

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) VIRULENTOS À BROCA-DO-CAFÉ *Hypothenemus hampei* (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

NEVES, P. M. O. J.¹ & HIROSE, E.²

¹ Dep. de Agr., Univ. Est. de Londrina, C. P. 6001 86051-990 – Londrina, PR. <pmojneve@uel.br>; Fone:(43) 371-4555/ Fax: 371-4697; ² Univ. Fed. do Paraná C.P. 19020 CEP.81001-990, Curitiba, PR. <hirose@onda.com.br>.

RESUMO: Com o objetivo de selecionar isolados de *Beauveria bassiana* para o controle da broca-do-café *Hypothenemus hampei*, foram testados 61 isolados, originários de diversos hospedeiros e regiões geográficas. A seleção foi realizada em duas fases: na primeira foram selecionados 11 isolados com mortalidade confirmada acima de 60%; e, na segunda, determinaram-se para os 11 isolados pré-selecionados: CL₅₀, taxa de esporulação (mortalidade confirmada/mortalidade total) e produção de conídios nos cadáveres de *H. hampei*. O isolado CG425 apresentou maior mortalidade total corrigida e confirmada, maior taxa de esporulação e CL₅₀= 2,53 x 10⁶ conídios/ml, e o isolado CB102 apresentou maior produção de conídios sobre os cadáveres, 11,6 x 10⁶ conídios/adulto, em média.

Palavras-chave: cafeeiro, *Metarhizium anisopliae*, fungos entomopatogênicos, controle biológico.

SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana* (DEUTEROMYCOTINA: HYPHOMYCETES) VIRULENTOS À BROCA-DO-CAFÉ *Hypothenemus hampei* (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE)

ABSTRACT: With the objective of selecting *Beauveria bassiana* strains, to be used in coffee berry borer *Hypothenemus hampei* control, 61 *Beauveria bassiana* strains from different hosts and geographical regions, was tested. The selection was accomplished in two stages: first one, 11 strains were selected based on the selection of strains with confirmed mortality over 60%. In the second stage, for each of 11 pre-selected strains was assessed: LC₅₀, conidiogenesis rate (confirmed/total mortality) and conidia production in the *H. hampei* cadavers. The CG425 strain, showed the higher total, correct and confirmed mortality, higher conidiogenesis rate and LC₅₀ = 2.53 x 10⁶ conidia/ml, and the CB102 strain, showed greater spore production on cadavers, 11.6 x 10⁶ conidia/borer.

Key words: entomogenous fungi, conidiogenesis, coffee plant.

INTRODUÇÃO

Estima-se que a broca-do-café provoque danos da ordem de 500 milhões de dólares em todo o mundo. Nos últimos anos esta praga tem se constituído no principal problema entomológico em todas as regiões cafeeiras do mundo, ocasionando perdas de 10 a 80% na produção (CABWEB - internet). O controle desta praga baseia-se no uso de inseticidas, especificamente o endossulfan, mas a sua utilização intensiva e repetida induz à resistência do inseto ao produto (Brun et al. 1989). Entre os diferentes agentes naturais de controle está o fungo *Beauveria bassiana*, que foi observado em muitos países atacando a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Murphy & Moore, 1990). No Brasil, ocorre enzooticamente (baixa prevalência) em diversas regiões do País (Alves, 1998), sendo considerado o mais eficiente agente de controle microbiano para essa praga (La Rosa et al. 1997).

