

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Igor Bitencourt Lima Moreira

Nematoides entomopatogênicos e *Beauveria bassiana* no controle da broca-do-café em condições de laboratório

**Monte Carmelo - MG
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Igor Bitencourt Lima Moreira

Nematoides entomopatogênicos e *Beauveria bassiana* no controle da broca-do-café em condições de laboratório

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, Campus Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

**Monte Carmelo - MG
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Igor Bitencourt Lima Moreira

Nematoides entomopatogênicos e *Beauveria bassiana* no controle da broca-do-café em condições de laboratório

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Agronomia, Campus Monte Carmelo, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho

Monte Carmelo, 14 de novembro de 2018.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Vanessa Andaló Mendes de Carvalho
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Gleice Aparecida de Assis
Membro da Banca

Prof. Dr. Lucas Silva de Faria
Membro da Banca

**Monte Carmelo - MG
2018**

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Vanessa Andaló pela sua importante colaboração para que esse trabalho fosse concluído com êxito. Por sua orientação e seu grande desprendimento em ajudar-me, sempre com entusiasmo e prontidão. Fica aqui meu sentimento de gratidão e admiração pela pessoa e profissional que é.

Aos meus familiares que sempre me ajudaram e me apoiaram em todo esse processo, e agradeço também aos meus amigos, em especial Alício Neto, Amanda, Ana Tamiosso e Hígor que me ajudaram nos dias de campo para a coleta dos frutos de café e Marlon pelos auxílios dados durante a escrita do mesmo. Agradeço também a Universidade Federal de Uberlândia por possibilitar a execução do experimento.

RESUMO

Dentre os principais problemas para a produção cafeeira no Brasil pode-se citar a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, que causa redução na produção e tem sido considerada de difícil controle. Assim, teve-se por objetivo avaliar o controle do *H. hampei* na cultura do cafeeiro, utilizando o fungo entomopatogênico *B. bassiana* e o nematoide entomopatogênico *H. amazonensis* MC01 isoladamente, bem como a eficácia de ação dos entomopatógenos quando associados. Foram feitos quatro experimentos onde através de técnicas diferentes avaliou-se a taxa de mortalidade resultante da utilização do fungo e do nematoide entomopatogênico. Foram utilizados três tratamentos, os dois entomopatógenos aplicados isoladamente e em conjunto, sendo aplicados sobre frutos brocados com o inseto (larvas e adultos). Posteriormente, frutos brocados foram imersos em suspensão dos nematoides e do fungo entomopatogênico em outro teste, os frutos foram imersos nas suspensões. Para avaliação do transporte de conídios de *B. bassiana* por *H. amazonensis* foram realizados testes verificando a mortalidade de larvas de *Tenebrio molitor* dispostas em local oposto à presença dos entomopatógenos. Além disso, *B. bassiana* e *H. amazonensis* foram adicionados a placas de Petri contendo ágar-água (1%) a fim de avaliar a locomoção dos entomopatógenos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre médias. Para o experimento contendo frutos brocados foi realizada a análise de regressão. De acordo com os dados obtidos quando os entomopatógenos foram aplicados na vermiculita, observou-se que para adultos de *H. hampei* os tratamentos utilizando *B. bassiana* e *H. amazonensis* MC01 isoladamente causaram as maiores mortalidades. Para os frutos mergulhados nas suspensões verificou-se que em relação à mortalidade de adultos e larvas não houve diferença significativa entre os tratamentos testados, ocorrendo diferença entre os tratamentos e o controle. Quando analisada a mortalidade do *T. molitor* utilizando as mesmas soluções observou-se que não houve diferença entre os tratamentos, porém quando avaliado a mortalidade causada pela aplicação em conjunto dos dois entomopatógenos, houve maior mortalidade pelo fungo *B. bassiana* em comparação ao *H. amazonensis* MC01. Para o último experimento a fim de avaliar a locomoção dos entomopatógenos de uma lado da placa para o outro obteve-se que no tratamento que continha a associação de fungo e nematoide foram encontrados juvenis e conídios do lado oposto da placa, podendo-se inferir que a presença de conídios deveu-se ao transporte por *H. amazonensis*.

