



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

Fungos endofíticos em folhas de cafeeiro: diversidade e potencial entomopatogênico sobre a broca do café.

RICARDO AUGUSTO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr. Antônio Batista Filho

Coorientador: Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida.

RICARDO AUGUSTO DE SOUZA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS EM FOLHAS DE CAFEIEIRO: DIVERSIDADE E
POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO SOBRE A BROCA DO CAFÉ.**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Dr. Antônio Batista Filho

Coorientador: Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida.

**São Paulo
2019**

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

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Souza, Ricardo Augusto de.

Fungos endofíticos em folhas de cafeeiro: diversidade e potencial entomopatogênico sobre a broca-do-café. / Ricardo Augusto de Souza - São Paulo, 2019.
69 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2019D.RS013

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Antônio Batista Filho.

Versão do título para o inglês: Endophytic fungi on coffee leaves: diversity and entomopathogenic potential against coffee-borer.

1. *Coffea arabica* 2. Fungos endofíticos 3. Fungos entomopatogênicos 4. Controle biológico 5. Cafeicultura I. Souza, Ricardo Augusto de II. Batista Filho, Antonio III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2019/013

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ricardo Augusto de Souza

Título: Fungos endofíticos em folhas de cafeeiro: diversidade e potencial entomopatogênico sobre a broca-do-café.

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

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICO E OFEREÇO COM TODA MINHA REVERÊNCIA,

A todos aqueles, conhecidos e anônimos, que direta ou indiretamente dedicaram e dedicam suas vidas e seu tempo à cafeicultura brasileira, fazendo desse país a maior nação cafeeira do mundo;

Ao agricultor que recolhe, a exemplo de meu pai, através do suor e esforço de suas mãos, o ouro verde ofertado pela mãe Terra;

À dona de casa que prepara, a exemplo de minha mãe, através do seu amor e dedicação, sempre uma deliciosa xícara de café;

Ao cientista, que dedica sua inteligência e habilidade ao aprimoramento das técnicas de cultivo, em prol da produtividade e sustentabilidade;

Ao poeta, que apenas manejando as palavras e a melodia, nos fez experimentar o aroma de um cafezal em flor.

“Quando o Brasil se dispuser a entregar à ciência a resolução dos seus problemas económicos, de preferência ao modo atual de solucionar questões a golpes de leis e regulamentos inspirados pela grande máquina de andar devagar que é a burocracia nacional, então a nossa pátria dará ao mundo o exemplo de um progredir com celeridade sem precedentes, ao utilizar-se das riquezas e do infinito de possibilidades que em potencial existem no imenso território do Brasil.”

Arthur Neiva, 1929.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles envolvidos com a organização e oferecimento do programa de pós-graduação do Instituto Biológico, dando-me a oportunidade de realizar este sonho de subir mais um degrau na escada de minha carreira;

Agradeço a providência divina por guiar os meus passos nestes 2 anos de curso. Agradeço pela proteção, pelas pessoas certas, pelos momentos corretos, pelas oportunidades de ajudar e ser ajudado, pelas vitórias e pelos desafios que me fizeram desenvolver como ser humano;

À minha esposa Joana, por toda a dedicação à nossa instituição familiar, o que me faz sempre navegar em águas calmas;

Ao meu orientador, Dr. Antônio Batista Filho, e meu co-orientador, Dr. José Eduardo Marcondes de Almeida, pelo compartilhamento do imenso saber do qual dispõem e das instruções para a realização deste projeto;

Aos meus estimados professores que, através das lições de conhecimento técnico e de vida, tornaram essa empreitada mais proveitosa;

Aos meus colegas de curso que, através das lições de companheirismo, tornaram o caminho mais suave e divertido;

À estagiária do laboratório de controle biológico e agora mestranda Carolina Stefanoviciaus Nunes, Carol, pela imensa colaboração na realização dos experimentos e cujo auxílio foi determinante;

A todos do Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico em Campinas, pelas valiosas dicas e auxílio na condução dos trabalhos experimentais;

A todos os cafeicultores que abriram a porteira de suas propriedades para a realização de coletas de materiais para a realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SOUZA, R. A. **Fungos endofíticos em folhas de cafeeiro: diversidade e potencial entomopatogênico sobre a broca-do-café.** 2019. 69 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

A cafeicultura é altamente dependente do uso de agrotóxicos para o controle das doenças e pragas, como é o caso da broca do café. Tal praga causa prejuízos quantitativos e qualitativos. Para se reduzir a dependência do uso de agrotóxicos para o controle da broca, é fundamental que se desenvolvam opções de controle biológico. Entre os potenciais agentes de controle biológico estão os chamados fungos endofíticos, que são microrganismos que vivem no interior dos tecidos vegetais, sem causar dano aparente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de ocorrência de fungos endofíticos isolados de folhas de cafeeiro e o seu potencial entomopatogênico sobre a broca do café. A coleta e isolamento de endofíticos ocorreu em 3 propriedades rurais localizadas em Águas de Lindóia, Itapira e Socorro, todas na região da média mogiana paulista e em 3 propriedades rurais localizadas em 3 regiões distintas, Águas de Lindóia, Poços de Caldas e Campinas, respectivamente média mogiana paulista, sul de Minas Gerais e leste paulista. Dentre todas as morfoespécies isoladas, 9 foram identificadas a nível molecular e constituíram os diferentes tratamentos de avaliação quanto ao potencial entomopatogênico sobre a broca, em duas concentrações, $1,0 \times 10^8$ conídios ml^{-1} e $2,5 \times 10^8$ conídios ml^{-1} . Em termos de diversidade de ocorrência, os fungos apresentaram baixa especificidade com o cafeeiro em termos de expressão da relação de endofitismo, variando de acordo com os locais de coleta e períodos de isolamento. Os índices de diversidade utilizados, Riqueza, Abundância, Equitabilidade e de Shannon Wiener foram superiores na propriedade rural sítio Monte Alegre e na região da média mogiana paulista. Os resultados das avaliações de entomopatogenicidade sobre a broca demonstraram que os endofíticos *Trichoderma viride*, *Meyerozima caribbica* e *Entonaema* sp. promoveram mortalidade por colonização do corpo do inseto (MC), porém em percentuais baixos. O endofítico *Xylaria* sp. resultou em percentuais de mortalidade de 70 % (MT) e, embora não tenha sido capaz de colonizar o corpo do inseto, causou rápida redução de motilidade das brocas e mortalidade, entre o 3° e 5° dia do experimento, na concentração maior de conídios.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, fungos endofíticos, fungos entomopatogênicos, controle biológico.

ABSTRACT

SOUZA, R. A. **Endophytic fungi on coffee leaves: diversity and entomopathogenic potential against coffee-borer**. Sao Paulo-SP. 2019. 69 f. Dissertation (Master in sanity, Food and Environmental safety on Agribusiness) - Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2019.

Coffee growing is highly dependent on the use of agrochemicals to control diseases and pests, such as the coffee borer. This pest is one of the most important and causes quantitative and qualitative damage. In order to reduce the dependence of pesticides, it is essential to develop another options in biological control. There are many sources that can be exploited to obtain biological control agents, including endophytic fungi, which are microorganisms that live inside of the plant tissues, without causing apparent damage. This work studied the diversity of endophytic fungi in leaves of coffee tree, as well as it is entomopathogenic potential against the coffee borer. In order to, were collected leaves and were isolated fungus of coffee trees in three farms located in Águas de Lindóia, Itapira e Socorro, on the mogiana region of São Paulo State and of three regions with distinct characteristics, Águas de Lindóia, Poços de Caldas e Campinas, respectively located in the mogiana region, south of Minas Gerais State and east of São Paulo State. Nine of the morphospecies isolated were identified at molecular level, constituting the different treatments, evaluated in terms to the entomopathogenic potential, in two concentrations, 1.0×10^8 conidia ml⁻¹ and 2.5×10^8 conidia ml⁻¹. The results demonstrated that endophytic fungi in coffee tree leaves has high diversity, showing low specificity with the coffee tree to stablish the endophytic relationship, being more dependent of the local and season conditions. Monte Alegre farm showed the more high diversity among the mogiana's farms and this region it was superior at the every diversity index considered - Richeness, Abundancy, Equability and Shannon Wiener's index. Only the species *Trichoderma viride*, *Meyerozyma caribbica* e *Entonaema* sp. showed colonization of the borer's body, however with low levels of colonization capacity (MC). The fungus *Xylaria* sp. caused high mortality (70% of mortality - MT) and, despite its inability to colonize the borer's body, it caused fast reduction of motility and earlier mortality, between the 3rd and 5th day of the experiment.

Key words: *Coffea arabica*, endophytic fungi, entomopathogenic fungi, biological control.

Lista de Figuras

Figura 1- Características morfológicas de adultos da broca do café em ilustração de Carlos Rudolph Fischer, 1927.	12
Figura 2 - Fases do ciclo biológico da broca do café.....	14
Figura 3 - Localização das três propriedades rurais da região da média mogiana paulista onde foram coletadas folhas de cafeeiro para o isolamento de fungos endofíticos.....	34
Figura 4 - Material vegetal (folhas) de cafeeiro coletadas para o isolamento de fungos endofíticos.....	37
Figura 5- Fluxograma das etapas para isolamento de fungos endofíticos de folhas de cafeeiro.....	37
Figura 6 - Exemplares de fungos endofíticos em crescimento no meio BDA a partir do mesófilo foliar.....	37
Figura 7 - Procedimento para conservação dos isolados de fungos endofíticos coletados.....	38
Figura 8 - Recipiente para manutenção da broca do café em laboratório.....	42
Figura 9 - Bioensaio para a avaliação do potencial entomopatogênico de fungos endofíticos sobre a broca do café.....	43
Figura 10 - Morfoespécies de fungos endofíticos em três propriedades rurais da média mogiana, coletados no período de dezembro de 2017 a junho de 2018.....	45
Figura 11 - Morfoespécies de fungos endofíticos coletados nas regiões média mogiana, Sul de Minas Gerais e leste paulista, nos meses de agosto e setembro de 2018.....	46
Figura 12 - Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de três propriedades rurais da média mogiana paulista, no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018.....	49

- Figura 13 - Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de três propriedades rurais da média mogiana paulista, no período de abril a junho de 2018.....50
- Figura 14 - Morfoespécies de fungos endofíticos isolados das regiões média mogiana paulista, sul de Minas Gerais e leste paulista nos meses de agosto e setembro de 2018.....50
- Figura 15 - Espécies de fungos endofíticos utilizados nos ensaios de entomopatogenicidade.53
- Figura 16 - Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de 1×10^8 conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.....54
- Figura 17 - Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.....55
- Figura 18- Número médio de brocas colonizadas, aos 5 dias após incubação em BOD, em função dos diferentes tratamentos.....57
- Figura 19 - Placas contendo os fungos *Trichoderma viride* (A), *Beaveria bassiana* oportunista (B), *Entonaema* sp.(C) e *Meyerozima caribbica* (D), colonizando o corpo de brocas do café, após a incubação.....58

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Produção estimada, em milhões de sacas e percentual da produção total dos países maiores produtores mundiais de café, no ano safra 2018/2019.....	4
Tabela 2 - Caracterização dos locais de coleta de folhas de café para isolamento de fungos endofíticos.....	33
Tabela 3 - Caracterização das regiões de coleta de folhas de café para isolamento de fungos endofíticos.....	33
Tabela 4 - Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas de cafeeiros de três propriedades rurais da região cafeeira média mogiana paulista, em duas épocas distintas, dez. 2017 a fev. 2018 e abr. a jun. 2018.....	44
Tabela 5 - Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas de cafeeiro de três regiões diferentes, média mogiana paulista, sul de Minas Gerais e leste paulista.....	45
Tabela 6 - Morfoespécies de fungos endofíticos de três propriedades rurais da média mogiana paulista, isoladas no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018.....	47
Tabela 7 - Morfoespécies de fungos endofíticos de três propriedades rurais da média mogiana paulista, isoladas no período de abril a junho de 2018.....	47
Tabela 8 - Morfoespécies de fungos endofíticos isolados das regiões média mogiana paulista, sul de Minas Gerais e Leste Paulista nos meses de agosto e setembro de 2018.....	48
Tabela 9 - Riqueza de morfoespécies, Abundância de isolados, Equitabilidade e índice de Shannon Wiener (H') de fungos endofíticos de três propriedades rurais da região média mogiana paulista.....	51
Tabela 10 - Riqueza de morfoespécies, Abundância de isolados, Equitabilidade e índice de Shannon Wiener (H') de fungos endofíticos isolados de três regiões cafeeiras.....	52

Tabela 11 - Constituição dos diferentes tratamentos de avaliação do potencial entomopatogênico sobre a broca do café e origem do endofítico utilizado.....	53
Tabela 12 - Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de 1×10^8 conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.....	54
Tabela 13 - Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.....	55
Tabela 14 - Número médio de brocas colonizadas/repetição, aos 5 dias após incubação em BOD, em função dos diferentes tratamentos, na concentração de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} ...	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. A cultura do café e sua importância econômica	3
3.2. Broca do café.....	5
3.2.1. Aspectos históricos.....	5
3.2.2. Centro de Origem.....	10
3.2.3. Morfologia.....	10
3.2.4. Biologia e ciclo de vida.....	12
3.2.5. Ocorrência e condições bióticas e abióticas favoráveis.....	14
3.2.6. Danos causados.....	17
3.2.7. Monitoramento.....	19
3.2.8. Controle.....	23
3.2.8.1. Controle Químico.....	23
3.2.8.2. Controle Biológico.....	25
3.2.8.3. Controle Cultural.....	25
3.3. Controle biológico por fungos entomopatogênicos.....	27
3.4. Fungos endofíticos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Coleta de material vegetal e isolamento de fungos endofíticos.....	32
4.2. Preservação de fungos endofíticos isolados.....	38
4.3. Caracterização morfológica dos fungos endofíticos isolados.....	38
4.4. Identificação Molecular dos isolados.....	39
4.4.1. Extração do DNA Genômico.....	39
4.4.2. Sequenciamento.....	40
4.5. Avaliação da diversidade de ocorrência das morfoespécies isoladas.....	40
4.6. Avaliação "in vitro" do potencial entomopatogênico dos isolados.....	41
4.6.1. Obtenção dos insetos alvo e dos conídios dos endofíticos.....	41
4.6.2. Bioensaios de entomopatogenicidade.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Morfoespécies isoladas.....	44
5.2. Análise da diversidade de ocorrência dos fungos endofíticos isolados.....	46

5.2.1. Especificidade da ocorrência	46
5.2.2. Índices de diversidade.....	49
5.3. Avaliação do potencial entomopatogênico dos isolados.....	53
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma planta perene de clima tropical. Pertence a família das Rubiaceas e ao gênero *Coffea* que reúne diversas espécies. As espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (robusta) são as de maior interesse econômico, constituindo respectivamente, 70% e 30% da produção mundial. A cultura do café apresenta grande importância a nível mundial, sendo inclusive a bebida de maior consumo, com exceção da própria água.

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial, produzindo atualmente de 50 a 60 milhões de sacas anuais.

Dados da Conab (2018), apontam para uma área ocupada de 2,16 milhões de ha, e uma produção da ordem de 47,50 milhões de sacas de *Coffea arabica* e mais de 14,20 milhões de sacas de conilon.

A cafeicultura no Brasil é praticada em cerca de 300.000 propriedades agrícolas, é grande geradora de emprego e renda e sua produção deve estar cada vez mais embasada em práticas sustentáveis.

A cultura do café impõe constantes desafios aos produtores rurais para tornar possível o processo produtivo com um desenvolvimento agrícola sustentável e com produto de qualidade para atender aos mercados consumidores cada vez mais exigentes. Dentre os fatores de produção que mais se relacionam ao desenvolvimento sustentável da cafeicultura estão o controle de pragas e doenças. Dentre as principais pragas existentes na cafeicultura está a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Tal praga exige a adoção de táticas de monitoramento e controle, uma vez que causa prejuízos quantitativos e qualitativos.

O controle das principais pragas e doenças do café tem se dado principalmente através do emprego do método químico.

Reconhecendo-se a importância dos problemas fitossanitários anteriormente apresentados, e objetivando-se a agregação de maior sustentabilidade na cafeicultura, formas alternativas de controle das pragas e doenças necessitam ser desenvolvidas e ter seu uso fomentado. Nesse sentido, o controle biológico de pragas e doenças assume, cada vez mais, importância fundamental no processo de Manejo Integrado de Pragas, visando o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

A utilização de microrganismos que possam servir como agentes de controle biológico é feita a partir de várias fontes, como o solo, o ar, a água, organismos superiores, etc.

Entretanto, em associação ecológica com as plantas cultivadas existe uma infinidade de outros microrganismos, dentre eles os chamados fungos endofíticos, que podem apresentar naturalmente efeitos de proteção às plantas.

Segundo Azevedo (1998), fungos endofíticos são organismos que colonizam internamente os tecidos das plantas sem causar dano aparente ou doença. O autor explica que a relação simbiótica endofítico-hospedeiro pode propiciar vários benefícios para as plantas hospedeiras, como potencialização da nutrição e/ou aumento da tolerância a seca, além de poder produzir substâncias reguladoras de crescimento para induzir produção de biomassa e alcaloides ou outros metabólitos. Adicionalmente os fungos endofíticos poderiam diretamente suprimir ou competir com patógenos, protegendo a planta de patógenos potenciais, ou serem utilizados para o desenvolvimento de bioprodutos com aplicação direta sobre as pragas-alvo. Sendo assim, o objetivo foi avaliar a diversidade de ocorrência dos fungos endofíticos isolados de folhas de cafeeiro, bem como verificar uma possível ação entomopatogênica destes microrganismos sobre o inseto-praga *Hypothenemus hampei* (broca-do-café).

2. OBJETIVOS

Geral

Estudar os fungos endofíticos em folhas de cafeeiros, a diversidade de ocorrência e potencial de aplicação como agentes de controle biológico sobre o inseto praga broca do café.

Específicos

Avaliar a diversidade devido a especificidade de fungos endofíticos em folhas de cafeeiro;

Avaliar a diversidade de ocorrência de fungos endofíticos em folhas de cafeeiro, através do emprego de índices de diversidade;

Isolar fungos endofíticos obtidos de folhas de cafeeiro a partir de coleta de material vegetal de diferentes locais e regiões de produção cafeeira;

Avaliar o potencial entomopatogênico sobre *Hypothenemus hampei* (broca-do-café), de isolados de fungos endofíticos obtidos a partir de folhas de cafeeiro.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A CULTURA DO CAFÉ E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Os cafeeiros pertencem à divisão das espermatófitas, classe Angiosperma, subclasse Eudicotiledônea, ordem Rubiales, família Rubiaceae, tribo Coffeae, sub tribo Coffeinae, gêneros *Coffea* e *Psilanthus*, subgênero *Coffea* e *Baracoffea*. O subgênero *Coffea* engloba 103 espécies, sendo distribuído em três seções, *Mascarocoffea*, *Mozambicoffea* e *Eucoffea*, de acordo com a abrangência geográfica. A seção *Eucoffea* apresenta como centro de origem as regiões central e oeste do continente africano. Tal seção reúne as espécies mais importantes de cafeeiros: *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. klainii*, *C. congensis*, *C. racemosa*, *C. salvatrix*, *C. stenophylla*, *C. eugenioides*, *C. kapakata*, *C. humilis*, *C. sessiliflora*, *C. heterocalyx*, *C. anthonyi*, entre outras. Embora haja grande diversidade de espécies, apenas *C. arabica* e *C. canephora* são cultivadas em larga escala, representando a totalidade do café comercializado a nível mundial.

A espécie *Coffea arabica* é originária do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, regiões com altitudes entre 1.000 e 2.000 metros.

Coffea canephora é originária de uma ampla região quente, úmida e de baixa altitude, temperatura mais elevada e precipitações de 1.500 a 2.000 mm anuais, estendendo da Guiné ao Congo, da costa oeste à região central do continente africano (Carvalho, 2008).

No Brasil, o café foi introduzido em 1727 por Francisco de Mello Palheta, a partir de mudas e sementes trazidas da Guiana Francesa, instalando-se inicialmente no estado do Pará. No final daquele século os plantios se iniciaram no Maranhão e Bahia e posteriormente no Rio de Janeiro. Em 1825 a cultura do café foi introduzida no vale do Paraíba, alcançando assim os estados de São Paulo e Minas Gerais e cerca de 15 anos depois, o estado do Paraná.

No estado de São Paulo, onde a cafeicultura brasileira mais se desenvolveu ao longo do século XIX, seu cultivo deu-se de início na região do Vale do Paraíba, alcançando em meados daquele século as regiões de Campinas e Ribeirão Preto, seguindo posteriormente para o oeste, em busca de novas terras férteis, já que as regiões de maior tempo de ocupação passaram a apresentar depauperamento do solo, em função do sistema exploratório de condução das lavouras.

No início do século XX, o café foi introduzido no estado do Espírito Santo, através principalmente do cultivo de *C. canephora*. A partir da década de 70 daquele século o cultivo do café se inicia nas regiões de cerrado do centro-oeste brasileiro, chegando, por fim, ao estado de Rondônia (MATIELLO et al., 2015).

O agronegócio do café apresenta uma grande importância a nível mundial, sendo uma das bebidas de maior consumo a nível global e importante geradora de emprego e renda.

A produção mundial de café no ano safra de 2018/2019 foi estimada em 167,47 milhões de sacas, sendo 104,01 milhões de arábica e 63,46 milhões de robusta. Para o mesmo período, o consumo mundial foi estimado em 165,19 milhões de sacas (OIC, 2018).

Os maiores produtores mundiais de café são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1. Produção estimada, em milhões de sacas e percentual da produção total dos países maiores produtores mundiais de café, no ano safra 2018/2019.

País	Produção (milhões de sacas)	Percentual da Produção mundial
Brasil	58,50	35,00
Vietnã	29,50	17,60
Colômbia	14,20	8,50
Indonésia	10,20	6,10
Etiópia	7,50	4,50
Honduras	7,45	4,40
Índia	5,20	3,10

Fonte: Organização Internacional do Café, 2018.

No Brasil a cafeicultura possui grande importância e o país se destaca a nível mundial. É o maior produtor e exportador e segundo maior mercado consumidor da bebida. Do total de 61,70 milhões de sacas produzidas no ano safra 2017/2018, 47,50 milhões de sacas corresponderam à espécie arábica e 14,20 milhões de sacas ao robusta. As exportações brasileiras em 2018 foram de 31,52 milhões de sacas de café verde, sendo 29,04 milhões de sacas de arábica e 2,48 milhões de sacas de robusta, o que gerou uma receita cambial de US\$ 5,09 (CONAB, 2018; CECAFÉ, 2018).

De acordo com Matiello et al (2015), os principais estados produtores de café no Brasil são Minas Gerais, com cerca de 50 % da produção total, Espírito Santo, com 21 %, onde se destaca o cultivo de café robusta, São Paulo, com cerca de 10 %, Bahia, com 7%, Rondônia, com 4 %, e Paraná, com 2%.