Estudos em laboratório e a campo indicam que esse fungo tem potencial para ser utilizado, desde que exista suficiente potencial de inóculo para induzir o processo infeccioso no campo (Fernandes et al. 1985; Bustillo et al., 1991; Jiménez-Gómez, 1992). Na Colômbia, são relatadas taxas de infecção de *B. bassiana* na broca-do-café no campo, variando de 20 a 90% (Bustillo, 1995). Vários autores têm demonstrado a capacidade infectiva de *B. bassiana* e seu potencial como agente de controle da broca-do-cafeeiro (Jiménez-Gómez, 1992; González-García et al., 1993; La Rosa et al., 1997). No entanto, para o desenvolvimento de um programa de controle microbiano, a seleção de isolados de fungos entomopatogênicos é de extrema importância e deve ser a etapa inicial. A grande variabilidade genética dos fungos deve ser explorada, para que sejam utilizados isolados mais adaptados ao inseto e, conseqüentemente, mais virulentos (Alves, 1998). Assim, este estudo teve por objetivo comparar a virulência de diferentes isolados e selecionar os melhores para controle da broca-do-café *H. hampei* a campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Os insetos utilizados foram obtidos da criação em frutos de café maduro, seguindo metodologia desenvolvida por Hirose & Neves (2001a). Com esta metodologia, 20 gaiolas permitiram a coleta de 450-500 insetos/dia, totalizando aproximadamente 11.000 brocas durante a realização dos bioensaios e dos estudos preliminares de determinação da metodologia. Os isolados utilizados foram os da coleção do Lab. de Controle Microbiano de Insetos/UEL, obtidos de diferentes instituições de ensino e pesquisa. Com o objetivo de reativar a virulência dos isolados, insetos sadios foram inoculados com os diferentes isolados

para posterior reisolamento, seguindo procedimentos utilizados no Centro Nacional de Investigaciones de Café – Colômbia (CENICAFÉ) (Vélez et al., 1997). Depois da reativação da virulência, os conídios foram repicados (inseto para meio de cultura) em SDAY e, após a esporulação, armazenados a $-4 \pm 2^\circ\text{C}$. Estes conídios, de primeira repicagem, foram novamente semeados em SDAY. Os conídios obtidos foram suspensos em água estéril + 0,02% Tween 20, e a suspensão padronizada com o auxílio de um hemacitômetro (Neubauer), em $2,5 \times 10^7$ conídios/ml. Esta concentração foi utilizada com base nos dados médios de CL_{50} obtidos por Jiménez-Gómez (1992), González-García et al. (1993) e La Rosa et al. (1997). Somente foram utilizados nos bioensaios isolados que apresentaram porcentagem de germinação superior a 90%. Os insetos coletados na criação foram soltos sobre folhas de papel branco, sendo somente coletados, para os bioensaios, os adultos que caminharam aderidos ao papel (sádios). A coleta foi realizada por leve sucção diretamente para os tubos de bioensaio, utilizando-se uma bomba de aquário invertida. Esta metodologia foi previamente selecionada, por ser a que menor estresse e mortalidade provocou durante o manuseio (Hirose & Neves, 2001b).

Forma de inoculação do fungo e manutenção do bioensaio: A suspensão-padrão ($2,5 \times 10^7$ conídios/ml) foi pulverizada (0,1 ml/tubo) diretamente sobre as brocas, dentro do tubo de vidro para dieta (8,4 cm de altura x 2,4 cm de largura) com o auxílio de um pulverizador “Pasche Size 3”, para micropintura, adaptado e ligado a uma bomba compressora (pressão de 25 lb/pol²). Os recipientes para o bioensaio foram tampados com frascos de antibiótico (10 ml), contendo água e fechados com algodão. Esta foi a vedação previamente selecionada, por não permitir a fuga dos insetos e reduzir a necessidade de manutenção diária com relação à umidade do sistema ($\text{UR} > 95\%$). Uma hora após a pulverização foi colocada uma cápsula feita de um canudo plástico de refrigerante (0,4 x 1,0 cm), recheado com pó de semente de café moído em partículas de 600 micras. A cápsula de alimento permitiu a sobrevivência dos insetos durante o período de bioensaio, além de tornar mais rápida e fácil a recuperação das brocas sem danificá-las. A cápsula se desmancha facilmente, tornando o processo de avaliação mais rápido e preciso, e 100% das brocas utilizadas nos bioensaios puderam ser recuperadas (Hirose & Neves, 2001b).

Avaliação do bioensaio: Cinco dias após a inoculação, o recipiente de bioensaio e a cápsula de alimento foram desmontados e as brocas mortas lavadas em água destilada e colocadas em câmara úmida por cinco dias, para confirmação da mortalidade pelo fungo. A seleção dos isolados foi realizada em duas fases, sendo uma inicial, testando os 61 isolados, e uma segunda fase, somente com os mais virulentos, investigando o CL_{50} , e a produção de conídios sobre os cadáveres dos insetos. Adaptações no tempo de avaliação (seis dias na primeira fase e cinco dias na segunda) e no número de insetos por recipiente de bioensaio (6 brocas/tubo e 8 brocas/tubo) foram efetivadas, com o objetivo de aumentar a pressão de

seleção sobre os isolados pré-selecionados e a precisão das avaliações. Toda a metodologia de bioensaio, como o recipiente, a metodologia de inoculação e o tempo de avaliação, foi previamente selecionada (Neves & Hirose, 2001b).

