

Adriana Micheli

Variabilidade intraespecífica, inimigos naturais e avaliação da mistura de fungos entomopatogênicos e inseticidas para o controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae).

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Daniel R. Sosa-Gómez

Curitiba, PR

2005

Variabilidade intraespecífica, inimigos naturais e avaliação da mistura de fungos entomopatogênicos e inseticidas para o controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae).

Por

Adriana Micheli

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora:

Dr. Daniel R. Sosa-Gómez
(Orientador - Embrapa Soja)

Dr. Ítalo Delalibera Jr.
(Esalq - USP)

Dra. Sônia M. N. Lazzari
(UPPR)

A Deus
Ofereço

À minha mãe Sueli
Dedico

Agradecimentos

Ao Dr. Daniel R. Sosa-Gómez, pela orientação, amizade e apoio irrestritos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR e aos professores, pela oportunidade de freqüentar o curso.

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

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Soja, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), pelo fornecimento da estrutura necessária à realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia de Insetos Ivanilda Soldorio, Fábio Paro e José Jairo da Silva, pela inestimável colaboração na condução dos trabalhos de laboratório, por serem profissionais tão competentes nos momentos necessários e amigos de todas as horas.

Ao funcionário do Laboratório de Bioecologia de Percevejos, Jovenil José da Silva, pelo constante auxílio na realização deste trabalho.

Ao funcionário do Laboratório de Criação de Lagartas, Adair Carneiro, pelo valioso trabalho fotográfico.

Aos funcionários de campo Elias, Eupídio, Oriverto, Pavão, Valter e Wilson, pela valiosa colaboração na coleta dos insetos.

Aos funcionários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, César, Silvana e Vera, pelo apoio técnico (e psicológico) nos trabalhos moleculares.

Aos funcionários do Laboratório de Tecnologia e Patologia de Sementes, pela convivência sempre tão agradável.

À Dra. Beatriz Corrêa-Ferreira, Rose e Joacir, pela colaboração na realização dos experimentos em casa de vegetação.

Aos amigos Edson Hirose, Ednéia Borges, Frederico Henning e Marliton Barreto, pelos ensinamentos, pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos e colegas do Curso de Mestrado do ano 2003, em especial Adelita, Ana Paula, Anamaria, Céuli, Fernanda, Elis, Gil Felipe, Mari e Venício. O tempo de convivência foi curto, mas o carinho é enorme. Aos colegas do doutorado Leandro e Geane.

Ao Dr. Rui Scaramella Furiatti (UEPG), Dr. Luís Alves (UNOESTE), Francisco Lozano Leonel Júnior (Bayer CropScience) pelo envio de insetos.

Ao Dr. Ronaldo Toma, pela identificação das moscas parasitóides.

Ao MSc. Luciano Moura, da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, pelo auxílio na identificação das espécies de *Cerotoma* e pelo apoio constante nos estudos com *Diabrotica*.

À Professora Valéria Langendick, pela revisão da gramática e ortografia.

Ao Dr. Flávio Moscardi, pelo eterno bom humor.

À Dra. Ivana Barbola, por ter sido a primeira a me ensinar Entomologia.

Ao Rangel, por estar sempre ao meu lado para absolutamente tudo!

À minhas amigas... Milena Raimam, Silvia Beatriz e Vilmarise Bobato. “O verdadeiro amigo é aquele que nos faz melhor do que somos”.

Em especial a minha mãe e meu pai, pelo exemplo distinto de honestidade e perseverança, que contribuíram de forma relevante no meu desenvolvimento pessoal. Aos meus irmãos Juliano e Luciana, por plantarem em meu coração a amizade sincera. Obrigada pelo apoio, incentivo e patrocínio!

A todos que, de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

“O homem que venceu na vida é aquele que viveu bem, riu muitas vezes e amou muito; que conquistou o respeito dos homens inteligentes e o amor das crianças, que preencheu um lugar e cumpriu uma missão; que deixa o mundo melhor do que encontrou, seja com uma flor, um poema perfeito ou o salvamento de uma alma; que procurou o melhor nos outros e deu o melhor de si”.

R. L. Stevenson

Sumário

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras.....	xviii

Capítulo 1. Introdução e Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução.....	1
1.2. Revisão Bibliográfica.....	2
1.2.1. Importância econômica de <i>Diabrotica speciosa</i>	2
1.2.2. Uso de marcadores moleculares RAPD em estudos de variabilidade genética.....	4
1.2.3. Estudos moleculares realizados com espécies do gênero <i>Diabrotica</i>	6
1.2.4. Ocorrência de inimigos naturais em <i>D. speciosa</i>	8
1.2.5. Utilização de fungos entomopatogênicos em programas de controle de insetos.....	9
1.3. Literatura citada.....	14

Capítulo 2. RAPD para estudo de populações de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)

2.1. Introdução.....	26
2.2. Material e Métodos.....	27
2.2.1. Extração de DNA.....	28

2.2.2.	Quantificação de DNA.....	29
2.2.3.	Análise molecular do DNA através da técnica de RAPD.....	29
2.2.4.	Análise de dados.....	30
2.3.	Resultados e Discussão.....	31
2.4.	Conclusões.....	35
2.5.	Literatura citada.....	36

Capítulo 3. Ocorrência de Protozoários, Parasitóides e Fungos em *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)

3.1.	Introdução.....	41
3.2.	Material e Métodos.....	44
3.2.1.	Avaliação de inimigos naturais em populações de campo de <i>D. speciosa</i>	44
3.2.2.	Densidade do inóculo de fungos entomopatogênicos relacionada à área foliar.....	44
3.3.	Resultados e Discussão.....	45
3.4.	Conclusões.....	52
3.5.	Literatura citada.....	53

Capítulo 4. Eficiência de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em mistura com inseticidas no controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)

4.1.	Introdução.....	60
------	-----------------	----

4.2.	Material e Métodos.....	61
4.2.1.	Seleção de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> em <i>Diabrotica speciosa</i>	61
4.2.2.	Determinação da DL ₅₀ dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> em <i>Diabrotica speciosa</i>	64
4.2.3.	Determinação da DL ₅ dos inseticidas em <i>D. speciosa</i>	65
4.2.4.	Efeito de <i>Beauveria bassiana</i> em mistura com inseticidas na infecção de <i>Diabrotica speciosa</i>	66
4.2.4.1.	Infecção de <i>Diabrotica speciosa</i> após aplicação de <i>Beauveria bassiana</i> em mistura com inseticidas em laboratório.....	66
4.2.4.2	Infecção de <i>Diabrotica speciosa</i> após aplicação de <i>Beauveria bassiana</i> em mistura com inseticidas em casa de vegetação.....	68
4.2.5.	Consumo foliar de <i>Diabrotica speciosa</i> em trifólios de soja tratados com fungos e inseticidas.....	69
4.3.	Resultados e Discussão.....	69
4.4.	Conclusões.....	108
4.5.	Literatura citada.....	109
	Considerações finais	115

Resumo

Diabrotica speciosa (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) é um inseto polífago considerado praga importante na cultura de milho (*Zea mays* L.). Na soja [*Glycine max* (L.) Merrill], os adultos podem causar danos ao desenvolvimento das plantas quando o ataque é intenso. Este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar populações geográficas de *D. speciosa* mediante a utilização de marcadores moleculares à base de RAPD, bem como estabelecer a ocorrência dos inimigos naturais em populações de campo e determinar o potencial de controle de isolados de fungos entomopatogênicos à este inseto através da utilização conjunta com inseticidas químicos em baixas dosagens. Utilizando marcadores moleculares pela técnica de RAPD constatou-se que houve a formação de grupos diferentes dentro de cada população geográfica, embora a presença de indivíduos de outras regiões nos agrupamentos indique uma frequência elevada de migração desses insetos entre locais distantes. Os insetos das populações de Florestópolis (PR), Primavera do Leste (MT), Paulínia (SP) e Ponta Grossa (PR) formaram agrupamentos com índices de similaridade de Dice próximos a 37 %, indicando elevado polimorfismo entre os indivíduos. Os indivíduos da população da Warta (PR) mostraram baixo índice de similaridade (8 %). Entre os inimigos naturais encontrados sobre *D. speciosa*, a maior ocorrência foi do protozoário *Gregarina* (97 %) seguida por moscas parasitóides do gênero *Celatoria* sp. (Diptera: Tachinidae) (26 %). Os maiores índices de parasitismo ocorreram durante os meses de fevereiro e março/2004. Durante a safra de soja 2003/04 a maior ocorrência de fungos entomopatogênicos nos folíolos de soja, foi do fungo *Beauveria* sp. Este resultado está relacionado com a ocorrência natural do fungo sobre *D. speciosa* (10 %). Para avaliar o potencial de controle de fungos entomopatogênicos à vaquinha patriota, isolados de *Beauveria bassiana* e de *Metarhizium anisopliae* foram utilizados para os testes de patogenicidade. Os isolados de *B. bassiana* com maior virulência foram utilizados em bioensaios com os inseticidas fipronil e imidacloprid. Os bioensaios foram realizados em laboratório e em casa de vegetação. Apesar da germinação dos fungos não ter sido afetada pelos inseticidas, os tratamentos de fungos em mistura com os

inseticidas não apresentaram efeito sinérgico no controle de *D. speciosa*. Foi observado que os insetos apresentaram um maior consumo de plantas pulverizadas com fipronil do que daquelas com imidacloprid.