Ainda segundo os autores, a cafeicultura no Brasil é dividida em tipos, os quais se diferenciam em função de uma série de características típicas. Nesse sentido, tem-se a cafeicultura de montanha, praticada em cerca de 610 mil hectares de terras localizadas principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo, onde a cultura é instalada em relevos mais acidentados e em terras de maior altitude, mais dependente da mão de obra manual e com

menores adensamentos dos cultivos. A cafeicultura de cerrado ocupa área de cerca de 830 mil hectares, principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia (oeste), em regiões de solos mais planos e de menor altitude, clima mais quente e de chuvas mais irregulares, o que gera dependência maior de irrigação. Caracteriza-se assim como uma cafeicultura mais tecnificada. A cafeicultura das regiões de arenito ocupa área de cerca de 190 mil hectares, situando-se em porções centrais do estado de São Paulo e estado do Paraná. Trata-se de região tradicional no cultivo e com limitações de áreas devido a problemas de nematóides. A cafeicultura do nordeste ocupa área de 140 mil hectares em regiões altas (chapadas) da Bahia, Pernambuco e Ceará, com boa disponibilidade de mão de obra para o cultivo e necessidade de irrigação. A cafeicultura de Conillon (robusta) ocupa área de cerca de 480 mil hectares, principalmente nos estados do Espírito Santo e áreas vizinhas no Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia, além de áreas nos estados de Rondônia, Amazônia, Acre e Pará.

Do total de terras agrícolas do Brasil a cafeicultura ocupa, entre áreas de produção e implantação, 1,75 milhões de hectares com a espécie arábica e 409 mil hectares com a espécie robusta. A produtividade média da espécie arábica se situa atualmente entre 23 a 32 sacas/ha. (CONAB, 2018).

A importância da cafeicultura para o Brasil também se reflete nos aspectos sociais e econômicos. É praticada em cerca de 300 mil estabelecimentos agropecuários brasileiros, envolvendo mão de obra direta ou indireta de três milhões de pessoas. Os valores de exportação dos grãos resultam em 3 bilhões de dólares anuais, além de movimentar uma complexa cadeia produtiva no país, constituída de fornecedores de insumos, indústrias de torrefação, armazenagem, distribuição e comercialização, prestadores de serviços, entre outros (MATIELLO et al., 2015).

3.2. BROCA DO CAFÉ

3.2.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

Nas primeiras décadas do século XX o café constituía o principal produto brasileiro na pauta das exportações e o principal meio de obtenção de divisas para o país. Na década de 20 as exportações de café representavam 70 % do valor total das exportações brasileiras, sendo que o Brasil participava com cerca de 50 % da produção mundial. A importância econômica e social apresentada pela cafeicultura, aliada à influência que a oligarquia cafeeira possuía junto ao governo federal e do Estado de São Paulo, o principal produtor, praticamente tornavam o grão imune às oscilações de preço e conduziam a um crescente de produção (SILVA, 2006).

De acordo com Furtado (1968, apud Silva, 2006), a hegemonia política exercida pelos produtores de café sobre o aparelho estatal republicano, o que garantia as políticas de proteção de preços, a expansão das frentes pioneiras de plantio em busca de terras férteis no Oeste do Estado de São Paulo para a implantação de novas lavouras, a disponibilidade de mão-de-obra garantida pela política imigratória, bem como as vantagens comerciais e acúmulo de capital proporcionados pelo café, levaram à supremacia paulista na produção e conseqüentemente a uma superprodução.

Toda a pujança proporcionada pelo cultivo do café em terras brasileiras, e em especial no Estado de São Paulo, se refletia em desenvolvimento econômico, crescimento de novas cidades, implantação da malha ferroviária, etc, e se sobrepunha aos efeitos deletérios causados por pragas como os gafanhotos, geadas e reduções de consumo em virtude da primeira Guerra Mundial (OBEIDI et al., 2016). O ponto de ruptura para o ciclo do café viria no final da década de 20, devido à superprodução brasileira e à crise de 1929 (CANO, 2012).

Entretanto, alguns anos antes do grande revés sofrido pelo negócio do café, ou seja, ainda na vigência do seu período áureo e de expansão dos cultivos, um problema fitossanitário causado por um pequeno besouro broqueador dos frutos da rubiaceae, conhecido como broca do café, trouxe grande alarde e se instalou em definitivo nos cafezais brasileiros (SILVA, 2006).

Segundo Obeidi et al. (2016), a broca do café foi identificada pela primeira vez como praga em 1901, no Quênia, causando perdas na qualidade da bebida ou mesmo inutilizando os grãos.

Em publicação no jornal O Estado de São Paulo de 16 de março de 1919, o Engenheiro Agrônomo Edmundo Navarro de Andrade, que após percorrer várias regiões produtoras de café no mundo, inclusive em Java, na Indonésia, pôde constatar os danos reais causados pela broca do café, alertava sobre os riscos da entrada da praga no Brasil (SILVA, 2006). De fato, segundo Obeidi et al. (2016), a presença da broca do café em Java trouxe grandes prejuízos, o que inclusive ajudou a reforçar o protagonismo brasileiro perante o mercado mundial.

Em 30 de maio de 1924, matéria publicada pelo jornal O Estado de São Paulo noticiava o que se temia, a constatação da presença da broca em cafezais brasileiros. Cerca de 15 dias antes da notícia sobre a presença da broca ser publicada no jornal O Estado de São Paulo, um agricultor de Campinas procurou a Secretaria da Agricultura do Estado para informar sobre a ocorrência da praga em uma de suas fazendas. A Secretaria enviou para o local o diretor de agricultura Adalberto Queiroz Telles acompanhado do entomologista Adolpho Hempel, os quais puderam verificar de imediato o potencial de dano da praga recém introduzida, quando um colono da fazenda mostrou-lhes uma saca de café em coco que deveria pesar 45 quilos,

porém estava reduzida a 16 quilos. O entomologista Adolpho Hempel, no uso de suas atribuições e por falta de bibliografia especializada, classificou o inseto apenas a nível de gênero, agrupando-o ao gênero *Stephanoderes* (SILVA, 2006).

Ainda segundo o autor, a partir da constatação da ocorrência da broca do café no Brasil, foi criada pela Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo a chamada “Comissão de Estudo e Debellação da Praga Cafeeira”, chefiada pelos entomologistas Arthur Neiva e Ângelo Moreira da Costa Lima, que durou de 1924 a 1926, focando suas ações no conhecimento pormenorizado da broca, bem como na determinação de ações de controle sobre a praga-alvo. Inclusive, foi promulgada a Lei n. 16.509, de 21 de julho, atribuindo ao governo estadual a execução das medidas de defesa sanitária vegetal do Ministério da Agricultura. Em agosto de 1924 o pesquisador Edmundo Navarro de Andrade, o mesmo que em 1919 alertou sobre os riscos da entrada da broca do café no Brasil, integrou a comissão para debelação da praga.

Enquanto aumentavam as áreas de ocorrência da broca, a comissão de cientistas elaborou uma série de documentos técnicos, 20 no total, que versavam sobre a biologia do inseto e formas de controle. Os documentos salientavam a impossibilidade de erradicação do problema, sendo possível apenas a redução populacional do inseto-praga para patamares abaixo do nível de dano econômico. Ao final de 1924 foi criada uma comissão permanente, onde Navarro de Andrade era o responsável pela supervisão e fiscalização das propriedades nas regiões de ocorrência do problema (OBEIDI et al., 2016).

O trabalho da comissão permanente para debelação da praga se iniciou com o mapeamento das regiões infectadas, detectando diferentes graus de contaminação. A constatação de que 19 dos 104 municípios avaliados estavam com focos da praga, levaram ao início das ações de controle. Tais ações se caracterizaram pela aplicação do sulfureto de carbono para expurgo do café colhido e de materiais como sacaria e palhada, a fim de controlar a propagação. Da mesma forma, um dos alicerces do programa foi a exigência da adoção do repasse, que se caracteriza pela coleta de grãos remanescentes na planta após a colheita e varrição e coleta dos grãos caídos no solo. Ressalta-se que a recomendação de tais medidas de controle partiram das experiências acumuladas pelos pesquisadores da comissão, embora os fazendeiros fossem a favor da erradicação e queima das lavouras contaminadas, o que auxiliaria inclusive na redução da superprodução de café, que àquela altura já passava a pressionar os preços do produto para baixo (MOTOYAMA, 2004; SILVA, 2006).

As ações da comissão envolveram ainda a implantação de um laboratório de entomologia, chefiado pelo pesquisador José Pinto da Fonseca, que estudou os aspectos da biologia do inseto e concluiu que as possibilidades de sobrevivência da praga fora das sementes

de café eram pequenas. Criou-se também um laboratório de química para examinar os efeitos da aplicação do sulfureto sobre a qualidade da bebida e traçar recomendações às empresas que se dispuseram a fabricar o produto, a Companhia de Óleos e Produtos Chimicos, Indústrias Reunidas F. Matarazzo e Sociedades de Produtos Chimicos Elekeiroz. Ainda, foram feitos materiais publicitários constituídos de uma cartilha denominada “História de um bichinho malvado”, que contou com ilustrações do zoólogo Rodolfo von Ihering, e um filme onde se apresentava os ciclos de vida da praga e as formas de realizar o seu controle, utilizando-se dos recursos do cinema (MOTOYAMA, 2004).

No final de 1926 a comissão criada para a debelação da broca do café encerrou as atividades e Arthur Neiva apresentou relatório composto de 30 capítulos e 38 tampas demonstrando todo o trabalho realizado para o controle da praga. Entre 1925 e 1927 observou-se queda significativa nos níveis de infestação e no número de municípios com focos da praga. Chegou-se inclusive a se acreditar que a broca tivesse sido extinta. Entretanto, o principal êxito do trabalho da comissão consistiu na criação do Instituto Biológico do Estado de São Paulo, proposto por Arthur Neiva. Ao final dos trabalhos da comissão de debelação da broca, na data de 20 de dezembro de 1926, o presidente de São Paulo, Carlos de Campos enviou à assembléia dos deputados o projeto de criação do Instituto Biológico e Defesa Agrícola. Apesar da influência exercida pela Sociedade Rural Brasileira, Sociedade Paulista de Agricultura e Liga Agrícola Brasileira, o projeto foi rejeitado pelos políticos do legislativo paulista, o que reforçou ainda mais a ideia corrente à época, de que o Estado de São Paulo mostrava descaso para com as ciências, e a pouca atenção se refletia em uma estrutura técnico-científica decadente em todas as esferas e provocava a evasão de capital humano, a exemplo do que ocorrera com o pesquisador Vital Brasil em 1918, que deixou o Instituto Butantan para fundar o Instituto de Higiene, Soroterapia e Veterinária, em Niterói. Entretanto, em dezembro de 1927, o projeto foi reenviado à câmara, tendo sido incluído na proposta, além da defesa vegetal, a defesa animal. Finalmente, em 26 de dezembro de 1927, por meio da lei nº 2.243 foi criado o Instituto Biológico de Defesa Agrícola e Animal, sendo que o recém criado órgão de defesa agregou muitos dos pesquisadores participantes da comissão para a debelação da broca do café (MOTOYAMA, 2004; REBOUÇAS et al., 2009; SILVA, 2006).

Superado o problema causado pela infestação inicial da broca do café, a ciência se ocupou nos anos subsequentes em desenvolver tecnologias que pudessem melhor estruturar a cafeicultura no combate ao inseto-praga. Nesse sentido, foi desenvolvido no Instituto Biológico, entre os anos de 1928 e 1929, um dos primeiros programas de controle biológico no

Brasil, ao introduzir a vespa de Uganda (*Prorops nasuta*), parasitoide de larvas e ninfas da broca do café. Os trabalhos de aclimação couberam a Adolph Hempel (BENASSI, 2007).

Decorridos mais de 20 anos desde a introdução da broca do café no Brasil, um novo surto atingiu várias regiões produtoras no Estado de São Paulo. Iniciativas inéditas de controle fitossanitário desenvolvidas pelo Instituto Biológico foram então colocadas em prática. Os técnicos do Instituto começaram a avaliar a utilização do BHC, considerado naquela época o inseticida ideal contra a praga. Ainda de iniciativa do mesmo instituto, iniciou-se o emprego da pulverização aérea dos cafezais com avião, servindo-se para isso dos conhecimentos e habilidades da aviadora e funcionária do instituto, Ada Rogatto (REBOUÇAS et al., 2009).

No transcorrer do século XX a cafeicultura atravessou diversos períodos de expansão e retração na atividade, geralmente em função de desequilíbrios na oferta e demanda, os quais tiveram razões diversas. Entretanto, a cafeicultura expandiu suas fronteiras para além do Estado de São Paulo. Segundo Soethe et al. (2014), a partir da metade do século XX, muitos dos descendentes dos trabalhadores rurais do Estado de São Paulo migraram para o Estado do Paraná, em busca de terras férteis, porém de preços mais acessíveis. Da mesma forma, de acordo com Ferreira et al. (2011), a partir das décadas de 60 e 70 a cafeicultura se consolidou em regiões como o sul de Minas Gerais e cerrado mineiro, enquanto no Estado de São Paulo a cafeicultura foi gradativamente sendo substituída pela citricultura e cana-de-açúcar e, no Estado do Paraná, a substituição se deu pela cultura da soja, considerada de melhor rentabilidade. Ainda segundo os autores, nesse período a cafeicultura passa a apresentar um perfil classificado como tecnológico produtivista.

A despeito do esforço inicial de combate a broca após a sua instalação, a popularização do uso de inseticidas sintéticos levou a uma descontinuidade na tomada de ações, tanto a nível de Brasil como em outros países de ocorrência (CURE et al., 1998). Nesse contexto de uma cafeicultura mais tecnificada, embora a broca tenha também se disseminado para as novas regiões cafeeiras, o controle químico adotado era bastante eficiente, tendo sido inicialmente baseado no uso de inseticidas clorados tradicionais, como o BHC e Lindane, e posteriormente através do inseticida clorado diferenciado Endosulfan. Entretanto, a partir de 2011 iniciou-se o processo de retirada desse inseticida devido a problemas ambientais, o que deixou os agricultores sem opções eficientes e conduziu ao início de um novo ciclo de expansão da praga nos cafezais brasileiros (MATIELLO et al., 2015).

3.2.2. CENTRO DE ORIGEM

Existem diferentes teorias sobre a origem geográfica da broca do café e seu hospedeiro original (DAMON, 2000). Segundo Corbett (1933), apud Damon (2000), a origem geográfica da broca seria Angola, no sudoeste da África. Para Murphy & Moore (1990), apud Damon (2000), existem duas possibilidades, sendo a primeira o nordeste da África, assim como o *C. arabica* e a segunda, uma contaminação do *C. arabica* na Etiópia ou Arábia Saudita (onde primeiro se importou sementes para cultivo, em algum período anterior ao século XV), pela passagem de frutos de robusta oriundos do oeste da África contaminados pela broca. De acordo com Baker (1984), apud Damon (2000), o robusta seria o hospedeiro original da broca do café uma vez que este é originário das regiões oeste e central da África, de menores altitudes (abaixo de 1.500 metros). Da mesma forma Davidson (1967), apud Damon (2000), reforçou esta teoria, ao relatar que a Etiópia seria território livre da broca. Entretanto, estudo feito por Abebe (1998), apud Damon (2000), concluiu que a broca estava presente em todos os locais estudados na Etiópia, com exceção de apenas um deles, e em altitudes variadas, desde abaixo de 1000 a mais de 1900 metros. A situação poderia indicar, segundo o autor, algumas possibilidades, como a introdução recente no país, a ação de controle populacional natural da praga, ou ainda a existência de resistência genética, o que sugere uma co-evolução de longa data entre a broca do café e o *C. arabica* na Etiópia.

A broca do café foi descrita originalmente como *Cryphalus hampei* pelo entomologista austríaco J.A.Graft Ferrari, em 1867. Mais tarde, Roepka relocou o inseto no gênero *Stephanoderes*. Costa Lima, em 1928, em um estudo comparativo entre espécies do gênero *Stephanoderes* e *Hypothenemus*, verificou que o número de tecidos antenais é constante nas fêmeas, independente do gênero, enquanto nos machos varia de 3 a 5 para *Hypothenemus*, e de 3 a 4 para *Stephanoderes*. Entretanto, esse número também resultou ser variável para as antenas de um mesmo indivíduo, razão pela qual se concluiu não ser um caráter distintivo e que a morfologia interna de reprodução não apresentava diferenças que justificassem a existência de dois gêneros, propondo assim o agrupamento de ambos no gênero *Hypothenemus* (BUSTILLO, et al. 1998).

3.2.3. MORFOLOGIA

A broca do café é um inseto de metamorfose completa, ou seja, possui as fases de ovo, larva, pupa e adulto. O ciclo relativamente curto aliado a uma elevada capacidade reprodutiva, faz com que a broca seja um importante problema fitossanitário para a maior parte dos países produtores de café, sendo beneficiado principalmente por condições como o adensamento de

cultivo, o relevo montanhoso, o que prejudica o controle químico, além do regime de chuvas que favorece, em muitos países produtores, um elevado número de floradas, o que possibilita a existência de grãos para hospedagem durante um longo período do ano. O ovo da broca do café é branco, elíptico, de brilho leitoso e tamanho variando entre 0,50 mm a 0,80 mm de comprimento. A larva é apoda, recurvada, de cor branca e apresenta as peças bucais e cabeça pardacentas. O corpo da larva apresenta pelos esparsos, largos e orientados para trás, apresentando ainda uma sutura longitudinal visível no corpo. O tamanho da larva varia entre 0,72 a 0,84 mm de comprimento. A pupa é branca durante o período inicial (3 a 4 primeiros dias), cabeça completamente envolvida pelo pronoto, com antenas e peças bucais livres e distintas. Apresenta coloração castanho-claro. As pupas fêmeas medem cerca de 1,80 mm de comprimento e as pupas machos medem 1,30 mm de comprimento. O adulto da broca do café corresponde a um diminuto besouro preto luzidio de corpo cilíndrico e recurvado para a parte posterior, sendo que as fêmeas possuem as dimensões de 1,65 mm de comprimento, 0,67 mm de largura e 0,73 mm de altura, enquanto os machos, menores, possuem as dimensões de 1,18 mm de comprimento, 0,51 mm de largura e 0,55 mm de altura. Os élitros são revestidos de cerdas e escamas filiformes e apresentam 11 interestrias e 10 estrias dispostas longitudinalmente. O abdome é completamente curvado na parte dorsal, sendo que as asas posteriores se ligam a essa região. Na posição ventral o inseto possui cinco esternitos ou placas abdominais bem diferenciadas onde existem muitas cerdas. As fêmeas de *Hypothenemus hampei* possuem asas membranosas normais e voam. Já os machos não voam e permanecem nos grãos de café para a realização da cópula com fêmeas da mesma progênie ou com fêmeas vindas do meio externo. Na parte superior do tórax situa-se o pronoto, que possui a forma semicircular e recobre totalmente a cabeça do inseto quando visto dorsalmente. É inclinado na região posterior, possui uma superfície lisa e grande quantidade de asperezas simétricas em espiral, com cerdas grandes, cilíndricas e filiformes. Na região torácica, entre o protórax e o mesotórax, existe um par de espiráculos localizados ventrolateralmente. Tais espiráculos possuem grande número de cerdas, provavelmente envolvidas com a redução de perda de água e retenção de material particulado. A cabeça do inseto é formada pelas peças bucais, olhos e antenas. O aparelho bucal de *Hypothenemus hampei* é constituído por mandíbulas fortemente endurecidas, articuladas dorsolateralmente, situadas na região anterior da cabeça, com formato triangular; possuem duas regiões, uma ventral onde se observam três incisivos destinados a cortar e um molar amplo na região dorsal, facilitando a trituração do material alimentar. O terceiro incisivo não é muito desenvolvido e visível. Os olhos compostos são formados, em média, por cerca de 115 omatídeos. As antenas são do tipo geniculo-capitada, possuindo flagelo

formado por oito flagelômeros fundidos entre si. Os quatro primeiros flagelômeros junto com o pedicelo formam o funículo, enquanto os demais flagelômeros formam uma clava ovalada com muitas cerdas. O funículo antenal apresenta quatro segmentos flagelares. As pernas posteriores e medianas possuem sete espinhos localizados distalmente na tíbia e auxiliam na abertura de galerias nos grãos de café. Nas pernas anteriores os espinhos são menos desenvolvidos (LAURENTINO & COSTA, 2004; BENASSI, 2000; CONSTANTINO et al., 2011; RAINHO, 2015).

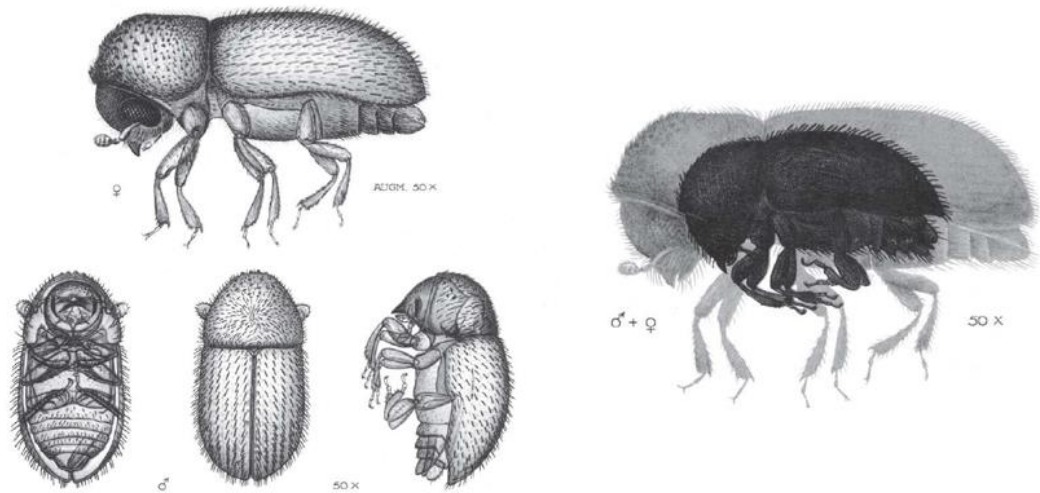


FIGURA 1. Características morfológicas de adultos da broca do café em ilustração de Carlos Rudolph Fischer, 1927.

Fonte: Silva (2006).

3.2.4. BIOLOGIA E CICLO DE VIDA

O ciclo de vida da broca do café, representado na Figura 2, tem sido estudado por vários autores. Existem grandes variações a respeito das informações sobre a duração dos estádios de vida da praga, porém é consenso que este obedece a diferenças nas condições ambientais, em especial, a temperatura (BUSTILLO et al., 1998).

O período total decorrido entre a fase de ovo até a emergência dos adultos é, em média, de 27,5 dias à temperatura de 24,5°C (BUSTILO et al., 1998).

