

CONTROL BIOLOGICAL

Seleção de Isolados de *Beauveria bassiana* Para o Controle Biológico da Broca-do-Café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae)

PEDRO M.O.J. NEVES¹ E EDSON HIROSE²

¹Depto. Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, C. postal 6001, 86051-970, Londrina PR, pedroneves@uel.br

²Depto. Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, 81531-990, Centro Politécnico Curitiba, PR

Neotropical Entomology 34(1):077-082 (2005)

Beauveria bassiana Strains Selection for Biological Control of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae)

ABSTRACT - *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coffee Berry Borer) is one of the most important coffee pests. Its control is carried out mainly using synthetic chemical products, which contaminate the environment, food and farmers. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is a natural enemy of coffee berry borer and presents potential for biological control. With the objective to select strains of *B. bassiana* for the management of *H. hampei*, the virulence of 61 strains, from diverse hosts and geographic regions, were tested. The selection was carried out in two phases: in the first phase 11 strains, with confirmed mortality above 60%, were selected. In the second phase, for the 11 preselected strains, we determined: LC₅₀, sporulation rate (confirmed mortality/total mortality) and conidia production on *H. hampei* cadavers. The CG425 strain presented the greater total and confirmed mortality, highest sporulation rate and CL₅₀ = 2.5 x 10⁶ conidia/ml and CB102 strain, presented highest conidia production on insects, 11.6 x 10⁶ conidia/insect. These isolates present height potential to be used in biological control programs of coffee berry borer with *B. bassiana*.

KEY WORDS: Coffee crop, entomopathogenic fungi, IPM

RESUMO - A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari), é uma das mais importantes pragas do cafeeiro. Seu controle é realizado, na maioria das vezes, utilizando-se produtos químicos sintéticos que contaminam o meio ambiente, os alimentos e os agricultores. O fungo *Beauveria bassiana* é um agente natural de controle dessa praga e apresenta potencial para o controle biológico. Assim, com o objetivo de selecionar isolados de *B. bassiana* para o controle da broca-do-café avaliou-se a virulência de 61 isolados, originários de diversos hospedeiros e regiões geográficas. A seleção foi realizada em duas fases: na primeira fase selecionaram-se 11 isolados com mortalidade confirmada acima de 60%. Na segunda fase determinou-se para os 11 isolados pré-selecionados, a CL₅₀, taxa de esporulação (mortalidade confirmada/mortalidade total) e a produção de conídios em *H. hampei*. O isolado CG425 apresentou maior mortalidade total corrigida e confirmada, maior taxa de esporulação e CL₅₀ = 2,5 x 10⁶ conídios/ml e o isolado CB102, apresentou maior produção de conídios sobre os cadáveres, 11,6 x 10⁶ conídios/adulto. Esses isolados apresentam potencial para serem utilizados em programas de controle biológico da broca-do-café com *B. bassiana*.

PALAVRAS-CHAVE: Cafeeiro, fungo entomopatogênico, MIP

Estima-se que a broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) provoque danos da ordem de 500 milhões de dólares em todo o mundo. O controle da praga baseia-se no uso de inseticidas, principalmente o endossulfam, mas a sua utilização intensiva e repetida leva ao desenvolvimento de resistência do inseto ao produto (Brun *et al.* 1989) além de causar

problemas ambientais, contaminação dos alimentos e agricultores.

Entre os diferentes agentes naturais de controle da broca está o fungo *Beauveria bassiana* que foi observado em muitos países atacando *H. 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 desse inseto praga (La Rosa *et al.* 1997).

Estudos em laboratório e em campo indicam que esse fungo tem potencial para ser utilizado desde que exista suficiente quantidade de inóculo para induzir o processo de doença (Fernandes *et al.* 1985, La Rosa 2000). Na Colômbia, são relatadas taxas de infecção da broca-do-café em campo por *B. bassiana* variando de 20% a 90% (Bustillo 1995). Vários autores têm demonstrado a capacidade infectiva da *B. bassiana* e seu potencial como agente de controle da broca-do-café (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 mais eficientes para controle da broca-do-café, *H. hampei*.

