	200	50% Poliéster e 50% Viscose
Poly R1	100	100% Poliéster
Poly R2	100	100% Poliéster
Poly Esmeralda	300	100% Poliéster

* Tecidos referidos também como tecidos não tecido (Nonwoven) ou tecidos sintéticos e artificiais
- Informação não encontrada

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 7×2 , sendo, sete tecidos sintéticos (Tabela 2) e duas condições de luminosidade (0 e 12 horas de fotofase) com quatro repetições de um quadrado de tecido cada, e o experimento foi repetido duas vezes no tempo.

O parâmetro avaliado para seleção do melhor tecido foi o número de conídios viáveis.cm⁻². Para isso, os conídios produzidos na superfície dos tecidos foram desagregados dos mesmos para quantificação seguindo metodologia adaptada de Higuchi et al. (1997). Os tecidos foram colocados em frascos de vidro de 250 mL (marca Schott), contendo 50 mL de solução com dois espalhantes; 0,01% Tween 80[®] e 0,075% Solubiol. Os frascos foram mantidos sob agitação contínua em "shaker", a 300 rpm, em 26 ± 1 °C por 40 minutos, colocados por 1 minuto em aparelho Ultrason e em seguida, agitados manualmente. Aproximadamente 10 mL da suspensão foi filtrada em tubo de ensaio (85 x 25 mm) com uma gaze. Após a

filtragem, a suspensão de conídios foi homogeneizada em aparelho Vortex® e sua concentração foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer. Para avaliação da viabilidade dos conídios utilizou-se o método proposto por Oliveira (2009), permitindo a determinação do número conídios viáveis.cm⁻² presente nos tecidos.

3.2.2 Mortalidade de *Hypothenemus hampei* após exposição por diferentes períodos a conídios de *Beauveria bassiana* produzidos após impregnação sobre tecido têxtil

Na armadilha de auto-inoculação proposta no item 3.3.1 para controle da broca-do-café por meio da sua contaminação pelo fungo *B. bassiana* ao sair por um orifício onde o fungo é colocado impregnado em um tecido têxtil. Sendo assim, o tempo de contato do inseto com esses conídios deve ser suficiente para aquisição de uma concentração letal.

Em observações preliminares quanto ao tempo em que as brocas colocadas dentro da armadilha de auto-inoculação levariam para sair, observou-se que algumas brocas conseguiam atravessar o orifício de saída com menos de 10 segundos o que poderia não ser suficiente para que este inseto adquirisse uma quantidade suficiente de conídios para provocar a sua mortalidade. Assim, a realização deste estudo visa determinar qual o menor tempo de exposição aos conídios presentes no tecido para infecção da broca pelo patógeno. Esse conhecimento é necessário para determinar as dimensões do orifício de saída e do tecido impregnado com o fungo na armadilha.

Fêmeas “colonizadoras” de *H. hampei* foram submetidas ao contato com conídios de *B. bassiana* (isolado ESALQ-PL63) por diferentes tempos de exposição. Para isso, pedaços do tecido sintético Lã “Sherpa” (30 × 30 mm) foram impregnados com meio de cultura contendo o patógeno, e a concentração de conídios viáveis.cm⁻² determinada conforme item 3.2.1 (n=4). Foram montados dois experimentos em delineamento inteiramente aleatorizado com três tempos de exposição (5, 25 e 50 s) e com quatro repetições contendo 13 insetos cada (n=52). As brocas foram coletadas com tubos de vidro (item 3.1.1) e cuidadosamente colocadas sobre o tecido contendo o fungo esporulado e acondicionados em placa de Petri (90 × 15 mm). Após os respectivos tempos de exposição, os tecidos foram virados sobre um

papel filtro com auxílio de uma pinça para auxiliar na coleta das brocas utilizando para isso, um pincel de cerda macia número 0. Os insetos foram acondicionados em placa de Petri (90 × 15 mm) e alimentados com pedaços de 1 mm³ de pergaminho de café hidratado. As placas foram tampadas com tela branca de malha fina, incubadas e a mortalidade avaliada conforme item 3.1.1.

No segundo experimento quantificou-se o número de conídios aderidos ao corpo das brocas após a exposição aos tecidos contendo o patógeno nos respectivos tempos. Neste experimento realizou-se quatro repetições com 10 insetos cada (n=40) que foram expostos aos conídios do patógeno conforme descrito anteriormente. Após a exposição grupos de 10 brocas (repetição) foram colocados em tubos Eppendorf sendo em seguida adicionado 1 mL de Tween 80[®] (0,01%), homogeneizado em aparelho Vortex[®] e o número de conídios foi determinado em câmara de Neubauer.

3.2.3 Influência da luz na viabilidade e concentração de conídios de *Beauveria bassiana* produzidos após impregnação em tecido têxtil

Os pedaços de Lã “Sherpa” (30 × 30 mm) foram impregnados com meio de cultura contendo o patógeno e avaliados conforme item 3.2.1. Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada do tipo B.O.D a 25 ± 1 °C, 60 ± 10% UR com 0 ou 12 horas de fotofase. Foi adotado o delineamento inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 2 x 4, ou seja, duas condições de luminosidade, 12 horas de fotofase (com duas lâmpadas fluorescentes com aproximadamente 850 lux cada) e escuridão total com 4 tempos de avaliações (10, 15, 30, e 45 dias após inoculação), e quatro repetições (um pedaço de tecido) sendo este experimento repetidos três vezes no tempo.

3.2.4 Viabilidade e concentração de conídios de *Beauveria bassiana* produzidos após impregnação sobre tecido têxtil ao longo do armazenamento em diferentes umidades relativas do ar

O delineamento experimental foi o inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 3 × 4, sendo, três condições de umidades relativas do ar (40, 60 e 80%) e 4 tempos

de avaliações (5, 15, 30, 45 após armazenamento), com cinco repetições de três pedaços do tecido para cada tempo de avaliação (n=15).

As umidades relativas foram conseguidas utilizando solução de hidróxido de potássio (500 mL por câmara de umidade) (SOLOMON, 1952). Para manutenção das referidas umidades relativas foram utilizadas câmaras de umidades constituídas de pote plástico circular com capacidade para 3,2 L (22,9 × 21,3 × 12,0 cm - Samremo[®], linha Flor), com um anel de borracha na tampa que proporcionou a vedação hermética (CASTRO, 2011). Na parte interna das câmaras de umidade foi colocado um suporte plástico com parte superior e central contendo uma tela plástica que serviu como apoio das unidades experimentais (pedaços de tecido com patógeno) que por sua vez localizava-se em uma placa de Petri de plástico de 14 cm de diâmetro. As respectivas umidades internas foram confirmadas antes da montagem do experimento através de um termohigrômetro digital colocado no interior de uma câmara sobre o suporte interno em cada um dos tratamentos. Os pedaços (30 × 30 mm) do tecido sintético Lã "Sherpa" foram impregnados com meio contendo o isolado ESALQ-PL63 sendo o número de conídios e sua viabilidade quantificada conforme item 3.2.1. Após a inoculação todos os quadrados do tecido foram colocados em bandejas e incubados em B.O.D. a 25 ± 1 °C, UR $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Após 10 dias de incubação, a viabilidade e a concentração de conídios de 5 pedaços do tecido foram quantificados e este resultado extrapolado para todas as unidades experimentais (pedaços do tecido) usadas no início do experimento. Assim, todos os quadrados do tecido foram mantidos nas câmaras dos seus respectivos tratamentos após atingirem a esporulação máxima (10 dias após inoculação), considerando que a concentração inicial foi de $4,4 \pm 0,07 \times 10^8$ conídios.cm⁻² e a viabilidade de $98,7 \pm 0,4\%$. As avaliações de concentração e viabilidade dos conídios no tecido de todos os tratamentos foram feitas aos 5, 15, 30 e 45 dias após o armazenamento em B.O.D a 25 ± 1 °C e fotofase de 12 horas.

3.3 Eficiência de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* com *Beauveria bassiana* em tecido sintético em condições de campo

Uma armadilha de auto-inoculação para controle de *H. hampei* foi desenvolvida contendo no seu interior um recipiente para liberação gradual do

atraente químico etanol: metanol na proporção de 1:1 e conídios do fungo *B. bassiana* produzido após impregnação sobre tecido têxtil selecionado no item 3.2.1. Esta armadilha foi utilizada no campo em diferentes estudos a fim de testar a sua eficiência de captura bem como a persistência do fungo em campo utilizando a armadilha IAPAR, reconhecidamente eficiente para captura deste inseto, como modelo de comparação (controle positivo) e o modelo de armadilha de auto-inoculação sem o patógeno como controle negativo.

3.3.1 Armadilha de auto-inoculação

A descrição da armadilha de auto-inoculação desenvolvida está apresentada na Figura 1. Esta constitui-se de um tubo cilíndrico com diâmetro na parte superior de 7,50 cm e inferior de 6,5 cm sendo que na parte superior encontram-se distribuídos de forma triangular 10 orifícios para permitir a entrada dos insetos na armadilha. Internamente, separando a parte superior da parte inferior encontra-se um funil para evitar a fuga das brocas pela parte superior após entrarem na armadilha. Nas laterais da parte basal do compartimento inferior encontram-se conectados, de forma rosqueável, dois tubos cilíndricos de 8,0 cm de comprimento. Estes são transparentes, com orifício interno de 3,3 cm de diâmetro e uma abertura (3,3 × 3,5 cm) voltada para baixo da armadilha, para permitir a saída da broca da armadilha. Neste caso, a saída dos insetos seria estimulada pela entrada de luz pelo orifício dos tubos e devido ao fototropismo positivo apresentado pelas fêmeas “colonizadoras” da broca. Como a armadilha foi pintada de preto no compartimento inferior (11,5 cm), a entrada de luz ocorreu somente pelo orifício dos tubos contendo o tecido com fungo, por onde, então, as brocas foram forçadas a sair. A parte superior da armadilha foi pintada de vermelho (7,5 cm) e no local de união do funil foi colocada uma fita adesiva vermelha, já que reconhecidamente é atraente para fêmeas ‘colonizadoras’ de *H. hampei* (MATHIEU et al., 1997).

Foi colocada uma cobertura circular preta de 19,5 cm de diâmetro onde com auxílio de um arame fino foi fixado um frasco difusor de vidro e com tampa de borracha com uma abertura central de 2 mm para permitir a liberação do atraente químico. Este frasco ficou na parte interna da armadilha, restrito ao local superior onde se encontra os orifícios para entrada das brocas. A cobertura também tem o objetivo de evitar a entrada de água da chuva.

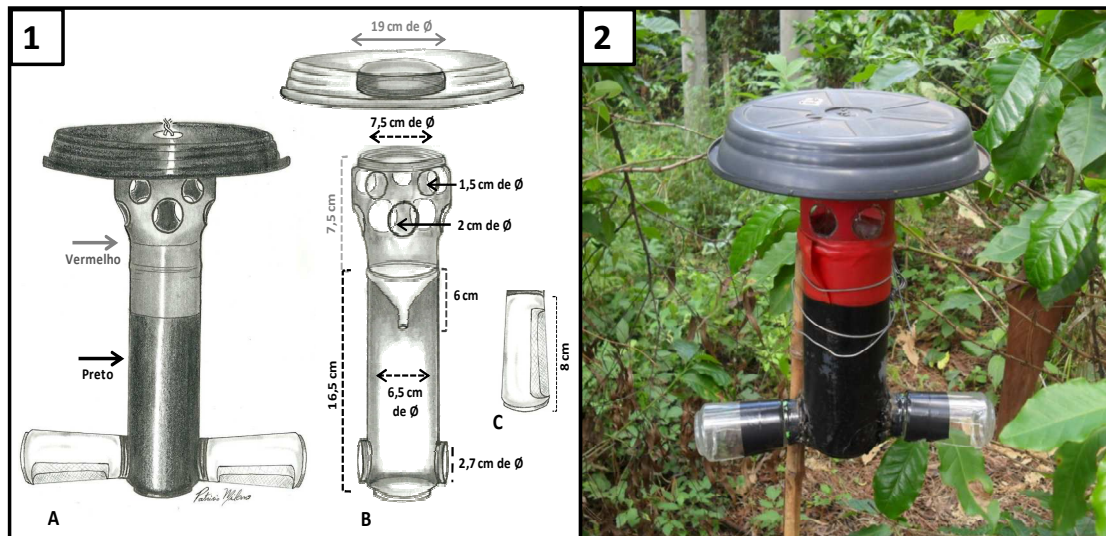


Figura 1 – 1: A. Visão externa da armadilha de auto-inoculação. B. Visão interna mostrando de cima para baixo: tampa com rosca onde é fixado o frasco difusor, orifícios de entrada dos insetos, funil, compartimento inferior com duas aberturas onde são inseridos os tubos cilíndricos com rosca, C. Tubo cilíndrico, contendo na parte proximal, rosca para inserção no compartimento inferior da armadilha e onde a faixa de tecido com fungo é colada e na parte distal orifício para entrada de luz e para permitir a saída das fêmeas ‘colonizadoras’ de *Hypothenemus hampei* e 2: Foto da armadilha de auto-inoculação instalada no local do experimento

Para montagem do tecido selecionado contendo o fungo na armadilha, inicialmente as faixas de Lã “Sherpa” (8 × 1 cm) foram autoclavadas a 120 °C por 20 min. Estas faixas foram então coladas com adesivo Cascola[®], na parede interna dos tubos de saída (Figura 1 C) que haviam sido esterilizados com álcool 70% e submetidos à luz UV por 40 min. Os tubos contendo as faixas de tecido foram mantidos na câmara de fluxo por aproximadamente 12 horas para secagem da cola, sendo posteriormente expostos por 40 min sob luz UV. Em seguida, foi feita a impregnação do fungo no tecido por imersão do tubo de saída no meio de cultura contendo o fungo em crescimento, como descrito no item 3.2.1. Após a esporulação do patógeno, os tubos foram rosqueados nas armadilhas. Para garantir uma menor incidência de luz diretamente sobre o patógeno, foi colocada uma fita adesiva preta de aproximadamente 3 cm de largura externamente no tubo de saída transparente, na parte proximal onde localiza-se internamente a faixa de tecido.

3.3.2 Delineamento experimental dos estudos de campo com armadilhas

Os experimentos foram montados em área de café (*C. arabica* var. Catuaí Vermelho e Amarelo) sombreado de aproximadamente 0,8 ha, localizada na Fazenda Areão da ESALQ/USP. As plantas de café tinham aproximadamente seis anos de idade plantadas em espaçamento de 1,5 x 3,0 m. O sombreamento do local é provido por aproximadamente 500 árvores de eucaliptos de 12 anos de idade espaçadas aleatoriamente na área.