Iniciando-se a descrição do ciclo do inseto a partir da fase de ovo, Bergamin (1943), apud Benassi (2000), encontrou períodos de incubação de 13,5 dias à 19,20°C, 6 dias à 22°C e 4 dias à 27°C. Tais resultados são corroborados por Damon (2000), que observou a duração de 4 dias para a fase de ovo, sob temperatura de 27°C. Estudando o ciclo da broca no Estado de Rondônia, Laurentino & Costa (2004), encontraram variações de 4 a 10 dias para a duração da fase de ovo.

A fase larval se inicia quando estas eclodem e coincide com o início dos danos às sementes, que são destruídas total ou parcialmente (SILVA et al., 2015).

Segundo Bergamim (1943), apud Benassi (2000), a fase de larva também é influenciada pela temperatura, podendo aumentar ou encurtar a sua duração. Nesse sentido, sob temperatura de 27°C a duração do período larval é de 13 dias e sob temperatura de 22°C é de 18 dias. Segundo Laurentino & Costa (2004), a duração da fase larval é de 10 a 16 dias, sendo que nesse período as fêmeas sofrem duas ecdises ou mudas de tegumento, enquanto que para os machos esse número é de apenas uma. De acordo com Bustillo et al. (1998), o sexo também influencia na duração do período larval, sendo de 15 dias para os machos e de 19 dias para as fêmeas.

A fase pupal do inseto divide-se em duas, sendo a primeira denominada de fase pré-pupal, com duração de apenas dois dias, sob temperaturas de 22°C a 27°C. A fase pupal é mais longa e dura, em média, oito dias (LAURENTINO & COSTA, 2004).

A broca atinge a fase adulta ainda no interior da semente de café. O macho adulto possui um período total de vida de cerca de 40 dias, enquanto a duração média da vida da fêmea é muito superior, de 156,50 dias. Segundo Bustillo et al. (1998), A proporção entre fêmeas e machos é, aproximadamente, de 10:1. Benassi (2000), estudou os aspectos da biologia da broca do café, e encontrou proporção de 9,05:1 e descendência média de 22,5 adultos/fêmea/fruto, após 28 dias da infestação inicial.

A cópula se dá no interior da semente do café, podendo ocorrer a fecundação de fêmeas por machos da mesma progênie, levando-se ao processo de endogamia nas gerações, o que inclusive auxilia na explicação do desenvolvimento rápido de resistência a inseticidas, assim como pode ocorrer a fecundação de fêmeas por machos de progênies diferentes, já que mais de uma fêmea pode realizar a oviposição em uma mesma semente (CONSTANTINO et al., 2011).

A pré-oviposição corresponde ao período em que ocorre a cópula, ainda no interior do fruto danificado, saída da broca fêmea do fruto onde ela se desenvolveu, abertura de nova galeria em um fruto sadio e se estende até a oviposição neste fruto. O período de pré-oviposição pode durar de 5 a 10 dias, ou mais, pois é necessário que os frutos de café de uma safra estejam em condições de receber a oviposição, ou seja, não estejam ainda aquosos. Caso o ambiente externo não seja favorável devido à falta de frutos para a oviposição, as brocas sobrevivem nos frutos secos remanescentes da safra anterior e iniciam um novo ciclo, de forma mais consistente, quando os frutos da safra atual estiverem no estágio verde (chumbões) ou em início de granação. Na vigência de condições adequadas, ocorre a fase chamada de trânsito, que corresponde ao período decorrido entre a saída de um fruto infestado e a entrada em um fruto sadio. Neste, a broca pode abrir, em um curto espaço de tempo, uma galeria até a semente, ou ficar alojada na

região da coroa do fruto, aguardando que a semente atinja o teor adequado de umidade para completar a abertura da galeria e da câmara onde realizará a oviposição. Embora esse período de espera não seja prolongado, em torno de 6 a 7 semanas, se caracteriza como um momento de grande exposição da broca e, assim como o período de trânsito, constitui um dos melhores momentos para a tomada de ações de controle químico e biológico (LAURENTINO & SOUZA, 2004; SOUZA et al., 2015; CURE et al., 1998; BENASSI, 2000; FANTON, 2001).

Durante toda a sua vida, uma fêmea da broca pode ovipositar de 74 a 119 ovos. O período de cada oviposição é de cerca de 20 dias, com postura de 2 – 3 ovos por dia.

Além da oviposição inicial, feita em frutos verdes, em uma mesma safra, ocorrem ainda mais duas oviposições, sendo uma em frutos cereja e passa e outra em frutos preferencialmente passa, realizadas respectivamente pela segunda e terceira gerações de brocas daquela safra. Assim, nos frutos infestados pelas gerações subseqüentes à primeira postura em um mesmo período de safra são encontrados indivíduos nos estádios de ovo, larva, pupa e adulto, enquanto que na primeira infestação do ano são encontrados majoritariamente adultos (CURE et al., 1998; FANTON, 2001).

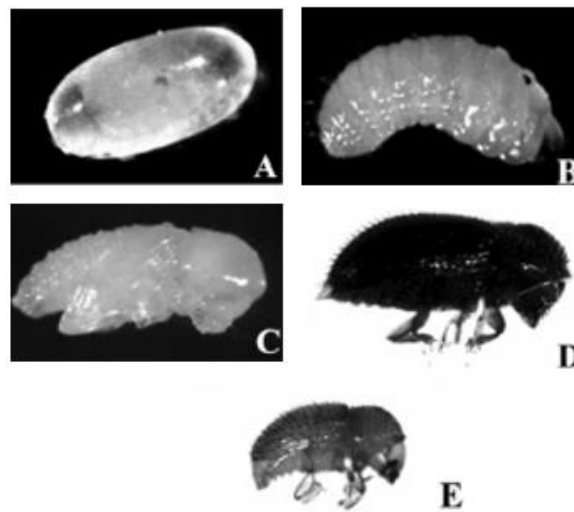


FIGURA 2. Fases do ciclo biológico da broca do café, ovo (A), larva (B), ninfa (C), fêmea adulta (D), macho adulto (E).

Fonte: Constantino et al. (2011).

3.2.5. OCORRÊNCIA E CONDIÇÕES ABIÓTICAS E BIÓTICAS FAVORÁVEIS

Mendes (1949), avaliou o potencial biótico de desenvolvimento de infestações da broca do café com base em informações do ciclo e biologia do inseto, bem como da infestação inicial, sob três situações: não controle no ano interior, ou seja, sem fatores de redução da população inicial; população inicial influenciada por repasse brando realizado após a colheita do ano anterior; repasse rigoroso para a coleta dos frutos remanescentes da safra anterior. Para isso, o

autor deduziu uma equação teórica para determinar o percentual de frutos infestados ao longo de quatro gerações da praga, considerando-se como primeira geração, aquela formada por indivíduos gerados pela última oviposição da broca em frutos pendentes e caídos no solo, remanescentes da safra anterior. Por sua vez, a última geração corresponderia àquela formada pela população de brocas que fazem a oviposição nos frutos remanescentes da colheita daquele ano considerado. Os resultados obtidos demonstraram que, para uma população inicial de 0,003 %, correspondente a uma contagem hipotética de 15 brocas vivas a cada planta de café com carga de 5000 frutos, chegou-se a um valor de infestação de 54,85 % na época da colheita para a situação 1 (não repasse). Para a situação 2 (repasso brando) o percentual de frutos atacados seria de 10,77 % e para a situação 3 (repasso rigoroso), a infestação atingiria apenas 4,60 % do total de frutos. Tais dados demonstram, segundo o autor, a importância da realização de ações que reduzam a população inicial da praga no campo, embora ressalte que os resultados expressam apenas o potencial máximo de crescimento segundo condições ambientais constantes e sem considerar eventos, naturais ou aplicados, que interfiram no desenvolvimento da população durante as quatro gerações consideradas.

A dinâmica populacional da broca do café é afetada por fatores intrínsecos ou endógenos, que são inerentes à espécie e extrínsecos ou exógenos, que dependem do meio externo (fatores ambientais). Ambos regulam o número de gerações e de indivíduos (FANTON, 2001).

Ainda segundo o autor, os fatores intrínsecos são constituídos pela taxa reprodutiva e migração. Com relação ao primeiro, a proporção de 10 fêmeas para 1 adulto favorece a elevada capacidade de infestação. Com relação ao segundo fator é mais conhecida a dispersão a curta distância, já que a broca expressa o comportamento de infestar frutos do mesmo ramo ou roseta, assim que abandonam o fruto inicialmente infestado. A migração a longas distâncias é menos estudada, havendo apenas evidências de sua ocorrência, como a observação de que a sua presença na Colômbia deu-se inicialmente nas regiões de fronteira com o Equador, onde a praga já era existente. Os fatores extrínsecos são de origem física e biótica. Os de origem física envolvem a precipitação/umidade relativa do ar, a temperatura e o fotoperíodo. Em condições de umidade relativa do ar abaixo de 90 % ocorre a inibição da saída da broca para a infestação de novos frutos. Além disso, invernos secos promovem aumento na mortalidade da praga. Temperatura mais elevada é um fator importante para a redução da duração do ciclo da broca e, conseqüentemente, na elevação dos danos. Ocorre ainda elevação no número de ovos sob temperaturas entre 20°C a 25°C e inibição da saída dos frutos infestados em temperatura abaixo de 20°C. O fotoperíodo auxilia na determinação do momento da broca abandonar os frutos

infestados e atacar frutos sadios. Os fatores bióticos relacionam-se às relações intraespecíficas e interespecíficas, bem como à ação humana. O fator intraespecífico mais importante refere-se à realização de postura por fêmeas diferentes em um mesmo fruto, o que reduz a endogamia na população (relação biótica intraespecífica positiva). As relações interespecíficas podem ser positivas como aquela promovida pela contaminação das galerias da broca pelo fungo *Fusarium solani*, o que promove uma melhor qualidade do alimento ao promover uma pré-digestão, assim como podem ocorrer relações interespecíficas negativas causadas por predadores como formigas dos gêneros *Crematogaster*, *Solenopsis* e *Wasmania*, microrganismos entomopatogênicos como os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, além de parasitoides como *Prorops nasuta* (vespa-de-Uganda), *Phymastichus coffea* (vespa-do-Togo), etc. A ação humana, caracterizada principalmente pelo manejo da cultura, também interfere na dinâmica populacional da broca do café. A irrigação, por exemplo, torna o ambiente mais favorável à ocorrência da broca ao manter a UR mais elevada. No entanto, uma das principais influências humanas se dá pela forma de realização da colheita, uma vez que uma operação de qualidade e posterior repasse constitui prática importante para reduzir a quantidade de frutos remanescentes na planta e no solo e que poderiam ser utilizados para a sobrevivência da broca.

Silva et al. (2015), estudaram a influência do clima na variação populacional da broca do café no sul de Minas, através da comparação dos dados de temperatura e pluviometria em relação à infestação por um período de quatro anos e observaram que, em anos de maiores índices pluviométricos e entressafra mais úmida no ano anterior, ocorreu aumento na infestação da broca.

No que se refere ainda à influência de elementos climáticos, Alves et al. (2009), estudaram a vulnerabilidade climática à ocorrência da broca do café em função da temperatura do ar. Segundo os autores, as regiões mais quentes como Rondônia, noroeste do Mato Grosso, sudeste do Amazonas e centro do Pará foram consideradas de alta vulnerabilidade. As regiões noroeste de Minas Gerais, noroeste do Estado de São Paulo e a quase totalidade do Estado do Espírito Santo foram consideradas de média vulnerabilidade. As regiões sul de Minas Gerais, centro de São Paulo e norte do Paraná foram situadas como de baixa vulnerabilidade.

Embora os fatores abióticos sejam importantes na determinação de uma maior ou menor infestação, assim como interferem na determinação da duração do ciclo da broca, de acordo com Ferreira et al. (2003), a fenologia reprodutiva da planta afeta mais diretamente a dinâmica populacional, desde que os fatores abióticos não estejam em níveis limitantes. Nesse sentido, Cure et al. (1998) estudaram a dinâmica populacional da praga em função da avaliação do desenvolvimento dos frutos dentro do período de uma safra agrícola, entre os meses de

novembro a maio. Os autores verificaram que os diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos em um mesmo ano agrícola permitem a ocorrência de no mínimo três gerações completas da broca e orientam que as medidas de controle devem se concentrar no período compreendido entre o final da safra até o início da maturação da safra seguinte.

3.2.6. DANOS CAUSADOS

Infestações ocasionadas pela broca do café causam prejuízos aos agricultores, em correlação direta à intensidade do ataque. Os danos ocasionados podem ocorrer de forma direta ou indireta, bem como podem ser de caráter quantitativo ou qualitativo.

Segundo Parra & Reis (2013), a broca do café constitui uma praga bastante prejudicial ao cafeeiro pois ataca os frutos de qualquer estágio de maturação, desde frutos verdes até frutos secos. De acordo com Matiello et al. (2015), os danos são mais expressivos para a espécie *C.canephora* em relação ao *C. arábica*.

Os danos causados pela broca do café iniciam-se com a perfuração dos frutos, geralmente pela região da coroa. Caso as condições de umidade da semente ainda não permitam a oviposição, a fêmea adulta permanece na região da coroa, alimentando-se apenas de partículas da casca do fruto. Posteriormente, ocorre a perfuração de uma galeria em direção a semente e de uma câmara para a oviposição. Com o surgimento das larvas inicia-se o processo de destruição parcial ou total da semente pela ação da própria larva e/ou de fungos que penetraram na galeria e causam o apodrecimento da semente (SANTOS et al., 1995; LAURENTINO & SOUZA, 2004).

Os primeiros danos causados pela broca correspondem à queda prematura dos frutos atacados. De acordo com Yokoyama et al. (1978), apud Santos et al. (1995), observou-se em estudo realizado em Piracicaba, que uma infestação de 61,05 % dos frutos em uma planta causou a queda de 34,32 % do total desses frutos.

De acordo com Reis (2016), os principais danos são causados pelas larvas, que vivem no interior das sementes, geralmente numa das duas sementes do fruto, onde se alimentam. Os danos causados são quantitativos, queda de frutos e redução do peso, bem como qualitativos, depreciação da qualidade por meio da alteração do tipo e às vezes da bebida. Neste sentido, o autor explica que a queda de frutos, devido ao ataque da praga, fica em torno de 8 % a 13 % para *Coffea arabica* (L.). Os frutos que permanecem na planta podem sofrer redução de peso de até 21 %. Qualitativamente, pode ocorrer redução na qualidade de classificação, passando do tipo de 2 para tipo 7, além de redução na qualidade da bebida, pela penetração de microrganismos, especialmente fungos como *Fusarium* e o *Penicilium*.

Mesmo sob condições de ataques mais brandos como aqueles esperados para lavouras localizadas em maiores altitudes, as perdas podem ser significativas. Matiello & Carvalho (2017), avaliaram as perdas de peso decorrentes de baixas infestações da broca em lavouras de maior altitude na região da Zona da Mata de Minas Gerais. Os autores observaram uma correlação linear entre perdas de peso de 3,00 % a 6,50 % com percentuais de frutos brocados de 6,00 % a 13,00 %.

Além das perdas quantitativas, as perdas devido a redução da qualidade do café são igualmente importantes. Segundo Matiello et al. (2015), a perda de qualidade em função do ataque da broca ocorre devido a depreciação do aspecto dos grãos e perda do tipo, já que a cada 5 grãos brocados conta-se 1 defeito para uma amostra de café. Uma vez que o café atinge pontuações mais baixas em termos de defeitos, ocorre a depreciação do preço. Da mesma forma, pode resultar em impedimentos para a exportação dos grãos, já que é admitido no máximo 10 % de grãos brocados quando se objetiva o mercado internacional.

Uma segunda implicação qualitativa para os grãos brocados refere-se à presença de microrganismos, em especial fungos, associados à broca do café e que podem atingir os grãos.

De acordo com Vega et al. (1999), a associação inseto-fungo tem ocorrido desde milhões de anos atrás. Estas associações podem resultar benéficas para os fungos, para o inseto ou para ambos. Dentre os benefícios desta interação para os fungos, pode-se mencionar o carreamento dos microrganismos pelo inseto até locais desejados, facilidade de entrada dos fungos nas plantas devido a injúrias provocadas pelos insetos, bem como podem se beneficiar do inseto como hospedeiro. Por outro lado, os insetos podem se beneficiar dos fungos uma vez que estes podem servir de alimento ou mesmo promover a pré-digestão de tecidos vegetais para serem posteriormente consumidos pelos insetos. Os autores apresentaram os principais gêneros de fungos em associação à broca do café, isolados de diversos países. Dentre os principais gêneros destacam-se *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Verticillium* e *Paecilomyces*.

Dentre os gêneros de fungos associados aos grãos de café, destacam-se *Penicillium* e *Aspergillus*. O primeiro é mais frequente em regiões onde predominam temperaturas baixas, enquanto o segundo é mais comum em regiões de clima quente. Muitas espécies de *Penicillium* são tolerantes a baixas temperaturas, sendo capazes de deteriorar grãos armazenados sob refrigeração. Com relação ao gênero *Aspergillus* é possível encontrar espécies termotolerantes. Várias espécies deste gênero produzem enzimas de grande utilidade na indústria química, alimentícia e farmacêutica. Outras, porém, são responsáveis pela produção de metabólitos secundários tóxicos, denominados micotoxinas, altamente prejudiciais à saúde humana e animal. Espécies de fungos do gênero *Penicillium* são igualmente importantes por produzirem

substâncias úteis, assim como substâncias prejudiciais como as micotoxinas ocratoxina A, a patulina e a citrinina (CHALFOUN & BATISTA, 2003).

Bueno & Taniwaki (2017), realizaram estudo comparativo entre amostras de grãos de café sadios e brocados oriundos do sul de Minas Gerais, Cerrado Mineiro, São Paulo, Espírito Santo e Bahia e a existência de fungos ocratoxigênicos no interior destes grãos, assim como a presença de ocratoxina A (OTA) nos mesmos. Os resultados demonstraram que, na maioria das amostras, os grãos brocados apresentaram maior infecção fúngica do que os grãos sadios, destacando-se a presença dos fungos deletérios *Aspergillus circundatti* nas amostras de *C. arábica* e *Aspergillus nigri* nas amostras de *C. canephora* oriundas do Espírito Santo e Bahia. Com relação a produção da toxina OTA, foram encontradas concentrações que variaram de não detectado a 20,36 µg/Kg, enquanto que nas amostras brocadas as concentrações variaram de não detectado a 63,37 µg/Kg. Segundo os autores, a legislação sanitária não estabelece limites para a concentração de OTA no café verde, sendo que para o café torrado os limites estabelecidos pela RDC nº 7 de 2011 são de 10,00 µg/Kg. Entretanto, enfatizam os autores, o processo de torra do café pode não ser suficiente para degradar toda a toxina, de modo a que essa, em altas concentrações no café verde, seja reduzida aos níveis máximos tolerados no café torrado.

3.2.7. MONITORAMENTO

De acordo com Bustillo et al. (1998), os danos causados pela broca do café exigem medidas de controle no momento correto, antes que a praga comece a causar danos econômicos. Segundo os autores, um requisito importante para um programa de manejo integrado consiste em medir a população da praga no campo em um dado momento e correlacioná-la com o dano obtido quando o produtor vende sua safra.

A tomada de decisão sobre o controle ou não de uma praga deve levar em conta os conceitos de nível de dano econômico (NDE) e nível de controle (NC). O nível de dano econômico corresponde à densidade populacional de uma praga, capaz de causar prejuízo econômico. O nível de controle ou ação, por sua vez, corresponde à densidade populacional de uma praga em que devem ser tomadas medidas de controle para que não cause danos econômicos (PICANÇO, 2017).

O monitoramento da ocorrência da broca do café é uma etapa fundamental no processo de manejo desta praga no campo. Ao se realizar o monitoramento, é possível ao cafeicultor trabalhar mais assertivamente no que se relaciona à tomada de decisões, uma vez que existirão dados de infestação e dinâmica de crescimento populacional, além de distribuição da praga no

campo. Segundo Souza et al. (2015), o monitoramento permite a utilização dos métodos de controle de forma mais assertiva (localizada) e econômica, uma vez que as infestações não ocorrem de forma homogênea em toda a lavoura.

Um bom método de amostragem de pragas deve ter como características principais a confiabilidade, economia, facilidade de execução e agilidade (BUSTILLO, et al., 1998).

O monitoramento populacional da broca do café pode ser realizado de diferentes formas, podendo ser convencional ou sequencial. O método convencional consiste na amostragem de um determinado número de frutos por planta e de um número representativo de plantas por talhão. O método convencional pode também se basear na contagem do número de brocas capturadas em armadilhas dispostas em um talhão. Outro método utilizado para a amostragem populacional da broca do café é o sequencial. Esse plano de amostragem é variável de acordo com o nível de dano, da precisão do plano e da densidade da praga. Apresenta a mesma precisão do convencional, porém com economia de custo, tempo e esforço amostral. Nesse método a amostragem de plantas e frutos é anotada de forma sequencial e a contagem da infestação é feita de forma acumulativa (PICANÇO, 2017).

Na literatura são descritos vários métodos de amostragem convencional, por análise de frutos ou armadilhas, e amostragem sequencial. Entretanto, segundo Bustillo et al. (1998), os métodos geralmente seguem os mesmos princípios estatísticos, ou seja, um universo amostral (tamanho do talhão considerado), um tamanho de amostra (número de plantas por talhão) e, finalmente, uma unidade amostral (frutos ou ramos amostrados por planta). Em experimento realizado para as condições de América Central e Colômbia, nas quais as propriedades cafeeiras exploram áreas menores se comparadas às propriedades no Brasil, o autor apresentou a comparação entre três métodos de amostragem, correlacionando-os ao percentual de infestação normalmente encontrado em cafés descascados recebidos pelas cooperativas colombianas, no momento do recebimento. O primeiro método avaliado, denominado de método da rama, considerou a escolha aleatória de 30 plantas por hectare e contagem dos frutos sadios e brocados existentes em uma rama representativa de cada uma das plantas. O segundo método, chamado de método do local, considerou a escolha de 4 plantas vizinhas em um mesmo ponto amostral e coleta de 25 frutos de cada planta. Para este método também se escolheu aleatoriamente 30 pontos por hectare. O terceiro método, da colheita, considerou a coleta de 50 frutos por ponto amostral, totalizando 1500 frutos por hectare. Após a mistura dos frutos em um saco plástico, foram retirados aleatoriamente 500 frutos, sendo o percentual de infestação determinado sobre os 1000 frutos restantes no saco. Os resultados encontrados pelo autor demonstraram que os métodos da rama e do local indicaram valores de infestação similares, porém com menor tempo

de execução para o método da rama. Da mesma forma, por tratar cada ponto amostral de forma isolada, estes dois métodos se mostraram válidos para avaliação de focos de infestação. Finalmente, ao se fazer uma correlação entre os percentuais de infestação no campo com os encontrados em amostras de café recebidos pelas cooperativas, o autor pôde inferir que o máximo de infestação tolerável no campo é de cerca de 5 %, já que tal percentual se converte em cerca de 2 % de café descascado brocado, limite estabelecido pela Federação Nacional dos Cafeicultores da Colômbia.