Primeira fase – Seleção inicial: Os isolados foram testados em grupos de 7 a 10 por bioensaio. As suspensões (água estéril + 0,02% Tween 20) foram padronizadas na concentração de $2,5 \times 10^7$ conídios/ml. Grupos de 36 brocas, colocadas em 6 tubos (6 brocas/tubo), foram pulverizados com a suspensão-padrão (0,1 ml suspensão/tubo). A avaliação foi realizada seis dias após a inoculação, sendo os insetos mortos transferidos para câmara úmida, para confirmação da mortalidade. Determinou-se a porcentagem de mortalidade total (mortalidade independente da causa), mortalidade corrigida em relação à testemunha pela fórmula de Abbott e mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu esporulação). Os isolados que apresentaram mortalidade confirmada acima de 60% passaram para a segunda fase da seleção.

Segunda fase – Determinação de concentração letal (CL_{50}): A fim de determinar a CL_{50} dos isolados previamente selecionados, grupos de 32 insetos foram utilizados para testar as concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml (germinação de conídios > 90%) e água destilada estéril + 0,02% Tween 20. Cada grupo (repetição) de 32 insetos foi distribuído em 4 tubos com 8 insetos/tubo (4 repetições/isolado), totalizando 128 insetos por isolado. Os insetos no interior do tubo foram pulverizados com 0,1 ml da suspensão. A mortalidade foi avaliada cinco dias após a inoculação. Os insetos mortos foram lavados em água destilada e deixados em câmara úmida, para confirmação da mortalidade. Foi determinada a mortalidade total corrigida (Abbott 1925) e confirmada e a taxa de esporulação (mortalidade confirmada/total). Para estimar a potência relativa da virulência entre os isolados, calculou-se a Razão Potencial da Virulência (RPV), dividindo o valor da CL_{50} de cada isolado pela menor CL_{50} obtida.

Determinação da produção de conídios sobre cadáveres da broca: Os insetos mortos que apresentaram plena esporulação, provenientes da concentração de 10^8 conídios/ml de cada isolado, foram colocados em grupos de 10 brocas em 5 tubos de vidro e os conídios suspensos em 10 ml água estéril + 0,02% Tween 20, sendo o número de conídios determinado com o auxílio de um hemacitômetro (Neubauer). Calculou-se o Aumento Potencial de Produção de conídios (APP) dividindo-se a produção nos diferentes isolados da produção no menor isolado. Todos os procedimentos, de multiplicação dos isolados de *B. bassiana*, bioensaio de virulência, esporulação nos cadáveres dos insetos, foram conduzidos em câmara ambiental (temperatura $25 \pm 5^\circ$ C; umidade relativa $95 \pm 5\%$; fotofase 12L:12E). Nas testemunhas de todos os bioensaios somente foi aplicada água estéril + 0,02% Tween 20.