Palavras-chave: cafeeicultura, controle biológico, *Hypothenemus hampei*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 Efeito de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Heterorhabditis amazonensis</i> na mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i>	8
2.2 Avaliação de mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i> com frutos mergulhados nas suspensões com entomopatógenos.....	9
2.3 Forésia de <i>Beauveria bassiana</i> por <i>Heterorhabditis amazonensis</i>	10
2.4 Deslocamento de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> e transporte de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> em ágar.....	12
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.1 Efeito de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Heterorhabditis amazonensis</i> na mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i>	12
3.2 Avaliação de mortalidade de <i>Hypothenemus hampei</i> com frutos mergulhados nas suspensões com entomopatógenos.....	16
3.3 Forésia de <i>Beauveria bassiana</i> por <i>Heterorhabditis amazonensis</i>	17
3.4 Deslocamento de <i>Heterorhabditis amazonensis</i> e transporte de conídios de <i>Beauveria bassiana</i> em ágar.....	18
4 CONCLUSÃO	19
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem ganhando grande destaque no setor da cafeicultura, sendo o maior produtor, exportador e o segundo maior consumidor de café do mundo. Um terço de toda safra mundial é proveniente de produção brasileira, mostrando assim sua grande importância tanto no âmbito produtivo quanto econômico. Cerca de 300 mil propriedades produtoras de café existem hoje no país, em que aproximadamente 80% são considerados como cafeicultura familiar (EMBRAPA CAFÉ, 2017).

Atualmente o Brasil possui 2,16 milhões de hectares de área plantada de café, onde 87% (1,88 milhão) dessa área são consideradas de produção, enquanto 13% (287,7 mil) ainda estão em formação (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2018a). A estimativa é que para o ano de 2018 a produção da safra cafeeira alcance 59,9 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2018b).

O estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de café do país, com aproximadamente 1,01 milhão de hectares em produção. Cerca de 31,55 milhões de sacas de café é a média de produção esperada para a safra de 2018 no estado (CONAB, 2018a). A região do Cerrado mineiro é de extrema importância para a cafeicultura brasileira, e vem sendo reconhecida mundialmente pelos seus cafés de qualidade (FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ DO CERRADO - FUNDACCER, 2015).

O Cerrado mineiro vem recebendo elevados investimentos nas áreas cafeeiras, o que impacta diretamente na sua produtividade. Para essa região espera-se uma produção de 6,5 milhões de sacas na safra 2018, que quando comparada a safra anterior teve um aumento de 79,5% (CONAB, 2018a).

Um dos grandes problemas para a produção cafeeira são as pragas que nela se encontram, dentre elas a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). Esse inseto originário da África apresenta cerca de 1 a 2 milímetros de comprimento e é considerada entre as mais prejudiciais na produção de café. O seu primeiro registro no Brasil foi em meados de 1922, mas hoje pode-se encontrar o inseto distribuído por todo o território nacional nas regiões cafeeiras. Esse inseto é de grande importância, pois é extremamente prejudicial ao cafeeiro, atacando os frutos em todos os estágios de maturação, desde os frutos verdes, maduros ou secos (GALLO et al., 2002). A broca-do-café também deprecia a classificação física pode comprometer a qualidade sensorial do fruto

Após o acasalamento a fêmea adulta abre um orifício, geralmente na coroa do fruto, e constrói galerias nas quais futuramente irá ovipositar, desagregando partículas do exocarpo (GALLO et al., 2002). Os frutos brocados sofrem grandes prejuízos, ocasionando assim a redução do peso do fruto que permanece na planta ou ocasionando a queda do mesmo. Estima-se que em Minas Gerais a saca de 60 kg de café beneficiado pode ter perda de cerca de 21% na sua produção (SOUZA et al., 2013). A broca-do-café também deprecia a classificação física pode comprometer a qualidade sensorial do fruto.

O controle da broca por meio do método químico é considerado difícil devido à baixa disponibilidade de inseticidas eficazes. A dificuldade do controle do inseto vem se agravando devido a problemas na colheita do café, onde se tem verificado grande quantidade de frutos que ficam na planta e no solo (CARVALHO et al., 2017). As medidas adequadas para se evitar que os frutos da pós-colheita permaneçam no campo, na maioria das vezes, não são tomadas, acarretando assim um aumento da praga e tornando o controle ainda mais difícil (CARVALHO; SOUZA, 2018; PARRA; REIS, 2013).

O Endossulfan[®], pertence ao grupo dos organoclorados, é um inseticida muito eficiente para o controle de pragas em diversas culturas anuais e perenes por meio da pulverização sobre as folhas ou com a sua incorporação no solo. O produto era extremamente eficaz no controle da broca-do-café, mas em 2013 teve o seu uso proibido pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) (GOTTEMS, 2014; SCORZA, 2013; SOUZA et al., 2013). Assim, após a sua proibição muitos esforços têm sido feitos a fim de se obter um novo produto com essa finalidade.

A definição de controle biológico se dá quando há uma contenção da população de pragas com a presença de um inimigo natural. O controle biológico natural pode ser maximizado com algumas ações do controle biológico por meio de microrganismos, como a utilização de nematoides, fungos, bactérias e vírus (GRAVENA, 1992).

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) (Nematoda: Rhabditida) são grandes aliados ao controle de pragas e vem sendo muito utilizados devido à facilidade de criação massal e a excelente taxa de mortalidade que ocasionam nos insetos, com destaque as espécies das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae (DOLINSKI et al., 2017).