De acordo com Picanço (2017), um programa de monitoramento convencional satisfatório para a broca do café deve envolver a divisão da lavoura em talhões homogêneos de até 5 hectares e amostragem de 20 plantas por talhão. Em cada planta deve-se amostrar 100 frutos. O nível de controle, segundo o autor, é de 4,00 %.

Carvalho & Souza (2018), indicam que o monitoramento deve ser iniciado após 80-90 dias da florada principal, uma vez que decorrido esse tempo os frutos já estarão no estágio de desenvolvimento propício à infestação pela broca e corresponde ao período em que ocorre o trânsito da broca dos frutos secos da safra anterior para os frutos da nova safra. O monitoramento deve ser realizado com periodicidade de 15 dias durante todo o período de desenvolvimento dos frutos. A recomendação dos autores é que sejam utilizados talhões homogêneos, com área máxima de 5,00 hectares, onde são escolhidas 30 plantas ao acaso e observados 60 frutos por planta. Para tanto, devem ser observados 30 frutos de cada lado da planta, escolhendo-se aleatoriamente 10 frutos por ramo do terço superior, médio e inferior da planta. Dessa forma, o total de frutos amostrados por talhão será de 1800. Os frutos brocados devem ser colhidos e reservados. Ao final da amostragem os frutos brocados são contados e o número obtido deve ser dividido pelo fator 18 para que se obtenha diretamente o percentual de infestação. Segundo os autores, o nível de controle de 3 %, tradicionalmente utilizado para a tomada de decisão, representa um valor não condizente com as exigências da cafeicultura moderna, devendo-se atentar a outros aspectos de forma conjunta como a presença de frutos secos remanescentes da colheita anterior, o número de brocas vivas nos frutos brocados amostrados e o estágio de maturação dos frutos.

Para a realização do monitoramento convencional através do emprego de armadilhas, Picanço (2017), recomenda a colocação de 1 armadilha contendo cairomônios por hectare, sendo que o nível de controle, nesse caso, seria atingido quando forem constatadas 100 brocas adultas por armadilha.

Villacorta et al. (2002), avaliaram um modelo de armadilha para a captura da broca na fase de vôo, denominada “armadilha Iapar”. Tal equipamento foi construído com garrafa pet,

abrigando em seu interior um vidro contendo cairomônio (substância volátil difusora), constituída por Etanol + Metanol na proporção de 1:3 e 5 ml de óleo de café. Além disso, foi inserida uma faixa vermelha na garrafa para melhorar a atração da broca e mistura de água + detergente na parte de baixo da armadilha visando matar as brocas por afogamento. Os autores instalaram as armadilhas a 1,00 metro do solo, utilizando-se uma densidade de 25 armadilhas/ha. Os resultados evidenciaram que as armadilhas foram eficientes na captura das brocas, mesmo em condições de baixa infestação, provavelmente devido ao efeito sinérgico promovido pelo cairomônio. Além disso, as armadilhas detectaram com precisão os picos de trânsito da praga no campo, especificamente nos meses de janeiro, março e julho. Da mesma forma, foi eficiente para a redução de 50 % no dano causado pela broca em relação às áreas adjacentes onde as armadilhas não foram colocadas.

No que se refere ao emprego de armadilhas com substâncias atrativas, Silva et al. (2006), verificaram que estas são mais eficientes para o mapeamento das regiões de maior infestação em um talhão, servindo assim para caracterizar tal infestação no espaço. Entretanto, segundo os autores, ainda se carece de informações confiáveis para a utilização das armadilhas na determinação do momento correto para o estabelecimento de estratégias de controle.

O monitoramento sequencial, segundo Bianco (2002), consiste em uma metodologia onde as plantas amostradas são anotadas de forma sequencial e a infestação é contabilizada de maneira acumulativa. Nesse sentido, o autor desenvolveu uma tabela, de fácil entendimento e aplicação, visando subsidiar os cafeicultores na tomada de decisão para o controle da broca. Para a utilização da metodologia deve-se percorrer o talhão aleatoriamente para a análise de 20 plantas, avaliando-se 5 ramos por planta e 10 frutos por ramo, devendo-se escolher, ao acaso, 1 ramo do terço superior da planta, 2 ramos do terço médio e 2 ramos do terço inferior. Uma amostra (ramo) será considerada infestada se conter ao menos 1 fruto infestado. Se o número de frutos brocados em um ramo for superior a 1, será computado apenas 1 ponto na tabela. A decisão sobre iniciar ou não o controle deverá ser feita após a avaliação de 5 amostras, sendo que nessa condição o controle deverá ser iniciado se forem contabilizadas 3 ou mais amostras infestadas. Cada planta amostrada de maneira sequencial corresponde a um intervalo de segurança na tabela, devendo-se iniciar o controle sempre que o número de amostras infestadas for maior que o intervalo de segurança correspondente, ou deve-se continuar amostrando, caso o número de amostras infestadas seja menor ou esteja dentro do intervalo de segurança correspondente à linha do número de plantas amostradas até aquele momento. Ao final de 20 plantas amostradas no talhão, deve-se iniciar o controle caso o número de amostras infestadas

seja igual ou superior a 25. Caso se situe abaixo ou no intervalo de segurança, entre 19 a 24, deve-se repetir a amostragem em uma outra ocasião, cerca de 7 a 15 dias depois.

3.2.8. CONTROLE

Dada a capacidade da praga em causar danos diretos e indiretos, o que acarreta prejuízos aos agricultores e redução da qualidade da bebida oferecida aos consumidores, é necessária a adoção de estratégias de controle, sejam elas de forma isolada ou combinadas em um plano de manejo integrado.

3.2.8.1. CONTROLE QUÍMICO

O controle químico da broca do café deve ser feito sempre que o monitoramento, iniciado nos frutos da primeira florada, indicar um percentual de frutos brocados de 3 a 5 %. Os produtos registrados têm apresentado eficiência de controle entre 40 a 70 %, inferiores ao controle obtido pelo endosulfan, quando este era de uso legalizado. Além disso, os produtos atualmente registrados têm apresentado baixo efeito residual, o que favorece novos picos populacionais da praga (MATIELLO et al., 2015).

No período compreendido entre 1970 a 2013 o controle da broca do café foi feito principalmente através do emprego do inseticida endosulfan, considerado bastante eficiente para a manutenção da praga a níveis abaixo do dano econômico, evitando-se assim prejuízos quantitativos e qualitativos. Dados de campo e também de experimentos atribuíam àquele inseticida a manutenção da população da broca do café a níveis inferiores a 2 %. Entretanto, a despeito da sua eficiência, o endosulfan possui elevada periculosidade ambiental, tendo sido proibido o seu uso a partir de julho de 2013. Após esse período, vários produtos têm sido registrados junto ao Ministério da Agricultura, porém sem alcançar a mesma eficiência apresentada pelo endosulfan, resultando em um número excessivo de aplicações, mistura abusiva de inseticidas e prejuízos aos agricultores devido às altas infestações da praga (SOUZA et al., 2017).

Segundo o Ministério da Agricultura, existem no ano de 2019, 24 produtos registrados no Brasil para o controle da broca do café. Entretanto, tais produtos são agrupados em reduzido número de princípios ativos, sendo que 10 produtos são do grupo dos organofosforados, 2 pertencem ao grupo dos neonicotinóides em associação a piretróides, 2 do grupo semicarbazone, 2 antranilamida (ciantraniliprole) de forma isolada e 2 em combinação com a avermectina, 2 inseticidas biológicos produzidos com conídios do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, 1 espinosina, 1 tetranortriterpenoide, 1 fenilpirazol, 1 éter difenílico, 1

caiomônio (etanol + metanol). Destes, somente o inseticida biológico é da classe IV de toxicidade (pouco ou muito pouco tóxico) e IV de periculosidade ambiental. O produto pertencente ao grupo químico antranilamida também pertence a classe IV de toxicidade embora seja da classe III de periculosidade ambiental. Os grupos químicos neonicotinóide, piretróide, espinosina, tetranortriterpenóide, fenilpirazol e éter difenílico pertencem ao grupo III de toxicidade (medianamente tóxicos). Os demais grupos são considerados de toxicidade alta ou extrema (classes I e II).

Considerando-se apenas os produtos químicos registrados para o controle da broca do café, somente o antranilamida (ciantraniliprole) é classificado como nível IV. O modo de ação do produto se dá pela ativação dos receptores de rianodina através de estímulo para a liberação das reservas de cálcio do retículo sarcoplasmático de células musculares, principalmente em insetos sugadores, causando má regulação, paralisia e morte em espécies sensíveis, tanto de adultos quanto de larvas e ninfas. Experimento com o ciantraniliprole na dosagem comercial de 1,50 l/ha, demonstrou eficiência no controle da broca de 79,70% e contagem de brocas vivas correspondente a 11,00 % dos frutos, enquanto a testemunha apresentou percentual de 54,25 % de brocas vivas, aos 90 dias após a segunda aplicação do produto (SOUZA et al. 2013).

Resultados de pesquisa evidenciam que inseticidas de classes mais tóxicas nem sempre representam melhores níveis de controle da broca. Experimento comparativo entre inseticidas com os ingredientes ativos ciantraniliprole (1,75 + 1,75 l/ha) e semicarbazone (2,00 + 1,50 l/ha), realizado por Mattiello & Mendonça (2017), nos municípios de Machado e Areado demonstraram, aos 45 dias após a aplicação, percentuais de brocas vivas de 0,80 e 0,50 % respectivamente, não diferindo significativamente entre si. Entretanto, o controle promovido pelos princípios ativos citados diferiram da testemunha, que apresentou percentual de 3,50 % de brocas vivas.

Capato et al. (2017), avaliaram os ingredientes ativos Clorpirifós (1,50 l/ha), ciantraniliprole (1,75 l/ha) e fenilpirazol (2,00 e 2,50 l/ha) em experimento de campo realizado em Franca, através de duas aplicações. Os produtos apresentaram eficiências de 43,10 %, 79,20 % para os dois primeiros e de 73,60 % 62,50 % para o fenilpirazol, verificando também nesse estudo, que o inseticida de maior classe toxicológica foi o que apresentou o pior resultado.

Mendonça (2017), realizou pesquisa junto a cafeicultores através da aplicação de questionário para a avaliação do nível tecnológico empregado, bem como das expectativas dos agricultores com relação aos produtos fitossanitários para o controle da broca. Dentre as principais características desejadas pelos cafeicultores em relação aos produtos utilizados, 23,80 % responderam ser a eficiência do produto a característica mais importante. Em segundo

lugar, para um percentual de 22,10 % dos agricultores, a característica mais importante seria a baixa toxicidade, indicando que os produtores rurais desejam a oferta de produtos com a menor toxicidade possível. Com relação à satisfação dos cafeicultores com relação aos produtos disponíveis no mercado, a grande maioria (74,10 %) não está satisfeito com os resultados apresentados pelos produtos para o controle da broca do café.

3.2.8.2. CONTROLE BIOLÓGICO

O emprego do método biológico para o controle da broca do café é feito atualmente através de produtos constituídos do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. O fungo é comumente encontrado nos orifícios abertos pela broca na região da coroa do fruto de café, principalmente em anos mais chuvosos (PARRA & REIS, 2013).

Segundo Antía et al. (1992), sob condições de laboratório, suspensões de *B. bassiana* em concentração de 1×10^7 conídios/ml permitem mortalidade de até 97 % de adultos da broca do café.

Santinato et al. (2017), realizaram experimento para avaliação do controle da broca do café através do emprego exclusivo de formulação comercial de *B. Bassiana*, em diferentes números de aplicações e na ausência de pulverizações químicas para controle das doenças do café. Os autores verificaram que, sob infestações moderadas da praga, de 6,75 a 11,00 %, os tratamentos não foram capazes de reduzir a incidência, sendo que após 120 dias da primeira aplicação houve elevação drástica da infestação. Ainda segundo os autores, a eficiência do controle biológico deve considerar a aplicação dos produtos de forma preventiva, sob condições de baixas infestações.

De acordo com Bustillo et al. (1998), para o sucesso da utilização de *B.bassiana* como agente de controle da broca do café deve-se procurar atingir o inseto na fase de trânsito, além de se atingir os frutos em uma concentração de conídios elevada, independente do volume de calda, além garantir a persistência do fungo mesmo sob condições desfavoráveis de temperatura e umidade.

Segundo Neves (2007), a utilização de *B. bassiana* deve ser considerada dentro de uma visão holística de manejo integrado e não em uma perspectiva linear, onde o fungo entre em substituição ao método químico.

3.2.8.3. CONTROLE CULTURAL

As práticas adotadas durante a colheita do café, em comparação com a biologia da broca, que depende de frutos disponíveis para sua sobrevivência, podem definir o padrão de

infestações nas lavouras. Dessa forma, somente o emprego de práticas de colheita que se relacionem ao controle cultural da broca do café podem responder por cerca de 80 % do controle da praga. Nas condições brasileiras, a realização conjunta do repasse, que corresponde à coleta dos frutos que ficaram nos ramos após a colheita, além da varrição, que se caracteriza pela coleta dos frutos caídos no solo, representam um controle mais efetivo do que tais práticas feitas de maneira isolada. Na África Central a recomendação para a colheita é que se faça um repasse a cada duas semanas, visando a coleta dos frutos maduros. Em Camarões observou-se que os cafezais chamados empresariais, mais dependentes do controle químico, apresentam maior infestação da broca em relação àqueles cultivados por pequenos agricultores, que realizam de forma mais intensiva o controle cultural. No México, trabalhos de pesquisa demonstraram que o controle cultural, realizado através do repasse, foi tão eficiente quanto a aplicação de duas pulverizações com produtos químicos. Dados experimentais obtidos na Colômbia mostraram que a colheita oportuna de frutos maduros, aliada ao repasse, reduziram as infestações da broca de 70 % para 6 % durante o período da colheita. Trabalhos realizados pelo Cenicafé, na Colômbia, demonstraram que cerca de 10 % da carga pendente de café pode cair ao solo ou permanecer na planta após a colheita, de modo que a coleta e posterior venda destes grãos garante renda extra aos produtores, além de ser fundamental para a redução da infestação pela broca nas safras seguintes (BUSTILLO et al., 1998).

Da mesma forma que os cuidados com a colheita e a coleta dos grãos remanescentes nas plantas e no solo, a utilização de armadilhas de captura massal é considerada uma forma de controle cultural sobre a broca do café, além de serem utilizadas para o monitoramento populacional da broca e do seu período de trânsito (FERNANDES, 2011).

Vários modelos de armadilhas foram desenvolvidos, considerando diferentes formatos, soluções e misturas de atrativos e cores. A mistura de Etanol e Metanol em proporção de 1:1 ou 3:1, com ou sem aditivos, como pó de café, tem sido a mais empregada (RODRIGUES et al., 2016).

Os dados experimentais são controversos sobre a efetividade do uso de armadilhas como forma de controle para a broca do café. Sob condições de média a alta infestação o emprego das armadilhas não tem apresentado resultados satisfatórios no longo prazo. Entretanto, melhores controles têm sido conseguidos quando os níveis populacionais iniciais são baixos. Nesse sentido, o uso das armadilhas deve ser considerado como uma ferramenta a mais dentro de um projeto de manejo integrado da broca (BARRERA et al., 2006).

3.3. CONTROLE BIOLÓGICO POR FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

A necessidade de redução da dependência de uso dos agrotóxicos para o controle das pragas e doenças nos patossistemas agrícolas tem levado a uma busca crescente de alternativas biotecnológicas, onde se insere o controle biológico.

Os microrganismos constituem um grupo amplamente utilizado nas diversas áreas da biotecnologia, sendo cada vez mais empregados para a obtenção de produtos e processos biotecnológicos.

Segundo Souza et al. (2017), a utilização de recursos biológicos industrialmente exploráveis pela biotecnologia se inicia com a prospecção e identificação de organismos e fenômenos biológicos potenciais. De acordo ainda com os autores, a obtenção de um produto biotecnológico passa pelas fases de coleta de material biológico adequado, seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final dos melhores candidatos e, por fim, desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial. Os autores enfatizam que, embora a diversidade de microrganismos com potencial de uso nas diversas áreas da biotecnologia seja elevada, apenas um pequeno percentual desses microrganismos é conhecido e estudado. Destacam ainda que o interior dos tecidos vegetais se caracterizam como habitats potenciais para a ocorrência de microrganismos com capacidade para a produção de compostos bioativos.

De acordo com Valicente (2009), as epizootias em condições naturais são causadas em sua maioria por fungos entomopatogênicos. Principalmente devido a sua grande variabilidade genética, os fungos apresentam potencial entomopatogênico sobre um grande número de espécies de insetos, em todas as fases de desenvolvimento destes organismos, sendo indicados assim para estudos de seleção de isolados e avaliação de virulência para controle de pragas.

As mesmas fases que ocorrem para o estabelecimento de relações patógeno-hospedeiro quando os fungos se comportam como agentes de doenças em plantas, existem para o estabelecimento da relação entomopatogênica de parasitismo com os insetos. Nesse sentido, tal relação envolve as fases de adesão ao corpo do inseto, germinação do tubo, formação de apressórios, formação do grampo de penetração, penetração, colonização e reprodução. Nesse caso, a atuação pode se dar por ingestão ou simples contato com o tegumento do inseto, e os sintomas causados caracterizam-se pela formação de manchas escuras pelo corpo, paralisação da alimentação, paralisia geral e perda de coordenação dos movimentos. O parasitismo constitui a principal forma de ataque dos fungos contra os insetos, embora ocasionalmente a morte dos insetos possa se dar por toxinas produzidas pelos fungos (ALMEIDA et al., 2004; VALICENTE, 2009).

A ação de controle biológico dos fungos entomopatogênicos vai além dos danos mecânicos causados pelo desenvolvimento de estruturas sobre o corpo do inseto. Várias espécies de fungos são capazes de sintetizar enzimas hidrolases como lipases, proteases, quitinases, glucanases, entre outras, capazes de degradar o tegumento dos insetos, que constitui uma barreira físico-química altamente eficiente. A cutícula do inseto é uma estrutura composta de nanofibras de quitina cristalina integrada a uma matriz de proteínas, polifenóis, água e alguns lipídeos.

Além de enzimas, os fungos entomopatogênicos são capazes de produzir metabólitos secundários, que são compostos não essenciais para o crescimento e desenvolvimento destes organismos e que são secretados no meio de cultura, podendo assim serem isolados para fins industriais. A capacidade dos fungos em produzir estas substâncias chega a ser 73 % superior em relação a outros microrganismos. Os metabólitos secundários podem se comportar como toxinas para os insetos e também resultam em substâncias de interesse para o desenvolvimento de produtos para controle de pragas (SPECIAN et al., 2014; CAFÊU et al., 2005).

Os mais conhecidos destes metabólitos são os depsipeptídeos, que possuem a denominação relacionada ao fungo a que correspondem, como a destruxina, produzida por *Metarhizium anisopliae* e a beauvericina, produzida por *B. bassiana*. Os depsipeptídeos possuem ampla gama de efeitos biológicos sobre os insetos, entre as quais, a indução da despolarização da membrana devido a abertura dos canais de Ca^{2+} , causando paralisia e morte, a alteração morfológica do citoesqueleto e plasmócitos, o que afeta a resposta imune, a redução da expressão de péptidos antimicrobianos que tem papel importante na resposta imunitária humoral dos insetos, além de indução de alterações estruturais nas células epiteliais, o que causa ruptura da membrana e estresse oxidativo ao inibir a taxa de secreção de fluido nos túbulos de Malpighi (MORA et al., 2016).

Muitas espécies de fungos endofíticos também são produtores de metabólitos secundários com potencial de utilização para fins diversos, como na agricultura, indústria alimentar e farmacêutica. Espécies endofíticas geralmente associadas ao cafeeiro produzem substâncias com potencial de aproveitamento. Metabólitos secundários como o ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico, citocalasinas D e B, griseofulvina e declorofulvina, estes dois últimos com propriedades reconhecidamente antifúngicas e antibióticas foram extraídos de culturas do fungo endofítico do gênero *Xylaria*. Experimentos com os metabólitos de *Xylaria*, citocalasinas D e B, mostraram atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (SPECIAN et al., 2014; CAFÊU et al., 2005; CAFÊU, 2007). Fungos endofíticos do gênero *Phomopsis*

produziram ácido 3-hidroxi-propiônico, metabólito reconhecidamente inibidor do nematoide *Meloidogyne incógnita* (SPECIAN et al., 2014).

Embora a diversidade de fungos com potencial de utilização contra pragas seja grande, os programas de controle biológico tem se embasado em algumas poucas espécies.

Os principais programas envolvem o emprego do fungo *M. anisopliae* contra a cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar e das pastagens, cupins de montículos e da cana-de-açúcar, *B. bassiana* contra a broca do café, brocas da bananeira, broca do olho do coqueiro, cupim da cana-de-açúcar, cochonilhas Ortézia e ácaros, *Sporothrix insectorum* contra o percevejo de renda da seringueira (ALMEIDA et al., 2004; VALICENTE, 2009).

3.4. FUNGOS ENDOFÍTICOS

A pesquisa científica se vale de diferentes fontes para a prospecção de microrganismos que possam resultar em produtos ou processos biotecnológicos de aplicabilidade em uma determinada área do conhecimento. O solo e os diferentes componentes edáficos, os ambientes extremos, o ar, a água, entre outros, são os ambientes estudados para a bioprospecção. Da mesma forma, tem-se estudado de forma crescente os microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais, os chamados endofíticos.

Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas superiores, habitando órgãos como folhas e caules, sem causar aparentemente danos aos hospedeiros (AZEVEDO, 1998).

Segundo Leite (2010), em se tratando de fungos endofíticos, a maior parte dos trabalhos de isolamento resulta em espécies do filo Ascomycota e seus anamorfos. O autor salienta que as fontes de inóculo para a colonização das plantas por endofíticos são os esporos sexuais e assexuais disseminados pelo ar, água e sementes, bem como estruturas vegetativas como as hifas. Por outro lado, Rodrigues (2010), informa que a biodiversidade de fungos endofíticos é formada pelos filos Ascomycota, Zygomycota, Basidiomycota, Glomerulomycota e Dothideomycete.

A ocorrência de fungos na condição de endofitismo parece guardar relação com aspectos inerentes ao hospedeiro e também com aspectos externos, relacionados a fatores bióticos e abióticos do meio onde estes hospedeiros vivem. De acordo com Rodrigues (2010), maior riqueza e frequência de fungos endofíticos são encontradas em locais de elevada biodiversidade, como a que ocorre nas florestas tropicais. O autor considera ainda que plantas lenhosas provavelmente apresentem maior riqueza de fungos endofíticos do que as herbáceas e que a localização geográfica influi quantitativa e qualitativamente na produção de compostos pelos

microrganismos em associação com as plantas superiores. Da mesma forma, a diversidade de ocorrência de fungos endofíticos depende da espécie vegetal, local ocupado pelo hospedeiro, fase do desenvolvimento das plantas, estação do ano e clima do local (DOS SANTOS; BARRETO; SCORIZA et al., 2014, apud MOURA et al., 2016).