Análise estatística: O delineamento foi inteiramente casualizado, para todos os experimentos. Na primeira fase de seleção optou-se pela análise gráfica dos resultados. Na segunda fase, para a determinação das CL₅₀ dos isolados, os dados de mortalidade corrigida por Abbott (1925) foram submetidos à análise de Probit, utilizando-se o programa Polo-PC (LeOra Software 1987), e à análise de variância (ANAVA) com regressão polinomial. Os dados de mortalidade corrigida e confirmada dentro de cada concentração e a produção de conídios dos isolados foram submetidos à ANAVA, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey (P<0,1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeira fase – seleção inicial: Os isolados CG068, CG076, CG150, CG152, UEL052, CG079 e UEL002 foram descartados antes do início dos bioensaios, por apresentarem esporulação insuficiente para obtenção de uma suspensão de $2,5 \times 10^7$ conídios/ml. Para os diferentes isolados testados, os valores de mortalidade corrigida, aos seis dias após a inoculação, variaram de 81,25 a 3,70% e confirmada de 83,33 a 3,33%. La Rosa et al. (1997) e Jiménez-Gómez (1992) verificaram variação na mortalidade corrigida entre 20 e 100% testando isolados de *B. bassiana* para a broca-do-café. Na fase de “screening” é possível descartar materiais pouco virulentos e com baixa capacidade de penetração e germinação (Moino Jr., 1993), deixando isolados com potencial para uma avaliação mais precisa de sua virulência. Assim, nesta fase inicial optou-se pela seleção baseada na mortalidade confirmada (> 60%), eliminando os isolados com baixa esporulação. A escolha da mortalidade confirmada como parâmetro de seleção deve-se ao fato de que os fungos diferem fundamentalmente dos agroquímicos, devido à capacidade de aumento da densidade do patógeno por meio da transmissão da doença, repetindo o ciclo através da população hospedeira (Hajek & St. Leger, 1994). Em sistemas de produção perene como o café, esse aspecto é mais relevante, pois favorece a manutenção do inóculo no campo. O nível de 60% de mortalidade confirmada foi estabelecido considerando-se que deveriam ser utilizados entre 10 e 15 isolados na segunda fase, buscando não eliminar os isolados de potencial, que porventura não tiveram bom desempenho na primeira fase. Assim, os isolados CB102, CB066, CB097-EMCAPA249, CG082, CG425, 447-ESALQ, CG481, CG026, CG424, CG432 e CG155 apresentaram mortalidade confirmada superior a 60% e foram selecionados para a segunda fase.

Segunda fase – Determinação de CL₅₀ dos isolados selecionados na primeira fase: As mortalidades na concentração de 10^4 conídios/ml de todos os isolados foram descartadas da análise, devido à baixa resposta. Pela análise de Probit, os isolados CB066, CG082, 447, CG155, CG424 e CG026 não se

adequaram ao modelo, por ter ocorrido um χ^2 significativo e elevada heterogeneidade dos dados. Os isolados que se ajustaram ao modelo não demonstraram diferenças significativas entre as CL_{50} , como pode ser constatado pela sobreposição dos intervalos de confiança (Tabela 1). Assim, optou-se por uma análise de variância com teste de comparação de médias das mortalidades em cada concentração, com regressão polinomial para determinar a equação de dose/resposta dos diferentes isolados e calcular as CL_{50} . As CL_{50} dos isolados testados, calculadas através da equação de regressão polinomial, variaram de $2,53 \times 10^6$ (CG425) a $62,80 \times 10^6$ (CB026) conídios/ml (Tabela 1). La Rosa et al., (1997), selecionando isolados de *B. bassiana*, obtiveram CL_{50} variando de 2,2 a $45,5 \times 10^6$ conídios/ml entre os isolados. Utilizando a análise de regressão polinomial, os valores das CL_{50} estimadas (Tabela 2) foram similares aos obtidos por Probit (Tabela 01). As maiores discrepâncias foram observadas nas CL_{50} dos isolados que não se ajustaram ao modelo de Probit (CB066, CG082, 447, CG155, CG424 e CG026), talvez pelo fato de a faixa de concentrações testadas não ser a ideal para os isolados. Por meio do cálculo da RPV, que determina a variação relativa entre as CL_{50} , verifica-se uma diferença de até 24,8 vezes entre o isolado com menor CL_{50} (CG425) e o maior (CG026).

Tabela 1 - Resultados (Probit) para a concentração letal (CL_{50}) após transformação da mortalidade corrigida (Abbott) dos isolados de *Beauveria bassiana* que foram selecionados (1ª fase) para o controle de *Hypothenemus hampei*. Londrina, PR. 2000