Foram montados dois experimentos em épocas diferentes. Em ambos os experimentos, o delineamento adotado foi em blocos aleatorizados sendo utilizados 3 tratamentos: 1) armadilha de auto-inoculação (Figura 1) contendo o fungo, 2) armadilha de auto-inoculação sem o fungo e 3) armadilha modelo IAPAR (VILLACORTA et al., 2001) com abertura de 17,5 x 11,5 cm, usada como controle positivo. Esta última armadilha foi confeccionada com garrafas plásticas do tipo "Pet," colocada de forma invertida sendo que na parte externa, próxima a abertura, foi colocado 10 cm de fita adesiva vermelha de 3 cm de largura, para aumentar a atração dos insetos. O modelo de armadilha de auto-inoculação sem o fungo foi usado para verificar se a presença (repelência) do fungo poderia reduzir a atratividade da armadilha e conseqüentemente a frequência de coleta dos insetos. Pela diferença de captura entre as armadilhas de auto-inoculação com e sem o fungo seria também possível determinar a infecção natural de *H. hampei* por *B. bassiana*. O modelo IAPAR foi usado para comparar a eficiência de coleta da broca-do-café desta com a armadilha de auto-inoculação, já que este modelo tem eficiência de captura comprovada. Para monitorar a viabilidade e a concentração do patógeno nas armadilhas, foi utilizado um modelo da armadilha de auto-inoculação modificado, contendo quatro saídas com fungo conforme especificado no item 3.3.2.2. Todos os tratamentos constituíram de quatro repetições (n=4). Cada armadilha constituiu de uma repetição, exceto para as armadilhas usada para avaliação da viabilidade e concentração onde cada armadilha continha 4 repetições (saídas com o patógeno).

Todas as armadilhas foram fixadas em estacas, a 1,2 m do chão, espaçadas de 15 m em cada linha de café (bloco) e entre blocos. Como atraente químico foi usado o metanol: etanol (1:1) puro para análise, colocando cerca de 10 mL em frasco difusor de vidro com tampa de borracha com abertura de 2 mm (SILVA,

VENTURA, MORALE, 2006; UEMURA-LIMA et al., 2010). A cada avaliação o volume da mistura de atraentes volatilizados dos frascos difusores foram completados novamente para ficar sempre com a quantidade inicial. Para as armadilhas usadas para monitorar a concentração e a viabilidade do patógeno, não foram colocados frasco difusor com atraente químico.

No início dos experimentos, a posição de todas as armadilhas foi aleatorizada, sendo a posição definida por sorteio. Na figura 2 está esquematizada a distribuição e distâncias das armadilhas usadas para captura da broca-do-café na área experimental. Para o primeiro experimento, as armadilhas foram distribuídas na região central da área experimental no dia 03-05-2012. Para o segundo experimento, montado em 07-09-2012, utilizou-se as extremidades da área para a alocação dos blocos sendo dois em cada extremidade. Foi deixada uma bordadura de aproximadamente 15 m das extremidades da área e de cada linha de café onde as armadilhas foram distribuídas. Para as armadilhas usadas no monitoramento da viabilidade e concentração do patógeno, estas foram dispostas em ziguezague na área, de forma que cada repetição ficou na linha de café imediatamente superior onde estavam as armadilhas usadas para captura dos insetos.

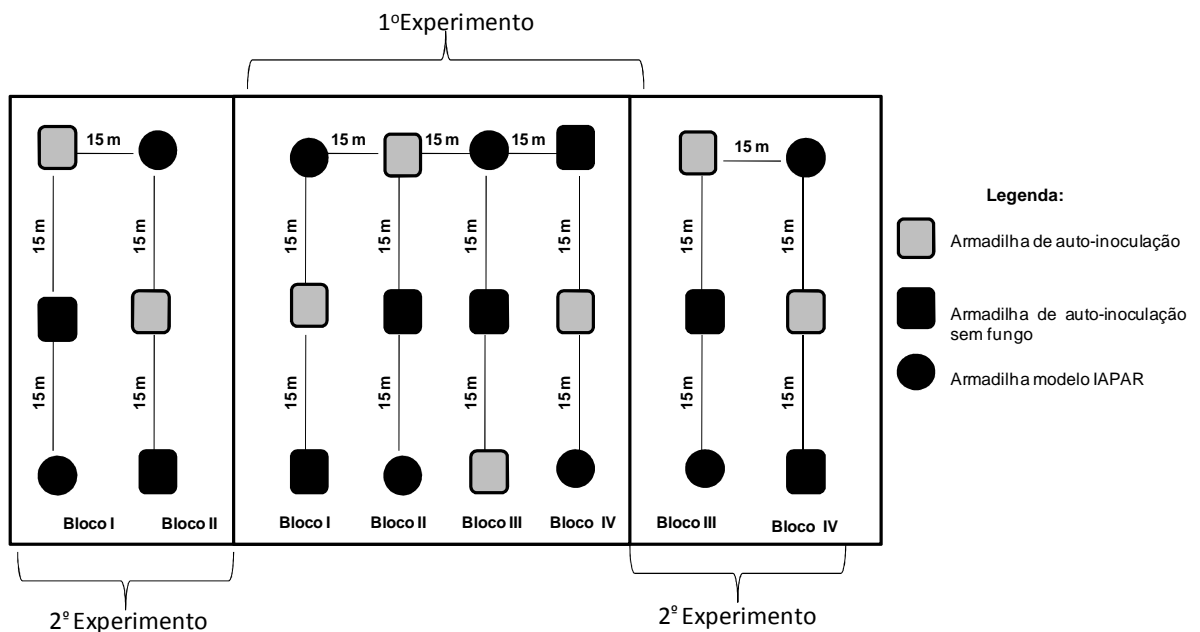


Figura 2 – Esquema da distribuição das armadilhas: auto-inoculação, armadilha de auto-inoculação sem fungo e modelo IAPAR na área experimental

3.3.2.1 Captura de *Hypothenemus hampei* pelas armadilhas e avaliação da sua infecção por *Beauveria bassiana* na armadilha de auto-inoculação

Para a quantificação do número de insetos capturados pelas armadilhas, amostragens semanais foram realizadas durante 24 semanas para o primeiro experimento e oito semanas para o segundo experimento (em andamento). A eficiência de captura da armadilha foi medida em relação ao número de brocas coletadas.

Para que fosse possível quantificar o número de brocas capturadas pela armadilha de auto-inoculação com o fungo e na armadilha de auto-inoculação sem o fungo, no local de saída das brocas foi colocado saco plástico transparente, preso por liga de borracha (Figura 3). Para a armadilha IAPAR a captura dos insetos foi feita colocando na parte inferior da garrafa aproximadamente 200 mL de água mais 5% de detergente neutro. Para retirada das brocas da armadilha IAPAR, como a garrafa foi colocada de forma invertida, a tampa da parte inferior foi aberta e os insetos coletados em uma peneira e acondicionados em envelopes de papel. Nas outras armadilhas os sacos plásticos fixados a cada tubo de saída contendo os insetos coletados durante os intervalos de avaliações, foram retirados e levados ao laboratório para quantificação, sendo substituídos por novos sacos plásticos.



Figura 3 – Saco plástico transparente colocado nos tubos de saída da armadilha de auto-inoculação para captura das fêmeas ‘colonizadoras’ de *Hypothenemus hampei*

A porcentagem de infecção nos insetos capturados pelas armadilhas de auto-inoculação com e sem o fungo, foi determinada em amostras de insetos capturados num período de 24 horas a cada semana. No modelo IAPAR a infecção não foi quantificada, pois os insetos eram coletados na água. Os insetos coletados foram levados ao laboratório e acondicionado em placas de Petri (9 cm), cobertas por tecido “voile”, alimentados com pergaminho de café hidratado e mantidos em B.O.D (25 ± 1 °C em escotofase, $60 \pm 10\%$ UR) por 10 dias. Os insetos mortos foram retirados diariamente das placas de Petri, esterilizados superficialmente com álcool 70% e então acondicionados em câmara úmida para confirmação da mortalidade pelo patógeno (Item 3.1.3). As avaliações para determinação da infecção foram realizadas no primeiro experimento com 1, 11, 17, 23, 29, 37, 45, 52, 57, 65, 81, 97, 102, 107, 141, 149, 151 dias após a montagem e no segundo experimento com 14, 20, 36, 40 dias após montagem. Ao final de cada semana de avaliação as armadilhas usadas na captura dos insetos foram aleatorizadas dentro do bloco para diminuir o efeito da localização.

Durante a instalação do primeiro experimento até a 5ª semana de avaliação, a porcentagem de infestação de brocas na área foi quantificada, amostrando 10 plantas por bloco e retirando 10 frutos de cada. Posteriormente foi contabilizado o número de frutos brocados e sadios o que permitiu o calculo da porcentagem de infestação. Nos períodos posteriores este parâmetro não foi quantificado devido à colheita dos frutos.

3.3.2.2 Monitoramento da viabilidade e concentração de *Beauveria bassiana* produzido após impregnação sobre faixas de tecido na armadilha de auto-inoculação

Neste estudo, a armadilha de auto-inoculação diferiu do modelo descrito no item 3.3.1 por possuir quatro saídas com o patógeno, dispostas em pontos equidistantes, ao invés de duas saídas (Figura 4). As armadilhas foram distribuídas na área experimental de forma aleatorizada na linha de café imediatamente superior as dos blocos dos experimentos descritos anteriormente (Figura 2) para monitoramento da concentração e viabilidade do patógeno.



Figura 4 – Armadilha de auto-inoculação com quatro tubos de saída contendo o fungo *Beauveria bassiana* impregnado em tecido têxtil, usados para avaliação da viabilidade dos conídios

Para o primeiro experimento foram distribuídas quatro armadilhas e em cada tempo de avaliação (quatro avaliações) uma saída de cada armadilha (n= 4) foi retirada de forma aleatória e, levada para o laboratório em sacos plásticos estéreis. Em câmara de fluxo laminar, o tecido com o inóculo foi removido com uma pinça e colocado diretamente em frasco de vidro de 250 mL (marca Schott) contendo 50 ml de água + espalhante adesivo estéril. Em seguida a concentração e viabilidade do fungo foram determinadas conforme descrito no item 3.2.1. As avaliações foram feitas 0, 10, 20, 40, 65 dias após a instalação do experimento. A partir dos 120 dias, como não havia mais saídas com fungo nestas armadilhas, não foi possível estimar a concentração de conídios e a viabilidade foi monitorada através da retirada de pequenas amostras das armadilhas de auto-inoculação utilizadas para verificação da captura e infecção das brocas como descrito no item 3.3.2.2. Para retirar estas amostras, utilizou-se uma espátula de metal e uma pequena amostra do fungo foi retirado de cada um das duas saídas e colocadas microtubo tipo Eppendorf de 2 mL. No laboratório foi adicionado 1 mL de Tween 20[®] (0,05%), seguido de homogeneização em aparelho Vortex[®] e feitas duas diluições para posterior teste de viabilidade conforme item 3.1.3.

No segundo experimento, a viabilidade foi monitorada de forma semelhante ao anterior, porém foram distribuídas de forma aleatorizada oito armadilhas, sendo duas por linha de café e espaçadas 15 m umas das outras. Para este experimento, em virtude da alta viabilidade encontrada para o primeiro experimento (ver seção

resultados) foram planejadas avaliações aos 0, 10, 20, 40, 65, 80, 100, 120 e 140 dias após a montagem e em cada avaliação uma saída com fungo foi coletada (n=4) de uma armadilha em cada linha (repetição). Como possuem duas armadilhas por linha, a saída foi retirada de forma aleatorizada, posteriormente procedeu às avaliações de concentração e viabilidade da mesma forma como no primeiro experimento. Este experimento foi instalado em 07/09/2012 e encontra-se em andamento sendo apresentados os resultados obtidos até 40 dias.

3.3.3 Dados climáticos

A temperatura e umidade relativa do ar foram registradas por Data Logger ICEL Manaus[®] modelo HT- 4000 colocado na região central da área experimental próximo a planta de café a 1,2 m do nível do solo. Os dados referentes a precipitação foram obtidos da estação meteorológica da ESALQ/USP localizada à latitude: 22° 42' 30" sul e longitude de 47° 38' 00" oeste com altitude de 546 metros, em Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R[®] versão 2.5.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2007). Os dados referentes à seleção de isolados e exposição de fêmeas de *H. hampei* a conídios produzidos sobre tecido foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A eficácia do controle foi determinada pela fórmula de Schneider-Orelli (1947). Para o cálculo do tempo letal médio TL_{50} , os valores das mortalidades acumuladas foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971), com auxílio do programa Polo Plus. Para comparação dos tecidos sintéticos, a concentração de conídios viáveis.cm⁻² de *B. bassiana* sofreu uma transformação logarítmica e os dados foram submetidos à análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). O efeito da luz na produção e armazenamento de tecidos impregnados com *B. bassiana* ao longo do tempo foi ajustado por modelos logísticos para o parâmetro de viabilidade dado pela seguinte equação eq.(1):

$$y = \frac{a}{1 + \exp(-(dias - b)/c)}$$

eq.(1)

Em que “a” é o parâmetro referente à assíntota, “b” é o tempo referente à metade do valor da assíntota e “c” é o parâmetro de escala.

Quanto à concentração os dados foram submetidos a uma transformação logarítmica, para atender as pressuposições da normalidade e em seguida foi comparada por meio de modelos de regressão.

A influência do armazenamento de tecido impregnado com *B. bassiana* em diferentes umidades relativas (UR) foi comparada por modelos mistos. Para o parâmetro concentração de conídios foram ajustados modelos mistos lineares. Para a viabilidade constataram-se, por meio de testes de razão de verossimilhanças e análise visual, que são necessárias três curvas para explicar o comportamento da viabilidade ao longo do tempo. Para 40% UR utilizou modelos lineares mistos e para as 60 e 80% de UR ajustaram-se modelos mistos não lineares, devido aos comportamentos se assemelharem ao comportamento de uma função exponencial negativa

Para os dados de campo, a flutuação populacional da broca-do-café foi estimada pela média semanal das somas do número de brocas capturadas em todas as armadilhas mais erro padrão das médias (EP). Esses dados foram correlacionados com as médias semanais das variáveis climáticas, temperatura máxima (T MAX), mínima (T MIN) e média (T MED), umidade relativa máxima (UR MAX), mínima (UR MIN) e média (UR MED) e com a precipitação. Pelas pressuposições de normalidade, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman (teste não paramétrico). Esta mesma correlação foi feita para os dados referentes à concentração e viabilidade do patógeno no campo levando em consideração a média dos dados climáticos referente a cada período de avaliação desse parâmetro. Estes parâmetros concentração e viabilidade ao longo do tempo também foram comparados por modelos de regressão.