Ainda com relação aos fatores determinantes da diversidade e frequência de ocorrência dos fungos endofíticos, Fernandes (2015), esclarece que tais fatores variam com a espécie hospedeira, idade e localização geográfica do hospedeiro, condições ecológicas e sazonais, incluindo a altitude e a precipitação. Pesquisa desenvolvida por Rodrigues (2010), mostrou similaridade baixa, de 9 %, entre os fungos endofíticos isolados da espécie *Vellozia compacta*, planta endêmica de campos rupestres, existente na Serra do Ouro Branco e no Parque Estadual do Jalapão. Segundo relatado por Fernandes (2015), no primeiro isolamento de endofíticos realizado em plantas de soja nos Estados Unidos, na década de 80, foram obtidas 33 espécies de fungos. Em décadas posteriores, no Brasil, o primeiro isolamento de fungos endofíticos em soja resultou em 13 gêneros diferentes, sendo que os gêneros *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Coletotrichum* sp., *Curvularia* sp. e *Penicillium* sp. foram encontrados nos isolamentos realizados nos dois países.

Aspectos inerentes à forma de estabelecimento e ocorrência das relações ecológicas entre os microrganismos endofíticos e seus hospedeiros também são objeto de estudos científicos. O conhecimento advindo da descoberta dos aspectos ligados às interações endofítico-hospedeiro, podem trazer à tona respostas para questões relativas às vantagens obtidas por cada um dos envolvidos na interação, entre elas, aspectos referentes à defesa vegetal e promoção de crescimento.

Barbosa (2005), explica que as principais portas de entrada dos endofíticos nas plantas são as aberturas naturais, como os estômatos e hidatódios, além de feridas e picadas de insetos. Informa ainda que as raízes constituem um dos principais locais de penetração, uma vez que a própria expansão radicular no solo causa ferimentos nas raízes. Uma vez na condição de endofíticos, os microrganismos podem estabelecer diversas interações com seus hospedeiros. Segundo Monteiro (2016), as interações endofítico-hospedeiro variam do mutualismo ao parasitismo e dependem do estado fisiológico, da espécie e dos constituintes químicos da planta, além das condições abióticas que afetam essas interações. De acordo com Azevedo (1998), os endofíticos podem modificar morfológica e fisiologicamente os tecidos dos hospedeiros, além de oferecer proteção contra o ataque de pragas e doenças. Barbosa (2005), informa que os endofíticos podem estabelecer relação mutualística com seus hospedeiros, recebendo nutrientes e proteção e produzindo compostos químicos como enzimas, alcaloides e antibióticos. Maki

(2006), informa que os microrganismos endofíticos são responsáveis por promoção de crescimento através da síntese de fitormônios e fixação de nitrogênio, além de produção de compostos de defesa bioquímica induzida como peroxidases, H₂O₂, fenilalanina, amônio liases (FAL), proantocianidinas e fenilpropanóides. Informa ainda, que os endofíticos são estudados no mundo todo como fortes candidatos a agentes de controle biológico de fitopatógenos, uma vez que ocupam os mesmos nichos ecológicos destes. Assim, uma das mais importantes ações realizadas pelos microrganismos endofíticos é a indução de resistência sistêmica (IRS). Ryan et al. (2008), apud Souza et al. (2017), explicam que neste mecanismo de ação, o endofítico induz a planta hospedeira a sintetizar compostos que atuam sobre o patógeno ou alteram a morfologia vegetal. Segundo os autores, essas alterações fisiológicas e morfológicas podem incluir o espessamento da parede celular por deposição de lignina e glucanas, aumento da espessura da cutícula, além da produção de fitoalexinas, que funcionam inibindo a penetração e colonização pelos patógenos.

A pesquisa relacionada a ação dos microrganismos endofíticos sobre seus hospedeiros tem ido além da verificação da indução de resistência, fenômeno no qual o hospedeiro, incitado pelo microrganismo endofítico, é quem produz os compostos de defesa. Vários estudos científicos vêm demonstrando a ação dos microrganismos endofíticos como agentes de controle biológico, o que nesse caso representa uma ação de defesa da planta promovida pelo microrganismo, sob várias formas. Cafêu et al. (2005), explicam que os fungos endofíticos produzem uma quantidade fantástica de metabólitos secundários, chegando em certos casos a ser 73 % superior à produção de outras classes de microrganismos.

Segundo Vieira (2012), a efetividade da ação dos endofíticos como agentes de controle biológico depende da especificidade da planta hospedeira, da dinâmica das populações e padrão de colonização das plantas, da agilidade para mover-se dentro dos tecidos do hospedeiro e da desenvoltura para induzir resistência sistêmica.

Barreti (2001), apud Barbosa (2005), isolou microrganismos endofíticos de plantas sadias de tomate com atividade de biocontrole sobre pinta-preta (*Alternaria solani*), requeima (*Phitophora infestans*) e murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*).

Monteiro (2016), verificou efeito fungicida do fungo *Muscodor coffeanum* contra o fungo deletério de grãos de café *Aspergillus ochraceus*, bem como inibição de crescimento de vários patógenos pelos compostos voláteis do fungo endofítico do gênero *Acremonium* sp.

É grande a diversidade de fungos que podem se comportar como endofítico em alguma fase da vida, incluindo os de solo, como *Trichoderma* spp. Como agente de biocontrole,

Trichoderma spp pode agir por antibiose, hiperparasitismo e competição (FONTENELLE, 2011).

Diversos isolados de *Trichoderma* possuem efeito antagônico contra uma grande gama de patógenos de solo e parte aérea, como *Phythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria*, *Pseudomonas*, dentre outros (RAI; SINGH, 1980; SCHAREN; BRYAN, 1981; ELAD KIRSCHNER, 1993; PERELLÓ; MÓNACO; SIMÓN, 2003; YEDIDIA et al., 2003; BENITEZ, 2004; LATORRE, 2004; SCHERM et al., 2008, apud FONTENELLE, 2011).

A realização de ensaios *in vitro* constitui uma alternativa interessante para se avaliar o potencial antagônico dos endofíticos sobre os patógenos e pragas, uma vez que permite a identificação de substâncias voláteis atuantes no processo de antagonismo.

Rocha (2007), estudou o efeito antagônico de fungos endofíticos isolados de seringueira sobre a germinação do patógeno causador do mal-das-folhas da seringueira, *Microcyclus ulei*, isolados PMB26 e PMB28. Os resultados mostraram que 15 isolados de endofíticos, com destaque para os fungos *Fusarium* sp., *Glomerella cingulata*, *Phomopsis* sp., *Myrothecium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Microdiplodia* sp., em concentrações de 50 % e 12,50%, promoveram inibição superior a 80 % sobre conídios do patógeno alvo. Também em condições de ensaios realizados *in vitro*, Junior et al. (2013), obtiveram resultados satisfatórios de inibição de *Botrytis cinérea*, agente causal do mofo cinzento em mudas de eucalipto, através da utilização dos fungos endofíticos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp., isolados de *Eucalyptus benthanii*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DE MATERIAL VEGETAL E ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

O isolamento de fungos endofíticos de folhas do cafeeiro teve como objetivo a obtenção de material biológico para o desenvolvimento deste trabalho, tanto para a análise da diversidade de ocorrência dos mesmos, como para a avaliação de isolados como agentes de controle biológico sobre a broca-do-café.

Para a análise da diversidade da ocorrência de fungos endofíticos foram coletadas folhas de cafeeiro em três propriedades rurais localizadas nos municípios de Águas de Lindóia (sítio Monte Alegre), Itapira (sítio São Longuinho) e Socorro (fazenda Paineira), todas localizadas em uma mesma região geográfica (média mogiana do Estado de São Paulo). A coleta de folhas e obtenção de isolados oriundos dessas propriedades foi realizada em duas épocas distintas,

sendo uma no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018 e outra no período de abril a junho de 2018, visando avaliar também a diversidade temporal dos fungos isolados.

Ainda visando a avaliação da diversidade de ocorrência dos fungos endofíticos, foram coletadas folhas de cafeeiro em três regiões geográficas distintas, a saber: média mogiana paulista (município de Águas de Lindóia), sul do Estado de Minas Gerais (município de Poços de Caldas) e leste paulista (município de Campinas), nos meses de agosto e setembro de 2018. As Tabelas 2 e 3 apresentam os locais de coleta de folhas de cafeeiro para o isolamento de fungos endofíticos e a Figura 3 localiza as propriedades rurais onde foram realizadas as coletas na região da média mogiana.

TABELA 2. Caracterização dos locais de coleta de folhas de café para isolamento de fungos endofíticos na região da média mogiana.

Nome da propriedade	Local da propriedade	Sistema de cultivo Cultivar	Coordenada latitude	Coordenada longitude	Altitude (m)
Sítio Monte Alegre	Águas de Lindóia-SP	Convencional Mundo Novo	22°26'47,10" S	46°35'43,12" O	1.000
Fazenda Paineira	Socorro-SP	Orgânico Icatu	22°32'52,48" S	46°25'41,22" O	1.350
Sítio São Longuinho	Itapira-SP	Convencional Bourbon	22°26'59,03" S	46°40'31,59" O	850

TABELA 3. Caracterização das propriedades rurais localizadas em 3 regiões geográficas de coleta de folhas de café para isolamento de fungos endofíticos.

Nome da propriedade	Local da propriedade/Região	Sistema de cultivo Cultivar	Coordenada latitude	Coordenada longitude	Altitude (m)
Sítio Monte Alegre	Águas de Lindóia-SP (Média mogiana)	Convencional Mundo Novo	22°26'47,10" S	46°35'43,12" O	1.000
Fazenda Recreio	Poços de Caldas-MG (Sul de Minas)	Convencional Bourbon	21°47'11,28" S	46°41'41,58" O	1.070
Instituto Biológico	Campinas-SP (Leste paulista)	Convencional Bourbon	22°54'24,90" S	47°00'55,21" O	700

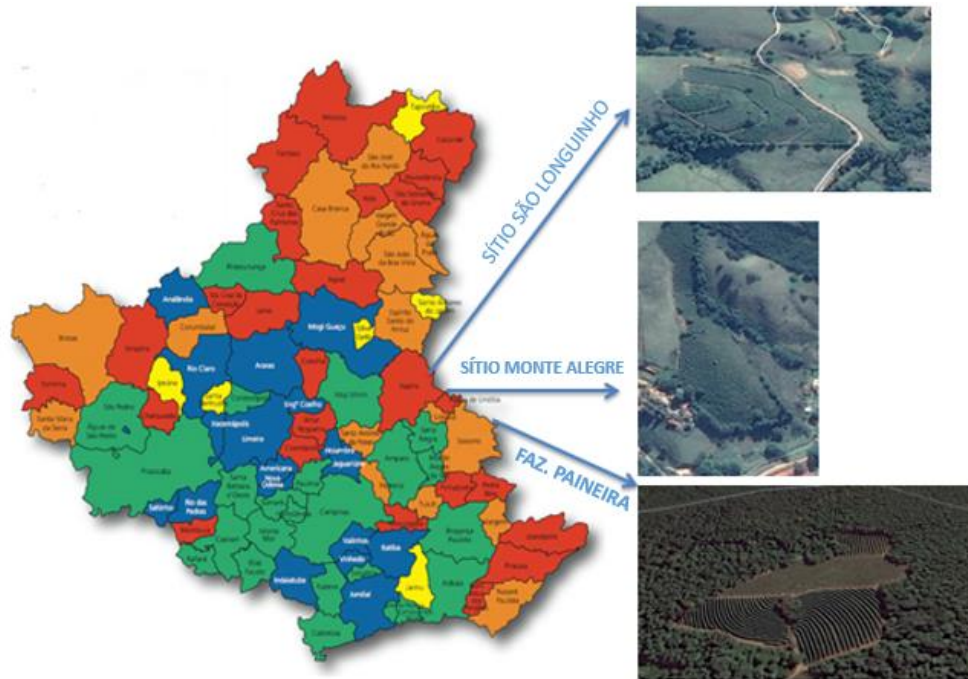


FIGURA 3. Localização das três propriedades rurais da região da média mogiana paulista onde foram coletadas folhas de cafeeiro para o isolamento de fungos endofíticos.

A região da média mogiana paulista se caracteriza por ser tradicionalmente produtora de cafés. Localiza-se na porção leste do Estado de São Paulo, acompanhando a cadeia de montanhas que serve de contraforte para a Serra da Mantiqueira, desde o entorno do município de Bragança Paulista até a região de Mococa, situando-se entre a depressão periférica que forma o relevo mais suave e de menor altitude da porção central do Estado de São Paulo e os limites divisórios do Estado de Minas Gerais. Possui municípios de grande vocação e foco na cafeicultura, como Espírito Santo do Pinhal, São Sebastião da Gramma, Caconde, Serra Negra, entre outros.

As propriedades inseridas nesta região e que serviram para a coleta de material para o isolamento de endofíticos, localizam-se nos municípios de Águas de Lindóia (Sítio Monte Alegre), Socorro (Fazenda Paineira) e Itapira (Sítio São Longuinho).

O sítio Monte Alegre dedica-se à cafeicultura familiar, utilizando-se de baixo nível tecnológico. Como insumos são aplicados somente fertilizantes minerais (formulações N-P-K), combinados à adubação orgânica. Não são realizados controles fitossanitários das doenças e pragas do cafeeiro, sendo constatada inclusive alta infestação de broca do café. Por essa razão, os insetos utilizados no experimento foram coletados desta propriedade. O relevo é montanhoso, situando-se a uma altitude superior a 1.000 m. A lavoura é formada pela cultivar Mundo Novo.

A fazenda Paineira dedica-se à produção de café orgânico em um talhão de cerca de 1 hectare. Por essa razão, também não são utilizados insumos químicos. A propriedade localiza-se a cerca de 1.350 metros de altitude, em um altiplano com relevo suave-ondulado. A cultivar empregada é a Icatu, implantada há cerca de 10 anos.

O sítio São Longuinho apresenta também relevo montanhoso, com altitude média de 850 metros. Utiliza a cultivar Bourbon implantada há cerca de 6 anos e adota o controle químico para os problemas fitossanitários e fertilizantes minerais para a nutrição da lavoura.

Nas três propriedades o solo é classificado como argissolo, textura média, formado a partir do intemperismo de rochas magmáticas ácidas, granitos e gnaisses (SANTOS, et al., 2013). Da mesma forma, o clima regional é classificado como Tropical de Altitude, com temperatura anual média de 18°C e pluviometria acumulada anual de 1.600 mm. O verão caracteriza-se como quente e úmido e o inverno é frio e seco.

Para a abordagem inter-regional escolheu-se locais de coleta de folhas situados na região da média mogiana paulista (sítio Monte Alegre, em Águas de Lindóia), sul de Minas Gerais (fazenda Recreio, em Poços de Caldas) e leste paulista (fazenda Mato Dentro-Instituto Biológico, em Campinas).

A fazenda Recreio, localizada no município de Poços de Caldas, possui relevo montanhoso, localizando-se a uma altitude de 1.070,00 metros. O cafezal é formado pela cultivar Bourbon implantada há cerca de 50 anos, sendo adotadas todas as práticas modernas de cultivo e ampla utilização dos insumos químicos para nutrição e tratamentos fitossanitários. O solo é classificado como Argissolo, com textura argilosa, oriundo de intemperismo de rochas magmáticas básicas, basalto e diabásio (SANTOS, et al., 2013).

O talhão de café do Instituto Biológico localiza-se no interior da Fazenda Mato Dentro, no entorno do laboratório de controle biológico da instituição. Constitui numa pequena plantação, com cerca de 800 m², onde foi utilizada a cultivar Bourbon, implantada há cerca de 4 anos. É cultivado no sistema orgânico, sem o emprego de insumos minerais para a adubação ou produtos químicos para o controle das pragas e doenças. O relevo é suave ondulado, com altitude de 700,00 metros. O solo é classificado como Latossolo Vermelho-amarelo, argiloso, oriundo de intemperismo de rochas magmáticas, bem como de rochas sedimentares (SANTOS, et al., 2013). De todos os locais de coleta de folhas, é aquele que possui as temperaturas médias mais elevadas e menor índice pluviométrico.

As folhas coletadas foram obtidas de plantas adultas. Os talhões foram percorridos em zigue-zague, de maneira que os pontos de coleta fossem satisfatoriamente distribuídos. Foram coletadas folhas de 5 plantas por talhão, com coleta de 1 ramo do terço médio de cada um dos

pontos cardeais das plantas. A determinação dos pontos cardeais Norte, Sul, Leste e Oeste foi obtida com auxílio de GPS de navegação, modelo Garmin. Com a coleta de 4 ramos por planta e 5 plantas por talhão, obteve-se o número total de 20 ramos por local de coleta.

Os ramos coletados foram imediatamente identificados e acondicionados em caixa térmica com gelo. O tempo máximo decorrido entre a coleta e a realização do isolamento foi de 24 horas.

O isolamento foi realizado no laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico/APTA, localizado em Campinas.

No laboratório, foi escolhida 1 folha de cada ramo coletado, utilizando-se como critério a integridade física das folhas e a ausência de sintomas de doenças e sinais de patógenos (Figura 4). As folhas escolhidas passaram pelo processo de desinfestação seguindo-se adaptação do protocolo estabelecido por Araujo et al. (2002). Cada folha, correspondente a um ponto cardinal de cada planta, foi desinfestada separadamente, iniciando-se com a lavagem em água corrente e detergente neutro para a retirada dos organismos epifíticos e resíduos de poeira e solo. Cada folha foi cortada em 2 fragmentos de 5 cm x 3 cm, para a geração de duas placas. Os fragmentos passaram por uma sequência de recipientes contendo álcool a 70% por 3 minutos, Hipoclorito de Sódio com 3% de Cloro ativo por 10 minutos, álcool a 70 % por 1 minuto e enxágue por 2 vezes em recipiente contendo água destilada esterilizada. Uma gota da última água de lavagem de cada folha foi colocada em placa de Petri contendo o mesmo meio usado para o isolamento dos fungos, visando atestar a eficiência da desinfestação.

O material vegetal foi plaqueado, utilizando-se placas de Petri plásticas, contendo meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) adicionado de pentabiótico para inibir o crescimento bacteriano (50 µg/ml). O plaqueamento foi realizado em câmara de fluxo, tendo sido as placas vedadas com fita plástica e incubadas em BOD a 28°C. Ressalta-se que todo o material utilizado no plaqueamento foi previamente esterilizado em autoclave. A Figura 5 ilustra a sequência utilizada para o isolamento dos fungos endofíticos.



FIGURA 4. Material vegetal (folhas) de cafeeiro coletadas para o isolamento de fungos endofíticos.

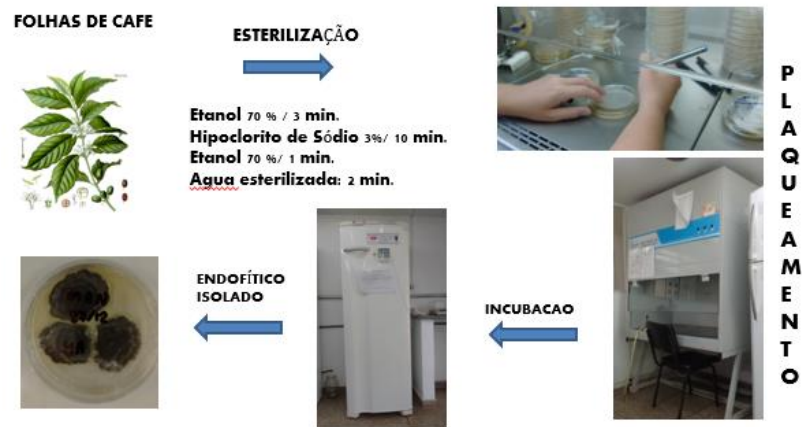


FIGURA 5. Fluxograma das etapas para isolamento de fungos endofíticos de folhas de cafeeiro.

O período de incubação variou de 7 a 15 dias e levou em conta o surgimento dos fungos endofíticos a partir da lateral seccionada (Figura 6), evidenciando o crescimento a partir do mesófilo foliar.

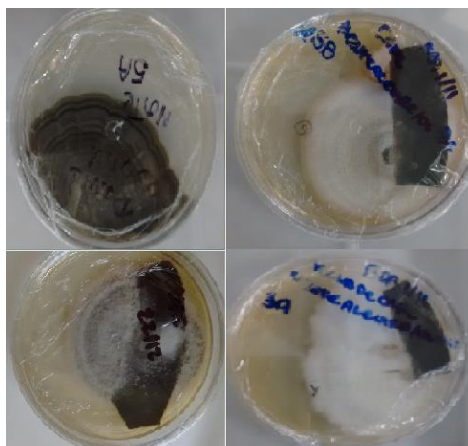


FIGURA 6. Exemplos de fungos endofíticos em crescimento no meio BDA a partir do mesófilo foliar.

Após a emergência dos endofíticos, foi realizada a repicagem dos isolados obtidos, através do plaqueamento em 3 repetições de cada placa, retirando-se pequenos fragmentos vegetativos dos fungos com auxílio de alça esterilizada, depositando-os em 3 pontos equidistantes do centro da placa contendo meio BDA + pentabiótico, seguindo-se incubação em BOD também a 28°C. Após o crescimento dos fungos, foi separada 1 placa para a classificação macromorfológica visual, 1 placa para a retirada de material visando o armazenamento dos microrganismos e 1 placa para replicações futuras.

4.2.PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS

Cada fungo isolado teve 1 amostra armazenada em 10 ml água destilada e esterilizada, devidamente acondicionada em frascos de vidro lacrados (Figura 7), utilizando-se a metodologia para preservação de fungos endofíticos preconizada por Castelani (1967). Todo o material utilizado foi previamente autoclavado. Após o acondicionamento o material foi identificado e armazenado em geladeira.



FIGURA 7. Procedimento para conservação dos isolados de fungos endofíticos.

4.3.CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

ISOLADOS

A caracterização morfológica dos fungos endofíticos isolados utilizou o conceito de morfoespécies.

Arnold et al. (2000) apud Carvalho & Pereira (2016), empregaram o termo morfoespécies ou morfotipos para designar unidades taxonômicas funcionais, informando que a metodologia de classificação com base nas características macroscópicas dos fungos é útil para a classificação, especialmente em ambientes tropicais, onde a diversidade usualmente é elevada.