Mais de 200 espécies de insetos são parasitados pelo fungo *Beauveria bassiana*, e possui ocorrência em inúmeras regiões do país, apresentando grande importância por ser o primeiro fungo a demonstrar ser patogênico ao bicho-da-seda (COSTA et al., 2002). Desde que o fungo possua a quantidade suficiente de inóculos para impelir o processo de doença, há a constatação do potencial do mesmo para o controle de insetos (FERNANDES; LECUONA;

ALVES, 1985). Segundo Bittencourt (1995), a utilização do fungo entomopatogênico *B. bassiana* tem sido testado no Brasil para controle de pragas das famílias Ixodidae, Reduviidae, Culicidae e Muscidae.

Assim, teve-se por objetivo avaliar o controle do *H. hampei* na cultura do cafeeiro, utilizando o fungo entomopatogênico *B. bassiana* e o nematoide entomopatogênico *H. amazonensis* MC01 isoladamente, bem como a eficácia de ação dos entomopatógenos quando associados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Efeito de *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* na mortalidade de *Hypothenemus hampei*

Para avaliação da mortalidade de *H. hampei* foram coletados no dia 03 de abril de 2018 cerca de 450 frutos brocados em uma lavoura de café de aproximadamente seis anos localizada pelas coordenadas (18°44'46.2''S, 47°31'07.6''O) com um total de 5 hectares de *Coffea arabica* L., cultivar MG1192 em espaçamento de 3,50 m entre linhas x 0,80 m entre plantas. Os frutos colhidos foram levados para o Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Monte Carmelo, onde se realizou a triagem do material, selecionando-se os frutos com sintomas da presença da broca-do-café.

Para estabelecimento do experimento, iniciado no mesmo dia da coleta dos frutos, foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo em cada placa 4,5 g de vermiculita, onde se adicionou 19 ml de água a fim de umedecer o substrato. Foram colocados 8 frutos brocados por placa, de forma que estes ficaram cobertos pela vermiculita, totalizando 320 frutos.

O experimento foi composto por 3 tratamentos e 1 controle, com 10 repetições cada. Os tratamentos foram: produto comercial à base de *B. bassiana*, aplicando-se 1 mL de suspensão na concentração de 1×10^9 conídios mL⁻¹; *H. amazonensis* MC01 na concentração de 1200 juvenis infectantes (JI) ml⁻¹ (150 JI por fruto); e a associação de *B. bassiana* e *H. amazonensis* MC01 0,5 mL de cada suspensão nas mesmas concentrações anteriores. No

controle aplicou-se apenas 20 ml de água. Tanto os entomopatógenos como a água foram adicionados na vermiculita (Figura 1).

As placas foram fechadas e vedadas com Parafilm® e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações de mortalidade de larvas e adultos da broca-do-café foram iniciadas após 4 dias da aplicação dos tratamentos durante 5 dias (totalizando 9 dias de contato com as suspensões), sendo avaliadas 2 repetições por dia com a ajuda de um estilete cortando o fruto ao meio e o analisando. Após a avaliação, estes insetos foram colocados em câmara úmida para confirmação da mortalidade pelos entomopatógenos.



Figura 1. Placas de Petri contendo vermiculita e frutos brocados por *Hypothenemus hampei*.

2.2 Avaliação de mortalidade de *Hypothenemus hampei* com frutos mergulhados nas suspensões com entomopatógenos

Posteriormente, foi estabelecido um experimento para verificar a ação dos entomopatógenos na broca-do-café quando os frutos brocados foram mergulhados nas suspensões contendo *B. bassiana*, *H. amazonensis* e associação entre os dois.

Para isso, foram coletados frutos brocados da mesma forma realizada no ensaio anterior. Assim, o experimento foi composto por três tratamentos e um controle, com cinco repetições cada. Foram utilizados 10 frutos brocados por repetição.

As suspensões foram preparadas nas mesmas concentrações do ensaio anterior para obtenção de volume final 100 mL cada. Na associação de *B. bassiana* e *H. amazonensis*

MC01, foi utilizado 50 ml de suspensão com o nematoide e 50 ml da suspensão contendo o fungo. No controle utilizou-se apenas água.

Para submergir os frutos, estes foram colocados em provetas de 200 mL e posteriormente adicionaram-se as suspensões, mantendo os frutos submersos por 5 segundos (Figura 2). Após o contato com os produtos, estes foram colocados em placas de Petri (9 cm de diâmetro) forradas com uma folha de papel filtro. As placas foram fechadas com Parafilm[®] e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 24 °C ± 1°C em 24 h de escuro.

As avaliações de mortalidade de larvas e adultos da broca-do-café foram iniciadas após 11 dias da aplicação dos entomopatógenos, sendo analisadas todas as repetições no mesmo dia. Os insetos mortos foram mantidos em câmara úmida para confirmação da mortalidade. Os dados obtidos nos dois experimentos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação entre médias.