Para analisar a infectividade do fungo presente na armadilha de auto-inoculação, para o primeiro experimento, os dados de mortalidade total e confirmada foi ajustado a um modelo beta binomial inflacionado de zeros, considerando-se inicialmente os efeitos de armadilha (armadilha de auto-inoculação com fungo e sem fungo), de tempo e da interação entre armadilha e tempo. Para a verificação desses efeitos foram utilizados testes da razão de verossimilhanças. Assim, para os dados

referentes ao número de insetos mortos o modelo selecionado foi o modelo com efeito de armadilhas. Quanto ao número de insetos confirmados, o modelo selecionado foi o modelo com efeito de armadilhas e de tempo. Para o segundo experimento os dados de mortalidade total e confirmada foram expressos em média de mortalidade e erro padrão da média por não ter se ajustado ao modelo. Para os dois experimentos foi estimado também o TL_{50} , usando os valores acumulados da mortalidade total, utilizando a mesma análise descrita anteriormente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados

4.1.1 Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para controle de *Hypothenemus hampei*

A mortalidade total, confirmada e corrigida da broca-do-café pelos isolados de *B. bassiana* foram estatisticamente semelhantes ($P > 0,05$) (Tabela 3). Apenas para a mortalidade total houve diferença significativa entre os isolados e o tratamento controle ($P < 0,05$). Todos os isolados apresentaram baixa virulência sendo que a maior mortalidade total observada foi de 38,5% (ESALQ-1455). Não foi constatada mortalidade causada pelo patógeno (confirmada) no tratamento controle, sendo observada mortalidade total neste tratamento de 11,5%.

Tabela 3 – Mortalidade total, mortalidade confirmada e mortalidade corrigida de fêmeas “colonizadoras” de *Hypothenemus hampei* a diferentes isolados de *Beauveria bassiana* aplicado na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹, após dez dias a 25 ± 1 °C e escotofase de 24 horas

Isolados	Mortalidade Total (%)*	Mortalidade Confirmada (%) ^{ns}	¹ Mortalidade Corrigida (%) ^{ns}
Controle	11,5 ± 4,6 b	...	-
ESALQ-1455	38,5 ± 7,4 a	32,7 ± 5,6	30,5 ± 8,1
ESALQ-1457	34,6 ± 5,6 a	26,9 ± 5,8	26,1 ± 6,0
CB-66	32,7 ± 6,5 ab	28,8 ± 5,2	24,0 ± 7,0
ESALQ-1451	37,5 ± 7,3 a	32,7 ± 6,6	29,4 ± 8,0
ESALQ-1436	31,7 ± 9,0 ab	25,0 ± 8,1	22,8 ± 8,4
ESALQ-1081	36,5 ± 7,5 a	29,8 ± 7,6	28,3 ± 7,5
ESALQ-1456	33,7 ± 7,8 ab	26,0 ± 6,3	25,1 ± 7,9
ESALQ-252	34,6 ± 6,7 a	27,9 ± 5,8	26,1 ± 7,2
ESALQ-PL63	37,5 ± 4,6 a	34,6 ± 7,3	29,4 ± 8,3

* Médias ± Erro Padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($P < 0,05$). ^{ns} Diferença não significativa ($P > 0,05$). ... Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento, - Não se aplica dado numérico. ¹ Estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (1947)

Como as porcentagens de mortalidade para todos os isolados foram baixas a virulência dos isolados não foi um parâmetro adequado para a escolha do melhor isolado. Escolhemos o isolado ESALQ-PL63 para prosseguir os estudos, testando novas abordagens para o controle dessa praga baseando-se no fato deste isolado já possuir registro junto ao Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA).

4.1.2 Produção e viabilidade de *Beauveria bassiana* após impregnação em diferentes tecidos têxteis e seu potencial para controle de *Hypothenemus hampei*

4.1.2.1 Seleção de um tecido têxtil para utilização como substrato de produção do fungo *Beauveria bassiana* após impregnação sobre os tecidos

A concentração de conídios.cm⁻² do fungo *B. bassiana* produzidos após impregnação sobre os diferentes tecidos apresentou interação tripla entre experimento, tecidos e a condição de luz. Desta forma procedeu-se a análise do efeito da interação dupla tecidos com condições de luz dentro de cada um dos dois experimentos. Para os dois experimentos o tecido sintético Lã “Sherpa” foi superior aos demais tecidos para as duas condições estudadas. Desta forma optou-se por apresentar os dados apenas de um dos experimentos (Tabela 4).

Todos os tecidos têxteis avaliados como substrato para impregnação do meio contendo o isolado ESALQ-PL63 permitiram o crescimento e a conidiogênese do patógeno sobre a sua superfície, independente da condição de luz em que foram submetidos (Figura 5). O tecido sintético Lã “Sherpa” permitiu uma maior produção de conídios viáveis do patógeno, diferindo significativamente da maioria dos demais tecidos avaliados ($P < 0,05$) para as duas condições de luminosidade (Tabela 4). Somente para a condição de fotofase 12 h que sua produção foi semelhante ao tecido Poy Esmeralda. Os tecidos, Lã “Sherpa” e Poly R2 tiveram maior produção no escuro que quando mantidos em fotofase de 12 horas. Para as duas condições avaliadas a menor produção de conídios ocorreu quando impregnado sobre o tecido Sofit. Os demais tecidos tiveram uma produção intermediária.

Tabela 4 – Concentração conídios viáveis.cm⁻² de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 produzidos após impregnação sobre diferentes tecidos têxteis e incubados por dez dias a 25 ± 1 °C, UR 60 ± 10% em duas condições de luz

Tecidos Têxteis	Concentração de conídios viáveis.cm ⁻² *	
	Fotofase 12 h (x10 ⁸)	Fotofase 0 h (x10 ⁸)
Lã “Sherpa”	3,78 ± 0,09 aB	5,44 ± 0,33 aA
Poly Esmeralda	2,94 ± 0,20 abA	3,10 ± 0,13 bA
Jade 200	2,28 ± 0,28 bA	2,70 ± 0,13 bA
Poly R1	2,80 ± 0,06 bA	2,73 ± 0,19 bA
Jade 100	2,77 ± 0,28bA	3,03 ± 0,15 bA
Poly R2	2,30 ± 0,19 bB	3,14 ± 0,10 bA
Sofit	1,33 ± 0,13 cA	1,77 ± 0,051cA

*Médias ± E.P seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

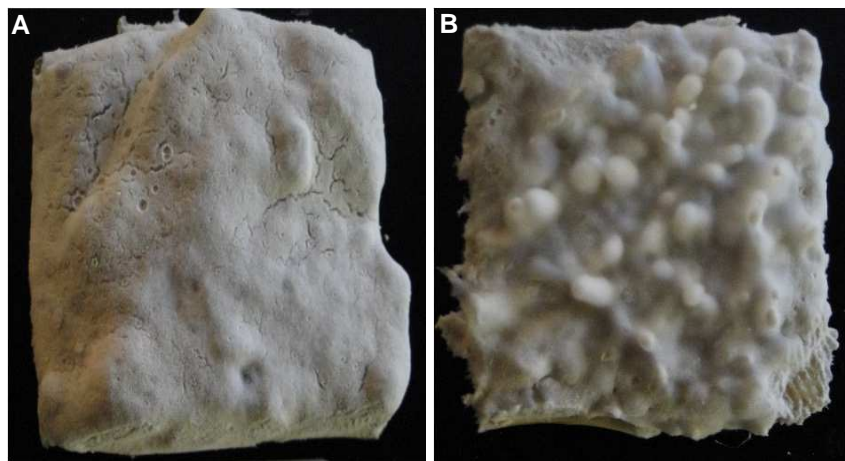


Figura 5 – A. Crescimento do isolado ESALQ-PL63 de *Beauveria bassiana* após impregnação sobre o tecido têxtil sintético Lã “Sherpa” e B. Sobre o tecido sintético “Jade 200” e incubado por dez dias a 25 ± 1°C, UR 60 ± 10% e escotofase de 24 horas

Diante destes resultados o tecido sintético Lã “Sherpa” foi escolhido para dar continuidade aos experimentos, para tentativa de utilização da técnica de impregnação de tecidos com o fungo *B. bassiana* para o controle de *H. hampei*.

4.1.2.2 Mortalidade de *Hypothenemus hampei* expostos por diferentes períodos a conídios de *Beauveria bassiana* produzidos após impregnação sobre tecido têxtil

A mortalidade total, corrigida e confirmada de *H. hampei* após diferentes períodos de exposição aos conídios do isolado ESALQ-PL63 produzidos após impregnação sobre tecido têxtil não apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos avaliados ($P > 0,05$), sendo que a mortalidade total, confirmada e a eficácia do controle foram superiores a 80% nos dois experimentos (Tabela 5). Para o segundo experimento a quantidade de conídios que ficaram aderidos sobre o corpo da broca-do-café em cada tempo de exposição, foram estatisticamente semelhantes (Tabela 5) variando de $2,83 \times 10^5$ a $2,89 \times 10^5$ conídios por broca.

Pela sobreposição de intervalos de confiança, não houve diferença entre o tempo letal médio e os tempos de exposição, sendo que para ambos os experimentos o período para matar 50% da população da broca variou de 4,0 a 4,9 dias (Tabela 6).

Tabela 5 - Mortalidade total, mortalidade corrigida e mortalidade confirmada de fêmeas 'colonizadoras' de *Hypothenemus hampei* expostas por diferentes períodos a conídios do isolado ESALQ-PL63 de *Beauveria bassiana* produzidos após impregnação sobre o tecido têxtil Lã "Sherpa" e mantidas por dez dias em a 25 ± 1 °C, UR de $60 \pm 10\%$

	Tratamento	Mortalidade total (%)	Mortalidade confirmada (%)^{ns}	³Mortalidade corrigida (%)^{ns}	Conídios/broca ($\times 10^4$)*
1º Experimento¹	Controle	17,3 \pm 7,9 b	...	-	
	5 s	88,5 \pm 6,7 a	86,5 \pm 5,8	86,1 \pm 8,1	
	25 s	94,2 \pm 5,8 a	94,2 \pm 5,8	93,0 \pm 7,0	
	50 s	94,2 \pm 1,9 a	92,3 \pm 3,1	93,0 \pm 2,3	
	Controle	5,8 \pm 5,8 b	...	-	...
2º Experimento²	5 s	88,5 \pm 7,4 a	88,5 \pm 7,4	87,8 \pm 7,8	28,9 \pm 3,9 ^{ns}
	25 s	92,3 \pm 5,4 a	90,9 \pm 4,8	91,8 \pm 5,8	28,3 \pm 3,7
	50 s	90,4 \pm 7,9 a	88,5 \pm 2,2	89,8 \pm 2,0	28,9 \pm 1,6
	Controle	5,8 \pm 5,8 b	...	-	...

Médias \pm Erro Padrão seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ^{ns} diferença não significativa ($P > 0,005$). * avaliação feita apenas no 2º. Experimento; ... Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento, - Não se aplica.

¹Concentração do fungo sobre o tecido de: $7,66 \pm 0,26 \times 10^8$ (Média \pm E.P) conídios viáveis.cm⁻².

²Concentração do fungo sobre o tecido de: $4,27 \pm 0,26 \times 10^8$ (Média \pm E.P) conídios viáveis.cm⁻².

³Estimada pela fórmula de Schneider-Orelli (1947)

Tabela 6 – Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀), em dias, e intervalo de confiança para fêmeas de *Hypothenemus hampei* após serem expostas por diferentes períodos a conídios de *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 produzidos após impregnação sobre o tecido têxtil Lã “Sherpa” e mantidas por dez dias a 25 ± 1 °C, UR 60 ± 10%

	Tratamento	n	TL ₅₀ (IC)	Coefficiente angular (± E.P)	χ ²	g.l.
1º Exp.	Controle	52	-	-	-	-
	5 s	52	4,5 (3,8; 5,1)	3,5 ± 0,3	15,2	8
	25 s	52	4,0 (3,6; 4,3)	4,1 ± 0,3	7,2	8
	50 s	52	4,0 (3,5; 4,6)	4,2 ± 0,3	17,2	8
2º Exp.	Controle	52	-	-	-	8
	5 s	52	4,6 (4,2; 5,0)	4,8 ± 0,4	10,3	8
	25 s	52	4,8 (4,5; 5,2)	4,8 ± 0,4	5,4	8
	50 s	52	4,9 (4,6; 5,3)	4,2 ± 0,3	5,0	8

Exp: experimento; n.: número de insetos testados; IC: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; χ²: valor de qui-quadrado calculado; g.l.: graus de liberdade; – não si aplica.

4.1.2.3 Influência da luz na viabilidade e concentração de conídios de *Beauveria bassiana* produzidos após impregnação em tecido têxtil

Para o parâmetro concentração de conídios ao longo do tempo de armazenamento, foi observada pela análise de variância uma interação tripla significativa entre os três experimentos, para os parâmetros dias de armazenamento e as condições de luz em que o tecido contendo o patógeno foi armazenado, desta forma, procedeu ao estudo de desdobramento. Para os três experimentos houve a tendência de maior concentração de conídios quando o patógeno foi produzido em fotofase de 12 horas do que quando foram mantidos no escuro. O comportamento da concentração ao longo do tempo diferiu entre os experimentos sedo que foram ajustados modelos de regressão linear, quadrático e cúbico. Entretanto, em todos os experimentos, e para as duas condições de armazenamento, observou-se uma tendência de redução da concentração em função do tempo de armazenamento. Desta forma, optamos por apresentar, para este parâmetro, os dados referentes apenas um dos experimentos (Figura 6 A).

Foi observada interação significativa para a produção e viabilidade de conídios de *B. bassiana* em função do tempo de armazenamento e a condição de luz que foram mantidos (P<0,05). Independente da condição de luz, a concentração

e viabilidade reduziram ao longo do tempo de armazenamento (Figura 6). Quanto à concentração, o armazenamento em 12 h de fotofase ajustou-se o modelo exponencial: $\exp(2,04 \times 10^1 - 5,61 \times 10^{-2} \cdot \text{dias} + 2,37 \times 10^{-3} \cdot (\text{dias})^2 - 3,11 \times 10^{-5} \cdot (\text{dias})^3)$, e para 0 h de fotofase ajustou-se ao modelo: $\exp(2,00 \times 10^1 - 5,61 \times 10^{-2} \cdot \text{dias} + 2,37 \times 10^{-3} \cdot (\text{dias})^2 - 3,11 \times 10^{-5} \cdot (\text{dias})^3)$. A concentração inicial do patógeno foi maior para a condição de fotofase de 12 h, com $4,9 \times 10^8$ conídios.cm⁻² do que quando o fungo foi produzido no escuro com $3,7 \times 10^8$ conídios.cm⁻².