Carvalho & Pereira (2016), realizaram a identificação de isolados de fungos endofíticos de orquídeas, utilizando a metodologia da classificação em morfoespécies, através dos

parâmetros cor da frente e cor do verso; textura do micélio, que se refere à altura dos micélios aéreos e pode ser classificada em algodonosa (micélio aéreo alto e denso), aveludada (micélio aéreo baixo), granular (superfície plana e esfarelenta) e glabra (sem micélio aéreo/leveduras); topografia da colônia, que pode ser rugosa (sulcos profundos/raios a partir do centro), umbilicada (elevação central) e verrucosa (superfície franzida e retorcida); velocidade de crescimento da colônia (rápido, moderado e lento); esporulação; crescimento uniforme; contorno da borda; presença de secreção.

Neste trabalho, a classificação em morfoespécies foi feita a partir da observação macroscópica dos fungos isolados, julgando-se suficiente a utilização dos parâmetros cor da colônia (frente e verso), textura, topografia e borda da colônia. Para cada morfoespécie foi atribuída uma letra para identificação.

4.4.IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Dentre os isolados obtidos pela coleta de material das diferentes regiões, foram escolhidos 9 que foram identificados nível molecular, constituindo a relação de fungos endofíticos avaliados quanto ao potencial entomopatogênico. Utilizou-se como critérios principais para a escolha dos isolados, aspectos visuais como a velocidade de crescimento da colônia e a capacidade de formação de massa de micélios.

A identificação molecular dos isolados obedeceu as etapas de extração do DNA genômico e sequenciamento.

4.4.1. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A etapa de extração do DNA genômico seguiu o protocolo estabelecido pelo método do CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*), (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). O material miceliar contido nas placas foi retirado com o auxílio de alça e disposto em microtubos de 1,5 mL. Em seguida foi adicionado 100 µL de CTAB. O micélio foi triturado utilizando-se um pistilo. Após, foi adicionado mais 500 µL de CTAB. Os microtubos foram então colocados por 30 min. a 65° C em Banho-maria, sendo frequentemente homogeneizados nesse período. Em seguida, foi adicionado 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguido de agitação em vortex por alguns segundos. O conteúdo foi centrifugado a 12.000 r.p.m. por 10 minutos. Após, o material sobrenadante (500 µL) foi transferido para um microtubo novo, onde adicionou-se 300 µL de isopropanol. Foi realizada nova centrifugação a 12.000 r.p.m. pelo tempo de 10 min. Por inversão, houve descarte do sobrenadante e adição de 500 µL de etanol. Após este procedimento a amostra foi centrifugada a 12.000 r.p.m. por 5 min.

e o sobrenadante novamente descartado por inversão. A seguir, o conteúdo foi seco pelo período de 10 min, sendo novamente hidratado antes do armazenamento (50 µL de água MilliQ autoclavada), que ocorreu em freezer a -20° C.

Foram feitas 2 repetições de cada um dos microtubos contendo o material de DNA dos isolados de endofíticos.

4.4.2. SEQUENCIAMENTO

As etapas subsequentes à extração do DNA genômico compreenderam a quantificação e diluição do DNA extraído dos isolados (eletroforese), a reação em cadeia de polimerase (PCR), o sequenciamento e a análise de bioinformática. Todas as etapas da identificação molecular dos fungos endofíticos isolados foram realizadas no laboratório de Genômica e bioEnergia da Unicamp, pela equipe do Dt. Welbe Oliveira Bragança.

4.5. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE OCORRÊNCIA DAS MORFOESPÉCIES ISOLADAS

A importância do conhecimento da diversidade de ocorrência dos endofíticos se dá pelo fato de que esses microrganismos constituem uma das principais fontes de agentes biológicos de interesse para o desenvolvimento de soluções tecnológicas no campo da agricultura, medicina e indústria alimentícia (AZEVEDO, 1998). Prospecções que considerem os aspectos da diversidade de ocorrência certamente serão mais assertivas, gerarão economia de recursos e alcançarão maior riqueza de material biológico. Além disso, eventos relacionados à indução de resistência, como os encontrados por Souza et al. (2017) e controle biológico como os encontrados por Barbosa (2005) e Monteiro (2016), poderão ser melhor compreendidos ao se considerar a diversidade de ocorrência dos endofíticos nos ambientes.

A avaliação da diversidade de ocorrência dos fungos endofíticos em folhas de cafeeiros foi feita sob duas formas. A primeira avaliou os aspectos de especificidade entre endofítico e planta hospedeira, ou seja, se a ocorrência se dá de uma maneira constante entre microrganismo e planta hospedeira, independente de outras condições bióticas ou abióticas impostas pelo meio, ou, segundo Rodrigues (2010), Fernandes (2015), Moura et al. (2016), para os quais a diversidade encontrada de microrganismos na condição de endofíticos varia consideravelmente em função de fatores diversos, relacionados ao meio externo (clima, solo, altitude, relevo, época do ano, etc), à planta hospedeira (espécie, cultivar, idade, etc) e ao próprio microorganismo. Para a realização dessa análise foram feitas comparações entre as diferentes morfoespécies

encontradas e as diferentes áreas e regiões de coleta, cada uma delas com suas características intrínsecas.

A segunda forma de avaliação da diversidade foi embasada nos conceitos de ecologia de populações, através da determinação da Riqueza, que indica o número de espécies diferentes em uma determinada comunidade, a Abundância, que apresenta a população de indivíduos de cada espécie, a Equitabilidade, que se relaciona com a distribuição da ocorrência das espécies na comunidade e o índice de diversidade de Shannon Wiener (H'), calculado pela expressão $\sum [(n_i/n) \ln (n_i/n)]$, em que (n_i) representa o número de indivíduos de uma determinada espécie e (n) representa o número total de indivíduos de todas as espécies de ocorrência em uma comunidade. Tal índice é adequado para a análise comparativa entre as comunidades (locais de coleta) atribuindo maior peso à Riqueza de espécies (AMARAL et al., 2008; ARNOLD & LUTZONI, 2007 LEITE, 2010).

4.6. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DOS ISOLADOS

A avaliação do potencial entomopatogênico sobre o inseto-praga *Hypothenemus hampei* foi feita através do emprego de 9 espécies de fungos endofíticos identificadas a nível molecular, isoladas das diferentes regiões de coleta.

A forma mais comum de um fungo entomopatogênico exercer controle biológico sobre insetos praga é através de danos mecânicos e consumo da hemolinfa, resultantes da colonização do corpo do inseto (ALMEIDA et al., 2004; VALICENTE, 2009).

Entretanto, os fungos constituem um dos principais organismos produtores de enzimas e outros metabólitos secundários, substâncias estas que também podem exercer efeito de controle sobre patógenos e pragas (CAFÊU et al., 2005; SPECIAN et al., 2014; MORA et al., 2016).

Assim, neste trabalho, as diferentes formas de controle biológico constantes na literatura foram consideradas para avaliar o potencial entomopatogênico dos fungos endofíticos sobre a broca do café.

4.6.1. OBTENÇÃO DOS INSETOS ALVO E DOS CONÍDIOS DOS ENDOFÍTICOS

Os insetos alvo utilizados corresponderam a adultos da espécie *Hypothenemus hampei* e foram obtidos através da coleta de frutos brocados realizada nos mesmos locais de coleta de folhas para isolamento de endofíticos e realizada entre 2 a 5 dias antes da instalação dos

bioensaios. A Figura 8 apresenta o recipiente construído com a finalidade de manutenção das brocas em condições de laboratório.



FIGURA 8. Recipiente para manutenção da broca do café em laboratório.

Os conídios utilizados corresponderam àqueles obtidos pela primeira repicagem da cultura pura, em meio BDA. As suspensões foram preparadas em água estéril + 0,02% Tween 20. Foram feitas diluições, de modo a se obter as concentrações utilizadas nas avaliações. A contagem da concentração de conídios foi feita em câmara de Neubauer. O potencial entomopatogênico dos fungos foi avaliado nas concentrações de 1×10^8 conídios ml^{-1} e de $2,5 \times 10^8$ conídios ml^{-1} .

A viabilidade foi determinada em meio agar/água após 24h, com contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se somente suspensões com percentual de germinação superior a 90%.

4.6.2. BIOENSAIOS DE ENTOMOPATOGENICIDADE

Para a avaliação do potencial entomopatogênico sobre a broca do café, foram escolhidos fungos endofíticos isolados de folhas de cafeeiros localizados em três regiões distintas, a saber: média mogiana (sítio Monte Alegre, localizado em Águas de Lindóia-SP), sul de Minas Gerais (fazenda Recreio, localizada em Poços de Caldas-MG) e leste paulista (Fazenda Mato Dentro/Instituto Biológico, localizado em Campinas-SP).

Os insetos para os bioensaios foram coletados dos recipientes de manutenção e colocados em mini placas de petri contendo papel de filtro no fundo. Os ensaios foram feitos inicialmente na concentração de conídios de 1×10^8 conídios ml^{-1} e posteriormente repetidos na

concentração de $2,5 \times 10^8$ conídios ml^{-1} . Foi mantida a dieta das brocas através da oferta de café cru moído a partir do 2º dia e pulverização periódica com água destilada, a fim de se manter a umidade em torno de 95 % UR. As placas foram mantidas em BOD.

Os 9 isolados dos fungos endofíticos identificados a nível molecular constituíram os diferentes tratamentos. O tratamento controle consistiu de água estéril + 0,02% Tween 20. Foram utilizadas 5 brocas por recipiente e 4 repetições. As diferentes suspensões de conídios foram aplicadas diretamente sobre o dorso dos insetos com o auxílio de pipeta de 1 ml. O papel de filtro colocado no fundo dos recipientes também auxiliou na absorção da suspensão e espalhamento sobre o corpo das brocas.

As avaliações e anotações foram realizadas diariamente após a inoculação dos conídios. Foram observados, através de microscópio estereoscópico, aspectos de comportamento das brocas (alimentação e motilidade) e após o período de 10 dias de condução do experimento, a porcentagem de mortalidade total (MT) e a mortalidade confirmada (MC). Para a confirmação da morte por efeito do fungo entomopatogênico, os insetos mortos retirados diariamente, eram colocados em placas de petri contendo meio BDA e mantidos em BOD para crescimento dos fungos. Os fungos desenvolvidos sobre o corpo dos insetos incubados eram então replicados, visando a confirmação da espécie.

Os bioensaios de avaliação do potencial entomopatogênico dos fungos endofíticos (Figura 9), tiveram delineamento estatístico inteiramente ao acaso, com análise gráfica dos resultados e de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,1$). Para o tratamento estatístico dos dados obtidos utilizou-se o software Sisvar, versão 5.7.

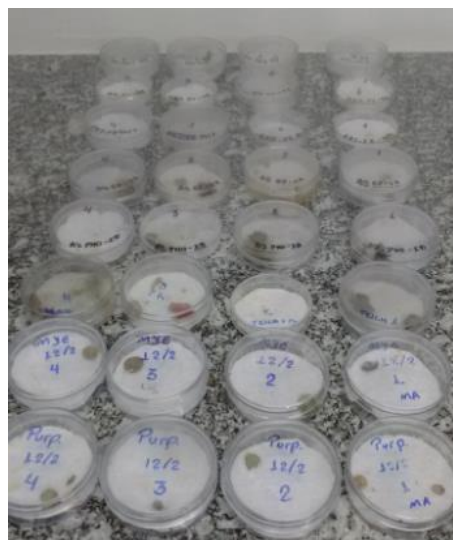


FIGURA 9. Bioensaio para a avaliação do potencial entomopatogênico de fungos endofíticos sobre a broca do café.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.MORFOESPÉCIES ISOLADAS

Os resultados do isolamento de endofíticos de folhas de café oriundos das três propriedades rurais da região da média mogiana e das três diferentes regiões de coleta, encontram-se nas Tabelas 4 e 5 e Figuras 10 e 11.

TABELA 4. Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas de cafeeiros de três propriedades rurais da região cafeeira média mogiana paulista, em duas épocas distintas, dez. 2017 a fev. 2018 e abr. a jun. 2018.

MORFOESPÉCIE	COR (FRENTE E VERSO)	TEXTURA	TOPOGRAFIA	BORDA DA COLÔNIA
A	preto e cinza	aveludada	rugosa	irregular
B	marrom escuro	aveludada	rugosa	lisa
C	branco	aveludada	umbilicada	lisa
D	branco	algodonosa	rugosa	lisa
E	branco	aveludada	rugosa	lisa
F	verde escuro	aveludada	umbilicada	lisa
G	cinza escuro	granular	rugosa	irregular
H	verde acizentado	aveludada	rugosa	lisa
I	cinza claro	aveludada	rugosa	lisa
J	branco	algodonosa	umbilicada	lisa
K	preto	granular	verrucosa	irregular
L	cinza esverdeado	granular	rugosa	lisa
M	preto	granular	rugosa	lisa
N	Preto/branco	aveludada	verrucosa	irregular
O	cinza/branco	aveludada	umbilicada	lisa



FIGURA 10. Morfoespécies de fungos endofíticos em três propriedades rurais da média mogiana, coletados no período de dezembro de 2017 a junho de 2018.

TABELA 5. Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas de café de três regiões diferentes, média mogiana paulista, sul de Minas Gerais e leste paulista.

MORFOESPÉCIE	COR (FRENTE E VERSO)	TEXTURA	TOPOGRAFIA	BORDA DA COLÔNIA
A'	Verde escuro	algodonosa	rugosa	irregular
B'	Verde claro	algodonosa	rugosa	irregular
C'	branco	aveludada	umbilicada	lisa
D'	Preto/branco	aveludada	verrucosa	irregular
E'	Branco/preto	aveludada	verrucosa	irregular
F'	branco	algodonosa	rugosa	irregular
G'	Púrpura/branco	aveludada	rugosa	lisa
H'	Rosado/branco	aveludada	rugosa	lisa
I'	branco	aveludada	rugosa	Muito irregular
J'	creme	algodonosa	rugosa	irregular
K'	Creme/roxo	granular	rugosa	irregular
L'	Marrom/branco	granular	rugosa	irregular
M'	rosada	aveludada	verrucosa	irregular
N'	Creme/amarela	aveludada	verrucosa	irregular
O'	Branco/preto	aveludada	rugosa	lisa

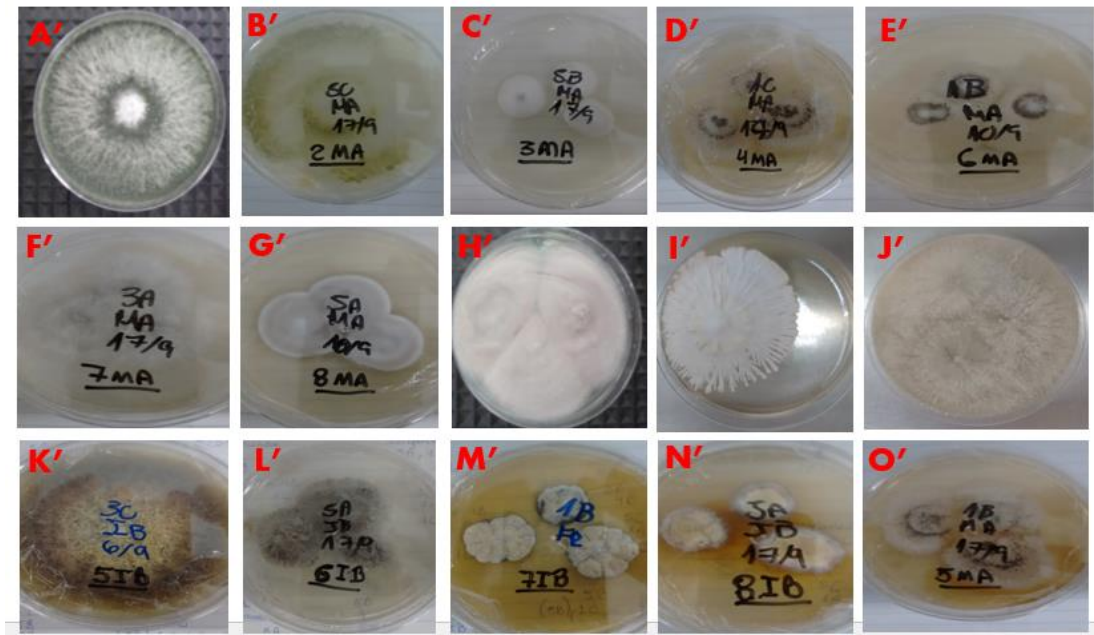


FIGURA 11. Morfoespécies de fungos endofíticos coletados nas regiões média mogiana, Sul de Minas Gerais e leste paulista, nos meses de agosto e setembro de 2018.

O conceito de morfoespécies foi útil para agrupar os diferentes isolados, segundo critérios visuais e macroscópicos.

O agrupamento de isolados obtidos em três propriedades rurais da região média mogiana em duas épocas distintas (verão e inverno), resultou em um total de 16 morfoespécies (Tabela 4 e Figura 10).

O agrupamento de isolados resultantes de coletas em três regiões distintas, resultou em 15 morfoespécies diferentes (Tabela 5 e Figura 11).

5.2. ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE OCORRÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS

5.2.1. ESPECIFICIDADE DE OCORRÊNCIA

A Tabela 6 apresenta as morfoespécies isoladas de cada uma das propriedades rurais da região da média mogiana no período do verão. A Tabela 7 apresenta o isolamento nas mesmas propriedades no período do inverno e a Tabela 8 apresenta os isolamentos nas três regiões distintas consideradas.

TABELA 6. Morfoespécies de fungos endofíticos de três propriedades rurais da média mogiana paulista, isoladas no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018.

MORFOESPÉCIE	SÍTIO MONTE ALEGRE	FAZENDA PAINEIRA	SÍTIO SÃO LONGUINHO
A	SIM	SIM	SIM
B	SIM	-	-
C	SIM	-	-
D	SIM	-	SIM
E	SIM	-	-
F	SIM	-	-
G	-	SIM	-
H	-	-	SIM
I	-	SIM	-
J	-	-	-
K	-	-	-
L	-	-	-
M	-	-	-
N	-	-	-
O	-	-	-
P	-	-	-
TOTAL POR PROPR.	6	3	3

TABELA 7. Morfoespécies de fungos endofíticos de três propriedades rurais da média mogiana paulista, isoladas no período de abril a junho de 2018.

MORFOESPÉCIE	SÍTIO MONTE ALEGRE	FAZENDA PAINEIRA	SÍTIO SÃO LONGUINHO
A	SIM	SIM	-
B	-	-	-
C	-	-	-
D	-	-	-
E	SIM	-	-
F	-	-	-
G	-	-	-
H	-	-	-
I	-	SIM	-
J	SIM	-	-
K	SIM	-	-
L	SIM	-	-
M	-	-	SIM
N	-	SIM	-
O	-	SIM	SIM
P	-	-	SIM
TOTAL POR PROPR.	05	04	03

TABELA 8. Morfoespécies de fungos endofíticos isolados das regiões média mogiana paulista, sul de Minas Gerais e Leste Paulista nos meses de agosto e setembro de 2018.

Morfoespécie	MÉDIA MOGIANA (ÁGUAS DE LINDÓIA)	SUL DE MINAS (POÇOS DE CALDAS)	LESTE PAULISTA (CAMPINAS)
A'	SIM	SIM	-
B'	SIM	-	-
C'	SIM	-	-
D'	SIM	SIM	SIM
E'	SIM	-	-
F'	SIM	-	-
G'	SIM	-	-
H'	-	SIM	-
I'	-	SIM	-
J'	-	SIM	-
K'	-	-	SIM
L'	-	-	SIM
M'	-	-	SIM
N'	-	-	SIM
O'	SIM	-	-
TOTAL POR REGIÃO	8	5	5

Pela análise das Tabelas 7, 8 e 9, constatou-se que houve grande variação de ocorrência dos endofíticos, tanto a nível de propriedade rural em uma mesma região e em épocas diferentes de coleta, como em regiões distintas.

As morfoespécies isoladas das três propriedades rurais da região média mogiana apresentaram alta especificidade local e temporal e baixa especificidade com o cafeeiro. Do total de 16 morfoespécies isoladas dos cafeeiros destas propriedades, somente os morfotipos **A**, **D** e **O** ocorreram em mais de um local e somente as morfoespécies **A**, **E** e **I** ocorreram em mais de uma época de coleta. No sítio Monte Alegre as morfoespécies **A** e **E** ocorreram nos dois períodos de coleta e a “**I**” foi isolada no Sítio São Longuinho nas duas épocas consideradas. De uma maneira geral, somente a morfoespécie **A** foi isolada em mais de uma propriedade e em épocas distintas, demonstrando assim ser a única a apresentar maior especificidade no estabelecimento de relação de endofitismo com o cafeeiro. As demais apresentaram especificidade relacionada mais ao local de coleta e época.

A análise da diversidade de ocorrência das morfoespécies, feita a partir dos dados dos isolamentos de endofíticos originários de regiões diferentes, também mostrou elevada especificidade com os locais de coleta. Observando-se os dados da Tabela 8, verificou-se que, dos 15 morfotipos encontrados, apenas a morfoespécie **D'**, identificada posteriormente como *Colletotrichum boninense*, foi isolada nas três regiões e a morfoespécie **A'** (*Trichoderma viride*), foi isolada na média mogiana e no sul de Minas.

Os resultados obtidos evidenciam que os fatores abióticos e bióticos inerentes a cada uma das propriedades rurais de uma mesma região, bem como aqueles intrínsecos às diferentes

regiões, foram mais determinantes para o estabelecimento da interação endofítico-hospedeiro do que uma relação de especificidade constante, corroborando o que é citado na literatura por Rodrigues (2010), Fernandes (2015), Moura et al. (2016).

5.2.2. ÍNDICES DE DIVERSIDADE

Os índices de diversidade utilizados neste trabalho, Riqueza, Abundância, Equitabilidade e índice de Shannon Wiener (H') foram determinados a partir dos resultados obtidos das morfoespécies (ocorrência e número de isolados) nos diferentes locais de coleta.

As Figuras 12 e 13 apresentam os dados de ocorrência e número de isolados das morfoespécies isoladas nas três propriedades rurais da região média mogiana e a Figura 14 apresenta os dados obtidos nas três regiões de coleta.

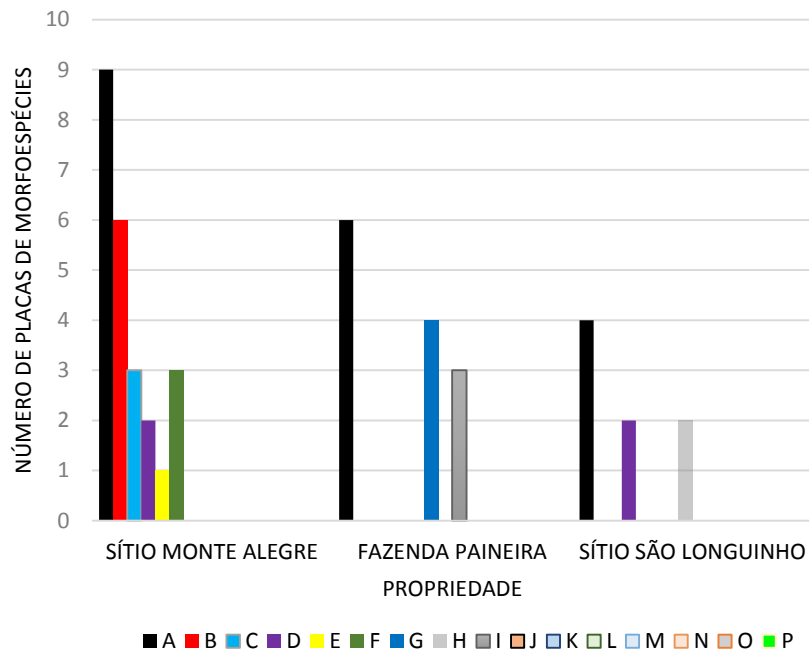


FIGURA 12. Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de três propriedades rurais da média mogiana paulista, no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018.