Abstract

Diabrotica speciosa (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) is a polyphagous insect and important pest on corn (*Zea mays* L.). In soybean [*Glycine max* (L.) Merrill], the adults cause yield reduction when high population density occurs. The aim of this work was to characterize geographically populations of *D. speciosa* using RAPD molecular markers, as well to determine the occurrence of natural enemies on field populations and determine the control potential of entomopathogenic fungi to this insect, using combination fungi with low dosages of insecticides. The analyses with RAPD markers showed that the individuals were clustered separately inside each geographic population, although some specimens clustered with individuals from other regions. This fact suggests a high level of migration between distant regions. The insects from Florestópolis (PR), Primavera do Leste (MT), Paulínia (SP) e Ponta Grossa (PR) clustered with Dice's similarity near 37 %, indicating high polymorphism between this individuals. The individuals from Warta (PR) showed low similarity (8 %). Among the natural enemies of *D. speciosa*, the most important were the *Gregarina* protozoa (97%) and *Celatoria* sp. (Diptera: Tachinidae) (26%). The highest parasitism and infection rates occurred on February and March of 2004. The number of *B. bassiana* colony forming units on the leaves were high during the period that the infection on *D. speciosa* reach a maximum of 10 % prevalence. To evaluate the entomopatogenic fungi potencial to control *D. speciosa*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates were used in the pathogenicity tests. The most virulent *B. bassiana* isolates were used in bioassays with fipronil and imidacloprid insecticides. The bioassays were done in laboratory and greenhouse. Insecticides do not affect the fungus germination, but the combination of insecticides and fungi did not show synergistic effect on *D. speciosa* control. It was observed that the feeding activity was enhanced by fipronil applications compared with those plants treated with imidacloprid.

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1.	Origem, data de coleta e plantas hospedeiras das populações de <i>D. speciosa</i> analisadas com marcadores moleculares para avaliação de variabilidade intraespecífica.....	28
Tabela 2.	Número de bandas geradas cada iniciador utilizado no estudo de variabilidade genética entre populações de <i>D. speciosa</i>	31
Tabela 3.	Distância (km) entre as localidades onde foram coletadas as populações de <i>D. speciosa</i>	35

Capítulo 3

Tabela 1.	Lista de inimigos naturais de <i>Diabrotica speciosa</i> registrados para a América do Sul.....	43
-----------	---	----

Capítulo 4

Tabela 1.	Lista de isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos ensaios.....	64
Tabela 2.	Mortalidade total e confirmada (% média \pm EP) de adultos de <i>Diabrotica speciosa</i> durante 15 dias após inoculação com isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i>	72
Tabela 3.	Mortalidade (% média \pm EP) de adultos de <i>Cerotoma arcuata</i> durante 15 dias após inoculação com isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	80
Tabela 4.	DL ₅₀ de <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de <i>Diabrotica speciosa</i> expostos a diferentes doses de conídios, com base na	

	mortalidade total (com e sem sinais do patógeno) 7 dias após inoculação.....	83
Tabela 5.	DL ₅₀ de <i>Beauveria bassiana</i> sobre adultos de <i>Diabrotica speciosa</i> expostos a diferentes doses de conídios, com base na mortalidade confirmada (com sinais do patógeno) 7 dias após inoculação.....	83
Tabela 6.	Doses (ng i.a./inseto) de fipronil em adultos de <i>Diabrotica speciosa</i> 96 horas após inoculação.....	84
Tabela 7.	Doses (ng i.a./inseto) imidacloprid sobre adultos de <i>Diabrotica speciosa</i> 96 horas após inoculação.....	84
Tabela 8.	Germinação dos conídios de <i>Beauveria bassiana</i> após 24 horas. Os conídios foram nebulizados sobre lâminas com meio de cultura BDA e sulfato de streptomicina após 4 horas de contato com o inseticida fipronil.....	88
Tabela 9.	Germinação dos conídios de <i>Beauveria bassiana</i> após 24 horas. Os conídios foram nebulizados sobre lâminas com meio de cultura BDA e sulfato de streptomicina após 4 horas de contato com o inseticida imidacloprid.....	89
Tabela 10.	Peso micelial (g) de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> em meio de cultura líquido batata-dextrose e sulfato de streptomicina, após 10 dias de agitação contínua.....	89
Tabela 11.	Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média ± DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb59 e sua compatibilidade com fipronil durante 10 dias de avaliação em laboratório.....	90
Tabela 12.	Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média ± DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb61 em compatibilidade com fipronil durante	

10 dias de avaliação em laboratório.....	91
Tabela 13. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb467 em compatibilidade com fipronil durante 10 dias de avaliação em laboratório.....	92
Tabela 14. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb59 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.....	94
Tabela 15. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb61 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.....	95
Tabela 16. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb467 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.....	96
Tabela 17. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de <i>Cerotoma arcuata</i> em tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb61 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.....	99
Tabela 18. Mortalidade total (com e sem sinais do patógeno) (média % \pm DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com isolados de <i>Beauveria bassiana</i> em mistura com inseticidas durante 10 dias de avaliação em casa de vegetação.....	102
Tabela 19. Mortalidade confirmada (com sinais do patógeno) (média % \pm DP) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos com isolados de <i>Beauveria bassiana</i> em mistura com inseticidas durante 10 dias	

de avaliação em casa de vegetação.....	103
Tabela 20. Área foliar de soja consumida por 5 adultos de <i>Diabrotica speciosa</i> após períodos de 24 e 48 horas, sob condições controladas de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60 % UR e fotofase de 14 horas.....	106
Tabela 21. Mortalidade média (%) de <i>D. speciosa</i> alimentada com trifólios de soja pulverizados com inseticidas e fungos, sob condições controladas de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60 % UR e fotofase de 14 horas.....	106

Lista de Figuras

Capítulo 2

- Figura 1. Amostras de DNA de *D. speciosa* da região de Warta, Londrina (PR) amplificadas com o iniciador OPC-04 através da técnica de RAPD. λ DNA foi utilizado como marcador molecular (M). Controle negativo (N)..... 32
- Figura 2. Amostras de DNA de *D. speciosa* da região de Paulínia (SP) amplificadas com o iniciador OPC-04 através da técnica de RAPD. λ DNA foi utilizado como marcador molecular (M). Controle negativo (N)..... 32
- Figura 3. Índice de Similaridade de Dice. Dendrograma de populações de *Diabrotica speciosa* PG = Ponta Grossa (PR), Flo = Florestópolis (PR), W = Warta, Londrina (PR), Pau = Paulínia, (SP) e PL = Primavera do Leste (MT)..... 33

Capítulo 3

- Figura 1. Mosca parasitóide *Celatoria* sp. (Diptera: Tachinidae)..... 46
- Figura 2. Prevalência (%) de *Celatoria* sp. sobre populações de *Diabrotica speciosa* durante a safra de soja (2003/04) em Londrina, PR..... 46
- Figura 3. Mosca parasitóide *Strongygaster* sp. (Diptera: Tachinidae) registrada em adulto de *Cerotoma arcuata*, em Londrina, PR..... 47
- Figura 4. Trofozoítos do protozoário *Gregarina* sp. encontrados na hemolinfa de *Diabrotica speciosa* (aumento 100X)..... 49
- Figura 5. Prevalência (%) de *Gregarina* sp. em populações de *Diabrotica speciosa* durante a safra de soja (2003/04), em Londrina. PR..... 50