O comportamento da viabilidade foi ajustado por modelos logísticos. O armazenamento em 0 hora de fotofase é dado pela equação eq.(2):

$$y = \frac{97.02387}{1 + \exp(-(dias - 21.49654)/(-2.23525))}$$

eq.(2)

Para o armazenamento em 12 horas de fotofase o comportamento da viabilidade se ajustou pela equação eq.(3):

$$y = \frac{97.02387}{1 + \exp(-(dias - 43.78443)/-2.23525)}$$

eq.(3)

A viabilidade foi drasticamente reduzida, quando os conídios foram mantidos no escuro, chegando próximo de zero aos 30 dias após inoculação. Para os tecidos com o fungo mantidos com 12 horas de fotofase a viabilidade manteve-se por mais tempo sendo que com 45 dias de inoculação apresentava aproximadamente 35% de viabilidade (Figura 6 B).

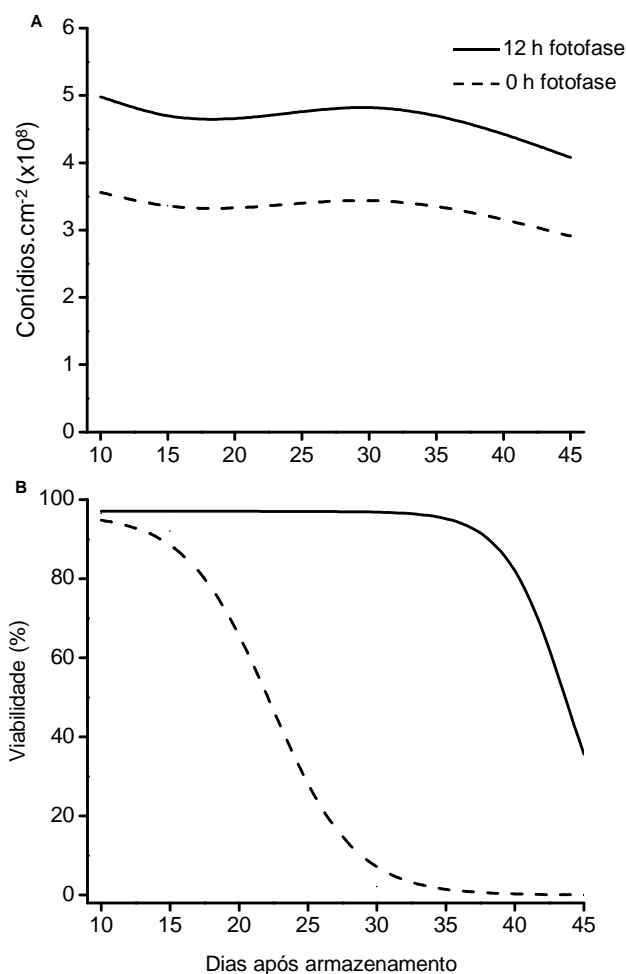


Figura 6 – A. Concentração e B. Viabilidade de conídios *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 produzidos após impregnação sobre o tecido têxtil Lã “Sherpa” após diferentes tempos de armazenamento a 25 ± 1 °C, UR $60 \pm 10\%$ fotofase de 0 e 12 horas.

4.1.2.4 Viabilidade e concentração de conídios de *Beauveria bassiana* produzidos após impregnação sobre tecido têxtil ao longo do armazenamento em diferentes umidades relativas do ar

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de conídios quando os tecidos foram armazenados a 60 e 80% de UR ($P > 0,05$), sendo os resultados expressados por um único modelo de regressão linear da concentração em função do tempo ($x = 4,59E \times 10^8 - 8,89 \times 10^5 \cdot \text{dias}$). O tecido impregnado com *B. bassiana* armazenado a 40% de UR apresentou um ligeiro aumento linear na concentração ao longo do tempo de armazenamento, diferindo das demais UR ($P < 0,05$), explicado pelo modelo: $x = 4,59 \times 10^8 + 1,78 \times 10^5 \cdot \text{dias}$ (Figura 7 A).

Por meio de testes de razão de verossimilhanças foram necessárias três curvas para explicar o comportamento da viabilidade ao longo do tempo em função do armazenamento nas diferentes UR, sendo que as três umidades diferem entre si ($P < 0,05$). O armazenamento em 40% de UR foi explicado pelo modelo linear misto: $X = 107,3 - 2,2 \cdot \text{dias}$. A viabilidade nas condições de 60 e 80% de UR ajustaram-se a modelos mistos não lineares, devido se assemelharem ao comportamento de uma função exponencial negativa, sendo $X = 183,0 \cdot \exp(-0,12 \cdot \text{dias})$ e $X = 254,0 \cdot \exp(-0,19 \cdot \text{dias})$, respectivamente. De forma geral, com o aumento da UR reduziu a concentração e a viabilidade do patógeno presente no tecido. Quando o tecido impregnado com *B. bassiana* foi armazenado a 40% de UR a viabilidade reduziu linearmente ao longo do tempo. Porém, observou-se uma redução exponencial acentuada para as condições de 80 e 60% de UR, respectivamente (Figura 7 B).

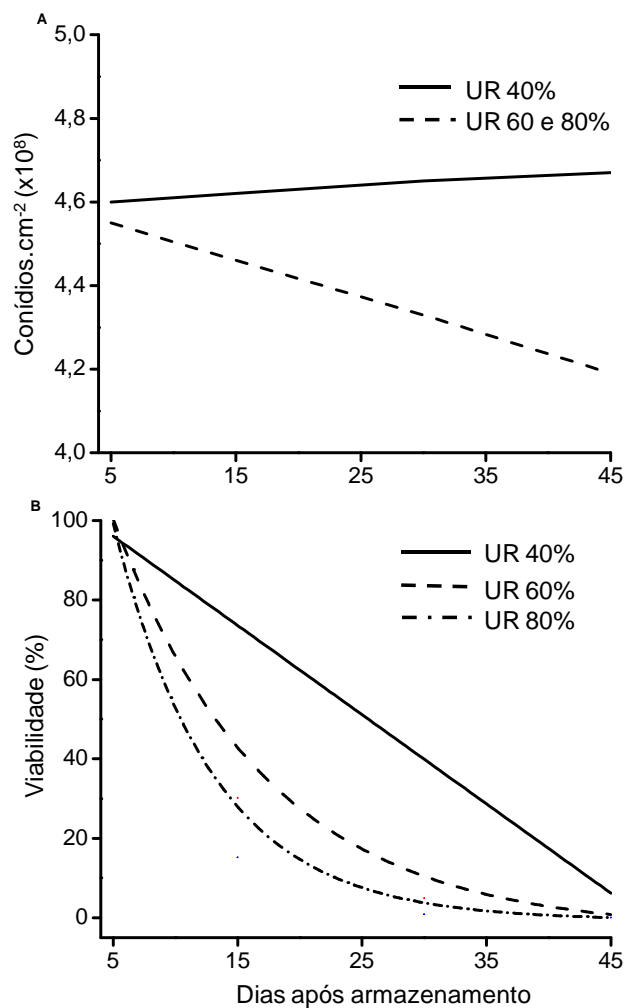


Figura 7 – A. Concentração e B. Viabilidade de conídios *Beauveria bassiana* ESALQ-PL63 produzidos após impregnação sobre o tecido têxtil Lã “Sherpa” após diferentes tempos de armazenamento a 25 ± 1 °C em diferentes umidades relativas do ar (UR) e fotofase de 12 horas

4.1.3 Eficiência de armadilha de auto-inoculação para o controle de *Hypothenemus hampei* com *Beauveria bassiana* em tecido sintético em condições de campo

No primeiro experimento instalado em 03-05-2012, coletou-se em 24 semanas de avaliações um total de 8.942 adultos *H. hampei* considerando todas as armadilhas presentes na área (N=12). No início da instalação desse experimento a infestação de broca-do-café na área foi estimada em $59,5 \pm 5,8\%$, considerando o número de frutos de café brocados, sendo uma média de $47,0 \pm 3,7\%$ de infestação até a 5ª semana de avaliação (03/05 a 07/06), quando foi possível esta quantificação. As maiores quantidades de insetos foram capturadas nas avaliações de 10/05 a 02/08, sendo que o maior pico de coleta ocorreu em 14/06, capturando um total de 1499 insetos (93,6 insetos/armadilha) (n=4) (Figura 8 A).

A análise de correlação de Spearman (Tabela 7) mostrou que a quantidade de brocas-do-café coletadas ao longo das avaliações foi influenciada diretamente pelas condições ambientais presentes na área. Observou-se uma correlação negativa significativa entre o número de brocas e a temperatura máxima e média, sendo que o aumento da temperatura levou a redução do número de brocas coletadas. Existe uma correlação positiva entre número de brocas e umidade relativa (máxima, mínima e média) e a precipitação, onde à medida que aumentam essas variáveis ocorre um aumento também na coleta de brocas. Durante todo período de avaliação a maior temperatura registrada foi de $36,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, a mínima de $5,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e média de $19,35\text{ }^{\circ}\text{C}$. A menor UR foi de 21,3% e máxima de 100%. Em geral as menores temperaturas médias, maiores UR e maiores quantidades de chuva ocorreram nas avaliações de 10/05 a 02/08, ocasião em que se deram as maiores coletas de brocas (Figura 8). Poucos insetos foram coletados entre 02/08 e 18/10, exceto na avaliação de 27/09 quando foram coletados vários insetos, devido ao fato de que nesta semana choveu mais de 6 mm, enquanto que entre 26/07 e 20/09 nenhuma precipitação havia sido observada.

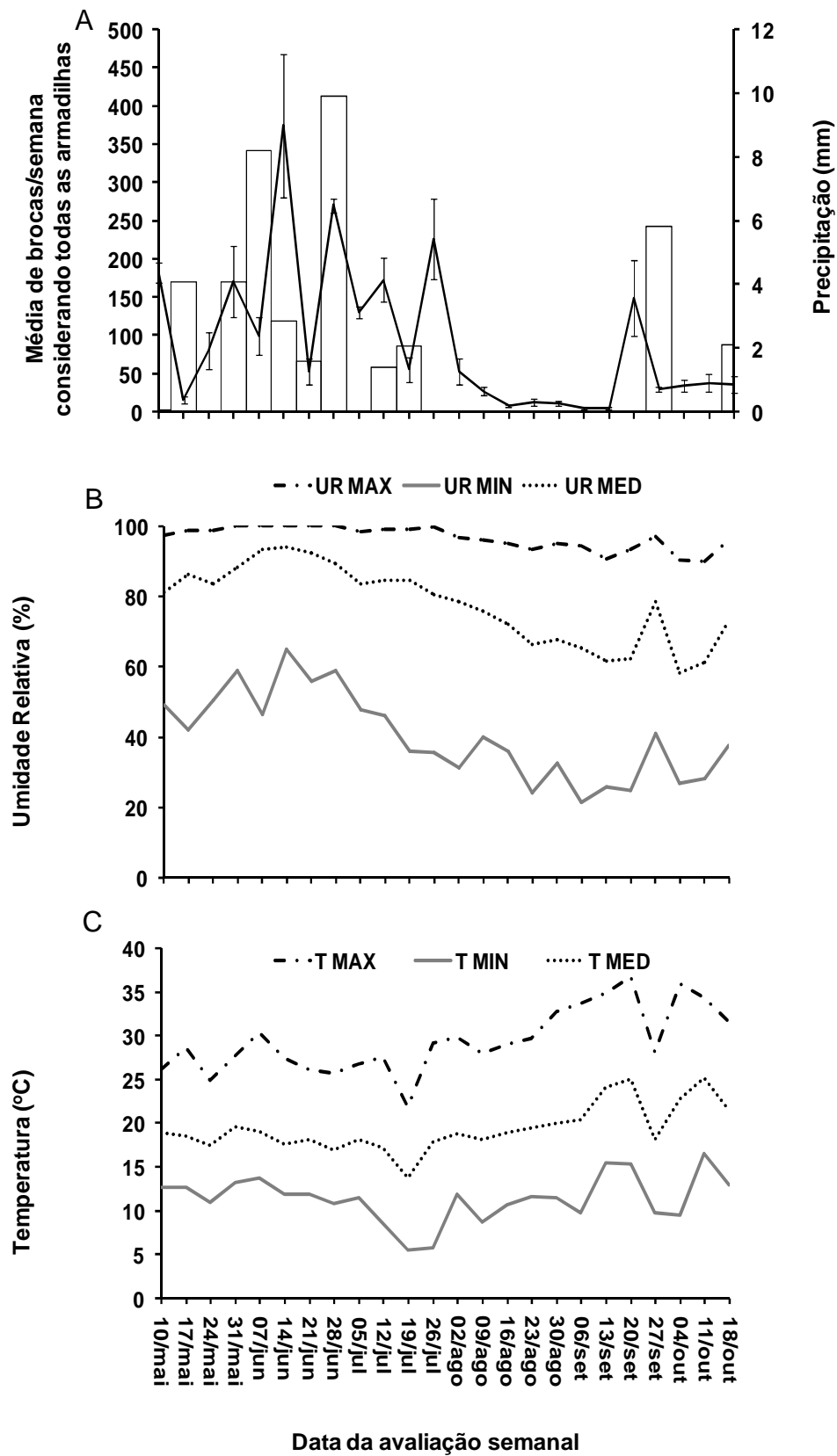


Figura 8 – A. Flutuação populacional de *Hypothenemus hampei* durante o período experimental (03-05-2012 a 18-10-2012) e precipitação média, B. Umidade relativa máxima (UR MAX), mínima (UR MIN) e média (UR MED), C. Temperatura máxima (T MAX), mínima (T MIN) e média (T MED), Piracicaba, São Paulo, Brasil

Tabela 7 - Coeficiente de correlação (C.C) de Spearman entre as variáveis: temperatura máxima (T MAX), mínima (T MIN) e média (T MED), umidade relativa máxima (UR MAX), mínima (UR MIN) e média (UR MED) e a precipitação média em relação à captura de broca-do-café

	T MX	T MIN	T MED	UR MAX	UR MIN	UR MED	Precipitação
C.C	-0.46	-0.01	-0.47	0.62	0.61	0.57	0.37
Valor-p	< 0,0001	0.888	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

No experimento instalado em 07-09-2012, no qual ainda não havia disponibilidade de frutos de café nas plantas, coletou-se em 8 semanas de avaliações um total de 2.325 adultos de *H. hampei* considerando todas as armadilhas presentes na área (N=12) (Figura 9 A). O maior número de brocas capturadas neste período foram nas avaliações do dia 21/09 e 19/10. De forma similar ao primeiro experimento, os picos de captura coincidiram com os dias de maiores precipitações (Figura 9 A). No entanto, esta observação foi feita apenas com base em observação visual, pois, nenhum parâmetro climático apresentou uma correlação significativa pelo teste de correlação de Spearman ($P > 0,05$) para este experimento. A temperatura máxima registrada nesse período foi de 36,8 °C e mínima de 9,5 °C. A temperatura média foi de 23,0 °C sendo superior a média do primeiro experimento. A UR variou de 24,6 a 97,1% (Figura 9 B e C).