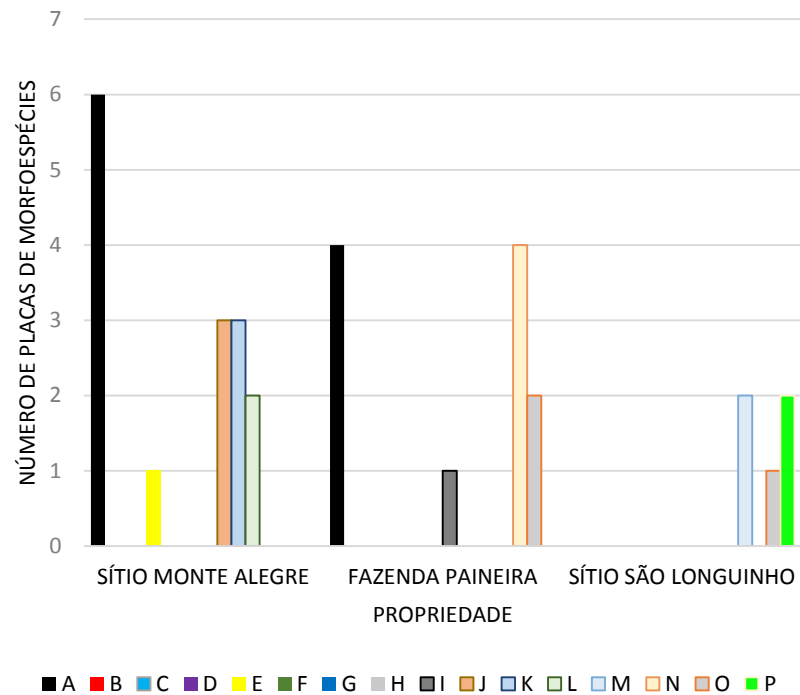


FIGURA 13. Morfoespécies de fungos endofíticos isolados de três propriedades rurais da média mogiana paulista, no período de abril a junho de 2018.

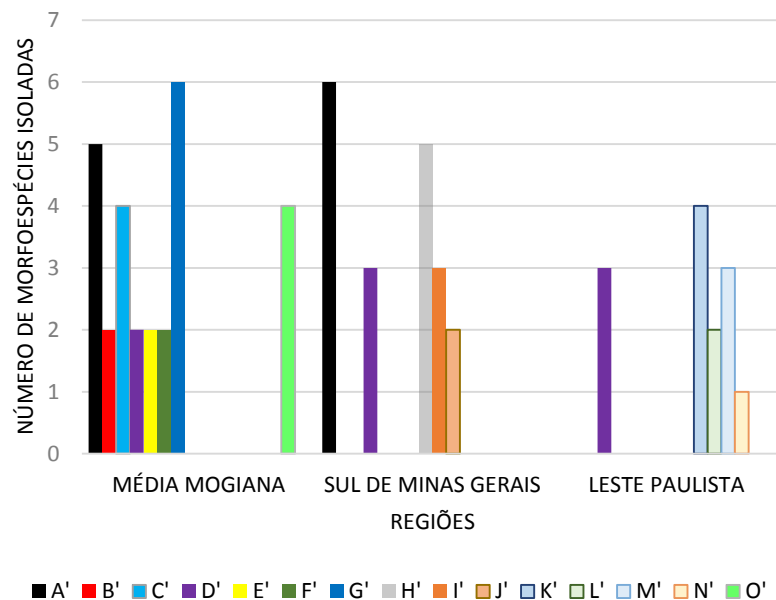


FIGURA 14. Morfoespécies de fungos endofíticos isolados das regiões média mogiana paulista, sul de Minas Gerais e leste paulista nos meses de agosto e setembro de 2018.

Verificou-se maior número de morfoespécies (Riqueza) no imóvel rural denominado sítio Monte Alegre. Nessa propriedade foram obtidos 6 diferentes morfoespécies nos isolamentos de verão, enquanto as outras propriedades resultaram em 3 cada uma (Figura 12).

Da mesma forma, considerando-se os isolamentos realizados no inverno (Figura 13), foram obtidos 5 morfotipos diferentes naquela propriedade, enquanto a fazenda Paineira gerou 4 morfoespécies e o sítio São Longuinho resultou em 3. Além de maior Riqueza, naquela propriedade foram isolados também maior número de endofíticos (Abundância), mensurados pelo número de placas onde se observou crescimento fúngico a partir do mesófilo foliar. Foram obtidas 24 placas com endofíticos no verão e 15 no inverno. A fazenda Paineira gerou 13 placas com fungos endofíticos no verão e 11 no inverno, enquanto no sítio São Longuinho foram obtidas 8 placas no verão e 5 no inverno. Os valores totais de Riqueza e Abundância de morfoespécies nas três propriedades rurais da média mogiana, em todas as épocas de coleta, bem como a Equitabilidade e o índice de diversidade Shannon Wiener são apresentados na Tabela 9.

TABELA 9. Riqueza de morfoespécies, Abundância de isolados, Equitabilidade e índice de Shannon Wiener (H') de fungos endofíticos de três propriedades rurais da região média mogiana paulista.

Propriedade rural da média mogiana	Riqueza	Abundância	Equitabilidade	Índice de Diversidade Shannon Wiener (H')
Sítio M. Alegre	9	39	0,82	1,82
S. S. Longuinho	5	24	0,88	1,42
Faz. Paineira	6	13	0,61	1,10
TOTAL	16	76	---	---

Pelos resultados da Tabela 9 verificou-se que Riqueza, Abundância e índice de diversidade de Shannon Wiener foram superiores no Sítio Monte Alegre, comparativamente às demais propriedades estudadas na região da média mogiana. Naquele local ocorreram 9 das 16 morfoespécies isoladas e 39 de um total de 76 isolados (51 %). A equitabilidade também se aproximou de 1, indicando que a maior parte das morfoespécies ocorreu em proporção equilibrada. O sistema de manejo adotado pode ter sido o responsável pela maior diversidade, a despeito de outros fatores como tipo de solo, clima, altitude e relevo serem semelhantes às outras propriedades da região mogiana. Naquela propriedade, o manejo da cultura é feito sem o emprego de produtos químicos para o controle fitossanitário, sendo utilizados somente fertilizantes minerais (N-P-K), em associação com adubos orgânicos. Tal manejo vem sendo adotado, segundo o proprietário, há mais de 30 anos. Pode colaborar ainda para um maior número e diversidade de endofíticos, o fato dos cafeeiros daquela propriedade serem antigos,

com idade superior a 40 anos, o que confirma afirmação de Fernandes (2015), para quem a idade da planta hospedeira interfere no estabelecimento da relação de endofitismo.

Com relação a diversidade de ocorrência dos endofíticos nas três regiões estudadas foram apurados os seguintes resultados, apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Riqueza de morfoespécies, Abundância de isolados, Equitabilidade e índice de Shannon Wiener (H') de fungos endofíticos isolados de três regiões cafeeiras.

Região	Riqueza	Abundância	Equitabilidade	Índice de Diversidade Shannon Wiener (H')
Média mogiana	8	27	0,94	1,96
Sul de Minas Gerais	5	19	0,95	1,53
Leste paulista	5	13	0,95	1,53
TOTAL	15	59	---	---

Quando se considerou os isolamentos realizados nas três regiões diferentes, a região da média mogiana (representada pelo sítio Monte Alegre, em Águas de Lindóia), resultou em maior Riqueza de morfoespécies (8 no total) e Abundância (27 isolamentos). Os isolamentos realizados no sul de Minas (Fazenda Recreio, Poços de Caldas) e leste paulista (Instituto Biológico, em Campinas), resultaram em igual Riqueza (5 morfoespécies em cada local), embora a Abundância de espécies tenha sido superior na propriedade localizada no sul de Minas Gerais. A equitabilidade foi semelhante nas três regiões e se aproximou da unidade, indicando que o número de isolados de cada morfoespécie encontrada para cada região não sofreu grandes variações, ou ainda, ocorreu de forma que poucas morfoespécies tiveram ocorrência rara.

Analisando-se comparativamente os dados do índice de diversidade de Shannon Wiener das três regiões estudadas, verificou-se superioridade da região média mogiana em relação às demais. Ressalta-se que tal região foi representada pela propriedade rural denominada sítio Monte Alegre e os fatores locais relacionados ao manejo, principalmente o não emprego de agrotóxicos e o longo tempo de implantação do cafeeiros, podem ter influenciado positivamente na expressão de maior diversidade em relação aos outros locais.

Considerando-se os resultados de diversidade baseados nos diferentes índices empregados, observou-se que esta ocorre de forma variável, tanto a nível intra-regional como inter-regional, o que indica uma dependência das condições intrínsecas de cada local para que ocorra em maior ou menor expressão.

5.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO DOS ISOLADOS

A Tabela 11 apresenta os resultados de identificação molecular dos fungos endofíticos utilizados nos ensaios de entomopatogenicidade, a correlação com os diferentes tratamentos e os locais de origem dos isolados. A Figura 15 apresenta os isolados identificados a nível molecular e que foram utilizados nos ensaios de entomopatogenicidade.

TABELA 11. Constituição dos diferentes tratamentos de avaliação do potencial entomopatogênico sobre a broca do café e origem do endofítico utilizado.

TRATAMENTOS	FUNGO ENDOFÍTICO UTILIZADO	ORIGEM DO ISOLADO
T1	<i>Trichoderma viride</i>	Sítio Monte Alegre
T2	<i>Colletotrichum boninense</i>	Sítio Monte Alegre
T3	<i>Meyerozima caribbica</i>	Sítio Monte Alegre
T4	<i>Purpureocillium</i> sp.	Fazenda Recreio
T5	<i>Xylaria</i> sp.	Fazenda Recreio
T6	<i>Entonaema</i> sp.	Fazenda Recreio
T7	<i>Phomopsis</i> sp.	Instituto Biológico
T8	<i>Cercospora</i> sp.	Instituto Biológico
T9	<i>Epicocum</i> sp.	Instituto Biológico
CONTROLE	---	---

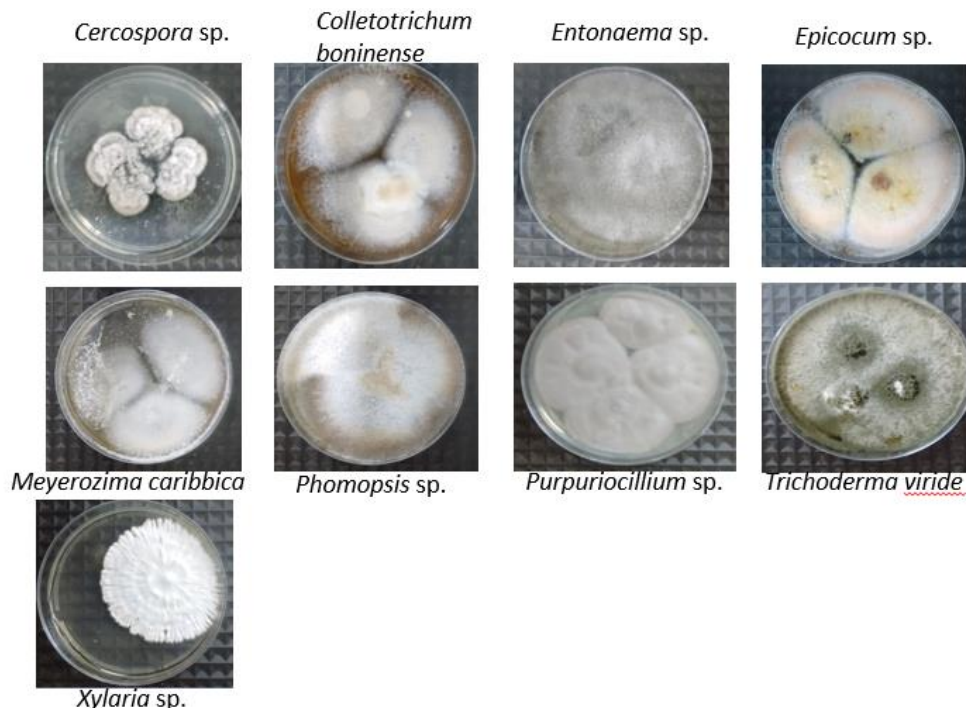


FIGURA 15. Espécies de fungos endofíticos utilizados nos ensaios de entomopatogenicidade.

Ao se analisar os dados constantes da Tabela 12 e Figura 16, verificou-se que nos tratamentos T1 e T5 ocorreram os maiores números médios de brocas mortas (mortalidade total-MT), obtendo-se percentuais de mortalidade de 30 % (T1) e 35 % (T2), inclusive diferindo estatisticamente do controle. No entanto, quando se realizou a incubação em câmara úmida dos

insetos mortos e observação do crescimento fúngico, em nenhum dos tratamentos houve a confirmação de que a morte tenha ocorrido em função da ação do fungo endofítico aplicado. Nas incubações em que se observou crescimento fúngico sobre o corpo do inseto morto ocorreram colonizações com fungos necrotróficos oportunistas e *B. bassiana*, neste caso também oportunista, já que nenhum dos tratamentos utilizou este entomopatogênico.

De qualquer forma, o percentual mais elevado de mortalidade verificado nos tratamentos T1 e T5 sugeriram a ocorrência de algum fenômeno relacionado a estes tratamentos, excluindo-se entretanto a possibilidade desta mortalidade ter ocorrido em função de estresses sofridos pelos insetos, uma vez que no controle houve baixa mortalidade. As evidências puderam ser melhor exploradas quando se utilizou a concentração de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} .

TABELA 12. Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de 1×10^8 conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	MÉDIA DE BROCAS MORTAS/repetição	% de mortalidade (mt)
T1	1,50 a2	30
T2	0,25 a1	5
T3	0,25 a1	5
T4	0,75 a1a2	15
T5	1,75 a2	35
T6	0,00 a1	---
T7	0,75 a1a2	15
T8	0,00 a1	---
T9	0,75 a1a2	15
CONTROLE	0,25 a1	5

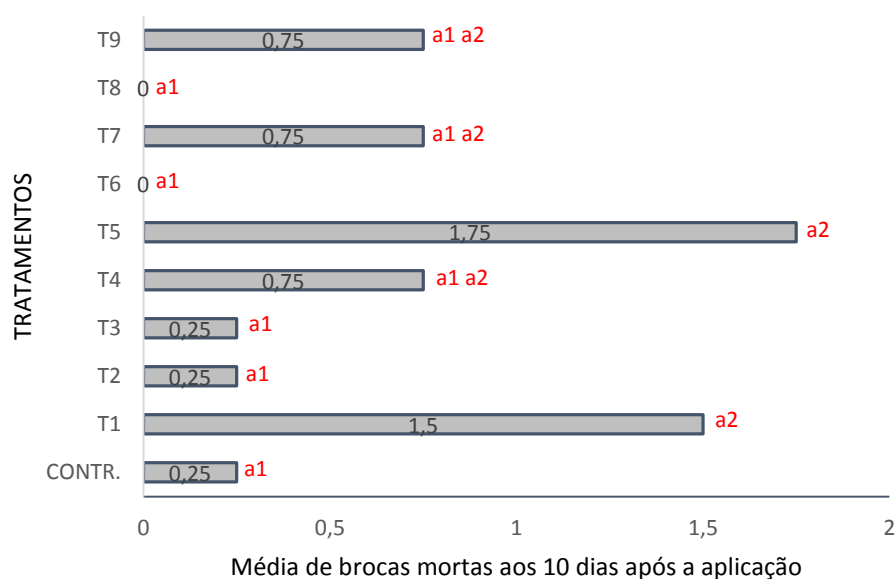


FIGURA 16. Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de 1×10^8 conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.

A utilização de suspensões com concentrações de 1×10^8 conídios ml^{-1} em ensaios laboratoriais de entomopatogenicidade constitui padrão em termos de pesquisas. Todavia, nas condições de campo, visando atingir o alvo biológico, no caso a praga, com um concentração o mais elevada possível, são utilizadas concentrações da ordem de 10^{11} a 10^{13} . Tal constatação motivou a utilização, mesmo em condições de ensaio “in vitro”, de concentração superior à padrão, da ordem de $2,5 \times 10^8$ conídios ml^{-1} . Os resultados do ensaio de entomopatogenicidade dos fungos endofíticos testados sobre a broca do café, nesta concentração, são apresentados na Tabela 13 e Figura 17.

TABELA 13. Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.

TRATAMENTOS	MÉDIA DE BROCAS MORTAS/repetição	% de mortalidade (MT)
T1	1,25 a2	25
T2	0,25 a2	5
T3	1,00 a2	20
T4	0,50 a1a2	10
T5	3,50 a1a2	70
T6	1,75 a1	35
T7	0,50 a2	10
T8	0,00 a1	---
T9	0,25 a1a2	5
CONTROLE	0,00 a1	---

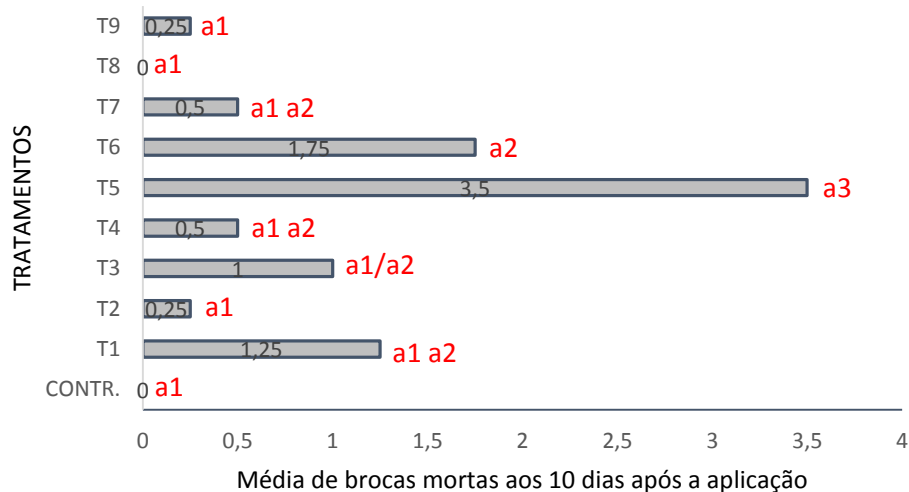


FIGURA 17. Número médio de brocas mortas/repetição, aos 10 dias após a aplicação de suspensão de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} , em função dos diferentes tratamentos.

A análise dos dados apresentados na Tabela 13 e Figura 17 permitiram constatar que os tratamentos T1, T5 e T6 foram superiores aos demais, inclusive corroborando os resultados alcançados na concentração menor, para os tratamentos T1 e T5.

O tratamento T5, que utilizou suspensão contendo o fungo *Xylaria* sp. diferiu estatisticamente dos demais, tendo alcançado percentuais de mortalidade de 70 % (mortalidade total-MT), comparáveis aos produtos químicos de uso atualmente no mercado para o controle da broca do café. Durante as avaliações diárias que se sucederam à aplicação dos fungos, percebeu-se redução da motilidade das brocas a partir do 2º dia. Verificou-se ainda que as mortes das brocas ocorreram entre o 3º e 5º dia, sendo que a partir daí os insetos remanescentes sobreviveram até o final do ensaio, ocorrido no 10º dia após a aplicação.

Cabe ressaltar que a incubação das brocas mortas não resultou na colonização do corpo dos insetos por *Xylaria* sp., o que confirmaria o controle biológico por esse efeito (mortalidade confirmada-MC). Assim, supõe-se que outro princípio de controle promovido pelo endofítico em questão esteja relacionado à redução da motilidade e conseqüente morte das brocas no experimento.

Em experimentos realizados por Cafêu et al. (2005), Cafêu (2007) e Specian et al. (2014), com fungos do gênero *Xylaria*, foram isolados os metabólitos secundários citocalasinas A e B, que apresentaram efeito de inibição da enzima acetilcolinesterase. Ressalta-se que a inibição desta enzima constitui um dos principais modos de ação empregados atualmente nos inseticidas neurotóxicos, ou seja, aqueles que interferem na transmissão dos impulsos nervosos.

Assim, no ensaio de patogenicidade utilizando o endofítico *Xylaria* sp. pode ter ocorrido a produção daqueles metabólitos secundários, o que explicaria a maior mortalidade de brocas promovida por este tratamento, sendo intensificada ao se utilizar a concentração maior. Como o modo de ação daquele metabólito afeta os impulsos nervosos, esta inibição poderia estar envolvida na menor motilidade apresentada pelas brocas a partir do 2º dia da aplicação. Entretanto, ressalta-se que não foram realizadas análises de identificação de metabólitos secundários, de modo que outras substâncias também podem ter ocasionado os efeitos observados.

Os tratamentos T1 e T6, na concentração maior de conídios, também se destacaram em relação aos demais (mortalidade total-MT), embora de forma menos acentuada do que o tratamento T5. Estatisticamente, o tratamento T6 diferiu do controle.

Para a confirmação do efeito entomopatogênico sobre a broca do café (mortalidade confirmada-MC), foi feita a incubação dos insetos mortos em BOD, retirados diariamente das placas de ensaio. Dentre todos os tratamentos, apenas o T1, T3 e T6 apresentaram brocas

colonizadas pelo fungo endofítico respectivo (Tabela 14 e Figura 18), embora a correspondência entre broca colonizada e broca morta tenha sido de 80 % para o T1, 50 % para o T3 e 43 % para o T6, obtidos pela comparação entre os dados da Tabela 14 com os da Tabela 13.

Mesmo que os resultados “in vitro” para os tratamentos T1, T3 e T6, representados respectivamente pelos fungos endofíticos *Trichoderma viride*, *Meyerozima caribbica* e *Entonaema* sp., tenham demonstrado a capacidade destes em colonizar a broca do café, deve-se ressaltar que, na duas concentrações de conídios utilizadas, os percentuais de mortalidade não ultrapassaram 35 % (T6 na concentração de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1}), ficando inclusive aquém dos valores citados na literatura, obtidos pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*. A Figura 19 apresenta as colonizações ocorridas sobre a broca do café.

TABELA 14. Número médio de brocas colonizadas/repetição, aos 5 dias após incubação em BOD, em função dos diferentes tratamentos, na concentração de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} .