Figura 6.	Oocisto de <i>Gregarina</i> encontrado na hemolinfa de <i>Diabrotica speciosa</i> (aumento 400X).....	50
Figura 7.	Densidade do inóculo dos fungos entomopatogênicos <i>Beauveria</i> sp. e <i>Metarhizium anisopliae</i> (UFC) em folíolos de soja ao longo da safra de soja 2003/04 em Londrina, PR.....	52

Capítulo 4

Figura 1.	Adulto de <i>Diabrotica speciosa</i> com conidiogênese de (a) <i>Beauveria bassiana</i> e (b) <i>Metarhizium anisopliae</i>	71
Figura 2.	Mortalidade média (%) de <i>Diabrotica speciosa</i> nos tratamentos com <i>Beauveria bassiana</i> em mistura com fipronil, 7 dias após inoculação. Médias seguidas de mesma letra nas barras de mesma cor, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	93
Figura 3.	Mortalidade média (%) de <i>Diabrotica speciosa</i> em tratamentos de <i>Beauveria bassiana</i> em compatibilidade com imidacloprid 7 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra nas barras de mesma cor, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	97
Figura 4.	Mortalidade média (%) de <i>Cerotoma arcuata</i> nos tratamentos com o isolado de <i>Beauveria bassiana</i> CNPSo-Bb61, imidacloprid, CNPSo-Bb61 + imidacloprid, e testemunha aos 7 dias de avaliação em laboratório. Médias seguidas de mesma letra nas barras de mesma cor, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	98
Figura 5.	Consumo foliar de <i>Diabrotica speciosa</i> em plantas de soja (cultivar Paraná) pulverizadas com: (a) fungos em mistura com o inseticida fipronil comparadas com plantas sem tratamento;	

(b) fungos em mistura com o inseticida imidacloprid comparadas com plantas sem tratamento; (c) inseticidas comparadas com plantas sem tratamento; (d) fungos comparadas com plantas sem tratamento.....	105
---	-----

Capítulo 1. Introdução e Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução

O gênero *Diabrotica* (Chevrolat, 1844) (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) é composto por 338 espécies, sendo a maior diversidade de espécies encontrada na região Neotropical, e apenas sete espécies são encontradas na região Neártica. O gênero é separado em três grupos: *signifera*, *fucata* e *virgifera* (Wilcox 1972). Nos dois últimos, encontram-se insetos pragas de importância econômica e por esse motivo são os mais estudados.

Uma das espécies do grupo *fucata* mais conhecidas, e com ocorrência em todos os estados brasileiros, é *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Krysan, 1986), um crisomelídeo polífago conhecido popularmente como vaquinha patriota. Esse inseto é considerado praga importante do milho (*Zea mays* L.), causando durante sua fase larval danos consideráveis ao sistema radicular. Na soja [*Glycine max* (L.) Merrill], os adultos podem causar danos ao desenvolvimento das plantas quando o ataque é intenso (Gallo *et al.* 2002). Segundo Hofmann-Campo *et al.* (2000), esse inseto vem causando preocupação a sojicultores da região oeste e sudoeste do Paraná.

Os insetos, em geral, têm suas populações controladas naturalmente por predadores, parasitóides e doenças, se condições adequadas forem oferecidas. Afortunadamente, a conscientização do impacto ambiental causado pelos produtos químicos vem aumentando entre a população, e novas formas de controle de pragas baseadas em procedimentos biológicos vêm sendo utilizadas (Charnley 1997).

Um dos métodos de controle biológico mais utilizados é o uso de fungos entomopatogênicos, sendo os mais estudados *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Os fungos não precisam ser ingeridos para causar doenças aos insetos, eles podem invadir seus hospedeiros através das membranas segmentares do exoesqueleto, todavia a umidade relativa e a

temperatura podem ser fatores limitantes ao seu desenvolvimento. Dessa forma, algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas para aumentar a eficiência dos fungos, entre as quais a combinação de fungos com baixas dosagens de inseticidas (Charnley 1997). O uso adequado de produtos químicos e a associação desses com inimigos naturais fazem parte de programas de manejo de controle.

Considerando a ampla distribuição desse inseto nos estados brasileiros e sua importância econômica foi realizado o estudo da variabilidade genética entre indivíduos geograficamente distintos mediante a utilização de marcadores moleculares à base de RAPD, de maneira a fornecer informações básicas para implementar os programas de controle, com dados de dispersão, diferenciação de espécies crípticas e caracterização de raças. Outro objetivo foi estabelecer a ocorrência de seus inimigos naturais e avaliar o potencial de controle de fungos entomopatogênicos em misturas com inseticidas sobre esse inseto. Devido ao elevado custo da produção de fungos entomopatogênicos e sua eficiência dependente das condições ambientais, a utilização conjunta do inseticida químico em baixas dosagens com o agente de controle biológico poderiam compensar essas deficiências com um menor impacto ambiental.

1.2. Revisão bibliográfica

1.2.1. Importância econômica de *Diabrotica speciosa*

O adulto desse inseto, com aproximadamente 4,5 mm de comprimento, é popularmente conhecido como vaquinha patriota pela sua cor verde, com três manchas amarelas sobre os élitros, sendo a basal mais longa e avermelhada, principalmente na região do calo humeral. Possui antenas escuras, sendo os três segmentos basais mais claros principalmente o escapo; cabeça variando do pardo avermelhado ao negro; labro, escutelo, metatórax, tíbias e tarsos negros (Marques 1941). A postura é realizada no solo, com cerca de 30 ovos/massa. O período de

incubação dos ovos é de 3 a 4 dias, e após esse período as larvas se desenvolvem passando por três instares para pupa e adulto (Milanez 1995). As larvas são brancas, tendo o tórax, a cabeça e as pernas torácicas pretas. Segundo Ávila & Parra (2002), a duração da fase larval dos insetos e seu tamanho variam de acordo com a planta hospedeira em que o inseto se encontra, de forma que a duração do período larval em soja é de aproximadamente 27 dias.

D. speciosa é um inseto polífago, sendo que os adultos têm preferência alimentar por folhas de leguminosas (folhas largas), como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em relação às gramíneas (folhas estreitas) (Marques 1999) e, ainda, pode ser encontrado em lentilha (*Lens esculenta* N.), batatinha (*Solanum tuberosum* L.), curcubitáceas como melancia (*Citrullus lanatus* Thumb. Mansf.), melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) e abóbora (*Curcubita* spp.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berinjela (*Solanum melongena* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) (Gallo *et al.* 2002) girassol (*Helianthus annuus* L.), banana (*Musa* spp.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (Zucchi *et al.* 1993) uva (*Vitis vinifera* L.) (Roberto *et al.* 2001), trigo (*Triticum aestivum* L.) (Cividanes *et al.* 1987) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (Bertels 1962).

Segundo Milanez (1995b), alguns fatores como sistemas de produção de milho, novos híbridos, manejo do solo, rotação com outras culturas e baixo índice de parasitismo foram determinantes para o desenvolvimento e adaptação dessa praga à cultura do milho, causando danos consideráveis ao sistema radicular dessa gramínea à semelhança de outras espécies do mesmo gênero nos EUA (Marques *et al.* 1999). Nos EUA, Metcalf (1986) estimou em um bilhão de dólares os custos com inseticidas e as perdas na produção devido ao ataque de espécies do gênero *Diabrotica*. O dano mais severo causado pelas larvas de *D. speciosa* à raiz do milho, é tornar as plantas mais suscetíveis ao tombamento (pescoço de ganso), aumentando as perdas na colheita mecânica, bem como facilitar a entrada de fitopatógenos através dos orifícios que fazem ao se alimentar das raízes, reduzindo a produtividade da planta (Silva 1995).