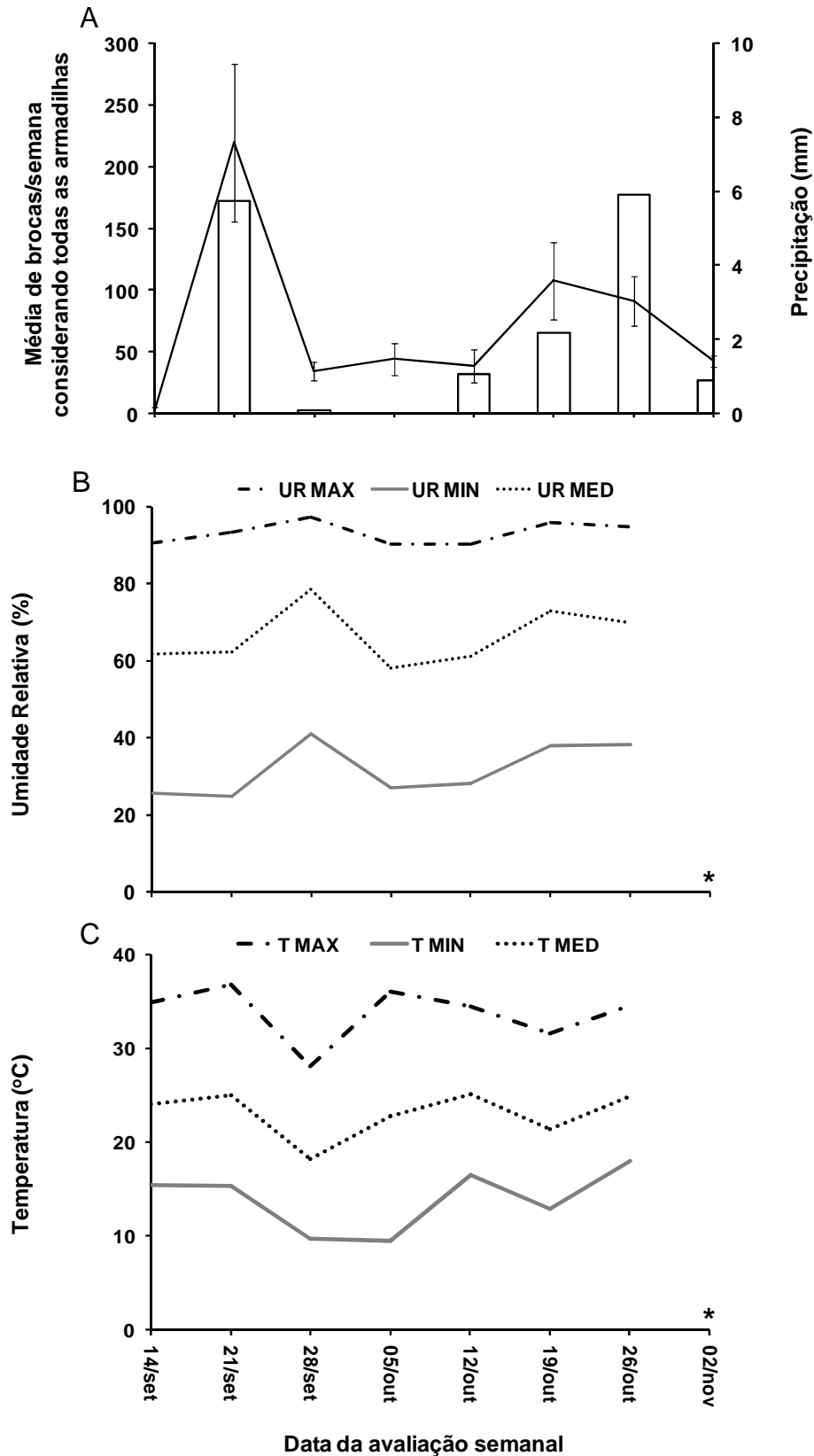


Figura 9 – A. Flutuação populacional de *Hypothenemus hampei* durante o período experimental (07-09-2012 a 02-11-2012) e precipitação média, B. Umidade relativa máxima (UR MAX), mínima (UR MIN) e média (UR MED), C. Temperatura máxima (T MAX), mínima (T MIN) e média (T MED), Piracicaba, São Paulo, Brasil. *Dados climáticos referentes à 02/11 não foram coletados devido a defeito no aparelho

A armadilha modelo IAPAR capturou nos dois experimentos um número muito superior de brocas do que as armadilhas de auto-inoculação e a armadilha de auto-inoculação sem fungo diferindo significativamente entre elas ($P < 0,05$) (Tabela 8). Durante o primeiro experimento, a armadilha IAPAR capturou em média $1613,25 \pm 348,25$ brocas/armadilha, contra $323 \pm 26,57$ e $248,75 \pm 74,70$ brocas/armadilha para as armadilhas de auto-inoculação e a armadilha de auto-inoculação sem fungo, respectivamente. Durante o segundo experimento, a mesma tendência de captura se manteve sendo maior para IAPAR seguida da armadilha de auto-inoculação e armadilha de auto-inoculação sem fungo. Entretanto, a captura dos dois últimos tipos de armadilhas não diferiu estatisticamente nos dois experimentos ($P > 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Número médio acumulado de *Hypothenemus hampei* coletada por armadilha ao final de 24 semanas para o 1º experimentos (03-05-2012 a 18-10-2012) e 8 semanas para o 2º experimento (07-09-2012 a 02-11-2012), Piracicaba, São Paulo, Brasil

Armadilhas	Total de <i>H. hampei</i> capturadas*	
	1º Experimento	2º experimento
IAPAR	$1613,3 \pm 174,2$ a	$464,8 \pm 107,1$ a
Auto-inoculação com fungo	$323,0 \pm 13,2$ b	$75,0 \pm 22,0$ b
Auto-inoculação sem fungo	$248,8 \pm 37,4$ b	$41,5 \pm 5,9$ b

*Médias \pm E.P seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Na figura 10 é apresentada a média acumulada de captura semanal para cada armadilha avaliada. Nota-se que os maiores incrementos de coleta ocorreram juntos aos picos de flutuação das brocas na área. Sendo nas avaliações de 14/06 a 26/07 para o primeiro experimento e de 21/09 a 19/10 para o segundo experimento. A armadilha IAPAR capturou aproximadamente cinco vezes mais brocas-do-café que as demais armadilhas considerando todas as avaliações.

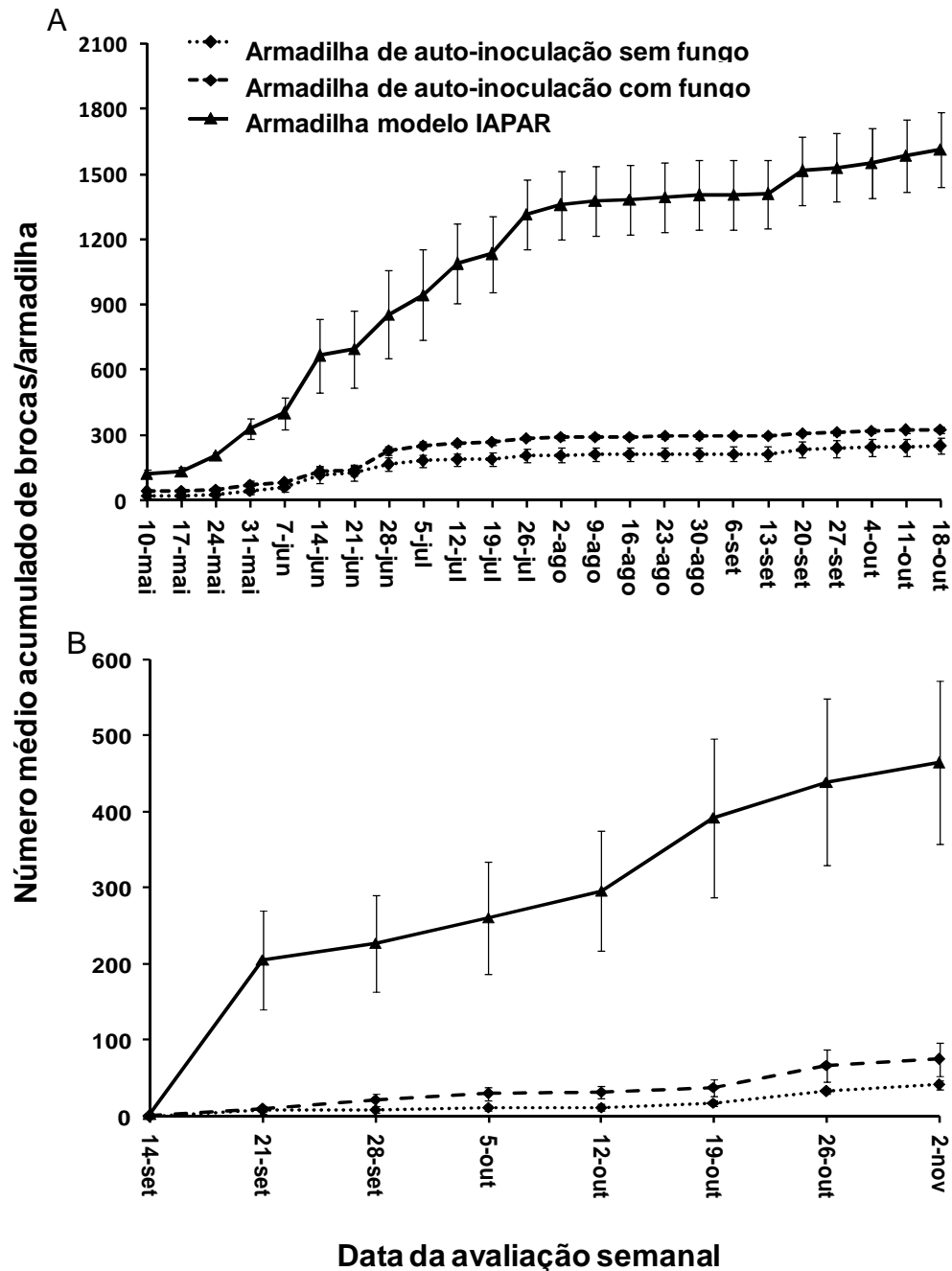


Figura 10 – Número médio acumulado de *Hypothenemus hampei* coletada por armadilha de auto-inoculação, armadilha auto-inoculação sem o fungo e armadilha IAPAR. A - durante o primeiro experimento de 03-05-2012 a 18-10-2012 e B - durante o segundo experimento 07-09-2012 a 02-11-2012 em Piracicaba, São Paulo, Brasil

Para o primeiro experimento, a mortalidade total ($p < 0,0001$, Razão de verossimilhanças 106,8) e confirmada ($p < 0,0001$, Razão de verossimilhanças 148,8) das brocas que passaram pela a armadilha de auto-inoculação com fungo foi superior a armadilha de auto-inoculação sem fungo, diferindo significativamente pelo modelo beta binomial inflacionado de zeros. A mortalidade total não diferiu ao longo do tempo das avaliações ($p > 0,05$, Razão de verossimilhanças 0,32) e também não

sofreu efeito da interação entre armadilhas e tempo ($p > 0,05$, Razão de verossimilhanças 3,6). Entretanto, a confirmação da mortalidade sofreu uma influencia significativa do tempo de avaliação ($p < 0,05$, Razão de verossimilhanças 4,2), não apresentando efeito de interação entre as armadilhas e o tempo ($p > 0,05$, Razão de verossimilhanças 3,0) (Tabela 9). Mesmo após 151 dias no campo a mortalidade foi de 74,6% sendo 66,3% confirmada pelo patógeno. Quanto à mortalidade total e confirmada das brocas obtidas na armadilha de auto-inoculação sem fungo considerando todas as avaliações, observa-se uma baixa taxa de infecção natural ocasionada por *B. bassiana*, em média, 1,5% e 21,9% de mortalidade total (Tabela 9). Em relação a TL_{50} observou-se que, neste experimento houve uma variação de 3,1 a 5,5 dias (Tabela 10), por sobreposição dos intervalos de confiança a avaliação com 57 dias deferiu das avaliações com 1, 29 e 81 dias da montagem. É interessante observar que este parâmetro não sofreu muita alteração ao longo das avaliações, confirmando que a infectividade do patógeno se manteve com o tempo.