Figura 2. Frutos brocados por *Hypothenemus hampei* imersos nas suspensões com os tratamentos em provetas.

2.3 Forésia de *Beauveria bassiana* por *Heterorhabditis amazonensis*

O experimento foi conduzido para a verificação da ocorrência de forésia dos conídios de *B. bassiana* por *H. amazonensis* MC01 possibilitando maior contato do fungo com o inseto. Para isso, foram utilizadas larvas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae), criadas de acordo com a metodologia de Potrich et al. (2007), dispostas em placas de Petri (9

cm de diâmetro) contendo 4,5 g de vermiculita. Uma tela de aço (1 cm de altura por 9 cm de largura) foi colocada no centro da placa a fim de dividir a placa em dois lados (Figura 3).

Em um dos lados de cada placa foram colocadas cinco larvas de *T. molitor*. No controle e no tratamento com *B. bassiana* a aplicação de água e do fungo, respectivamente, foi realizada na placa toda, enquanto nos tratamentos com nematoide e associação de *B. bassiana* com nematoide os entomopatógenos foram adicionados em apenas um dos lados da placa, oposto a presença de *T. molitor*. Foram utilizados três tratamentos: *B. bassiana*, *H. amazonensis* e a associação dos dois entomopatógenos. Cada tratamento foi composto por 10 repetições.



Figura 3. Placa de Petri contendo vermiculita e tela de aço para divisão.

A vermiculita foi primeiramente umedecida com 14 mL de água para depois ser feita a aplicação das suspensões. Para *B. bassiana* foi utilizado 1 mL de suspensão na concentração de 1×10^9 conídios. *Heterorhabditis amazonensis* MC01 foi adicionado à vermiculita na concentração de 1200 JI ml^{-1} . Para a associação entre *B. bassiana* e *H. amazonensis* MC01 adicionou-se 0,5 mL de cada suspensão nas mesmas concentrações anteriores. No controle foram adicionados 15 mL de água.

As placas foram devidamente fechadas e vedadas com a utilização de Parafilm[®] e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h. A avaliação de mortalidade de larvas de *T. molitor* foi feita após 12 dias, avaliando a mortalidade do inseto, assim, verificou-se se há presença de conídios no lado da placa onde não foi aplicado. Nas larvas mortas verificou-se a sintomatologia característica da morte pelo entomopatógeno e quando necessário foram mantidas em câmara úmida ou dissecadas.

2.4 Deslocamento de *Heterorhabditis amazonensis* e transporte de conídios de *Beauveria bassiana* em ágar

A fim de observar o possível transporte de conídios de *B. bassiana* por JIs de *H. amazonensis* MC01 quando inoculados conjuntamente, foi estabelecido experimento em condições de laboratório. Para isso, foram utilizadas 20 placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo 20 mL de ágar-água por placa na concentração de 1%.

Foram utilizados quatro tratamentos com cinco repetições, sendo os tratamentos *B. bassiana*, na concentração de 1×10^9 conídios mL⁻¹; *H. amazonensis* MC01 na concentração de 1200 JI ml⁻¹; e a associação de *B. bassiana* e *H. amazonensis* MC01 nas mesmas concentrações anteriores e em volumes iguais. No controle foi utilizado apenas água.

Para cada tratamento foi adicionado 0,25 mL da suspensão de um dos lados da placa, que foram posteriormente fechadas com Parafilm[®] e mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ em 24 h de escuro, sendo a avaliação realizada após sete dias.

As avaliações foram feitas em microscópio estereoscópio verificando-se a presença de JIs e conídios em ambos os lados da placa, a fim de observar se houve transporte de conídios pelo nematoide. Para obtenção de imagens foram preparadas lâminas que foram observadas em microscópio óptico trinocular.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito de *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* na mortalidade de *Hypothenemus hampei*

Em relação à mortalidade de adultos de *H. hampei* no experimento onde os entomopatógenos foram aplicados na vermiculita, verificou-se que não houve interação entre os tratamentos e as épocas (tempo) de avaliação, utilizando-se, então, os dados obtidos de mortalidade final da broca-do-café. Desta forma, não houve diferença entre os tratamentos utilizando *B. bassiana* e *H. amazonensis* MC01 isoladamente, porém estes causaram maior

mortalidade do que o tratamento com os patógenos aplicados conjuntamente e o controle (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Análise de variância para mortalidade de adultos e larvas de *Hypothenemus hampei*.

	Adultos			Larvas	
	gl*	Deviance	Prob.	Deviance	Prob.
Tratamento	3	13,88	0,003	60,23	<0,001
Época	4	18,55	0,001	13,40	0,009
Tratamento x Época	12	9,86	0,628	21,50	0,043

*gl = grau de liberdade.