1.2.2. Uso de marcadores moleculares RAPD em estudos de variabilidade genética

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, foi um dos passos revolucionários na genética molecular, pois se tornou possível a produção de múltiplas cópias de seqüências específicas de DNA sem a necessidade de clonar esses segmentos (Alberts *et al.* 1994). A PCR explora as características da duplicação do DNA e consiste em desnaturar o DNA genômico, submetendo-o a uma alta temperatura e, desse modo, permitindo que as duas fitas simples originadas sejam duplicadas. Nesse ponto reside um dos trunfos dessa técnica, que é a utilização de uma enzima extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, a *Taq* polimerase. Essa bactéria habita locais quentes e sua enzima suporta temperaturas de até 94 °C, sendo que sua temperatura ótima é de 72 °C. Essa peculiaridade permite que o processo seja realizado em aparelho termociclador com programas pré-estabelecidos com alterações de temperatura. Além da *Taq* polimerase, são necessários dois iniciadores de seqüência conhecida, que irão anelar-se às fitas simples do DNA em suas extremidades 3', que obviamente tenham seqüências complementares, e direcionar a polimerase na síntese da seqüência desejada. Ambas as fitas servem como moldes e o resultado de "n" ciclos de PCR é a formação de 2ⁿ duplas fitas de DNA, que são cópias da seqüência flanqueada pelos iniciadores (Alberts *et al.* 1994).

As vantagens dessa técnica são muitas, entre elas a quantidade de DNA necessária para a reação, na ordem de dezenas de nanogramas. Entre as principais utilidades da reação em cadeia da polimerase estão os estudos de evolução molecular, diferenciação de grupos taxonômicos, identificação de genes específicos, entre outras.

As limitações da PCR residem no fato de que a contaminação com DNA alheio pode prejudicar a análise dos resultados e da necessidade de se conhecer a seqüência que flanqueia determinado segmento a ser amplificado para que os oligonucleotídeos possam ser construídos. Para resolver esse problema

desenvolveu-se uma técnica denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) “Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso” que utiliza oligonucleotídeos (iniciadores) curtos (10 nucleotídeos) de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação (Ferreira & Grattapaglia 1998).

Essa técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. Williams *et al.* (1990) denominaram a tecnologia como RAPD, enquanto Welsh & McClelland (1990) propuseram a denominação AP-PCR (*Arbitrary Primed-Polymerase Chain Reaction*), “Reação em Cadeia da Polimerase com Oligonucleotídeos Arbitrários”, já que os oligonucleotídeos possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos do genoma. Nessa técnica, a PCR utiliza apenas um oligonucleotídeo arbitrário por reação e a amplificação ocorrerá quando esta mesma seqüência reconhecer um sítio de homologia em uma das fitas e também o mesmo sítio, com orientação invertida, na outra fita da molécula de DNA. Os produtos da amplificação são submetidos à eletroforese em gel de agarose, de maneira que os fragmentos de tamanhos distintos resultem em bandas no gel. Cada banda é resultante da interação entre o oligonucleotídeo e o DNA molde. Se entre os sítios para o oligonucleotídeo ocorrer a inserção de alguma base, o fragmento gerado será mais longo e a banda produzida por sua amplificação terá maior peso molecular, por outro lado, se houver uma deficiência, o fragmento será menor e a banda terá também menor peso molecular. Os polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro genótipo (Dalzoto 1999).

As aplicações dos marcadores moleculares RAPD incluem: obtenção de “impressões digitais” (*fingerprintings*) genômicas de indivíduos, variedades e populações; análise de estrutura e diversidade genética em populações naturais; definição das relações filogenéticas entre diferentes espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genética e a localização de genes (Ferreira & Grattapaglia 1998).

1.2.3. Estudos moleculares realizados com espécies do gênero *Diabrotica*

O gênero *Diabrotica* (Chevrolat, 1844) é composto por 338 espécies (Wilcox 1972) caracterizadas pela similaridade morfológica entre os indivíduos, comum em outros gêneros da subfamília Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) (Wilcox 1965). Por esse motivo, há grande dificuldade na identificação das espécies, de modo que esse gênero nunca foi revisado sistematicamente (Krysan 1986). Frente à dificuldade na identificação das espécies, estudos de ecologia, evolução e relação filogenética entre os indivíduos limitam-se àquelas espécies reconhecidas como pragas de importância agrícola, geralmente as mais estudadas.

Um dos complexos de pragas mais importantes economicamente para a cultura de milho dos Estados Unidos é composto por espécies desse gênero. Por esse motivo, o uso de marcadores moleculares vem sendo a ferramenta utilizada por pesquisadores para solucionar problemas como identificação de espécies, bem como estudar relações filogenéticas entre os indivíduos, diversidade genética entre populações, entre outros (Francisco 2002, Silvestre 2002).

A maioria dos estudos realizados com indivíduos do gênero *Diabrotica* limita-se ao estudo das relações filogenéticas das espécies que ocorrem na América do Norte, bem como a identificação dessas espécies. Como exemplo, Szalanski & Powers (1996) utilizaram a técnica de PCR-RFLP para diferenciação de larvas de *D. undecimpunctata howardi*, *D. barberi* e *D. virgifera virgifera*, visto que a identificação de larvas desse gênero pode ser difícil e até mesmo impossível (Krysan 1986). A identificação de espécimes parcialmente destruídos também pode ser facilitada através desse método, pois uma pequena quantidade de tecido do inseto (perna, cabeça, antena) pode ser suficiente para realizar a análise molecular mediante a utilização da técnica de PCR.

Uma das vantagens do método é a rapidez e baixo custo para identificação das espécies (Taylor *et al.* 1996). Como exemplo, Roehrdanz (2003) comparou seqüências de nucleotídeos dos genes da enzima citocromo oxidase I (COI) e citocromo oxidase II (COII) para diferenciar larvas de *D. virgifera virgifera* e *D. barberi*, as quais podem ser encontradas nas mesmas áreas. Também testou

iniciadores específicos para cada espécie, permitindo maior rapidez para identificação de estágios imaturos. Essas seqüências do genoma do DNA mitocondrial são indicadas para estudos taxonômicos porque parecem evoluir mais rapidamente do que o genoma nuclear, podendo assim detectar diferenças mesmo entre espécies próximas (Francisco 2002).

Clark *et al.* (2001), baseados na seqüência da subunidade I da enzima citocromo oxidase e região intergênicas de genes ribossomais ITS 2, estudaram a filogenia de nove das dez espécies conhecidas que ocorrem nos EUA, e algumas espécies que ocorrem na Américas Central e do Sul. A análise dos resultados desse estudo colocou as espécies nos seus grupos morfológicos tradicionais e, ao contrário de Krysan *et al.* (1989), afirmam que as espécies da região Neártica não podem ser consideradas um grupo monofilético, pois verificaram que as espécies não podem ser separadas de acordo com a região geográfica em que se encontram. Szalanski *et al.* (2000) baseados em seqüências de rDNA e mtDNA confirmam a separação das espécies em grupos (*fucata* e *virgifera*), mostrando que *D. undecimpunctata howardi* e *D. balteata* formam um clado (grupo *fucata*) e *D. barberi*, *D. virgifera virgifera* e *D. virgifera zae* formam outro clado (grupo *virgifera*).

Poucos são os estudos sobre a variabilidade genética entre indivíduos geograficamente distintos. Szalanski *et al.* (1999), através da análise das regiões ITS 1 e de genes das subunidades ribossômicas do genoma mitocondrial, observaram maior variabilidade entre indivíduos de *D. virgifera zae* Krysan & Smith do que entre indivíduos geograficamente distintos de *D. virgifera. virgifera*. Baixos níveis de diversidade genética das regiões ITS1 e mtDNA entre indivíduos de populações amplamente dispersas têm sido relatadas para espécies de insetos que possuem grande mobilidade (migração). O fluxo gênico é aumentado pela migração em algumas espécies de insetos. A expansão geográfica das espécies de insetos pode ser favorecida pela introdução em novos habitats. Esses fatores podem contribuir para a falta de variação genética entre populações, como o caso de populações de *D. virgifera virgifera*. O baixo nível de diferenciação genética observado entre indivíduos de *D. virgifera virgifera* e *D. virgifera zae* Krysan &

Smith indica uma história evolucionária recente entre os indivíduos (Szalanski *et al.* 1999).

1.2.4. Ocorrência de inimigos naturais em *D. speciosa*

O uso de produtos químicos tem sido a principal forma de controle de insetos nos últimos 50 anos. Porém, com o surgimento da resistência aos inseticidas, ressurgência de pragas e conscientização do impacto ambiental causado pelos produtos agrícolas, a atenção às formas alternativas de controle de pragas baseado em procedimentos biológicos vem aumentando (Charnley 1997).