Material e Métodos

Os insetos utilizados foram obtidos da criação em frutos de café maduro, seguindo metodologia descrita por Hirose & Neves (2002). Os isolados utilizados foram provenientes da coleção do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos/UEL obtidos de diferentes instituições de ensino e pesquisa (EMBRAPA/Cenargen, Instituto Biológico de São Paulo, Unioeste, ESALQ) e de coletas a campo.

Padronização dos Isolados e Insetos. Para reativar a virulência dos isolados, seguiram-se os procedimentos do Centro Nacional de Investigaciones de Café – Colômbia (CENICAFÉ) (Vélez *et al.* 1997) inoculando-se insetos sadios com cada um dos 61 isolados e após a conidiogênese sobre o inseto, cada isolado foi cultivado em meio SDAY, e os conídios recolhidos e armazenados a $-4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para os bioensaios de seleção foram utilizados conídios de segunda repicagem multiplicados em meio SDAY, a partir dos conídios previamente armazenados. As suspensões foram preparadas em água estéril + 0,02% Tween 20. A viabilidade dos conídios foi determinada em meio agar/água, com leitura após 24h, sendo descartados os isolados que apresentaram porcentagem de germinação inferior a 90%.

Os insetos para os bioensaios foram coletados da criação, soltos sobre folhas de papel e considerados sadios os que caminharam ativamente aderidos ao papel. Para reduzir o estresse no manuseio, as brocas foram succionadas diretamente para os tubos de bioensaio (8,4 cm de altura x 2,4 cm de largura) (Hirose 2000).

A suspensão de conídios foi pulverizada diretamente nos tubos de dieta, sobre as brocas, com o auxílio de um pulverizador “Pasche” “size 3” para micropintura (pressão de 25 lb/pol²). Os recipientes para o bioensaio foram tampados com frascos de antibiótico (10 ml), contendo água e fechados com algodão. A vedação impediu a fuga dos insetos e reduziu

a necessidade de manutenção diária com relação à umidade (UR > 95%).

Para alimentar e abrigar as brocas durante o bioensaio, 1h após a pulverização foi colocado um tubo plástico (0,4 cm de diâmetro x 1cm de comprimento), recheado com pó de semente de café moído em partículas de 600 µm. Essa técnica, utilizada por Hirose (2000), torna o processo de avaliação mais rápido e preciso, recuperando 100% das brocas utilizadas nos bioensaios.

Seleção Inicial. Os 61 isolados foram testados em grupos de sete a dez. As suspensões de cada isolado foram padronizadas com o auxílio de um hemacitômetro (Neubauer), em $2,5 \times 10^7$ conídios/ml. Essa concentração foi escolhida com base nos dados médios de CL_{50} obtidos por Jiménez-Gómez (1992), González-García *et al.* (1993) e La Rosa *et al.* (1997) em estudos para o controle biológico da broca com *B. bassiana*.

Foram testadas 36 brocas/isolado, colocadas em seis tubos (6 brocas/tubo) e pulverizadas 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 pelo patógeno. Determinou-se a porcentagem de mortalidade total (MT), mortalidade corrigida (MCA) em relação à testemunha pela fórmula de Abbott (1925) e mortalidade confirmada (MC) (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu conidiogênese do fungo). Os isolados que apresentaram mortalidade confirmada acima de 60%, foram pré-selecionados.

Determinação de Concentração Letal (CL_{50}). Para determinar a CL_{50} dos isolados previamente selecionados, grupos de 32 insetos foram pulverizados nas concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 conídios/ml. Essas concentrações foram baseadas em dados médios de CL_{50} obtida por Jiménez-Gómez (1992), González-García *et al.* (1993) e La Rosa *et al.* (1997). Cada grupo de 32 insetos foi distribuído em quatro tubos contendo oito insetos/tubo (4 repetições/isolado). A mortalidade total foi avaliada cinco dias após a inoculação, e a mortalidade confirmada após cinco dias em câmara úmida.