Tabela 2. Mortalidade de adultos de *Hypothenemus hampei* causada por *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após cinco dias de avaliação.

Tratamento	Mortalidade (%)*
<i>Beauveria bassiana</i>	28,16 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	27,97 a
<i>H. amazonensis</i> MC01 + <i>B. bassiana</i>	0,76 b
Controle	0,01 b

*Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Por meio da análise de regressão pode-se verificar o aumento da mortalidade dos insetos ao longo das épocas de avaliação (Figura 4).

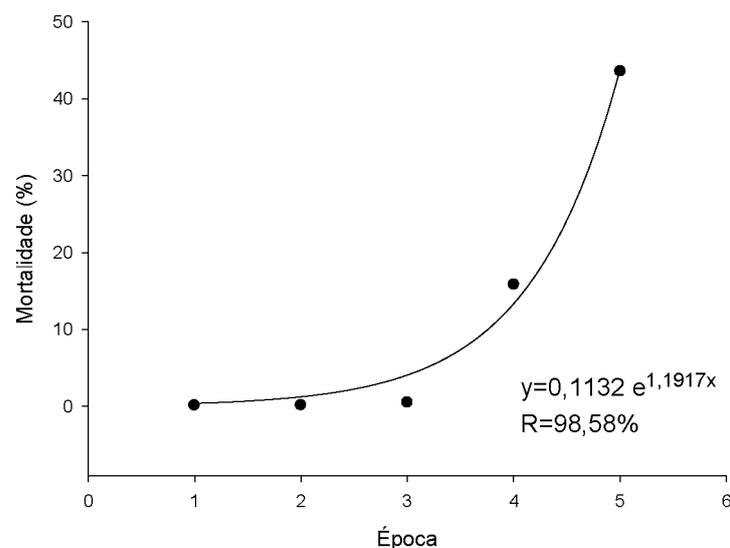


Figura 4. Mortalidade de adultos de *Hypothenemus hampei* após cinco dias de avaliação.

Quando analisada a mortalidade das larvas da broca-do-café observou-se interação entre as épocas de avaliação e os tratamentos. A partir do 3º dia de avaliação houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle, sendo o mesmo observado até o 5º dia de avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade de larvas de *Hypothenemus hampei* causada por *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01 por 5 dias de avaliação.

Tratamento	Época de avaliação (dias)*				
	5º	6º	7º	8º	9º
<i>B. bassiana</i>	38,46 a	76,47 a	68,42 a	81,25 a	75,00 a
<i>H. amazonensis</i>	52,94 a	72,22 a	75,00 a	76,47 a	92,30 a
<i>B. bassiana</i> + <i>H. amazonensis</i>	48,57 a	25,00 b	69,23 a	66,67 a	93,33 a
Controle	29,41 a	20,00 b	23,07 b	11,11 b	18,75 b

*Médias seguidas por letras iguais na coluna não se diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

De acordo com a análise de regressão observou-se diferentes comportamentos nas curvas de regressão dos tratamentos testados. Para *B. bassiana* verificou-se que a partir no 5º dia de avaliação houve redução na mortalidade, enquanto para o nematoide e a associação entre o nematoide e o fungo verificou-se crescimento na mortalidade até o 5º dia de avaliação (Figura 5). Os dados obtidos demonstram o potencial de uso dos entomopatógenos sobre larvas de *H. hampei*, já que foram obtidos índices de mortalidade superiores a 90%.