Isolado	Equação de regressão	CL_{50}	Intervalo de confiança		n**	χ^2
CG425	Y= -0,143914 + 0,800322 *logx	$2,67 \times 10^6$	$8,94 \times 10^4$	$1,19 \times 10^7$	128	3,746
CB066	Y= -0,717504 + 0,826425 *logx	$8,29 \times 10^6$	$9,41 \times 10^5$	$3,25 \times 10^7$	128	6,538 * ¹
CB097	Y= -0,080487 + 0,728555 *logx	$9,40 \times 10^6$	$4,55 \times 10^6$	$1,77 \times 10^7$	88	1,298
CG432	Y= 0,691457 + 0,606962 *logx	$12,55 \times 10^6$	$7,17 \times 10^6$	$2,27 \times 10^7$	128	1,476
CG082	Y= -2,851045 + 1,100746 *logx	$13,57 \times 10^6$			64	6,080 *
CB102	Y= 1,347791 + 0,507223 *logx	$15,86 \times 10^6$	$3,92 \times 10^6$	$7,26 \times 10^7$	128	2,582
CG481	Y= 1,627662 + 0,464493 *logx	$18,21 \times 10^6$			128	4,620
447	Y= -0,720089 + 0,780933 *logx	$21,12 \times 10^6$			112	7,483 *
CG155	Y= 2,135643 + 0,385003 *logx	$27,53 \times 10^6$			120	16,231 *
CG424	Y= 0,724237 + 0,564859 *logx	$37,12 \times 10^6$			128	6,514 *
CG026	Y= -2,329660 + 0,940832 *logx	$61,75 \times 10^6$			128	11,885 *

¹* significativo P >95% (sem ajuste ao modelo).

** número de insetos testados.

As curvas de mortalidade corrigida pela equação de regressão polinomial mostram, para alguns isolados, que o aumento na concentração de conídios não representa aumento na mortalidade, até determinados níveis. Isso provavelmente ocorreu pela variação nos mecanismos de ataque e de sua intensidade, para os diferentes isolados, e dos mecanismos de defesa do inseto-alvo. O fungo, ao atravessar a cutícula e invadir a hemocele, pode causar a morte do hospedeiro de forma indireta, pela exaustão de nutrientes e quebras fisiológicas/bioquímicas, e/ou de forma direta, por metabólicos secundários (toxinas) liberados pelo patógeno. Para muitos fungos, a realidade está provavelmente na

combinação destes fatores (Hajek & St. Leger, 1994; Charnley, 1997). Essa combinação de fatores talvez seja responsável pela ampla base de subdose, que não causou a mortalidade do inseto. Assim, devido ao complexo mecanismo de ação e à variabilidade de um isolado para outro, haverá, numa leitura pontual (5-6 dias), para a avaliação da mortalidade, dados nem sempre lineares, dificultando uma análise através de modelos de dose/resposta.

Tabela 2 - Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2), concentração letal (CL_{50}) (conídios/ml) e redução potencial de virulência (RPV), em relação ao isolado CG 425, para os diferentes isolados. Londrina, PR. 2000

Isolado	Equação de Regressão	R2	CL50	RPV
CG425	$y = 25,2755 * \log x - 111,8458$	0,9679	$2,532 \times 10^6$	1,00
CB066	$y = 25,1865 * \log x - 122,6698$	0,9533	$7,178 \times 10^6$	2,83
CB097	$y = 21,9935 * \log x - 101,9278$	0,9628	$8,091 \times 10^6$	3,20
CG432	$y = 20,6185 * \log x - 95,7515$	0,9966	$11,722 \times 10^6$	4,63
CB102	$y = 17,1378 * \log x - 73,1618$	0,9382	$15,382 \times 10^6$	6,07
CG082	$y = 10,3265 * (\log x)^2 - 110,8713 * \log x + 312,9313$	0,9995	$15,885 \times 10^6$	6,27
CG481	$y = 15,9442 * \log x - 122,6698$	0,8980	$16,943 \times 10^6$	6,69
447	$y = 11,9669 * (\log x)^2 - 132,3506 * \log x + 378,7369$	0,9986	$19,534 \times 10^6$	7,71
CG155	$y = 3,4789 * (\log x)^2 - 29,2846 * \log x + 74,8786$	0,9338	$35,892 \times 10^6$	14,17
CG424	$y = 7,6593 * (\log x)^2 - 83,033 * \log x + 238,6944$	0,9971	$39,719 \times 10^6$	15,69
CG026	$y = 9,7269 * (\log x)^2 - 111,1411 * \log x + 325,2139$	0,9900	$62,806 \times 10^6$	24,80

Com as diferentes análises realizadas, utilizando a mortalidade corrigida, em cada concentração, verifica-se o melhor desempenho geral dos isolados CG425, CG082, CB066, CB097 (Tabela 3). Também o isolado CG425 apresentou maior mortalidade confirmada em todas as concentrações (Tabela 4).