Tabela 9 - Mortalidade total e confirmada de *Hypothenemus hampei* após passarem por armadilha de auto-inoculação contendo o fungo *Beauveria bassiana* impregnado sobre tecido têxtil Lã “Sherpa” e mantidas por dez dias a 25 ± 1 °C, UR $60 \pm 10\%$

Dias em Campo	Armadilha de auto-inoculação			Armadilha de auto-inoculação sem fungo*		
	Insetos coletados	Mortalidade total (%) ¹	Mortalidade confirmada (%) ²	Insetos coletados	Mortalidade total (%) ¹	Mortalidade confirmada (%) ²
1	62	87,5 ± 8,0	87,5 ± 8,0	38	3,0 ± 3,0	0,0 ± 0,0
11	9	100 ± 0,0	100 ± 0,0	4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
17	25	84,4 ± 11,8	81,3 ± 10,8	7	33,3 ± 33,3	0,0 ± 0,0
23	70	92,2 ± 4,7	92,2 ± 4,7	67	10,6 ± 6,14	7,6 ± 4,8
29	17	95,8 ± 4,2	95,8 ± 4,2	27	3,8 ± 3,75	0,0 ± 0,0
37	111	100 ± 0,0	95,8 ± 2,8	135	16,5 ± 6,21	1,7 ± 1,7
45	29	92,6 ± 7,4	92,6 ± 7,4	17	24,1 ± 14,46	5,6 ± 5,6
52	246	94,0 ± 4,3	93,5 ± 4,3	108	13,6 ± 7,72	3,9 ± 2,3
57	42	91,7 ± 8,3	91,7 ± 8,3	30	50,0 ± 17,68	0,0 ± 0,0
65	6	100 ± 0,0	100 ± 0,0	3	50,0 ± 50,0	0,0 ± 0,0
81	61	86,9 ± 7,6	86,9 ± 7,6	49	21,3 ± 15,28	0,0 ± 0,0
97	13	100 ± 0,0	72,2 ± 14,7	9	25,0 ± 25,0	0,0 ± 0,0
102	4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
107	3	100 ± 0,0	100 ± 0,0	3	25,0 ± 25,0	0,0 ± 0,0
141	97	78,9 ± 13,4	75,5 ± 12,0	73	28,6 ± 8,3	3,9 ± 2,8
149	33	100 ± 0,0	98,7 ± 1,3	22	18,2 ± 2,94	3,7 ± 3,7
151	17	74,6 ± 13,0	66,3 ± 5,2	4	50,0 ± 50,0	0,0 ± 0,0

¹Médias de mortalidade total (\pm E.P) não diferem estatisticamente pelo modelo beta binomial inflacionado de zeros ao longo do tempo de avaliação ($P > 0,05$) e diferindo entre as duas armadilhas ($P < 0,0001$). ²Médias de mortalidade confirmada (\pm E.P) diferem estatisticamente pelo modelo beta binomial inflacionado de zeros entre as duas armadilhas ($P < 0,0001$) e ao longo do tempo de avaliação ($P < 0,05$)

Tabela 10 - Estimativa do tempo letal médio (TL₅₀), em dias, e intervalo de confiança para fêmeas de *Hypothenemus hampei* após passarem por armadilha de auto-inoculação contendo o fungo *Beauveria bassiana* impregnado sobre tecido têxtil Lã "Sherpa" e mantidas por dez dias a 25 ± 1 °C, UR 60 ± 10%

Dias em campo	n	TL ₅₀ (IC)	Coefficiente angular (± E.P)	X ²	g.l.
1	62	5,5 (4,6; 6,3)	5,5 ± 0,4	18,7	6
23	70	4,4 (3,9; 5,0)	5,7 ± 0,4	11,5	6
29	17	4,9 (4,3; 5,3)	6,4 ± 0,9	4,9	8
37	111	3,7 (3,5; 4,6)	7,2 ± 0,4	12,4	7
52	246	3,1 (2,6; 3,6)	4,9 ± 0,2	13,8 ^{ns}	4
57	42	3,7 (3,3; 4,1)	3,8 ± 0,3	5,5	8
81	61	5,2 (4,7; 5,7)	7,0 ± 0,5	19,7	8
141	97	4,0 (3,3; 4,7)	2,7 ± 0,2	24,1	8

n.: número de insetos testados; IC: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; X²: valor de qui-quadrado calculado; g.l.: graus de liberdade.

No segundo experimento, as brocas que passaram pela armadilha de auto-inoculação com fungo, assim como para o primeiro experimento, também apresentaram mortalidade elevada, variando entre 96,2 a 100% para mortalidade total e 92,3 a 100%, para a mortalidade confirmada. A mortalidade média obtida com as brocas da armadilha de auto-inoculação sem fungo foi de 18,2% e uma taxa de infecção natural de 2,2%. A TL₅₀ para este período variou de 2,7 a 3,8 dias, sendo que com 40 dias diferiu das demais avaliações, apresentando o maior tempo letal (Tabela 11). Esses resultados demonstram que o patógeno permaneceu infectivo até o último dia da avaliação (40 dias) em condições de campo

Tabela 11 - Mortalidade total, confirmada e corrigida e estimativa do tempo letal médio (TL₅₀), em dias, e intervalo de confiança para fêmeas de *Hypothenemus hampei* após passarem por armadilha de auto-inoculação contendo o fungo *Beauveria bassiana* impregnado sobre tecido têxtil Lã “Sherpa” e mantidas por dez dias a 25 ± 1 °C, UR 60 ± 10%

	Dias em campo	n	Mortalidade total (%) [*]	Mortalidade confirmada (%) [*]	TL ₅₀ (IC)	Coeficiente		
						angular (± E.P)	χ ²	g.l.
Armadilha de auto-inoculação	14	36	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	2,7 (2,2; 3,2)	4,5 ± 0,4	13,1	8
	20	54	100,0 ± 0,0	97,7 ± 2,3	3,1 (2,8; 3,3)	6,8 ± 0,6	11,3	8
	36	16	96,2 ± 3,85	92,3 ± 7,7	-	-	-	-
	40	79	97,0 ± 3,03	92,9 ± 3,6	3,8 (3,5; 4,2)	5,6 ± 0,4	13,9	8
Armadilha de auto-inoculação sem fungo	14	32	4,8 ± 4,8	4,8 ± 4,8	-	-	-	-
	20	3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-	-	-	-
	36	13	50,0 ± 9,6	0,0 ± 0,0	-	-	-	-
	40	27	18,1 ± 6,6	4,2 ± 4,2	-	-	-	-

* Médias de mortalidade (± E.P). n.: número de insetos testados; IC: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro; χ²: valor de qui-quadrado calculado; g.l.: graus de liberdade; – não se aplica.

A viabilidade e a concentração dos conídios do fungo *B. bassiana* produzidos após impregnação sobre o tecido selecionado e associado à armadilha de auto-inoculação reduziram ao longo do tempo nos dois experimentos (Figura 11). Sendo que a redução foi mais acentuada para a concentração do que para a viabilidade. Durante o primeiro experimento, a viabilidade passou de 98,3% logo após a montagem das armadilhas para 86,9% após 65 dias (Figura 11 A). Para as avaliações feitas a partir de 120 dias (Figura 11 A), por ter sido obtida por amostragem diferente da anterior, foram analisadas separadamente, não se observando diferenças entre as avaliações deste período ($P > 0,05$). Após 120 dias em campo, a viabilidade foi de 72,0% e com 160 dias reduziu-se para 44,0%. A concentração teve uma redução exponencial significativa ao longo do tempo ($P < 0,05$) ajustada pelo modelo ($X = 9,2 \times 10^8 * \exp(-0,02 * \text{dias})$), variando de $9,34 \times 10^8$ para $2,95 \times 10^8$ conídios.cm⁻².

A viabilidade dos conídios no segundo experimento passou de 99,2% na instalação do experimento para 78,1% na última avaliação (40 dias) (Figura 11 B). Com relação à concentração de conídios durante este experimento, foi observada uma redução ao longo das avaliações, variando de $5,23 \times 10^8$ a $4,79 \times 10^8$ conídios.cm⁻², não apresentando diferenças significativas ($P > 0,05$). Com isso, verificou-se que a redução da concentração de conídios nesse experimento foi menor quando comparada ao primeiro.

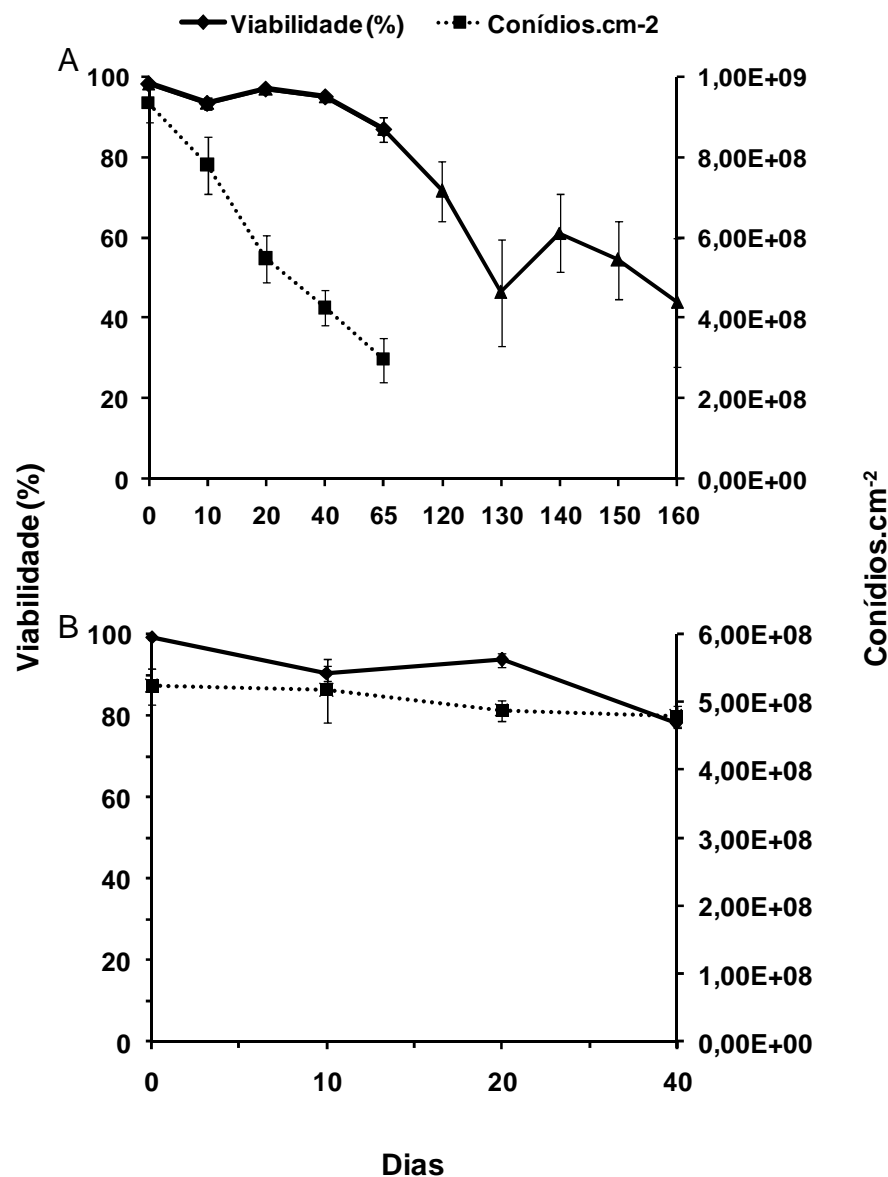


Figura 11 – A. Viabilidade e concentração de conídios do fungo *Beauveria bassiana* impregnado sobre tecido têxtil e associada à armadilha de auto-inoculação para controle de *Hypothenemus hampei*. (03-05-2012 a 18-10-2012) e B. Viabilidade e concentração de conídios de *B. bassiana* durante o período experimental (07-09-2012 a 02-11-2012).

Para o primeiro experimento a redução da viabilidade e a concentração do patógeno presente na armadilha foi afetada pelas condições climáticas. Houve uma correlação negativa entre as TMAX e URMAX, sendo que o aumento dessas variáveis diminui a concentração do patógeno. A TMIN e TMED correlacionaram positivamente com o aumento da concentração de conídios. Não se observou correlação entre concentração e volume de chuva (Tabela 12). A viabilidade foi afetada negativamente pelo aumento da TMED, URMAX e a precipitação, não existindo uma correlação com as demais variáveis climáticas. (Tabela 12).

Tabela 12 - Coeficiente de correlação (C.C) de Spearman entre as variáveis: temperatura máxima (T MAX), mínima (T MIN) e média (T MED), umidade relativa máxima (UR MAX) e média (UR MED) e a precipitação média em relação viabilidade e concentração de conídios do fungo *Beauveria bassiana* impregnado sobre tecido têxtil e associada à armadilha de auto-inoculação para controle de *Hypothenemus hampei* para o período experimental de (03-05-2012 a 18-10-2012) considerando os 65 dias iniciais

Concentração de conídios						
	T MX	T MIN	T MED	UR MAX	UR MED	Precipitação
C.C	-0.73	0.84	0.74	-0.73	-0.65	-0.45
Valor-p	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0.0813
Viabilidade de conídios						
	T MX	T MIN	T MED	UR MAX	UR MED	Precipitação
C.C	-0.57	0.34	0.17	-0.57	-0.24	-0.55
Valor-p	0.0212	0.2035	0.5293	0.0212	0.3775	0.0266

4.2 Discussão

Devido à baixa virulência apresentada pelos nove isolados utilizados neste trabalho, não conseguimos selecionar um isolado de *Beauveria bassiana* para o controle de *H. hampei* baseando-se no critério de mortalidade. Valores baixos de mortalidade também foram observados por Varela e Morales, (1996) quando pulverizaram broca-do-café com 10^7 conídios.mL⁻² de isolados de *B. bassiana*, após 10 dias, a mortalidade das brocas para cinco isolados testados variaram de 24,1 a 35% e Neves e Hirose (2005) quando as brocas foram pulverizadas com a mesma concentração com auxílio de um pulverizador tipo “Pasche” a mortalidade corrigida para 10 de 11 isolados ficou entre 23,6 e 49% e mortalidade confirmada de 10,7 a 35,2%. A alta concentração de conídios de *B. bassiana* necessárias para controlar *H. hampei* em laboratório justificou o nosso interesse em desenvolver a estratégia de disseminação do fungo com armadilha já que na armadilha os insetos necessariamente entram em contato com uma concentração de conídios extremamente alta, o que posteriormente provocará sua morte no ambiente e a esporulação do patógeno sobre seu corpo poderá contribuir para disseminação da doença para outras brocas no agroecossistema.

Outros autores obtiveram mortalidade elevadas das brocas o que pode estar associado às metodologias diferentes de inoculação utilizadas, especialmente por imersão. Alguns autores aplicando a mesma concentração de diferentes isolados de

B. bassiana, observaram até 100% de mortalidade das brocas para grande maioria dos isolados. Posada e Vega (2005) avaliaram a mortalidade de brocas imersas por 2 min em suspensão de 10^7 conídios.mL⁻², colocadas individualmente em frascos com papel filtro umedecido e sem fornecimento de alimento, conseguindo uma mortalidade de 100% para 47 isolados de *B. bassiana*. Em outros trabalhos antes da aplicação do fungo, a superfície do corpo da broca foi tratada com 0,025% Triton X-100 (Jiménez-Gómez, 1992) e 0,5% hipoclorito de sódio (González; Posada; Bustillo, 1993), e os insetos foram inoculados por imersão em suspensões de 10^7 conídios.mL⁻², resultando em mortalidade superior a 90% para todos os isolados. Possivelmente a imersão das brocas nas suspensões de conídios permite que um maior número de conídios fique aderido a cutícula do inseto e isso aliado ao processo de homogeneização das brocas no momento da imersão nas suspensões fúngicas pode provocar ferimentos na cutícula do inseto e facilita a entrada do patógeno e contribuir para a elevada mortalidade encontrada nestes trabalhos.