Devido à importância econômica das espécies do gênero *Diabrotica* e ao alto custo com produtos químicos utilizados para seu controle, a observação de seus principais inimigos naturais fornece informações para o aprimoramento de programas de controle biológico. A conservação e a utilização de agentes de controle biológico dentro dos agroecossistemas é uma das principais estratégias adotadas no manejo integrado de pragas (Batista Filho *et al.* 2003).

As espécies do gênero *Diabrotica* têm sido encontradas parasitadas por taquinídeos, nematóides, protozoários, fungos entomopatogênicos e um braconídeo (Kuhlmann & van der Burgt 1998).

Os taquinídeos parasitóides encontrados sobre *Diabrotica* são: na América do Sul, *Celatoria bosqi* Blanchard com parasitismo de 0,1 a 30,2% sobre *D. speciosa* (Heineck-Leonel & Salles 1997); no México, *Celatoria compressa* Wulp, com parasitismo de 10,2 % sobre *D. balteata* LeConte e *D. scutellata* Baly e 10,1 % sobre *D. tibialis* Baly (Eben & Barbercheck 1996), e na América do Norte, mais precisamente Carolina do Sul e do Norte, *Celatoria diabroticae* (Shimer) com índices de 3 a 15 % de parasitismo sobre *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber (Meinke & Gould 1987 citados por Krysan 1999).

Entre os fungos entomopatogênicos encontrados em *D. speciosa*, a espécie *Beauveria bassiana* foi observada em maior proporção em comparação com

Metarhizium anisopliae, sendo que *B. bassiana* pode causar mortalidade entre 5 e 10% (Hohmann & Carvalho 1989).

As espécies de protozoários do gênero *Gregarina* têm sido descritas e listadas como parasitas de besouros crisomelídeos, porém a taxonomia do grupo é bastante precária, pela falta de descrições e de taxonomistas desse grupo no Brasil. Segundo Clopton *et al.* (1992), existem mais de 1.400 nomes de espécies na literatura, porém o que geralmente ocorre é o uso do gênero como um nome coletivo do grupo para qualquer tipo de gregarina, sem se importar com suas características taxonômicas. Clopton *et al.* (1992) descreveram uma nova espécie de gregarina, *Gregarina coronata*, infectando *D. undecimpunctata howardi*. Este trabalho possui informações como estrutura do oocisto e os tamanhos morfométricos das fases de desenvolvimento endógeno, permitindo a identificação desse protozoário. Os protozoários do gênero *Gregarina* são comumente encontrados em criações de laboratório, tornando-se um problema, pois diminuem a fecundidade e aumentam a mortalidade dos insetos (Singh & Moore 1985).

Poucos são os inimigos naturais de *Diabrotica* spp. Segundo Metcalf (1994), esse fato é resultado, em grande parte, pela adaptação entre Galerucinae e Cucurbitaceae. Os insetos adultos alimentam-se de plantas dessa família e armazenam substâncias tóxicas (cucurbitacinas) em seus corpos gordurosos, as quais possuem propriedades deterrentes aos predadores, parasitóides e patógenos. Confirmando a teoria de Metcalf (1994), Tallamy *et al.* (1998) encontraram patogenicidade reduzida de *M. anisopliae* em ovos e larvas de *D. undecimpunctata howardi* que possuíam cucurbitacina armazenada.

1.2.5. Utilização de fungos entomopatogênicos em programas de controle de insetos

Os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* são deuteromicetos da família Moniliacea. Os deuteromicetos são considerados fungos imperfeitos por não apresentarem ciclo sexual. A reprodução desses

fungos ocorre por simples divisão mitótica, e os conídios são formados a partir de estruturas hifais diferenciadas, os conidióforos. Entretanto, foi descoberta uma forma alternativa de divisão celular em *B. bassiana*, permitindo que ocorra recombinação genética, o ciclo parassexual e sua variação, a parameiose (Paccola-Meirelles & Azevedo 1991, Dalzoto 1999). *B. bassiana* foi descrito pela primeira vez por Bassi, em 1835, como causador da “muscardina”, uma doença que atingia as lagartas do bicho-da-seda (Lepidoptera: Bombycidae).

Em 1879, Metschnikoff descreveu pela primeira vez o fungo *M. anisopliae* parasitando larvas do besouro *Anisoplia austriaca* Herbst, 1783 (Coleoptera: Scarabaeidae) denominando-o então, *Entomophthora anisopliae*. Após uma série de proposições de diversas denominações, Sorokin, em 1883, descreveu-o como *Metarhizium anisopliae* (Ribeiro, 2002).

Os fungos não precisam ser ingeridos para causar infecções aos insetos, sendo assim podem infectar estágios de insetos que não se alimentam, como ovos e pupas. O sítio de invasão é geralmente entre as peças bucais ou através dos espiráculos, onde a pouca esclerotinização facilita a penetração dos conídios. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* possuem conídios hidrofóbicos que se aderem à cutícula dos insetos através de interações não-específicas. A falha na adesão do conídio à cutícula do inseto pode ser um dos fatores de especificidade do fungo ao hospedeiro, dessa forma a cutícula do inseto também pode ser não somente a primeira, mas a maior barreira para invasão no hospedeiro (Charnley 1997). Além dos requisitos químicos, a topografia da cutícula também tem sido fator determinante na formação do apressório de adesão (St. Leger *et al.* 1991 citado por Sosa-Gómez 1997).

O ciclo da relação fungo-hospedeiro está completo quando ocorre a esporulação no cadáver do inseto infectado, permitindo a transmissão horizontal do entomopatógeno na população do inseto (Charnley 1997). Mas, para que a doença causada pelo fungo no inseto alcance a fase de esporulação, vários fatores estão relacionados, entre os quais as condições ambientais, nutricionais e bióticas (Alves & Lecuona 1998). Fernandes *et al.* (1989) avaliaram o efeito da temperatura, umidade relativa e concentração do inóculo de *B. bassiana* para o

controle de *Cerotoma arcuata*, outro crisomelídeo, e relataram que o desenvolvimento da infecção e morte do inseto independente da umidade relativa é devido à existência, na superfície do inseto, de uma camada de ar com umidade alta, pouco influenciada pela umidade relativa atmosférica. Segundo Fargues *et al.* (1997), a média de crescimento em laboratório de isolados de fungos de diferentes regiões foi significativamente afetada pela temperatura e isolado do fungo. Em contrapartida, Luz *et al.* (1998) encontraram diferença na virulência de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae) quando submetidos à baixa umidade relativa (50%). Os isolados de *B. bassiana* mostraram-se mais virulentos quando submetidos a temperaturas de 25 e 30 °C do que a 15 e 20 °C. Sosa-Gómez & Alves (2000) concluíram que o número de conídios de *B. bassiana* formados foi função da umidade relativa, temperatura, isolado de fungo, espécie hospedeira, fase do hospedeiro e tempo de infecção.

O impacto nas populações de insetos causado por epizootias naturais, especialmente por fungos e vírus, demonstra o potencial desses microrganismos para o controle de pragas e, em meados de 1960, vários produtos à base dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram desenvolvidos e registrados (Lacey & Goettel 1995). Os exemplos mais importantes de programas que utilizam fungos entomopatogênicos se desenvolvem na China, África e Colômbia. No Brasil, a empresa BIOTECH produz o fungo *M. anisopliae*, recomendado para o controle de cigarrinhas das pastagens e cana-de-açúcar (Sosa-Gómez 1999).