Além das características dos isolados, que definem sua virulência, um outro fator que afetou a taxa de esporulação (mortalidade confirmada/total) foi a concentração da suspensão. Observou-se relação positiva entre a concentração de conídios da suspensão e a taxa de esporulação. Isso pode ser explicado considerando-se que uma maior quantidade de conídios germinou, sendo a invasão e colonização do corpo do inseto mais rápidas e eficientes, dificultando a proliferação de outros micro-organismos (bactérias), que poderiam prejudicar a esporulação do fungo. Nas baixas concentrações, a morte do inseto ocorreu provavelmente antes de o fungo colonizar todo o inseto, dificultando seu desenvolvimento.

No caso do isolado CG425, verifica-se que mesmo na concentração de 10^5 a mortalidade confirmada de 5,47% representa 28,32% da mortalidade corrigida, provavelmente por características intrínsecas que definem sua virulência, o que contribui para a manutenção e o aumento do inóculo num sistema perene como o café.

Esporulação sobre os cadáveres de broca: Os isolados com melhor desempenho na produção de conídios sobre os cadáveres foram CB102 e CG432 (Tabela 5). Maior virulência nem sempre se traduz em

maior produção de conídios, mostrando a variação nas “habilidades” de cada isolado sobre a broca-do-café. Assim, o isolado CG425 apresentou maior mortalidade confirmada, o que poderia representar maior número de focos de disseminação (inseto onde ocorre esporulação), mas menor produção de conídios por foco. Em contrapartida, o isolado CB102 apresentaria a desvantagem de um menor número de focos de disseminação, porém a vantagem de uma “habilidade” para a produção de conídios. A dispersão dos propágulos infectivos viáveis (conídios) para um novo hospedeiro representa a parte mais delicada do ciclo de vida do fungo, devido à ação de agentes desativadores, principalmente a temperatura, a umidade e a radiação, que afetam também o processo de produção de conídios, dispersão, sobrevivência e germinação. Assim, o maior número de conídios produzidos por cadáver compensaria parcialmente a elevada probabilidade de a maioria não sobreviver para infectar um novo hospedeiro (Hajek & St. Leger, 1994).

Tabela 3 - Mortalidade corrigida (Abbott) em porcentagem (média \pm DP), da broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, provocada pelos isolados de *Beauveria bassiana*, nas diferentes concentrações, Londrina, PR. 2000

Isolados	Concentração da suspensão (conídios/ml)											
	10 ⁵			10 ⁶			10 ⁷			10 ⁸		
CG425	19,31	\pm 9,51	AB ¹	31,20	\pm 13,85	A	67,95	\pm 10,88	A	91,31	\pm 1,95	A
CG082	17,02	\pm 4,30	AB	18,57	\pm 9,85	A	43,69	\pm 16,12	AB	86,55	\pm 5,25	AB
447	15,67	\pm 4,00	AB	16,90	\pm 4,88	A	37,20	\pm 12,33	AB	86,30	\pm 12,97	A
CB066	6,72	\pm 9,43	B	28,22	\pm 15,54	A	43,71	\pm 20,60	AB	85,52	\pm 5,66	AB
CB097	13,26	\pm 9,32	AB	23,83	\pm 15,81	A	48,97	\pm 6,75	AB	78,16	\pm 10,96	AB
CG432	7,39	\pm 4,83	AB	29,01	\pm 14,89	A	46,37	\pm 21,79	AB	70,32	\pm 17,62	AB
CG155	24,01	\pm 6,12	A	27,22	\pm 8,56	A	28,02	\pm 11,65	B	68,95	\pm 8,68	AB
CG481	20,58	\pm 12,9	AB	24,04	\pm 8,38	A	40,63	\pm 20,96	AB	68,17	\pm 9,12	AB
CB102	17,88	\pm 6,85	AB	22,97	\pm 5,19	A	44,10	\pm 21,01	AB	67,96	\pm 18,08	AB
CG424	14,53	\pm 4,88	AB	17,68	\pm 14,88	A	31,32	\pm 7,20	B	65,11	\pm 16,03	B
CG026	13,02	\pm 5,46	AB	13,07	\pm 9,49	A	23,56	\pm 10,20	B	62,72	\pm 5,69	B

¹ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si em nível de significância de 10% pelo teste de Tukey.