Foram determinadas a MT, MC e a taxa de esporulação (mortalidade confirmada/total).

Determinação da Produção de Conídios sobre Cadáveres da Broca. Brocas foram pulverizadas com cada isolado na concentração de 10^8 conídios/ml, os insetos mortos foram colocados em câmara úmida e ao apresentarem plena conidiogênese pelo fungo (cinco dias após a morte), foram transferidos, em grupos de 10 cadáveres, para cinco tubos (repetições) e os conídios suspensos em 10 ml água estéril + 0,02% Tween 20. O número de conídios foi 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 pela menor produção.

Todos os procedimentos de multiplicação dos isolados de *B. bassiana*, bioensaio de virulência e conidiogênese nos cadáveres foram conduzidos em câmara ambiental (temperatura $25 \pm 5^\circ\text{C}$; UR $95 \pm 5\%$; fotofase: 12h). 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 CL_{50} dos isolados, as mortalidades foram submetidos a análise de Probit utilizando-se o programa Polo-PC e análise de variância (ANOVA) com regressão polinomial. Os dados de mortalidade corrigida e confirmada dentro de cada concentração e a produção de conídios dos isolados foram submetidos a ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,1$).

Resultados e Discussão

Seleção Inicial. Os isolados CG068, CG076, CG150, CG152, UEL052 e CG079, UEL002 foram descartados antes do início dos bioensaios por apresentarem baixa esporulação nas placas de meio de cultura. Para os isolados testados os valores de mortalidade corrigida variaram de 81,3% a 3,7% e mortalidade confirmada de 83,3% a 3,3%. Jiménez-Gómez (1992) e La Rosa *et al.* (1997) verificaram variação na mortalidade corrigida entre 100% e 20%, 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. 1998). Assim, nesta primeira etapa optou-se pela seleção baseada na mortalidade confirmada (> 60%), eliminando-se os isolados com baixa esporulação. A escolha da mortalidade confirmada como parâmetro de seleção, baseou-se no fato de que os fungos diferem dos agroquímicos quanto ao modo de ação. Devido à capacidade de aumento da densidade do patógeno pela transmissão horizontal, há repetições do ciclo da doença na população hospedeira (Hajek & St. Leger 1994). Em culturas perenes 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. Assim, os isolados CB102, CB066, CB097-EMCAPA249, CG082, CG425, 447, CG481, CG026, CG424, CG432 e CG155 foram pré-selecionados para uma avaliação mais apurada.

Determinação de CL_{50} . A concentração 10^4 conídios/ml não foi considerada na análise dos dados, visto que o percentual de mortalidade de brocas obtido nessa concentração foi muito baixo. 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} pela sobreposição dos intervalos de confiança. 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 pela equação de regressão polinomial, variaram de $2,5 \times 10^6$ (CG425) a $62,8 \times 10^6$ (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 1) foram similares aos obtidos por Probit. As maiores discrepâncias foram observadas nas CL_{50} para os isolados que não se ajustaram ao modelo de Probit (CB066, CG082, 447, CG155, CG424 e CG026), talvez porque a faixa de concentrações testadas não tenha sido a ideal.

As curvas de mortalidade corrigida pela equação de regressão polinomial mostram, para alguns isolados, que o aumento na concentração de conídios não correspondeu a aumento na mortalidade, até determinados níveis. Isso provavelmente ocorreu pela variação na intensidade dos fatores de virulência dos 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.

Tabela 1. Equação de regressão, coeficiente de determinação (R^2), concentração letal (CL_{50}) (conídios/ml) para isolados de *B. bassiana* na broca-do-café, *H. hampei*.