Devido aos inúmeros fatores que podem interferir no processo infectivo dos fungos entomopatogênicos, algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas para aumentar a eficiência dos mesmos e dessa forma aumentar a mortalidade dos insetos, como, por exemplo, a combinação de fungos com baixas dosagens de inseticidas. Em 1982, Dr. Walter M. Zeck, membro do Grupo de Pesquisas da Bayer, descobriu que doses subletais de inseticidas com componentes de nitroguanidina, incluindo imidacloprid, aumentavam a suscetibilidade de cupins subterrâneos a vários fungos oportunistas, incluindo *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Quintela & McCoy 1998). Essa abordagem está baseada na suposição de que o inseto se torna mais vulnerável ao ataque do entomopatógeno quando submetido

a outro agente estressor. A etapa inicial para realizar estudos de sinergismo é a determinação da compatibilidade do inseticida com o organismo entomopatogênico. Gardner & Kinard (1998) não encontraram diferenças significativas na resposta dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* em estudos de compatibilidade com imidacloprid, utilizando diferentes métodos de avaliação, germinação e crescimento. Quintela & McCoy (1998a) encontraram efeito sinérgico entre *B. bassiana* e imidacloprid na mortalidade de *Diaprepes abbreviatus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae) quando incorporados no solo. O tempo letal causado pelo fungo *M. anisopliae* a *D. abbreviatus* foi menor quando associado a imidacloprid em baixas dosagens (Quintela & McCoy 1997). O conhecimento da compatibilidade de fungos e inseticidas pode facilitar os modos de aplicação dos fungos, visto que estes podem ser aplicados da mesma maneira que os pesticidas químicos, através de pulverizadores (Wilson, 1970). Todavia, alguns estudos revelam que fungicidas, herbicidas e inseticidas podem evitar a germinação e/ou crescimento micelial do fungo *in vitro* (Hirose *et al.* 2001, Oliveira *et al.* 2003) enquanto outros (Boucias *et al.* 1996, Moino Jr. & Alves 1998, Furlong & Groden 2001) revelaram o efeito sinérgico entre fungos e inseticidas.

Alves *et al.* (1998) sugerem uma padronização dos estudos de compatibilidade para melhor comparação entre os resultados obtidos. Esse sistema baseia-se em valores médios de porcentagem de conidiogênese e crescimento vegetativo das colônias dos fungos, para testes *in vitro*, realizados em meio de cultura sólido. O índice leva em conta a produção de conídios como fator mais importante, quando comparado com o crescimento vegetativo, já que são os propágulos do fungo que vão atuar no desenvolvimento da doença. Porém, existe a possibilidade de o inseticida precipitar no meio de cultura, não permitindo total contato do fungo inoculado no meio com o produto químico (Sosa-Gómez, comunicação pessoal). Portanto, existem outros métodos para avaliação da compatibilidade de fungos e inseticidas como o crescimento do patógeno em meio líquido contendo o produto a ser avaliado, a implantação de pedaços de papel impregnados com os produtos no meio de cultura, entre outros (Alves *et al.* 1998).

Os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são habitantes naturais da fauna do solo (Yaginuma *et al.* 1994), portanto o incremento de propágulos dos fungos ao solo vem sendo utilizado como alternativa para aumentar a eficiência dos fungos entomopatogênicos no controle de insetos. Krueger & Roberts (1997) demonstraram que, através da incorporação de micélio seco ao solo, *M. anisopliae* foi eficiente no controle de larvas de *D. undecimpunctata* Mannerheim em cultura de milho, protegendo as raízes dos danos causados por esses insetos. Bruck & Lewis (2001), utilizando o mesmo método, avaliaram *B. bassiana* para o controle de *D. virgifera virgifera* LeConte e *D. barberi* Smith & Lawrence e encontraram baixa infectividade do fungo ao inseto, em condições de semeadura direta e convencional, revelando que a porcentagem de infecções não foi afetada pela prática cultural adotada. Entretanto Sosa-Gómez *et al.* (2001) observaram que a maior incidência dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* no solo ocorreu sob condições de semeadura direta em cultura de soja, mas a ocorrência dos fungos sobre os folíolos não foi afetada pelas condições de semeadura direta ou modo convencional. Bidochka *et al.* (1998) examinaram amostras de solo da região de Ontario, Canadá, e registraram a maior ocorrência de *B. bassiana* em solos de ambientes naturais, enquanto *M. anisopliae* ocorreu mais freqüentemente em solos de áreas cultivadas. Com base nesses resultados, os autores inferem que o fungo *B. bassiana* ocorreu com maior freqüência em solos que não sofreram os distúrbios ocasionados pelas práticas culturais.

1.3. Literatura citada

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Ralf, K. Roberts & J.D. Watson. 1994. (eds.) Molecular biology of the cell. 3 ed. New York, Garland Publishing, 1294p.

Alves, S.B., A. Moino Jr. & J.E.M. Almeida. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos p. 217-238. In: Alves, S.B. (eds), Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

Ávila, C.J., Parra, J.R.P. 2002. Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes hospedeiros. Cienc. Rural 32: 739-743.

Batista Filho, A., Z.A. Ramiro, J.E.M. Almeida, L.G. Leite, E.R.R. Cintra & C. Lamas. 2003. Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. Arq. Inst. Biol. 70: 61-67.

Bertels, A. 1962. Insetos – hóspedes de solanáceas. Iheringia 25: 01-11.

Bidochka, M.J., J.E. Kasperski, & G.A.M. Wild. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. Can. J. Bot. 76: 1198-1204.

Boucias, D.G., C. Stokes, G. Storey & J.C. Pendland. 1996. The effects of imidacloprid on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the mycopathogen *Beauveria bassiana*. Planzenschulz-Nachr. Bayer 49: 103-144.

Bruck, D.J. & L.C. Lewis. 2001. Adult *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) infection at emergence with indigenous *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). J. Invertebr. Pathol. 77: 288-289.

- Cabrera Walsh, G. 2004.** Distribution, host specificity, and overwintering of *Celatoria bosqi* Blanchard (Diptera: Tachinidae), a South American parasitoid of *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae). Biol. Contr. 29: 427-434.
- Charnley, A.K. 1997.** Entomopathogenic fungi and their role in pest control. Chapter 12. pp. 186-198. In.: The Mycota IV. Environmental and microbial relationships. Wicklow/Soderstrom (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Cividanes, F.J., L.H. Silvestre & M.J. Thomazini. 1987.** Levantamento populacional de insetos na cultura de trigo. Semina. 8: 14-16.
- Clark, T.L.; J. Meinke & J.E. Foster. 2001.** Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. Insect. Mol. Biol. 10: 303-314.
- Clopton, R.E., T.J. Percival & J. Janovy, Jr. 1992.** *Gregarina coronata* n. sp. (Apicomplexa: Eugregarinida) described from adults of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Protozool. 39: 417-420.
- Dalzoto, P.R. 1999.** Investigação dos processos de recombinação no deuteromiceto *Beauveria bassiana* Vuill por meio de RAPD. Dissertação de Mestrado. Curitiba, UFPR, p. 3-25.
- Eben, A. & M.E. Barbercheck. 1996.** Field observations on host plant associations and natural enemies of diabroticite beetles (Coleoptera: Luperini) in Veracruz, Mexico. Acta Zool. Mex. 67: 47-65.

- Fargues, J., M.S. Goettel, N. Smits, A. Ouedraogo & M. Rougier. 1997.** Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia*, 89: 383-392.
- Fernandes, P.M., S.B. Alves, B.P. Magalhães & J.C. Lord. 1989.** Efeitos da combinação de temperatura, umidade relativa e concentração de inóculo de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. na mortalidade de *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1791) (Coleoptera: Chrysomelidae). *An. Soc. Entomol. Brasil*. 18: 313-319.
- Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1998.** Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª. ed. Brasília: Embrapa – Cenargen. (Embrapa – Cenargen Documento 20). 220p.
- Francisco, F.O. 2002.** Diversidade genética de populações da abelha sem ferrão *Plebeia remota*: análise do DNA mitocondrial e microssatélites. Dissertação de Mestrado, São Paulo, USP, 140p.
- Furlong, M.J. & E. Groden. 2001.** Evaluation of synergistic interactions between the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid, and cyromazine. *J. Econ. Entomol.* 94: 344-356.
- Gallo, D. (in memoriam), O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. de Baptista, E.Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** (eds.) *Entomologia Agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Gardner, W.A. & D.J. Kinard. 1998.** *In vitro* germination and growth response of two entomogenous fungi to imidacloprid. *J. Entomol. Sci.* 33(3): 322-324.