Assim, levanta-se a questão sobre qual isolado deve ser recomendado em um programa de controle a campo. Analisando as variáveis observadas, é interessante a utilização de um grupo ou mistura de isolados, onde cada um apresentaria vantagens que permitiriam sobreviver e iniciar o processo da doença, ampliando as chances de sucesso de controle. A relevância da virulência do isolado é clara. Contudo, alta esporulação e potencial epizootico podem ter igual ou maior importância em um produto comercial (Charney, 1997). Poprawski et al. (1988), avaliando diferenças isoenzimáticas entre populações de *B. bassiana* atacando o gorgulho *Sitona* sp. em alfafa, concluem que as populações com maior heterogeneidade apresentariam maior capacidade adaptativa. Dessa forma, um grupo de isolados selecionados através de critérios mínimos de mortalidade, mas com habilidades diferenciadas de

sobrevivência e disseminação, poderia ter mais sucesso na implantação da doença no campo do que um único isolado.

Tabela 4 - Mortalidade confirmada em porcentagem (média \pm DP), da broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, provocada pelos isolados de *Beauveria bassiana*, nas diferentes concentrações, Londrina, PR. 2000

Isolado	Concentração da suspensão (conídios/ml)											
	10 ⁵			10 ⁶			10 ⁷			10 ⁸		
CG425	5,47	\pm 6,93	A1	17,97	\pm 2,99	A	53,91	\pm 13,59	A	82,81	\pm 7,86	A
447	2,08	\pm 2,95	A	6,25	\pm 2,55	ABC	27,78	\pm 13,75	AB	77,08	\pm 19,15	AB
CB097	3,47	\pm 2,60	A	4,17	\pm 3,90	BC	21,53	\pm 9,67	AB	64,24	\pm 14,49	AB
CB066	4,69	\pm 1,80	A	14,06	\pm 9,72	AB	35,16	\pm 19,16	AB	62,50	\pm 11,97	AB
CG424	2,34	\pm 1,56	A	6,25	\pm 4,42	ABC	26,56	\pm 5,41	AB	60,16	\pm 11,23	AB
CB102	0,78	\pm 1,56	A	7,81	\pm 4,03	ABC	30,47	\pm 10,33	AB	58,59	\pm 14,96	AB
CG082	0,00	\pm 0,00	A	1,56	\pm 3,13	C	28,13	\pm 6,25	AB	59,38	\pm 11,97	AB
CG432	3,13	\pm 2,55	A	13,28	\pm 12,60	AB	31,25	\pm 22,96	AB	59,38	\pm 19,93	AB
CG026	1,56	\pm 3,13	A	3,13	\pm 2,55	BC	15,63	\pm 11,12	B	54,69	\pm 4,03	B
CG155	2,60	\pm 3,13	A	3,91	\pm 2,99	BC	10,68	\pm 5,54	B	52,08	\pm 5,10	B
CG481	0,78	\pm 1,56	A	4,69	\pm 5,41	BC	25,00	\pm 19,60	AB	51,56	\pm 14,55	B

¹ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si em nível de significância de 10% pelo teste de Tukey.

Pode-se, portanto, concluir que os diferentes isolados selecionados poderão ser utilizados em produtos comerciais ou experimentais para o controle da broca-do-café, com maior relevância para os oito isolados mais virulentos (CG425, CB066, CB 097, CG432, CB102, CG082, CG481 e 447), em que foram, respectivamente, observados os RPV (redução potencial de virulência) e APP (aumento potencial de produção) de: (1,00; 1,92), (2,83; 2,65), (3,20; 4,50), (4,63; 5,20), (6,07; 6,17), (6,27; 1,39), (6,69; 4,17) e (7,71; 4,68).