Isolado	Equação de regressão	R^2	CL_{50} ($\times 10^6$)
CG425	$y = 25,28 * \log x - 111,85$	0,97	2,5
CB066	$y = 25,19 * \log x - 122,67$	0,95	7,2
CB097	$y = 21,99 * \log x - 101,93$	0,96	8,1
CG432	$y = 20,62 * \log x - 95,75$	1,00	11,7
CB102	$y = 17,14 * \log x - 73,16$	0,94	15,4
CG082	$y = 10,33 * (\log x)^2 - 110,87 * \log x + 312,93$	1,00	15,9
CG481	$y = 15,94 * \log x - 122,67$	0,90	16,9
ESALQ447	$y = 11,97 * (\log x)^2 - 132,35 * \log x + 378,74$	1,00	19,5
CG155	$y = 3,48 * (\log x)^2 - 29,28 * \log x + 74,88$	0,93	35,9
CG424	$y = 7,66 * (\log x)^2 - 83,03 * \log x + 238,69$	1,00	39,7
CG026	$y = 9,73 * (\log x)^2 - 111,14 * \log x + 325,21$	0,99	62,8

Para muitos fungos a realidade está provavelmente na combinação desses fatores (Hajek & St. Leger 1994, Charnley 1997). A combinação e a intensidade dos fatores de virulência de cada isolado são provavelmente responsáveis por não ocorrer aumento na mortalidade proporcional ao aumento da concentração de conídios aplicada. Assim, devido ao complexo mecanismo de ação e à variabilidade de um isolado para outro, numa leitura pontual (5-6 dias) para a avaliação da mortalidade os dados nem sempre são lineares, dificultando a análise através de modelos de dose/resposta.

Com as diferentes análises realizadas, utilizando a mortalidade corrigida, verificou-se a melhor performance geral dos isolados CG425, CG082, CB066, CB097 (Tabela 2). Também

o isolado CG425 apresentou maior mortalidade confirmada, em todas as concentrações (Tabela 3).

Além das características dos isolados que definem sua virulência, um outro fator que afetou a taxa de conidiogênese (mortalidade confirmada/total) foi a concentração da suspensão. Observou-se uma relação positiva entre a concentração de conídios da suspensão e a taxa de conidiogênese. Isso pode ser explicado, considerando-se que quando uma maior quantidade de conídios germinou, a invasão e colonização do corpo do inseto foi mais rápida e eficiente, dificultando a proliferação de outros microorganismos competidores que poderiam prejudicar a esporulação do fungo. Nas baixas concentrações a morte do

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade corrigida (média \pm EP), da broca-do-café, *H. hampei*, provocada pelos isolados de *B. bassiana* nas diferentes concentrações.

Isolados	Concentração da suspensão (conídios/ml)			
	10 ⁵ (n = 32)	10 ⁶ (n = 32) ns*	10 ⁷ (n = 32)	10 ⁸ (n = 32)
CG425	19,3 \pm 9,51 ab	31,2 \pm 13,85	68,0 \pm 10,88 a	91,3 \pm 1,95 a
CG082	17,0 \pm 4,30 ab	18,6 \pm 9,85	43,7 \pm 16,12 ab	86,6 \pm 5,25 ab
ESALQ447	15,7 \pm 4,00 ab	16,9 \pm 4,88	37,2 \pm 12,33 ab	86,3 \pm 12,97 a
CB066	6,7 \pm 9,43 b	28,2 \pm 15,54	43,7 \pm 20,60 ab	85,5 \pm 5,66 ab
CB097	13,3 \pm 9,32 ab	23,8 \pm 15,81	49,0 \pm 6,75 ab	78,2 \pm 10,96 ab
CG432	7,4 \pm 4,83 ab	29,0 \pm 14,89	46,4 \pm 21,79 ab	70,3 \pm 17,62 ab
CG155	24,0 \pm 6,12 b	27,2 \pm 8,56	28,0 \pm 11,65 b	69,0 \pm 8,68 ab
CG481	20,6 \pm 12,9 ab	24,0 \pm 8,38	40,6 \pm 20,96 ab	68,2 \pm 9,12 ab
CB102	17,9 \pm 6,85 ab	23,0 \pm 5,19	44,1 \pm 21,01 ab	68,0 \pm 18,08 ab
CG424	14,5 \pm 4,88 ab	17,7 \pm 14,88	31,3 \pm 7,20 b	65,1 \pm 16,03 b
CG026	13,0 \pm 5,46 ab	13,1 \pm 9,49	23,6 \pm 10,20 b	62,7 \pm 5,69 b

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si a 10% de significância pelo teste de Tukey.