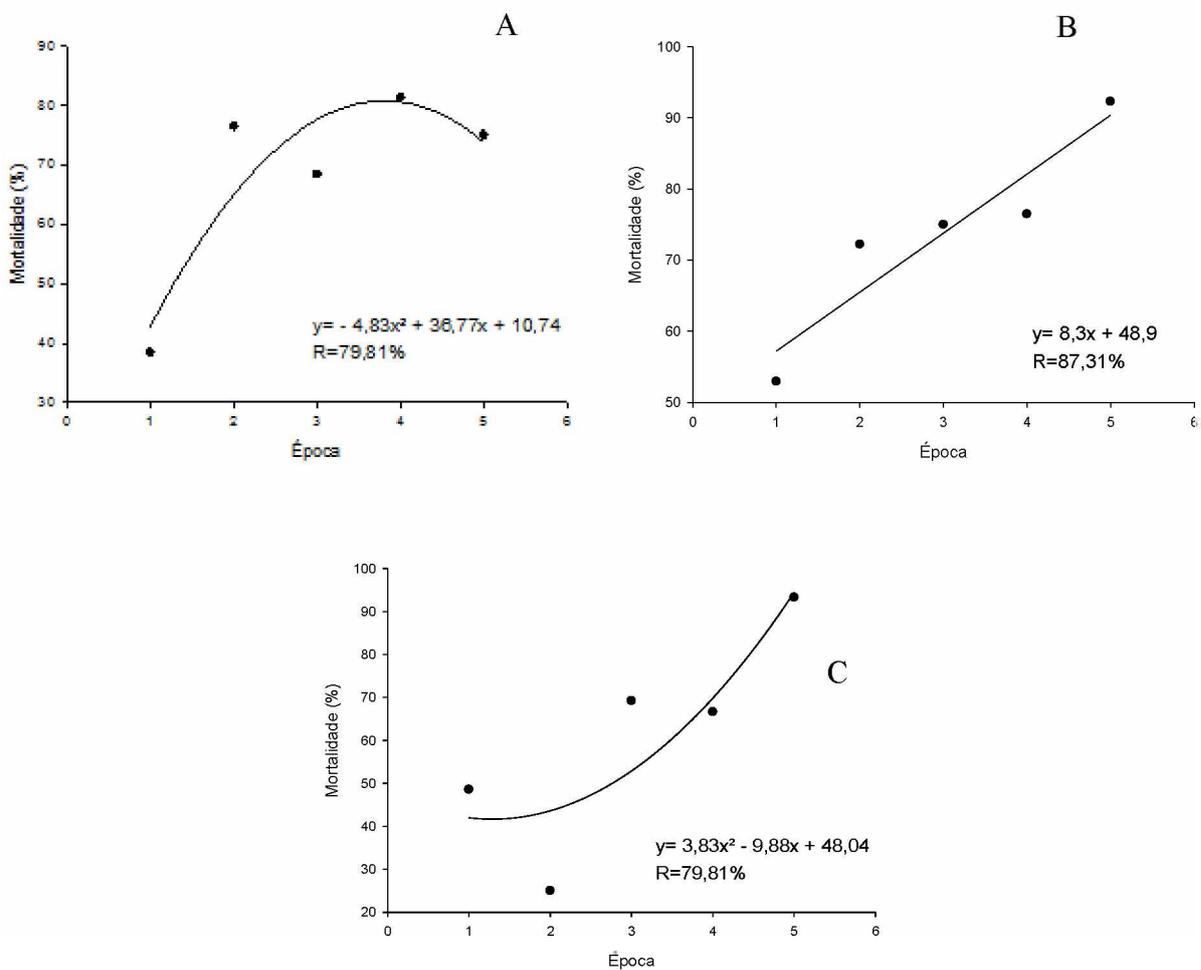


Figura 5. Mortalidade de larvas de *Hypothenemus hampei* causada por *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01 e associação entre os entomopatógenos por 5 dias de avaliação. A. *Beauveria bassiana*. B. *Heterorhabditis amazonensis* MC01. C. *Beauveria bassiana* + *Heterorhabditis amazonensis* MC01.

Apesar de não ter sido observado incremento na mortalidade do inseto quando os entomopatógenos foram associados, SIMI et al. (2018) verificaram que a associação entre *B. bassiana* e o nematoide entomopatogênico *Steinernema brazilense* aumentou a taxa de mortalidade da broca-do-cupuaçu, *Conotrachelus humeropictus* Fiedler (Coleoptera: Curculionidae), causando mortalidade de 65%. Essa diferença observada entre os resultados pode ter ocorrido pelo experimento ter sido feito em placas de Petri, facilitando o fungo e nematoide em localizar o hospedeiro.

Além disso, os menores índices de mortalidade observados em adultos do que em larvas podem estar associados à dificuldade de penetração dos nematoides e do fungo pelo tegumento rígido do inseto.

3.2 Avaliação de mortalidade de *Hypothenemus hampei* com frutos mergulhados nas suspensões com entomopatógenos

Quanto ao efeito de *B. bassiana* e *H. amazonensis* MC01 e sua associação sobre adultos da broca-do-café, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, sendo que estes diferiram do controle (Tabela 4). Os índices encontrados podem ser considerados satisfatórios alcançando 50% de mortalidade de adultos.

Tabela 4. Mortalidade de adultos de *Hypothenemus hampei* causada por *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após 11 dias de avaliação.

Tratamento	Mortalidade (%)*
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	52,1 a
<i>H. amazonensis</i> MC01 + <i>B. bassiana</i>	52,0 a
<i>Beauveria bassiana</i>	44,6 a
Controle	0,0 b

*Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Quanto à mortalidade de brocas quando os frutos foram mergulhados nas suspensões observou-se que não houve diferença entre os tratamentos testados, porém estes diferiram do controle. Além disso, obtiveram-se elevados índices de mortalidade do inseto, atingindo valores de até 98% de larvas mortas (Tabela 5).

Tabela 5. Mortalidade de larvas de *Hypothenemus hampei* quando imersos em suspensões de *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após 11 dias de avaliação.