Tabela 5 - Número de conídios produzidos (média \pm DP) pelos diferentes isolados em cadáveres da broca-do-café *Hypothenemus hampei*. Londrina, PR. 2000

ISOLADOS	Número de Conídios (10 ⁶ conídios/broca) (média \pm DP)	APP ²
CB102	11,61 \pm 1,65	A ¹
CG432	9,79 \pm 2,85	AB
CG026	8,85 \pm 1,25	AB
447-ESALQ	8,80 \pm 0,41	AB
CG424	8,73 \pm 1,56	AB
CB97-EMCAPA-249	8,46 \pm 2,48	B
CG481	7,84 \pm 2,26	BC
CB066	5,00 \pm 0,97	CD
CG425	3,62 \pm 1,04	DE
CG082	2,62 \pm 0,40	DE
CG155	1,88 \pm 0,85	E

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 10% pelo teste de Tukey

² Aumento Potencial de Produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265-267.
- ALVES, S. B. 1998. Fungos entomopatogênicos. p.289-381. In: Alves, S., Cont. microbiano de insetos. São Paulo, FEALQ.
- BRUN, L.O., C. MARCILLAUD, V. GAUDICHON, & D. SCUKLING. 1989. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. *J. Econ. Entomol.* 82: 1311-1316.
- BUSTILLO, A.E. 1990. Uso potencial del entomopatogeno *Beauveria bassiana* en el control de la broca del cafe. p. 91-105. In: SEMINARIO Sobre la Broca del Cafe. Medellin -Colombia, Mayo 21, 1990. Resúmenes... Medellin (Colombia), SOCOLEN.
- BUSTILLO, A.E., H. CASTILLO, D. VILLALBA, E. MORALES & P.E. VÉLEZ. 1991. Evaluaciones de campo con el hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. p. 679-686. In: COLLOQUE Scientifique International sur le Café, 14. San Francisco (Estados Unidos), 14-19 Juillet. 1991, Paris (Francia). ASIC.
- BUSTILLO, A.E. 1995. Utilizacion del control biológico clásico en un programa de manejo integrado: el caso de la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia. p. 143-148. In Manejo Integrado de Plagas Curso Internacional. Instituto Agropecuario, Santa Fé de de Bogotá, Colombia.
- CABWEB. 2000. INTERNET, em 30 de julho de 1999. pest.cabweb.org/archive/pestofmonth/pest9710.htm.
- CHARNLEY, A.K. 1997. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. p. 185-218. In Esser K. & P.A. Lemke, *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Ed. Wicklow/Soderstrom.
- FERNANDEZ, P.M., R.E. LECUONA & S.B. ALVES. 1985. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: Scolytidae). *Ecosistema (Brasil)* 10:176-182.
- GONZÁLEZ-GARCIA, M.T., F.J.P. FLÓREZ & A.E. BUSTILLO. 1993. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44: 93-102.
- HAJEK, A.E, & R.J. ST. LEGER. 1994. Interactions between fungal pathogens and inset hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39:293-322.
- HIROSE, E. & NEVES, P. M. O. J. 2001A. Técnica de criação da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) em laboratório. Resumos, VII Simpósio de Controle Biológico. 03-05 de Julho 2001, Poços de Caldas, p. 429.
- HIROSE, E. & NEVES, P. M. O. J. 2001B. Metodologia para avaliar a avirulência de isolados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotyna:Hyphomycetes) sobre a broca-do-café *Hypothenemus hampei*

(Coleoptera: Scolytidae). Resumos, VII Simpósio de Controle Biológico. 03-05 de Julho 2001, Poços de Caldas, p. 300.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, J. 1992. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. *Cenicafé* 43:84-98.

LA ROSA W., R. ALATORRE, J. TRUJILLO & J.F. BARRERA. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *J. Econ. Entomol.* 90:1534-1538.

MOINO JR. A. 1993. Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para o controle de pragas de grãos armazenados. Piracicaba. Dissertação de Mestrado – Escola Sup. Agr. “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, 100p.

MURPHY, S.T. & D. MOORE. 1990. Biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), previous programmer and possibilities for the future. *Biocontrol news and information.* 11:107-117.

POPRAWSKI, T.J., G. RIBA, W.A. JONES & A. AIOUN. 1988. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Environ. Entomol.* 17:275-279.

VÉLEZ, P.E.A., F.J.F. POSADA, P.M. MARÍN, M.T.G. GONZÁLEZ, E.V. OSÓRIO & A.E.P. BUSTILLO. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. *Cenicafé. Boletim Técnico* 17. 37p.