- Heineck, M.A., & E. Corseuil. 1995.** Ciclo vital e consumo alimentar de adultos de *Cerotoma arcuata tingomariana* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) em soja. An. Soc. Entomol. Brasil. 24: 579-586.
- Heineck-Leonel, M.A. & E. Corseuil. 1997.** Flutuação populacional de *Cerotoma arcuata tingomariana* (Bechyné) (Coleoptera: Chrysomelidae) em soja. An. Soc. Entomol. Brasil. 26: 183-185.
- Heineck-Leonel, M.A., L.A.B. Salles. 1997.** Incidência de parasitóides e patógenos em adultos de *Diabrotica speciosa* (Germ.) (Coleoptera: Chrysomelidae) na região de Pelotas, RS. An. Soc. Entomol. Brasil 26: 81-85.
- Hirose, E., P.M.O.J. Neves, J.A.C. Zequi, L.H. Martins, C.H. Peralta & A. Moino Jr. 2001.** Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. Braz. Arch. Biol. Techn. 44: 419-423.
- Hoffmann-Campo, C.B., F. Moscardi, B.S. Corrêa-Ferreira, L.J. Oliveira, D.R. Sosa-Gómez, A.R. Panizzi, I.C. Corso, D.L. Gazzoni & E.B. de Oliveira (in memorian). 2000.** Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Circular Técnica 30, Embrapa Soja, 70p.
- Hohmann, C.L. & S.M. Carvalho. 1989.** Pragas e seu controle. In O feijão no Paraná. Circular Técnica 63, IAPAR, 303p.
- Kogan, M, G.P. Waldbauer, G. Boiteau & C.E. Eastman. 1980.** Sampling bean leaf beetles on soybean. p. 201-236. In Kogan, M. & D.C. Herzog (eds.). Sampling methods in soybean entomology. New York, Spring-Verlag, 587p.

- Krafsur, E.S. 1995.** Gene flow between univoltine and semivoltine northern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 88: 699-704.
- Krafsur, E.S., P. Nariboli & J.J. Tollefson. 1993.** Gene diversity in natural *Diabrotica barberi* Smith and Lawrence populations (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 490-496.
- Krueger, S.R. & D.W. Roberts. 1997.** Soil treatments with entomopathogenic fungi for corn rootworm (*Diabrotica* spp.) larval control. *Biological Control* 9: 67-74.
- Krysan, J.L., I.C. McDonald & J.H. Tumlinson. 1989.** Phenogram based on allozymes and its relationship to classical biosystematics and pheromone structure among eleven *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82: 574-581.
- Krysan, J.L. 1999.** Selected Topics in the Biology of *Diabrotica*, p. 479-513. In *Advances in Chrysomelidae biology 1*. Cox, M.L. (eds.). Leiden, Backhuys Publishers, 671p.
- Kuhlmann, U., van der Burgt, W.A.C.M. 1998.** Possibilities for biological control of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte, in Central Europe. *Biocontr. News Inf.* 19: 59-68.
- Lacey, L.A. & M.S. Goettel, 1995.** Current developments in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century. *Entomophaga*. 40: 3-27.
- Luz, C., M.S. Tigano, I.G. Silva, C.M.T. Cordeiro & S.M. Aljanabi. 1998.** Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 93: 839-846.

- Marques, M.A. 1941.** Contribuição ao estudo dos crisomelídeos do gênero *Diabrotica*. Bol. Esc. Nac. Agron. 2: 61-117.
- Marques, G.B.C., C.J. Ávila & J.R.P. Parra. 1999.** Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho. Pesq. Agropec. Bras. 34: 1983-1986.
- McDonald, I.C., J.L. Krysan & O.A. Johnson. 1985.** Genetic variation within and among geographical populations of *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 78: 271-278.
- Metcalf, R.L. 1986.** Foreword, p. vii-xvi. In J.L. Krysan & T.A. Miller (eds.). Methods for the study of *Diabrotica*. New York, Springer-Verlag, 260p.
- Metcalf, R.L. 1994.** Chemical ecology of Diabroticites. In: Jolivet, P.H., M.L. Cox, & E. Petitpierre. Novel aspects of the biology of Chrysomelidae. Series Entomologica 50, Kluwer, 582p.
- Milanez, J.M. 1995a.** Bioecologia de *Diabrotica speciosa*, p. 44-45. In Resumos da Reunião Brasileira de insetos de solo V. Dourados, Embrapa CPDA, Documento 8.
- Milanez, J.M. 1995b.** Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae). Tese de Doutorado, Piracicaba, ESALQ, 102p.
- Moino Jr., A. & S.B. Alves. 1998.** Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). An. Soc. Entomol. Brasil 27: 611-619.

- Nava, D.E. & Parra, J.R.P. 2002.** Desenvolvimento de uma técnica de criação para *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) em laboratório. Neotrop. Entomol. 31: 055-062.
- Oliveira, C.N. de, P.M.O.J. Neves & L.S. Kawazoe. 2003.** Compatibility between the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and insecticides used in coffee plantations. Sci. Agri. 60: 663-667.
- Paccola-Meirelles, L.D. & J.L. Azevedo. 1991.** Parasexuality in *Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 57: 172-176.
- Panizzi, A.R., B.S. Correa, D.L. Gazzoni, E.B. de Oliveira, G.G. Newman & S.G. Turnipseed. 1977.** Insetos da soja no Brasil. Embrapa Soja, Boletim Técnico 1, 20p.
- Quintela, E.D. & C.W. McCoy. 1997.** Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. Environ. Entomol. 26: 1173-1182.
- Quintela, E.D. & C.W. McCoy. 1998a.** Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. J. Econ. Entomol. 91: 110-122.
- Quintela, E.D. & C.W. McCoy. 1998b.** Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. J. Invert. Pathol. 72: 220-230.

- Ribeiro, J.Z. 2002.** Presença, influência e transmissão de RNA dupla fita no fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Dissertação de Mestrado. Curitiba, UFPR, p. 5-11.
- Roberto, S.R., W. Genta & M. Ventura. 2001.** *Diabrotica speciosa* (Ger.) (Coleoptera: Chrysomelidae): new pest in table grape orchards. Neotrop. Entomol. 30: 721-722.
- Roehrdanz, R.L. 2003.** Multiplex polymerase chain reaction method for differentiating western and northern corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 96: 669-672.
- Silva, A.G.A., C.R. Gonçalves, D.M. Galvão, A.J.L. Gonçalves, J. Gomes, M.N. Silva & L. Simoni. 1968.** Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores; insetos hospedeiros e inimigos naturais. t.1, parte 2. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Laboratório Central de Patologia Vegetal, 1968. 622p.
- Silva, M.T.B. da. 1995.** Considerações sobre as necessidades de pesquisas para o manejo de lagartas radiculares do gênero *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) pp. 46-49. In Resumos da V Reunião Sul-Brasileira de Insetos de Solo. Dourados, Embrapa CPAO.
- Silvestre, D. 2002.** Sequenciamento e análise do genoma mitocondrial de *Melipona bicolor* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 119p.
- Singh, P. & R.F. Moore. 1985.** Handbook of insect rearing. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier. 488p.

- Sosa-Gómez, D.R. 1999.** Estado actual del control biológico de plagas agrícolas con hongos entomopatógenos. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 58: 295-300.
- Sosa-Gómez, D.R. & S.B. Alves. 2000.** Temperature and relative humidity requirements for conidiogenesis of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliaceae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 29: 515-521.
- Sosa-Gómez, D.R., D.G. Boucias & J.L. Nation. 1997.** Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *J. Invert. Pathol.* 69: 31-39.
- Sosa-Gómez, D.R., K.E. Delpin, F. Moscardi, & J.R.B. Farias. 2001.** Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation systems. *Neotrop. Entomol.* 30: 407-410.
- Szalanski, A.L., R.L. Roehrdanz, D.B. Taylor & L. Chandler. 1999.** Genetic variation in geographical populations of western and mexican corn rootworm. *Insect Mol. Biol.* 8: 519-525.
- Szalanski, A.L., R.L. Roehrdanz & D.B. Taylor. 2000.** Genetic relationship among *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae) based on rDNA and mtDNA sequences. *Fla. Entomol.* 83: 262-267.
- Szalanski, A.L. & T.O. Powers. 1996.** Molecular diagnostics of three *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) pest species. *J. Kans. Entomol. Soc.* 69: 260-266.
- Tallamy, D.W., D.P. Whittington, F. Defurio, D.A. Fontaine, P.M. Gorski & P.W. Gothro. 1998.** Sequestered cucurbitacins and pathogenicity of *Metarhizium*

anisopliae (Moniliales: Moniliaceae) on spotted cucumber beetle eggs and larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ. Entomol. 27: 366-372.

Taylor, D.B., A.L. Szalanski & R.D. Peterson, II. 1996. Identification of screwworm species (Diptera: Calliphoridae) by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism. Med. Vet. Entomol. 10: 63-70.

Welsh, J. & McLelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic. Acids. Res. 18: 7213-7218.