Tratamento	Mortalidade (%)*
<i>H. amazonensis</i> MC01 + <i>B. bassiana</i>	98,0 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	92,2 a
<i>Beauveria bassiana</i>	86,6 a
Controle	0,0 b

*Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Assim, apesar de não ter sido observado efeito aditivo entre o fungo e o nematoide nas condições testadas, pode-se vislumbrar o potencial de ação desses organismos, mesmo que isoladamente, sobre a broca-do-café em função dos índices de mortalidade encontrados em duas fases de desenvolvimento do inseto, o que pode auxiliar no controle no campo.

3.3 Forésia de *Beauveria bassiana* por *Heterorhabditis amazonensis*

Ao analisar a mortalidade do *T. molitor* após 12 dias observou-se que não houve diferença entre os tratamentos testados, porém estes diferiram do controle. Além disso, obtiveram-se elevados índices de mortalidade do inseto, atingindo valores de até 96% de larvas mortas (Tabela 6).

Tabela 6. Mortalidade de *Tenebrio molitor* causada por *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01 após 12 dias de avaliação.

Tratamento	Mortalidade (%)*
<i>Beauveria bassiana</i>	96,0 a
<i>H. amazonensis</i> MC01 + <i>B. bassiana</i>	96,0 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	88,0 a
Controle	0,0 b

*Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Quando feita a avaliação da mortalidade causada por *B. bassiana* e *H. amazonensis* MC01 quando aplicados conjuntamente, pode-se observar que houve diferença significativa entre a quantidade de insetos mortos pelos entomopatógenos, verificando-se que *B. bassiana* causou maior mortalidade do que o nematoide (Tabela 7). Como *B. bassiana* foi aplicada apenas no lado contrário da presença das larvas de *T. molitor*, pode-se inferir que o nematoide auxiliou na dispersão nos conídios do fungo, ocorrendo uma associação forética.

Tabela 7. Diferença de mortalidade de larvas de *Tenebrio molitor* por *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01 quando aplicados conjuntamente após 12 dias de avaliação.

Tratamento	Mortalidade (%)*
<i>Beauveria bassiana</i>	70,0 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	26,0 b

*Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3.4 Deslocamento de *Heterorhabditis amazonensis* e transporte de conídios de *Beauveria bassiana* em ágar

Em relação à avaliação do transporte de conídios de *B. bassiana* aplicados juntamente com juvenis infectantes de *H. amazonensis* MC01 em placas com ágar verificou-se que no controle e no tratamento apenas com o fungo não foram encontrados propágulos dos entomopatógenos no lado oposto da placa. No tratamento com o nematoide foram encontrados juvenis infectantes no lado oposto da placa. No tratamento com a associação de fungo e nematoide foram encontrados juvenis e conídios do lado oposto da placa, podendo-se inferir que a presença de conídios deveu-se ao transporte feito pelos juvenis infectantes (Tabela 8).

Tabela 8. Número de entomopatógenos encontrados no lado oposto da aplicação de *Beauveria bassiana* e *Heterorhabditis amazonensis* MC01.

Tratamento	Presença do entomopatógeno*
<i>H. amazonensis</i> MC01 + <i>B. bassiana</i>	5,4 a
<i>Heterorhabditis amazonensis</i> MC01	5,0 a
<i>Beauveria bassiana</i>	0,0 b
Controle	0,0 b

*Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Foi possível observar por meio de microscópio óptico trinocular, conídios aderidos aos juvenis infectantes no lado oposto da placa onde foram aplicados (Figura 6). De acordo com Simi et al. (2018) os nematoides entomopatogênicos apresentam a capacidade de transportar conídios de *B. bassiana* pelo solo em profundidade entre 7 a 10 cm.



Figura 6. Conídio de *Beauveria bassiana* aderido a juvenis infectantes de *Heterorhabditis amazonensis* MC01.

Estudos verificando a ocorrência de *B. bassiana* em *H. hampei* têm sido desenvolvidos em diferentes países, onde os índices de mortalidade natural da praga pelo fungo podem atingir 40 e 80% na Nicarágua e Honduras, respectivamente. No entanto, no Brasil não são registrados índices maiores que 20% de mortalidade (ALVES et al. 2002; GUHARAY, 2000; TREJO; FÚNEZ, 2004) o que demonstra que existe potencial de controle da broca pelo fungo, no entanto, o manejo adotado nas lavouras cafeeiras no Brasil não tem sido adequado para ação de *B. bassiana*.

Acevedo et al. (2006) testaram nematoides entomopatogênicos para controle de *H. hampei* e verificaram que os juvenis infectantes conseguem penetrar no fruto brocado e atingir o inseto. Os autores verificaram índices de mortalidade da broca-do-café de 50,9% utilizando *Steinernema feltiae* e índice de penetração no fruto de 15%. Com isso, verificando-se que *B. bassiana* e os nematoides entomopatogênicos apresentam potencial de ação no controle de *H. hampei* e que a associação destes entomopatógenos pode ser uma estratégia de aplicação a fim de incrementar os fatores de mortalidade da praga.