*ns = não significativo

Tabela 3. Porcentagem de mortalidade confirmada (média \pm EP), da broca-do-café, *H. hampei*, provocada pelos isolados de *B. bassiana*, nas diferentes concentrações.

Isolados	Concentração da suspensão (conídios/ml)			
	10 ⁵ (n = 32) ns*	10 ⁶ (n = 32)	10 ⁷ (n = 32)	10 ⁸ (n = 32)
CG425	5,5 \pm 6,93	18,0 \pm 2,99 a	53,9 \pm 13,59 a	82,8 \pm 7,86 a
ESALQ447	2,1 \pm 2,95	6,2 \pm 2,55 abc	27,8 \pm 13,75 ab	77,1 \pm 19,15 ab
CB097	3,5 \pm 2,60	4,2 \pm 3,90 bc	21,5 \pm 9,67 ab	64,2 \pm 14,49 ab
CB066	4,7 \pm 1,80	14,1 \pm 9,72 ab	35,2 \pm 19,16 ab	62,5 \pm 11,97 ab
CG424	2,3 \pm 1,56	6,2 \pm 4,42 abc	26,6 \pm 5,41 ab	60,2 \pm 11,23 ab
CB102	0,8 \pm 1,56	7,8 \pm 4,03 abc	30,5 \pm 10,33 ab	58,6 \pm 14,96 ab
CG082	0,0 \pm 0,00	1,6 \pm 3,13 c	28,1 \pm 6,25 ab	59,4 \pm 11,97 ab
CG432	3,1 \pm 2,55	13,3 \pm 12,60 ab	31,2 \pm 22,96 ab	59,4 \pm 19,93 ab
CG026	1,6 \pm 3,13	3,1 \pm 2,55 bc	15,6 \pm 11,12 b	54,7 \pm 4,03 b
CG155	2,6 \pm 3,13	3,9 \pm 2,99 bc	10,7 \pm 5,54 b	52,1 \pm 5,10 b
CG481	0,8 \pm 1,56	4,7 \pm 5,41 bc	25,0 \pm 19,60 ab	51,6 \pm 14,55 b

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si a 10% de significância pelo teste de Tukey.

*ns = não significativo

inseto ocorreu provavelmente antes de o fungo colonizar todo o inseto, dificultando seu desenvolvimento.

No caso do isolado CG425, mesmo na concentração 10^5 conídios/ml a mortalidade confirmada de 5,5% representou 28,3% da mortalidade corrigida, provavelmente por características intrínsecas que definem sua virulência, e que contribuem para a manutenção e o aumento do inóculo num sistema perene como o café.

Conidiogênese de *B. bassiana* Sobre os Cadáveres de Broca.

Os isolados com melhor desempenho na produção de conídios sobre os cadáveres foram CB102, CG432 (Tabela 4). 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, mas menor produção de conídios por foco. Em contrapartida, o isolado CB102 apresentaria a desvantagem de menor número de focos de disseminação, mas a vantagem de elevada produção de conídios.

A dispersão dos propágulos infectivos viáveis (conídios) para um novo hospedeiro representa a fase mais crítica do ciclo das relações patógeno hospedeiro devido à ação deletéria de alguns fatores abióticos, como a temperatura, umidade e radiação. Edginton *et al.* (2000) observaram que conídios de *B. bassiana* são completamente desativados após 1h de exposição à luz solar. Assim, maior número de conídios produzidos por cadáver compensaria, parcialmente, a elevada probabilidade de a maioria não sobreviver para infectar novo hospedeiro (Hajek & St. Leger 1994).

Assim, na definição do isolado mais recomendado em um

Tabela 4. Número de conídios de *B. bassiana* produzidos (média \pm EP) e aumento potencial de produção de conídios dos diferentes isolados em cadáveres da broca-do-café, *H. hampei*.