James et al. (1998) relataram que o método de exposição de *Hippodamia convergens* Guérin-Meneville (Coleoptera: Coccinellidae) a suspensão de conídios de *B. bassiana* por imersão resultou em uma dose por inseto 5 vezes maior que aplicação por pulverização. Assim, uma das hipóteses para baixa mortalidade encontrada no presente trabalho pode estar relacionada com o fato da quantidade de conídios que ficou aderido na cutícula da broca após a aplicação em torre de Potter não ter sido suficiente para causar a morte da maioria dos insetos. A cutícula destes insetos é altamente hidrofóbica, o que dificulta a aderência dos conídios, que também são hidrofóbicos, quando estes são aplicados em suspensão. O contato direto dos insetos com a alta concentração de conídios nos tecidos pode explicar as altas mortalidades, superiores a 90% nas armadilhas e em relação aos 37,5% quando foi aplicado em suspensão.

A quantidade de conídios produzidos nos tecidos têxteis avaliados, provavelmente está relacionada às características físicas de cada tipo de tecido relacionadas a capacidade de retenção do meio de cultura usado para inoculação do patógeno e a área de superfície para esporulação. Apesar de não ter sido quantificado a capacidade de retenção do meio para cada tecido, durante as inoculações visualmente foi observado que o tecido sintético Lã "Sherpa", que apresentou a maior produção de conídios, retinha uma quantidade de meio um pouco superior aos demais.

Praticamente todos os trabalhos encontrados com utilização de tecido têxtil para impregnação de fungos entomopatogênicos utilizam os tecidos sintéticos. Dubois et. al (2004a) quando impregnaram *B. brongniartii* e *M. anisopliae* em tecido sintético obtiveram produção de $1,12 \times 10^8$ e $1,65 \times 10^8$ conídios.cm⁻², respectivamente e para um produto comercial de tecido contendo *B. brongniartii* (Nitto Denko®) a quantidade de conídios obtidos foram de $4,25 \times 10^8$ conídios/cm². Hajek et. al (2006) estudando a eficiência do produto Biolisa Kamikiri® e tecido têxtil de poliéster impregnado com meio contendo *M. anisopliae* encontraram concentrações de $3,03 \times 10^8$ e $1,24 \times 10^8$ conídios/mm², respectivamente. Marannino et. al (2008) obtiveram $4,45 \times 10^8$ conídios.cm⁻² em tecido com *M. anisopliae*. Shanley et. al (2009) impregnaram meio contendo *B. bassiana* sobre tecido têxtil, encontraram densidade inicial de $3,06 \times 10^8$ conídios viáveis.cm⁻². No geral, esses valores são próximos aos encontrados no presente trabalho.

As elevadas mortalidades da broca-do-café após um curto tempo de exposição aos conídios de *B. bassiana* presentes em tecido têxtil é um resultado promissor para o controle deste inseto. Essa é a primeira tentativa de utilização de produção de fungo em tecido associado ao uso de atraentes químicos em armadilhas para controle da broca-do-café. Outros autores também encontraram alta mortalidade trabalhando com outras pragas exposta por diferentes tempos a inóculo do patógeno produzidos sobre tecido têxtil. Marannino et. al (2008) estudando em laboratório o efeito de tecido têxtil impregnado com conídios de *M. anisopliae* para o controle do coleóptero *Capnodis tenebrionis* observaram mortalidade de até 100% dos insetos após contato com o fungo presente no tecido. Higuchi et al., (1997) trabalhando com o coleóptero *Psacotha hilaris*, forçaram os insetos a andar sobre tecido impregnado com *B. brongniartii* por 5 segundos, resultando em 100% de mortalidade. Dubois et. al (2004a) observaram que *A. glabripennis* expostos a tecido contendo *B. brongniartii* com $1,12 \times 10^8$ conídios.cm⁻² por 25, 50 ou 250 segundos morreram mais rápido que quando expostos a 5 segundo de exposição.

O tempo letal médio de *H. hampei* expostos aos conídios de *B. bassiana* sobre tecido foi em geral, semelhante ao valor obtido por outros autores trabalhando com pulverização desse patógeno sobre este inseto. Posada e Vega (2005) encontraram uma sobrevivência média entre 3,2 - 9,6 dias e Cruz; Gaitan e Gongora (2006) observaram uma variação de 4,75 a 5,98 dias.

Observamos que em alguns estudos o fotoperíodo afetou a produção do patógeno nos tecidos. No entanto a influência da luz na produção de conídios não está elucidada existindo resultados contraditórios na literatura. Onofre et al. (2001) trabalhando com diferentes regimes de luz no crescimento e esporulação de *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* concluíram que as melhores condições para o crescimento micelial e esporulação foram conseguidas com luz contínua. Rangel et al. (2011) verificaram que a produção de conídios de *M. robertsii* em meio PDAY não foi afetada pelo regime de luz.

O decréscimo da viabilidade de conídios produzidos sobre o meio impregnado sobre o tecido têxtil e armazenado em condições de luz (12 horas) e escuro constante é normal e dependendo das condições ambientais que é submetido à redução pode ser mais acentuada. Higuchi et al., (1997) observaram que tecido impregnado com *B. brongniartii* quando armazenado em diferentes temperaturas a concentração de conídios viáveis decresceram rapidamente com o tempo. Nas temperaturas de 35, 37 e 39 °C a redução foi mais acentuada que nas de 5, 10, 15 e 20 °C.

Observou-se que a redução da viabilidade do patógeno foi menos acentuada quando o fungo foi produzido e armazenado com 12 horas de fotofase do que quando foram produzidos e armazenados no escuro. Provavelmente quando o patógeno é produzido na presença de luz, induza a uma maior resistência à sobrevivência e estresse das condições ambientais. O efeito da luz visível durante o crescimento do micélio na tolerância dos conídios produzidos ao estresse não é conhecido. Entretanto, a presença da luz afeta o acúmulo de trealose e da proteína de choque térmico durante o crescimento micelial e indica que os conídios produzidos nesta condição quando expostos a luz podem exibir maior tolerância a UVB e calor úmido (Rangel et al., 2011). Estes mesmos autores verificaram que a tolerância a UVB de conídios de *M. robertsii* produzidos em meio PDAY sob luz visível contínua foi duas vezes maior do que os conídios produzidos no escuro.

Os efeitos da elevação da UR na redução da concentração e viabilidade de conídios de *B. bassiana* produzidos em tecido foram claramente demonstrados neste trabalho. Resultados similares também foram encontrados por outros autores. Em geral, é reconhecido que a sobrevivência de conídios puros é inversamente proporcional aos níveis de umidade de armazenamento para *B. bassiana* (Hong et

al. 2001; Hong et al. 2005) e de forma geral UR próximas a saturação estimula os conídios a germinarem (ALVES, 1998).

Várias condições ambientais têm sido associadas ao comportamento de abandono do fruto de café por fêmeas colonizadoras da broca-do-café para colonização de novos frutos sendo que os estímulos podem ser pelo estágio fenológico do fruto, aumento da insolação, voláteis emitidos pelos frutos, período chuvoso, umidade relativa do ar, estado fisiológico das fêmeas, dentre outros (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997, FERREIRA et al., 2000).

De forma semelhante ao encontrado neste trabalho, onde houve uma correlação positiva de capturas de brocas com os períodos de chuva Mathieu et al. (1997) e Ferreira et al. (2000) observaram que os picos de coleta das brocas ocorreram nos períodos de chuvas, evidenciando que o umedecimento dos frutos é um fator que estimula a saída das fêmeas colonizadoras da broca-do-café. Esta condição também explica a correlação positiva em relação ao aumento da umidade relativa do ar com a captura deste inseto.

Os insetos apresentam zona de conforto térmico e temperatura ótima para o desenvolvimento. Para a broca-do-café a temperatura ótima é de aproximadamente 24,5 °C (BERGAMIN, 1943) o que pode explicar a correlação negativa da elevação da temperatura e a captura de brocas.

A captura dos insetos é influenciada também pelo estado fenológico da planta que determina a densidade populacional da broca-do-café na área. A média de infestação dos frutos foi 47,0% do início do primeiro experimento até a 5ª semana (03/05 a 07/06) quando as plantas estavam no estágio de frutificação, com a maioria dos frutos "cereja". Nesta mesma semana deu início a colheita do café na área, finalizada no início da 6ª semana (08/06), o que também pode explicar a menor quantidade de brocas-do-café coletadas no segundo experimento, iniciado a partir do mês de setembro. .

As brocas-do-café capturadas após a colheita, na entressafra, são provenientes de frutos infestados caídos no solo ou remanescentes nas plantas. Na safra seguinte estes insetos serão os responsáveis pela infestação dos novos frutos, o que pode explicar a captura de brocas mesmo depois da colheita. A quantidade de frutos remanescente nas plantas e no solo é determinante para o tamanho inicial da população e conseqüentemente na intensidade de infestação na safra seguinte (DUFOUR; FRÉROT, 2008). A eficiência das armadilhas para captura de insetos é

em parte influenciada pelos modelos de armadilhas, tipos de atraentes químicos e a taxa de liberação desses compostos. Neste trabalho, a maior captura de brocas pela armadilha IAPAR pode em parte ser atribuída a sua maior área de abertura para entrada da broca sendo de 201,3 cm², superior a da armadilha de auto-inoculação que foi de 29,31 cm². Embora o mesmo atraente e o mesmo tamanho de orifício de liberação dos compostos tenha sido utilizado em todas as armadilhas, a conformação da armadilha pode influenciar a taxa de liberação do volátil (Uemura-Lima et al. 2010).

Apesar da menor captura da broca-do-café pela armadilha de auto-inoculação este sistema mostrou-se extremamente eficiente na inoculação do patógeno *B. bassiana* por um longo período. Uma abordagem semelhante para o controle de broca-do-café foi feita por Batista-Filho; Abrahão; Cruz (1988), aplicando conídios puros de *B. bassiana* na parede interna de uma armadilha utilizada para monitoramento de *H. hampei*, resultando em infecção de até 100% das brocas capturadas. No entanto, não foram apresentadas informações quanto à persistência do inoculo ao longo do tempo nestas armadilhas.

Este é o primeiro trabalho que buscou a associação de armadilha atrativa com o fungo *B. bassiana* impregnado em tecido têxtil para o controle da broca-do-café e se mostrou uma técnica promissora. A utilização tecidos impregnados com fungos entomopatogênicos para o controle de outros coleópteros sem armadilhas ou atraentes foi estudada por diversos autores obtendo elevada mortalidade, semelhantes as observadas no presente estudo. Stand et al. (1991) observaram que tecido impregnado com *B. brongniartii* colocado em volta de troncos de árvores resultou em até 100% de mortalidade de *Semanotus japonicus* (Coleoptera: Cerambycidae). Shimazu et al., (1995) utilizou tecido impregnado com *B. bassiana* colocado em troncos de árvores e obtiveram o controle de até 100% de larvas de *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae).

A exposição de fêmeas adultas da broca-do-café a conídios de *B. bassiana* ESALQ-PL63 por apenas 5 segundos já foi suficiente para adquirir uma dose letal do patógeno. Assim, o fator que pode estar determinando os elevados níveis de mortalidade das brocas após o fungo ficar exposto às condições de campo por até 151 dias mesmo com redução na viabilidade do patógeno, pode estar associado à quantidade de conídios adquirida pelas brocas em contato com o fungo no tecido presente na armadilha.

A conservação da viabilidade e virulência do patógeno impregnado em tecido e mantido por longos períodos em condições de campo também foram observados por outros autores. Shanley et. al (2009) encontraram 100% de mortalidade do cerambicídeo *Anoplophora glabripennis* usando tecido impregnadas com *M. anisopliae*, mantidas em condições de campo por 119 dias, com temperatura média para o período de 20,5 °C. Também foi obtida 100% de mortalidade desse cerambicídeo por *B. bassiana* impregnada em tecido, após 63 dias em campo com temperatura média para o período de 24,6 °C.

Shanley et. al (2009) sugerem que os conídios na superfície de tecido têxtil são produzidos de forma semelhante aos conídios sobre a superfície de insetos. Esta condição de alguma forma mantém os conídios infectivos por longos períodos no ambiente. Conforme observado por Sprenkel e Brooks (1977) que verificaram que cadáveres de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) mumificado com o fungo *Nomurea rileyi* continham conídios infectivos por um período de até 281 dias em condições de campo. De forma semelhante Thomas; Gbongboui e Lomer (1996) observaram a persistência de estruturas infectivas de *Metarhizium flavoviride* em cadáveres de *Hieroglyphus daganensis* Krauss (Orthoptera, Acrididae).

Higuchi et al. (1997) observaram que quando o fungo *B. brongniartii*, impregnado em tecido têxtil foi armazenado sob regime variável de temperatura ao longo do dia e que foram umedecida com água de forma periódica as células fúngicas ficaram viáveis por até 40 dias. Sugerindo que a precipitação pode contribuir para aumento da longevidade do patógeno em campo.

Diferentemente do observado a campo, nos experimentos de laboratório a redução na viabilidade dos conídios no tecido impregnado com *B. bassiana* foi significativamente mais rápida. Vários fatores podem estar associados a essa conservação prolongada do patógeno nas condições de campo, como as médias de temperatura que em geral ficaram próximas de 20 °C, pelo local em que o fungo foi colocado na armadilha o qual conferiu uma maior proteção contra a incidência direta da radiação solar e pelo próprio local em que o experimento foi montado que tinha uma condição de sombreamento, propiciando uma condição microclimática favorável.

Levando em consideração a fenologia do cafeeiro nas condições tropicais do Brasil, a fase reprodutiva inicia-se em setembro completando a maturação dos frutos em meados de junho, sendo que da fase de granação a maturação dos frutos tem-

se cerca de 180 dias, entre os meses de janeiro a junho (CAMARGO E CAMARGO, 2001). Considerando a preferência de *H. hampei* por frutos de café cereja e maduros sugere-se que a instalação da armadilha de auto-inoculação no início da fase de granação dos frutos (Janeiro) poderia garantir o controle da broca durante todo este período de maior preferência dos frutos de café por este inseto. Outra estratégia que poderia ser também adotada é a colocação da armadilha no início do período de “transito” da broca, que ocorre entre os meses de setembro a outubro, o que garantiria o controle antes que a broca começasse a provocar alguma perda na produção.