TRATAMENTOS	MÉDIA DE BROCAS COLONIZADAS /repetição (mc)
T1	1,00 a1
T2	0,00 a1
T3	0,50 a1
T4	0,00 a1
T5	0,00 a1
T6	0,75 a1
T7	0,00 a1
T8	0,00 a1
T9	0,05 a1
CONTROLE	0,00 a1

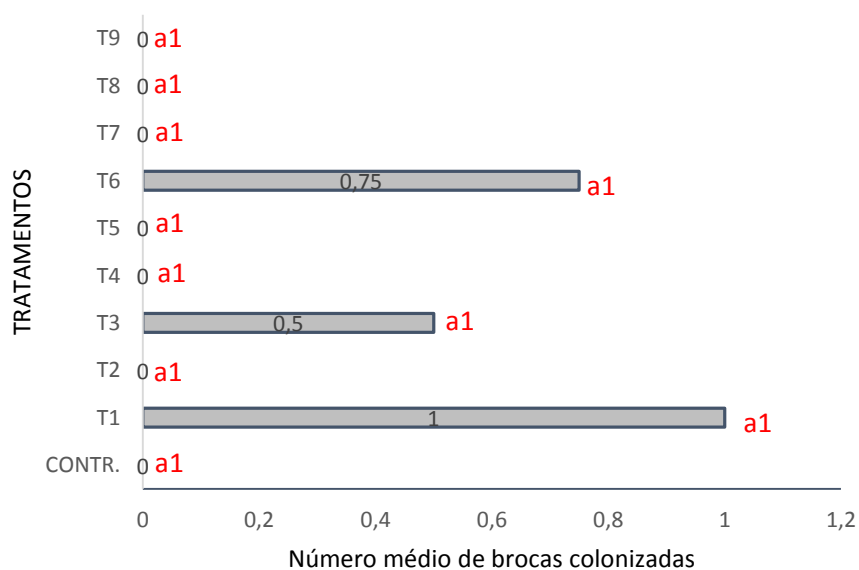


FIGURA 18. Número médio de brocas colonizadas, aos 5 dias após incubação em BOD, em função dos diferentes tratamentos.

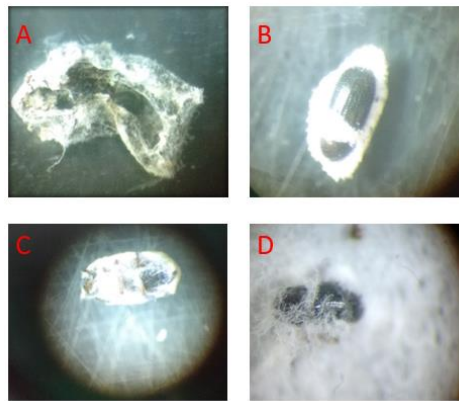


FIGURA 19. Placas contendo os fungos *Trichoderma viride* (A), *Beaveria bassiana* oportunista (B), *Entonaema* sp.(C) e *Meyerozima caribbica* (D), colonizando o corpo de brocas do café, após a incubação.

6.CONCLUSÕES

A diversidade de ocorrência dos fungos isolados mostrou baixa especificidade entre endofítico-hospedeiro, variando de acordo com o local e época do isolamento.

A diversidade de ocorrência, avaliada através dos índices de diversidade utilizados, foi variável entre as áreas e regiões estudadas, sendo que o sítio Monte Alegre foi a propriedade onde obteve-se a maior Riqueza de morfoespécies e Abundância de isolados na região da média mogiana paulista e essa região apresentou índices de diversidade superiores às demais.

Os tratamentos T1, T3 e T6, representados respectivamente pelos fungos endofíticos *Trichoderma viride*, *Meyerozima caribbica* e *Entonaema* sp., demonstraram capacidade de colonizar a broca do café na concentração de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} , porém apresentaram percentuais de mortalidade (MT) que não ultrapassaram 35 %.

O tratamento T5, que utilizou suspensão contendo o fungo *Xylaria* sp., promoveu mortalidade total (MT) em percentuais de 70 % na concentração de $2,50 \times 10^8$ conídios ml^{-1} e, embora não tenha sido capaz de colonizar o corpo do inseto, causou rápida redução de motilidade das brocas e mortalidade, entre o 3º e 5º dia do experimento, na concentração maior de conídios.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.2018. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 25 nov. 2018.

ALMEIDA, J. E. M. de.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A. S. Controle da Cigarrinha da Raiz da Cana-de-Açúcar, *Mahanarva Fimbriolata*, com o fungo entomopatogênico *Metarhizium Anisopliae*. **Rev. STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 22, n. 4, p. 42-45, 2004.

ALVES, M. C. et al. Vulnerabilidade climática à broca do café no Brasil, em função da temperatura do ar. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 16., 2009, Belo Horizonte. **Resumo expandido**. Belo Horizonte: SBA, 2002, 5 p.

AMARAL, L. P. et al. Variabilidade espacial do índice de diversidade de Shannon-Wiener em Floresta Ombrófila Mista . **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 41, n. 97, p. 83-93, 2013.

ANTÍA LONDOÑO, O. P. et al. **Produccion en finca del hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café**. Chinchiná: Cenicafé, 1992. 12p. (Avances tecnicos, 182). Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/Alex_Bustillo/publication/233957052_Produccion_en_finca_del_hongo_Beauveria_bassiana_para_el_control_de_la_broca_del_cafe/links/55134cb90cf23203199bb665/Produccion-en-finca-del-hongo-Beauveria-bassiana-para-el-control-de-la-broca-del-cafe.pdf> Acesso em: 16 mai. 2018.

ARAÚJO, W. L. et al. **Manual de Isolamento de microrganismos endofíticos**. Esalq, Piracicaba, 2002, 86 p.

ARNOLD, A. E., LUTZONI. F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, 2007, p.541-549. Disponível em:

<https://nature.berkeley.edu/garbelotto/downloads/espm107/Arnold_Lutzoni_Ecology_2007.pdf>. Acesso em: 25 set. 2018.

AZEVEDO, J.; L. Microrganismos endofíticos. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 1998. 21p. Disponível em:

<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismosendofiticos_000fdrap80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf>. Acesso em 10 mai. 2018.

BARBOSA, E. C. **Isolamento de microrganismos endofíticos de malva do campo e avaliação do seu potencial enzimático e antimicrobiano**. 2005. 84 f. Dissertação (mestrado em Biologia) – Programa de Pós Graduação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.

BARRERA, J. F. et al. Trampas de Metanol – Etanol para Detección, Monitoreo y Control de la Broca del Café. In: Simposio sobre Trampas y Atrayentes em Deteccion, Monitoreo y Control de Plagas de Importância Econômica, 2006, Colina, México. **Anais**. Colina, México: Sociedade Mexicana de entomologia y el Colegio de la Frontera sur Manzanillo, 2006, p. 71-83.

Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/237360341_TRAMPAS_DE_METANOL-ETANOL_PARA_DETECCION_MONITOREO_Y_CONTROL_DE_LA_BROCA_DEL_CAFE_HYPOTHENEMUS_HAMPEI_Methanoethanol_traps_for_detection_monitoring_and_control_of_the_coffee_berry_borer_Hypothenemus>. Acesso em 12 mai. 2018.

BENASSI, V. L. M. Aspectos Biológicos da Broca do Café, *Hypothenemus hampei* (FERRARI, 1867) (COLEOPTERA:SCOLYTIDAE) em *coffea canephora*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. **Anais**. Brasília: Embrapa Café, 2001, p. 1181-1184.

BENASSI, V. L. M. Parasitóides da broca-do-café no Brasil: histórico e perspectivas. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DA BROCA DO CAFÉ. 2004, Londrina. **Anais**. Londrina: IAPAR, 2007. p. 193 - 198.

Disponível em <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/workshop_anais.pdf> Acesso em: 12 set. 2018.

BIANCO, R. Monitoramento da Broca do Café: Viabilidade Técnica e Econômica do Uso da Tabela de Amostragem do IAPAR. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais**. Brasília: Embrapa Café, 2002, p. 1993-1998.

BUENO, J.; TANIWAK, M. H. Comparação da Incidência de fungos Ocratoxigênicos e Ocratoxina A em Café com Broca e sem Broca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2017, p. 110-111.

BUSTILLO, P. A. et al. **Manejo Integrado de la Broca del café *Hypothenemus hampei* em Colombia**. 1. ed. Caldas: Cenicafe – Centro Nacional de Investigaciones del Café, 1998. 134 p.

CAFÊU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, Araraquara, v. 28, n. 6, p. 991-995. 2005.

CAFÊU, M. C. **Estudo Químico e Avaliação Biológica dos Fungos Endolíticos, *Xylaria* sp. e *Colletotrichum Crassipes* Isolados de *Casearia Sylvestris* (Flacourtiaceae)**. 2007. 255 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação do Instituto Química, Unesp, Araraquara, 2007.

CANO, W. Da década de 1920 à de 1930: Transição rumo à crise e à industrialização no Brasil. **Revista Economia**, Brasília, v. 13, n. 3b, p. 897-916, 2012.

CAPATO, S. B. et al. **Avaliação da Eficácia de Etiprole e Etiprole + Imidacloprido no Controle da Broca do Café**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2017, p. 90-91.

CARVALHO, C. H. S. de. et al. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. 1. ed. Brasília: Embrapa Café, 2008. 334 p.

CARVALHO, J. P. F.; SOUZA, J. C. **Manual de Prevenção e Combate a Broca-do-Café**. Patrocínio: Fundacer, 2018. 13 p. Disponível em: http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/manual-combate-a-broca.pdf. Acesso em 17 out. 2018.

CARVALHO, S. B. G.; PEREIRA, M. Fungos endofíticos em raízes de *Prosthechea pachycephala* (Orchidaceae) da Serra do Cipo – MG. **Natureza online**, Santa Tereza-ES, 9 p. 2016. Disponível em:

<<http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/NOL20160305%20-%20c%C3%B3pia%20corrigida%20autor.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2018.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. **Fungos associados a Frutos e Grãos do Café: *Aspergillus* e *Penicillium***. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 69 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café – safra 2018**. V.5, n. 4, Brasília, 2018. 84 p. Disponível em:

<[file:///C:/Users/User/Downloads/BoletimZCafeZdezembroZ2018_1%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/BoletimZCafeZdezembroZ2018_1%20(2).pdf)> Acesso em: 10 fev. 2019.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL - CECAFÉ. **Resumo das exportações de café: relatório mensal - dez. 2018**. São Paulo, 2018. 22 p. Disponível em:

<http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_estatistico/CECAFE_Relatorio_Mensal_Dezembro_2018.pdf> Acesso em: 10 fev. 2019.

CONSTATINO, L. M. et al. Aspectos Biológicos, Morfológicos y Genéticos de *Hypothenemus Obscurus* e *Hypothenemus hampei* (Coleoptera:Curculionidae:Scolytinae). **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá-Colômbia, v. 37, n. 2, p. 173-182. 2011. Disponível em:

<<http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v37n2/v37n2a02.pdf>>. Acesso em 25 out. 2018.

CURE, J. R.; SANTOS, R. H. S.; MORAES, J. C. Fenologia e dinâmica populacional da broca do café relacionadas a fase de desenvolvimento do fruto. **Anuário da sociedade entomológica do Brasil**, Santo Antônio de Goiás-GO, v.27, n.3, p. 325-335, 1998. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/aseb/v27n3/v27n3a02.pdf>>. Acesso em 25 out. 2018.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of entomological research**, Tapachula-México, n. 90, p. 453-465, 2000. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/12221364_A_review_of_the_biology_and_control_of_the_coffee_berry_borer_Hypothenemus_hampeii_Coleoptera_Scolytidae/download>.

Acesso em 25 out. 2018.

FERREIRA, D. A. O.; FERREIRA, E. R.; MAIA, A. C. **Estudo Agrários: a complexidade do rural contemporâneo**. São Paulo: Cultura Academia, 2011, 339 p.

FANTON, C. J. **Ecologia da broca do café *Hypothenemus hampei* (FERRARI, 1867) (COLEOPTERA:SCOLYTIDAE) na Zona da Mata de Minas Gerais**. 2001. 58 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001. Disponível em:

<<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/10901/texto%20completo.pdf?sequencia=1&isAllowed=y>> Acesso em 05 ago. 2018.

FERNANDES, E. G. **Fungos endofíticos em soja: Diversidade, biocontrole de fitopatógenos e análise de metabólitos**. 2015. 146 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/8470>> Acesso em 15 set. 2018.

FERNANDES, F. L. et al. Capacidade de captura da broca do café em função das concentrações de cairomônio em armadilha atrativa. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória. **Resumos**. Brasília: Embrapa Café, 2011, (CD-ROM), 4p.

FERREIRA, A. J. et al. Bioecologia da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae), no agroecossistema cafeeiro do cerrado de Minas Gerais. **Ciênc. Agrotéc.**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 422-431, 2003.

FONTENELLE, A. D. B. **Promoção de crescimento e indução de resistência em tomateiro a *Xanthomonas vesicatoria* e *Alternaria solani* por *Trichoderma* spp**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado – Sanidade Vegetal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio)- Instituto Biológico, São Paulo, 2011. Disponível em:

< http://www.biologico.sp.gov.br/pos_graduacao/teses_dissertacao.php>. Acesso em: 15 dez. 2016.

JUNIOR, J. A. S. et al. Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para controle biológico de *Botrytis cinérea* em *Eucalyptus bentamii*. **Revista Floresta**, Curitiba, v. 43, n. 1, p. 145-152, 2013. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/floresta/article/view/26265>> Acesso em: 03 mai. 2018.

LAURENTINO, E.; COSTA, J. N. M. **Descrição e Caracterização Biológica da Broca do Café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia**. Porto Velho: Embrapa, 2004. 21p. (Documentos, 90).

LEITE, A. D. B. **Diversidade de fungos endofíticos de folhas de soja (*Glycine max*) cultivada em Viçosa-MG**. 2010. 63 f. Dissertação (Mestrado – Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/5329>>. Acesso em: 15 mai. 2018.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos do cacau**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Piracicaba, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-06042006-172002/pt-br.php>> Acesso em: 24 set. 2018.

MATIELLO, J. B. et al. (Ed.). **Cultura do café no Brasil: manual de recomendações**. 1. ed. São Paulo: Futurama, 2015. 585 p.

MATIELLO, J. B.; CARVALHO, M. L. Correlação entre níveis Baixos de Infestação de Broca do Café com Perda de Peso dos Grãos, na Zona da Mata – MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2017, p. 41-42.

MATTIELLO, A. L.; MENDONÇA, P. L. P. Avaliação do controle da broca do cafeeiro com o novo ativo Meta Flumizone. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2017, p.14-15.

MENDES, L. O. T. Determinação do Potencial Biótico da Broca do Café, e considerações sobre o crescimento de sua população. **Bragantia**, Campinas, v. 9, p. 203 – 214, 1949.

MENDONÇA, P. L. P. Avaliação do Manejo e Controle da Broca do Cafeeiro efetuado pelos Produtores Brasileiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2017, p.12-13.

MONTEIRO, M. C. P. **Fungos endofíticos de cafeeiro produtores de compostos orgânicos voláteis e enzimas extracelulares**. 2016. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia agrícola) – UFLA, Lavras, 2016. Disponível em:

<http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/12141/2/TESE_Fungos%20endof%C3%ADticos%20de%20cafeeiro%20produtores%20de%20compostos%20org%C3%A2nicos%20vol%C3%A1teis%20e%20enzimas%20extracelulares.pdf> Acesso em: 25 set. 2018.

MORA, M. A. E.; CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E. Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade. **Revista Brasileira de Produtos Agroindústrias**, Campina Grande, V.18, n. 3, p. 335-349, 2016. Disponível em:

<<http://www.bibliotekevirtual.org/revistas/RBPA/v18n03/v18n03a12.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2018.

MOTOYAMA, S. **Preludio para uma história: ciência e tecnologia no Brasil**. São Paulo: Edusp, 2004. 520 p.

MOURA, L. F. W. G. et al. Isolamento e identificação de fungos associados às plantas medicinais nativas da Caatinga, das regiões dos Inhamus, Tauá, Ceará, Brasil. **Essentia**, Sobral, v.17, n.2, p. 43-63, 2016. Disponível em: <<file:///C:/Users/User/Downloads/78-330-1-PB.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2018.

NEVES, P. M. O. J. Utilização de *Beauveria Bassiana* no Manejo da Broca do Café no Brasil. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DA BROCA DO CAFÉ. 2004, Londrina. **Anais**. Londrina: IAPAR, 2007. p. 233-248.

Disponível em <http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/workshop_anais.pdf> Acesso em: 12 set. 2018.

OBEIDI, B. M. et al. Edmundo Navarro de Andrade e a eucaliptocultura no Brasil. **Páginas do Instituto Biológico**, São Paulo, V.12, n. 1, p. 1 - 6, 2016.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ - OIC. **Relatório sobre o mercado de café-dez. 2018**. Londres, 2018. 8 p. Disponível em:

<http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_dezembro_2018.pdf> Acesso em: 10 fev. 2019.

PARRA, J. R. P.; REIS, P. R. Manejo Integrado para as principais Pragas da Cafeicultura do Brasil. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 12, p. 47-50, 2013.

PICANÇO, M. C. **Manejo integrado de pragas em culturas perenes e café: guia de estudos**. Viçosa: Agropós/Clonar, 2017. 185 p.

RAINHO, H. L. **Resposta comportamental da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae), a voláteis de frutos de café**. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós Graduação, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2015. Disponível em:

<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/135939/000858012.pdf?sequence=1>>.

Acesso em: 26 out. 2018.

REBOUÇAS, M. M. et al. O Instituto Biológico e seu acervo documental. **Caderno de História da Ciência – Instituto Butantan**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 95-122, 2009.

REIS, P. R. Avanços no controle da broca do café. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 27, n. 211 p. 42-44, 2016.

ROCHA, A. C. S. **Antagonismo *in vitro* de fungos endofíticos, isolados de *Hevea brasiliensis*, contra o *Microcyclus ulei* (fungo causador do mal-das-folhas na seringueira)**. 2007. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007. Disponível em:

<http://www2.uefs.br/ppgbiotec/portugues/arquivos/corpo%20discente/mestrado/2005/anderson_carlos_silva_rocha-dissertacao.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2018.

RODRIGUES, A. A.; CANCEGLIERI, R. C.; PREZOTTI, L. Eficiência de armadilhas de garrafa PET com diferentes atrativos no monitoramento da broca do café, *Hypothenemus hampei*, na cultura do café conilon. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS

CAFEEIRAS, 42., 2016, Serra Negra. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2016, p. 432.

RODRIGUES, R. L. **Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* presente em afloramentos rochosos nos Estados de Minas Gerais e Tocantins**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. Disponível em:

<http://gesto.to.gov.br/site_media/upload/gestao/documentos/Rodrigues_Fungos_endofiticos_associados_a_Vellozia_compacta_presente_em_afloramentos_rochosos_nos_estados_de_Minhas_Gerais_e_TO.pdf> Acesso em: 16 set. 2018.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

SANTINATO, R. et al. *Beauveria Bassiana* Koopert Aplicada em Lavoura de Café na ausência de fungicidas para Controle da Broca do Café nas Condições do Sul de Minas e Cerrado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2017, p. 125-126.

SANTOS, J. C. F.; GARCIA, A.; ALVES, P. M. P. **Monitoramento e níveis de controle das principais pragas e doenças do cafeeiro em Rondônia**. Porto Velho: EMBRAPA, 1995. 19 p. (Circular Técnica, 23).

SILVA, A. F. C. Ciência nos cafezais: a campanha contra a broca do café em São Paulo (1924 – 1927). **Revista História, Ciências, Saúde: Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 957-993, 2006.

SILVA, R. A. et al. Influência do clima na flutuação populacional da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae), no Sul de Minas. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 8., 2013, Salvador. **Resumo expandido**. Brasília: Embrapa Café, 2013, 4 p. Disponível em:

<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/3789/148_VIII-SPCB-2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10 jun. 2018.

SILVA, F. C.; MORALES, L. O Papel das armadilhas com semioquímicas no manejo da broca do café. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p. 399-405, 2006. Disponível em: <<file:///C:/Users/User/Downloads/2457-8072-1-PB.pdf>> Acesso em: 15 mai. 2018.

SANTOS, H. G. et al. (Ed.). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353 p.

SOETHE, P.A. et al. (Org.). **A expansão do cultivo de café como fator de conformação da paisagem e da estrutura social agrária do norte do Paraná**. Maringá: Eduem, 2014. p. 81-117. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/yvqhq/pdf/kohlhepp-9788576286554-07.pdf>>. Acesso em: 09 out. 2018.

SOUZA, I. F. A. C. et al. Importância biotecnológica dos microrganismos endofíticos: uma revisão da literatura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, 2., 2017, Campina Grande. **Anais**. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 2017, 12p. Disponível em: <http://editorarealize.com.br/revistas/conbracis/trabalhos/TRABALHO_EV071_MD1_SA11_ID1140_01052017182356.pdf> Acesso em 15 jun. 2018.

SOUZA, J. C. et al. **Cafeicultor: saiba como monitorar e controlar a broca do café com eficiência**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2015. 5 p. (Circular Técnica, 205).

SOUZA, J. C. et al. Controle Químico da Broca do Café com Cyantraniliprole. **Coffee Science**, Lavras, v.8, n. 4, p. 404-410, 2013. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/7994/Coffee%20Science_v8_n4_p4_04-410_2013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 14 out. 2018.

SOUZA, J. C. et al. Resultado da eficiência de inseticidas no controle da broca do café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: scolytidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 43., 2017, Poços de Caldas. **Anais**. Varginha: Fundação Procafé, 2017, p. 445.

SPECIAN, V. et al. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endolíticos. **Unopar Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 16, n. 4, p. 345-

351, 2014. Disponível em: <<file:///C:/Users/User/Downloads/393-1501-1-PB.pdf>>. Acesso em 10 nov. 2018.

VALICENTE, F. H. Controle Biológico de Pragas com Entomopatógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, V.30, n. 251, p. 48-55, 2009.

VEGA, F. E.; MERCADIER, G.; DOWD, P. Fungi associated with the coffee berry borer. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM OF COFFEE, 18., 1999, Helsinki. **Proceedings**. Lausanne: ASIC, 1999, p. 229-238. Disponível em: <<https://naldc.nal.usda.gov/download/38748/PDF>>. Acesso em: 20 set. 2018.

VIEIRA, R. S. **Aplicação de rizobacterias e bactérias endofíticas para promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira**. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal do Recôncavo Baiano, Cruz das Almas, 2012. Disponível em: <<https://www.ufrb.edu.br/pgmicrobiologia/dissertacoes/category/6-2012?download=47:rosiane-silva-vieira-2012>> Acesso em: 25 set. 2018.

VILLACORTA, A. et al. Um Modelo de Armadilha com semioquímicos para o Manejo Integrado da Broca do Café no Paraná. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais**. Brasília: Embrapa Café, 2002, p. 2093-2098.