Isolados	Número de conídios/broca x 10^6 (média \pm EP) (n = 50)	APP ¹
CB102	11,6 \pm 1,65 a	6,2
CG432	9,8 \pm 2,85 ab	5,2
CG026	8,8 \pm 1,25 ab	4,7
ESALQ 447	8,8 \pm 0,41 ab	4,7
CG424	8,7 \pm 1,56 ab	4,6
CB97	8,5 \pm 2,48 b	4,5
CG481	7,8 \pm 2,26 bc	4,2
CB066	5,0 \pm 0,97 cd	2,6
CG425	3,6 \pm 1,04 de	1,9
CG082	2,6 \pm 0,40 de	1,4
CG155	1,9 \pm 0,85 e	----

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 10% de significância pelo teste de Tukey.

¹Aumento Potencial de Produção = conídios produzidos pelo isolado x /conídios produzidos pelo isolado CG 155

programa de controle analisando as variáveis observadas, é interessante utilizar de um grupo ou mistura de isolados, de forma a ampliar os limites de tolerância aos fatores adversos, permitindo maior manutenção de inóculo e ampliando as chances de sucesso do controle.

A relevância da virulência do isolado é clara. Contudo, alta esporulação e o potencial epizootico podem ter igual ou maior importância em um produto comercial (Charney 1997). Nesse sentido, Poprawski *et al.* (1988), avaliando diferenças isoenzimáticas entre populações de *B. bassiana* atacando o gorgulho *Sitona* sp. em alfafa, concluíram que as populações com maior heterogeneidade apresentam maior capacidade adaptativa. Assim, um grupo de isolados selecionados por meio de critérios mínimos de mortalidade mas com habilidades diferenciadas de sobrevivência e disseminação, podem ter mais sucesso na implantação da doença no campo do que um único isolado.

Pode-se, portanto, concluir que os isolados CG432, CB066, CB 97, CB102, CG424, CG481, ESALQ447, selecionados neste estudo, poderão ser utilizados em produtos comerciais ou experimentais para o controle da broca-do-café por serem mais virulentos e com maior potencial de produção de conídios sobre os insetos mortos.

Agradecimentos

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio a esta pesquisa.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café pelo financiamento deste estudo.

Literatura Citada

- 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 S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- 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. 1995.** Utilización del control biológico clásico en un programa de manejo integrado: El caso de la broca del café *Hypothenemus hampei*, en Colombia, p.143-148. In *Manejo Integrado de Plagas. Curso Internacional*. Instituto Agropecuario, Santa Fé de Bogotá, Colômbia, 232p.
- Charley, A.K. 1997.** Entomopathogenic fungi and their role in pest control, p. 185-201. In D. Wicklow & M. Soderstrom (eds), *The Mycota IV: Environmental and microbial*. Heidelberg, Springer-Verlag, 453p.
- Edginton, S., H. Segura, W. De La Rosa & T. Williams. 2000.** Photoprotection of *Beauveria bassiana*: Testing simple formulations for control of the coffee berry borer. *Int. J.*

Pest Manag. 45: 169-176.

Fernandes, P.M., R.E. Lecuona & S.B. Alves. 1985. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill à broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867) (Coleoptera: Scolytidae). Ecosistema 10: 176-182.

González-García, 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 insect hosts. Annu. Rev. Entomol. 39: 293-322.

Hirose, E. 2000. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) virulentos à broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 66p.

Hirose, E. & P.M.O.J. Neves. 2002. Técnica para criação da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae), em laboratório. Neotrop. Entomol. 31: 161-164.

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

Moino Jr., A., S.B. Alves, & R.M. Pereira. 1998. Efficacy of

Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. J. Appl. Entomol. 122: 301-306.

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. Bioc. News Infor. 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.

Rosa, W. De La, R. Alatorre, J.F. Barrera & C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. J. Econ. Entomol. 93: 1409-1414.

Rosa W. De La, 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.

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.

Received 12/1/04. Accepted 25/XI/04.