4 CONCLUSÃO

Beauveria bassiana e *H. amazonensis* MC01 foram considerados patogênicos a *H. hampei*, sendo as lavas mais suscetíveis à ação associada dos entomopatógenos nas condições testadas.

Heterorhabditis amazonensis é capaz de transportar os conídios de *B. bassiana*, o que se observou pela mortalidade de larvas de *T. molitor*. Quando associados fungo e nematoide, *B. bassiana* causou maior mortalidade das larvas de *T. molitor* do que os juvenis infectantes.

Os juvenis infectantes transportaram aderidos à sua cutícula conídios da *B. bassiana* até o lado oposto da placa de Petri, destacando assim a ocorrência de forésia entre as duas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, J. P. M.; NÚÑES, J. C. L. Efeito da aplicação de nematoides entomopatogênicos sobre frutos infestados com broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Nematologia Brasileira**, v. 33, p. 115-122, 2006.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M.; LOPES, R. B.; TAMAI, M. A. Use of entomopathogenic fungi in Latin America. In: UPADHYAY, R. K. (ed.). **Advances of microbial control of insect pests**. Kluwer Academic, New York, pp. 193-212, 2002.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; **Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 105 p. 1992.
- CARVALHO, M. L.; MATIELLO, J. B. **Correlação entre níveis baixos de infestação de broca do café com perda de peso dos grãos, na Zona da Mata -MG**: Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9331/41_43-CBPC-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 01 de setembro de 2018.
- CARVALHO, J. P. F.; SOUZA, J. C. de. **Manual de prevenção e combate à broca-do-café**. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/manual-combate-a-broca.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2018.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, v. 5, safra 2018, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-66, 2018a.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, v. 5, safra 2018, n. 3 – Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-76, 2018b.
- COSTA, J. N. M.; SILVA, R. B.; RIBEIRO, P. A.; GARCIA, A. Ocorrência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari) o estado de Rondônia, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 32, p. 517-519, 2002.
- DOLINSKI, C.; MONTEIRO, C.; ANDALÓ, V.; LEITE, L. G. Studies on entomopathogenic nematodes in Brazil: past and future. **Nematoda**, v. 4, p. e102017, 2017.
- EMBRAPA CAFÉ. **Evolução da cafeicultura brasileira nas últimas duas décadas**. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Consortio-Embrapa-Cafe-Evolucao-24-1-2017.pdf> Acesso em: 25 de agosto de 2018.
- FERNANDES, P. M., LECUONA, R. E.; ALVES, S. B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill à broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **Ecosistema**, v. 10, p. 176-182, 1985.

FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DO CAFÉ DO CERRADO - FUNDACCER.
Plano de desenvolvimento, sustentabilidade e promoção da Região do Cerrado Mineiro 2015/2020. 2015. 54 p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola.** Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GOTTEMS, L. **Proibição do endossulfan deixa cafeicultores brasileiros sem opção.** Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/noticias/proibicao-do-endossulfan-deixa-cafeicultores-brasileiros-sem-opcao_203125.html>. Acesso em: 10 ago. 2018.

GRAVENA, S.; **Controle biológico no manejo integrado de pragas.** Pesq. agropec. bras., Brasília, 27, S/N:281-299, abr. 1992.

GUHARAY, F.; MONTERREY, J.; MONTERROSO, D.; STAVAR, C. H. **Manejo integrado de plagas en el cultivo de café.** CATIE, Managua, 2000. 272 p.

POTRICH, T. D.; LORINI, I.; VOSS, M.; STEFFENS, M. C. S.; PAVANI, D. P.; **Metodologia de criação de *Tenebrio molitor* em laboratório para obtenção de larvas.** Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do82_12.htm> Acesso em: 03 de outubro de 2018. Embrapa Trigo, Documentos Online, 82, 2007.

SIMI, L. D.; LEITE, L. G.; TREVISAN, O.; COSTA, J. N. M.; OLIVEIRA, L. E.; SCHMIDT, F. S.; BUENO, R. N. S.; FILHO, A. B.; Mortality of *Conotrachelus humeropictus* in response to combined application of the nematode *Steinernema brazilense* and the fungus *Beauveria bassiana*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.85, p. 1-9, 2018.

SOUZA, J. C.; REIS, P.; SILVA, R.; CARVALHO, T. A. F.; PEREIRA, A. B. Controle químico da broca-do-café com cyantraniliprole, **Coffee Science**, v. 8, p. 404-410, 2013.

TREJO, S. A. R., FÚNEZ, C. R. **Manejo integrado de la broca de café, basado en criterios bioecológicos de la broca y del cultivo de café.** Instituto Hondureño del Café (IHCAFE), 44 p, 2004.