Diante do exposto, a técnica de impregnação do fungo entomopatogênico *B. bassiana* sobre tecido têxtil e sua associação à armadilha de auto-inoculação apresentaram resultados promissores. Futuros estudos devem ser feitos para melhorar a eficiência de atração de brocas pela armadilha e determinar a eficiência da transmissão do patógeno entre os insetos contaminados na armadilha e insetos sadios no campo para estimar a eficiência da auto-inoculação como estratégia de controle da praga em campo no longo prazo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os nove isolados de *Beauveria bassiana* quando pulverizados sobre *Hypothenemus hampei* na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹, apresentaram baixas porcentagens de mortalidades. O tecido sintético tipo Lã “Sherpa” permitiu a maior produção de conídios do isolado de *B. bassiana* ESALQ-PL63, sendo que sua produção foi maior quando incubado no escuro que em fotofase de 12 horas. A exposição de *H. hampei* a conídios produzidos sobre tecido sintético Lã “Sherpa” por apenas 5 segundos foi suficiente para causar mortalidade superior a 85% dos insetos. A concentração e a viabilidade de conídios produzidos sobre o tecido sintético Lã “Sherpa” reduziu mais rápido quando incubadas no escuro comparado aos que foram produzidos em fotofase de 12 horas. O tecido sintético impregnado com *B. bassiana* e armazenado em diferentes UR, teve sua concentração e viabilidade afetada negativamente com o aumento da UR.

A captura de *H. hampei* pelas armadilhas foi positivamente correlacionada com a precipitação e UR. Maiores quantidades da broca foram coletadas pela armadilha IAPAR comparado a armadilha de auto-inoculação e a armadilha de auto-inoculação sem fungo em todas as semanas avaliadas. A armadilha de auto-inoculação e a armadilha de auto-inoculação sem fungo tiveram capturas semelhantes, mostrando que a colocação do patógeno na armadilha não interferiu na atratividade da mesma. Foram observados elevados valores de mortalidade total e confirmada de *H. hampei* que passaram pela armadilha de auto-inoculação em praticamente todas as avaliações. A viabilidade e a concentração do patógeno na armadilha de auto-inoculação tiveram uma redução ao longo do tempo. Sendo que a redução da viabilidade foi menor que o da concentração. O fungo permaneceu com viabilidade de aproximadamente 44% e causando 66,3% de mortalidade confirmada mesmo após 151 dias no campo. Estes resultados sugerem que novos estudos devem ser realizados buscando o aprimoramento deste sistema de auto-inoculação proposto.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. cap 11, p. 289-381.
- BATISTA-FILHO, A.; ABRAHAO, J.; CRUZ, B.P.B. Contribuição ao estudo de *Hypothenemus hampei*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 55, p. 65, 1988. Suplemento.
- BENASSI, V.L.R.M. Levantamento dos inimigos naturais da Broca-do-Café *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae) no Norte do Espírito Santo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 24, p. 635-638, 1995.
- 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.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 28, de 9 de agosto de 2010. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 ago. 2010. Seção 1.
- 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.
- BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V.; SUCKLING. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, p. 1311-1316, 1989.
- BRUN, L. O.; MARCILLAUD, C.; GAUDICHON, V.; SUCKLING. Monitoring of endosulfan and lindane resistance in the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 80, p. 129-135, 1990.
- CAMARGO, A. P de. CAMARGO, M. B. P de. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, p. 65-68, 2000.
- CASTRO, T.R. **Estudos para o desenvolvimento de metodologia da produção *in vivo* do fungo *Meozygites floridana* Weiser e *Mima* para controle do ácaro *Tetranychus urticae* Koch**. 2011. 87p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.
- COSTA, J.N.M.; SILVA, R.B. da; RIBEIRO, P.A.; GARCIA, A. Ocorrência de *Beuveria bassiana* (Bals) Vuill. em broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) no estado de Rondônia, Brasil. **ACTA AMAZONICA**, Manaus, v. 32, p. 517-519, 2002.

CRUZ, L.P.; GAITAN, A.L.; GONGORA, C.E. Exploiting the genetic diversity of *Beauveria bassiana* for improving the biological control of the coffee berry borer through the use of strain mixtures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.71, p.918-926, 2006.

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**, Jaboticabal, v. 27, p. 325-335. 1998.

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.

DE LA ROSA, W.;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, n. 5, p.1409-1414, 2000.

DUBOIS, T.; LI, Z.; JIAFU, H.; HAJEK, A.E. Efficacy of fiber bands impregnated with *Beauveria brongniartii* cultures against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 320-328, 2004a.

DUBOIS, T.; HAJEK, A.E.; JIAFU, H.; LI, Z. Evaluating the efficiency of entomopathogenic fungi against the asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae), by using cages in the field. **Environmental Entomology**, College, v. 33, n. 1, p. 62-74, 2004b.

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.

FERNÁNDEZ, S.; CORDERO, J. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) em condiciones de laboratorio. **Bioagro**; Barquisimeto, v.19, n. 1, p. 35–40, 2007.

FERREIRA, A.J.; BUENO, V.H.P.; MORAES, J.C.; CARVALHO, G.A.; BUENO FILHO, J.S. de S. Dinâmica Populacional da Broca-do-Café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) em Lavras, MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 237-244, 2000.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333p.

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

GONZÁLEZ, G. M. T.; POSADA, F. F.J.; BUSTILLO P. A. E.; Desarrollo de um bioensayo para evaluar La patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. **Cenicafé**, Chinchiná, v. 44, n.3, p. 93-102, 1993.

HAJEK, A.E.; HUANG, B.; DUBOIS, T.; SMITH, M.T.; LI, Z. Field studies of control of *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) using fiber bands containing the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 329-343, 2006.

HARAPRASAD, N.; NIRANJANA, S.R.; PRAKASH, H.S.; SHETTY, H.S.; WAHAB, S. *Beauveria bassiana* – a potential mycopesticide for the efficient control of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) in India. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 251-260, 2001.

HIGUCHI, T.; TAKESHI, S.; SHUJI, S.; MIZOBATA, T.; KAWATA, Y.; e NAGAI, J. Development of biorational pest control formulation against longicorn beetles using a fungus, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 84, n. 3, p.236-243, 1997.

HONG, T.D; GUNN, J.; ELLIS, R.H.; JENKINS, N. E.; MOORE, D. The effect of storage environment on the longevity of conidia of *Beauveria bassiana* . **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 5, p. 597-602, 2001.

HONG, T.D.; EDGINGTON, S.; ELLIS, R.H.; MURO, M.A.; MOORE, D. Saturated salt solutions for humidity control and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia .**Journal of Invertebrate Pathology** , San Diego, v. 89, p.136–143, 2005.

JAMES, R. R.; CROFT, B. A.; SHAFFER, B. T.; LIGHTHART, B. Impact of Temperature and Humidity on Host-Pathogen Interactions Between *Beauveria bassiana* and a Coccinellid. **Environmental Entomology**, College Park, v. 27, n. 6, p. 1.506-1.513, 1998.

JARAMILLO, J.; CHABI-OLAYE, A.; KAMONJO, C.; JARAMILLO, A.; VEJA, F.E.; POEHLING, H.M.; BORGEMEISTER, C. Thermal Tolerance of the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*: Predictions of Climate Change Impact on a Tropical Insect Pest. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 4, n. 8, p. 1-11, 2009.

JARAMILLO, J.; MUCHUGU, E.; VEGA, F.E.; DAVIS, A.; BORGEMEISTER, C.; CHABI-OLAYE, A. Some like it hot: the influence and implications of climate change on coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee production in East Africa. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 6, n. 9, p. 1-14, 2011.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, J.Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del cafe. **Cenicafé**, Chinchiná, v. 43, n.3, p. 84-98, 1992.

LIU, H.; BAUER, L.S. Microbial control of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) with *Beauveria bassiana* strain GHA: Greenhouse and field trials. **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 124-132, 2008.

MANIANIA, N.K.A. Device for Infecting Adult Tsetse Flies, *Glossina* spp., with an Entomopathogenic Fungus in the Field. **Biological Control**, Orlando, v. 11, p. 248-254, 1998.

MAPA/Agrofit. 2012. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. Acesso em: 10 nov. 2012.

MARANNINO, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZA, C.; DE LILLO, E.; QUESADA-MORAGA, E. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. to target larvae and adults of *Capnodis tenebrionis* (L.) (Coleoptera: Buprestidae) in soil and fiber band applications. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 97, p.237–244, 2008.

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.; BRUN, L.O.; MARCHILLAUD, C.; FRÉROT, B. Trapping of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferr. (Col. Scolytidae) within a mesh-enclosed environment: interaction of olfactory and visual stimuli. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 121, p. 181-186, 1997.

MATHIEU, F.; MALOSSE, C.; FRÉROT, B. Identification of the volatile components released by fresh coffee berries at different stages of ripeness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 1106-1110, 1998.

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.

MENDESIL, E.; BRUCE, T.J.A.; WOODCOCK, C.M.; CAULFIELD, J.C.; SEYOUUM, E.; PICKETT, J.A. Semiochemicals used in host location by the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 8, p. 944-950, 2009.

MENDONZA MOURA, J.R. **Resposta da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* a estímulos visuais e semioquímicos**. 1991. 44p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

MIGIRO, L.N.; MANIANIA, N.K.; CHABI-OLAYE, A.; VANDENBERG, J. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) Isolates to the Adult Pea Leafminer (Diptera: Agromyzidae) and Prospects of an Autoinoculation Device for Infection in the Field. **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, n.2, p.468-475, 2010.

NEVES, P.M.J.O.; SANTORO, P.H.; SILVA, R.Z. Utilização de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill no manejo integrado da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). In: VEZON, M.; PAULA JR., T.J de.; PALLINI, A. (Ed.).

Tecnologias Alternativas para o Controle de Pragas e Doenças. Viçosa (Brasil): EPAMIG, 2006. p. 137-158.

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.

NIASSY, S.; MANIANIA, N.K; SUBRAMANIAN, S.; GITONGA, L.M.; EKESI, S. Performance of a semiochemical-baited autoinoculation device treated with *Metarhizium anisopliae* for control of *Frankliniella occidentalis* on French bean in field cages . **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 14, n.2, p. 97–103, 2011.

OKUMURA, A.S.K.; PEDRO NEVES, M.O.J.; POSSAGNOLO, A.F.; CHOCOROSQUI, V.R.; SANTORO, P.H. Controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) FERRARI em terreiros de secagem de café. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 277-282, 2003.

ONOFRE, S. D.; MINIUK, C.M.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes .**Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, n.3, p.613-616, 2001.

OLIVEIRA, D. G. P de. **Proposta de um protocolo para avaliação da viabilidade de conídios de fungos entomopatogênicos e determinação da proteção ao calor conferida a *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* pela formulação em óleo emulsionável.** 2009. 90p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PIMENTA, C.J e VILELA, T.C. Efeito de diferentes porcentagens de grãos brocados no rendimento e atividade da polifenoloxidase em café (*Coffea arabica* L.) da região de Três Pontas, MG. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.5, p.179-184, 1999.

POSADA, F.J; VEGA, F.E. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 5, n.37, p 1-10, 2005.

R Development Core Team (2007). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. Disponível em: < <http://www.R-project.org>>. Acesso em 15 out. 2012.

RANGEL, D. E. N; FERNANDES, E. K.K.; BRAGA, G. U. L.; ROBERTS, D. W. Visible light during mycelial growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance . **FEMS Microbiology Letters**, Amstermad, v. 315, p. 81–86, 2011.

SCHNEIDER-ORELLI, O. **Entomologisches praktikum.** Aarau: Sauerlander, 1947. 149p.

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**, Oxford, v.12, n.5, p. 631-635, 2010

SHANLEY, R.P.; HAJEK, A.E. Environmental contamination with *Metarhizium anisopliae* from fungal bands for control of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 18, n. 8, p.109-120, 2008.

SHANLEY, R.P.; KEENA, M.; WHEELER, M.M.; LELAND, J; HAJEK, A.E. Evaluating the virulence and longevity of non-woven fiber bands impregnated with *Metarhizium anisopliae* against the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 94–102, 2009.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; COTTRELL, T.E.; GARDNER, W.A.; BEHLE, R.W.; REE, B.; HARRIS, M.K. Efficacy of Entomopathogenic Fungi in Suppressing Pecan Weevil, *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae), in Commercial Pecan Orchards. **Southwestern Entomologist**, Dallas, v. 34, n. 2, p. 111-120, 2009a.

SHAPIRO-ILAN, D.I.; COTTRELL, T.E.; GARDNER, W.A.; LELAND, J.; BEHLE, R.W. Laboratory Mortality and Mycosis of Adult *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae) Following Application of *Metarhizium anisopliae* in the Laboratory or Field. **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 44, n. 1, p. 24-36, 2009b.

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.

SHIMAZU, M; TSUCHIYA, D.; SATO, H.; KUSHIDA, T. Microbial control of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae) by application of nonwoven fabric strips with *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on infested tree trunks. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 30, n. 1, p. 207-2-13, 1995.

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.

SOLOMON, M.E. Controlo f humidity with potassium hidroxide, sulphuric acid, or other solutions. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 42, p. 543-554, 1952.

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

SPRENKEL, R. K.; BROOKS, W. M. Winter Survival of the Entomogenous Fungus *Nomuraea rileyi* in North Carolina I. **Journal Of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 29, p. 262-266. 1977.

STAND, D.D.; SHIBATA, E.; YONEDA, Y.; HIGUCHI, T.; ICHINOSE, H.; YAMADA, N. Control method of the adults sugi bark borer, *Semanitus japonicas* Lacordaire (Coleoptera: Cerambycidae), using the nowoven fabric sheet with an entomogenous fungus, *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch, in Japanese cedar, *Cryptomeria japonica*. **Japanese society of Applied Entomology and Zoology**, Tokio, v.26, n. 4, p. 587-590, 1991.

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.

THOMAS, M.B.; GBONGOUI, C.; LOMER, C.J. Between-season Survival of the Grasshopper Pathogen *Metarhizium avoviride* in the Sahel. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, p. 569-573, 1996.

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.

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.; 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.

VEGA, F.E.; MERCADIER, G.; DAMON, A.; KIRK, A. Natural enemies of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in Togo and Ivory Coast, and additional entomofauna associated with coffee beans. **African Entomology**, Pretoria, v. 7, p. 243 – 248, 1999.

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.

VERA, J.T.; MONTOYA, E.C.; BENAVIDES, 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**, Oxford. v 21, n.1, p. 1-14, 2011.

VILLACORTA, A. Ocorrência de *Beauveria* sp. infectando a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) em lavouras do Estado do Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 13, p. 177-178, 1984.

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. **Proceedings...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p.2093-2098.