Wilcox, J.A. 1965. A synopsis of the North American Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae). New York State Mus. Sci. Serv. Bull. 400: 1-226.

Wilcox, J.A. 1972. *Coleopterorum Catalogus Supplementa*, pp. 296-431. In Pars 78. Fasc2. (editio secunda). (Galerucinae: Luperini: Diabroticina).

Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, L.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic. Acids. Res. 18: 6531-6535.

Wilson, F. 1970. The nature and advantages of biological control. Advance Sci. 26: 374-378.

Yaginuma, K., R.T. Alves & K. Kishino. 1994. Isolation and use of entomogenous fungi in the cerrados for the control of insect pests, p. 215-225. In Relatório Técnico do Projeto Nipo-Brasileiro de Cooperação em Pesquisa Agrícola 1987/1992, Embrapa CPAC.

Zucchi, R.A., S. Silveira Neto & O. Nakano. 1993. (eds.) Guia de identificação de pragas agrícolas. Piracicaba, FEALQ, 139p.

Capítulo 2. RAPD para estudo de populações de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Resumo

Regiões do DNA de indivíduos de *D. speciosa*, praga agrícola encontrada em todos os estados brasileiros, foram amplificadas através da técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) a fim de avaliar a diversidade genética de populações de diferentes locais. As populações foram coletadas em Primavera do Leste (MT), Paulínia (SP), Florestópolis, Ponta Grossa e Warta, Distrito de Londrina (PR). O DNA de 27 indivíduos de cada população foi obtido dos tecidos da cabeça e protórax dos insetos através do método de extração com sais de CTAB. O DNA dos indivíduos foi amplificado através de 11 iniciadores. Todos os iniciadores selecionados possibilitaram a amplificação do DNA de *D. speciosa*, gerando bandas com pesos moleculares variáveis. Os indivíduos formaram grupos diferentes dentro de cada população geográfica, embora tenha sido registrada a presença de indivíduos de outras regiões nos agrupamentos. As populações que apresentaram agrupamentos com maior homogeneidade foram as de Ponta Grossa e Paulínia. Os indivíduos das populações de Florestópolis, Primavera do Leste, Paulínia e Ponta Grossa formaram agrupamentos com índices de similaridade de Dice próximos a 37 %. A população da Warta apresentou maior heterogeneidade de genótipos, tendo indivíduos com índice de similaridade de 8 %. A ocorrência de indivíduos de outras regiões nos agrupamentos, indica uma frequência elevada de migração desses insetos mesmo entre locais distantes, como em Primavera do Leste (MT) e Paulínia (SP).

Abstract

DNA region of individuals of *D. speciosa*, an important agricultural pest with distribution in all the country, were amplified by RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) to evaluate the genetic diversity among populations from Primavera do Leste (MT), Paulínia (SP), Florestópolis, Ponta Grossa and Warta, (PR). The DNA of twenty-seven insects from each population was obtained from head and prothorax tissues following the CTAB extraction method. The DNA was amplified with eleven primers. The primers produced variable molecular bands with different weight. The *D. speciosa* individuals clustered separately inside each geographical population. Individuals from Florestópolis, Primavera do Leste, Paulínia and Ponta Grossa clustered with Dice's similarity near 37 %. Ponta Grossa and Paulínia clusters had high homogeneity, and Warta had the highest genotypic heterogeneity (8 %). Some specimens clustered with individuals from other regions, suggesting migration between distant regions, like the case of Primavera do Leste (MT) and Paulínia (SP).

2.1. Introdução

Um dos complexos de pragas do milho mais importantes dos EUA é composto por insetos do gênero *Diabrotica* (Chevrolat, 1844) (Coleoptera: Chrysomelidae). Os indivíduos desse gênero possuem grande semelhança morfológica, o que dificulta a identificação das espécies (Krysan 1986). Essas espécies que ocorrem na América do Norte estão distribuídas em regiões geograficamente distintas e, por esse motivo, são conhecidas de acordo com a região onde ocorrem. Como, por exemplo, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte é conhecida vulgarmente como larva do milho da região oeste. Entretanto essas espécies estão se sobrepondo e a identificação através de caracteres morfológicos de espécies simpátricas não está sendo possível. Por esse motivo, as técnicas da genética molecular vêm sendo utilizadas para facilitar a identificação das espécies desse gênero (Szalanski & Powers 1996, Clark *et al.* 2001, Roehrdanz 2003). Dessa maneira, a variabilidade genética entre indivíduos de diferentes regiões também vem sendo realizada através da análise de sequências do DNA nuclear e mitocondrial com a técnica de PCR-RFLP (Szalanski *et al.* 2000, Szalanski & Powers 1996).

Diabrotica speciosa (Germar, 1824) é uma das espécies desse gênero mais conhecidas na América do Sul e com ocorrência em todos os estados brasileiros (Krysan 1896). Segundo Szalanski *et al.* (1999), a expansão geográfica das espécies de insetos pode favorecer a variabilidade genética. Porém não existem estudos sobre a variabilidade genética dessas espécies no Brasil. A maioria dos estudos realizados com indivíduos geograficamente distintos de *Diabrotica* spp. limitam-se ao estudo das espécies que ocorrem na América do Norte.

Como exemplo, Szalanski *et al.* (1999), através da análise das seqüências dos genes das regiões ITS 1 e de genes das subunidades ribossômicas do genoma mitocondrial, observaram variação substancialmente maior entre indivíduos geograficamente distintos de *Diabrotica virgifera zea* Krysan & Smith do que entre indivíduos de *D. v. virgifera* LeConte. O baixo nível de diferenciação

genética observado entre indivíduos de *D. v. virgifera* e *D. v. zea* indica uma história evolucionária recente entre os mesmos.

Para avaliar a variabilidade genética entre indivíduos geograficamente distintos de uma espécie ou de espécies diferentes, alguns estudos têm utilizado a técnica de marcadores moleculares RAPD. Essa técnica vem sendo utilizada com sucesso para avaliar a variabilidade genética entre e dentro de populações geográficas, para determinar a estrutura genética das populações (Apostol *et al.* 1996, Stott *et al.* 1997, Brown *et al.* 1997, Sidorenko & Berezovskaya 2001, Sosa-Gómez *et al.* 2004, Sosa-Gómez 2004). As aplicações dos marcadores RAPD incluem ainda obtenção de impressões digitais (*fingerprintings*) genômicas de indivíduos, variedades e populações; estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies; construção de mapas genéticos de alta cobertura genética e a localização de genes de interesse econômico, além de ser uma técnica rápida e simples (Williams *et al.* citados por Sidorenko & Berezovskaya 2001).

O objetivo deste estudo foi gerar informações sobre a variabilidade genética de *D. speciosa* através de marcadores RAPD, visto que, além de ser uma das espécies do gênero *Diabrotica* mais conhecidas na América do Sul, é considerada praga de várias culturas, em especial leguminosas, curcubitáceas, solanáceas e gramíneas (Zucchi *et al.* 1993).

2.2. Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da Embrapa Soja, em Londrina, Paraná.

As populações analisadas foram coletadas em áreas de soja de Primavera do Leste (MT), Florestópolis, Ponta Grossa e Warta, Distrito de Londrina (PR) e em áreas de feijão na região de Paulínia (SP) (Tabela 1). Todos os indivíduos de uma mesma população foram coletados em uma única data. Os insetos coletados foram mantidos em sílica gel a -20 °C até extração do DNA.

Tabela 1. Origem, data de coleta e plantas hospedeiras das populações de *D. speciosa* analisadas com marcadores moleculares para avaliação de variabilidade intraespecífica.

Local de coleta	Data de coleta	Planta hospedeira
Warta, Londrina (PR)	14 de junho, 2004	soja
Florestópolis (PR)	18 de agosto, 2004	soja
Ponta Grossa, Fazenda Escola da Univ. Est. de Ponta Grossa (PR)	04 de maio, 2004	soja
Paulínia, Estação Agrícola Exp. Bayer Cropscience (SP)	28 de junho, 2004	feijão
Primavera do Leste (MG)	20 de julho, 2004	soja

2.2.1. Extração do DNA

O DNA de 27 indivíduos de cada população foi extraído dos tecidos da cabeça e protórax dos insetos, a fim de diminuir a possibilidade de ocorrência de microorganismos naturalmente presentes na hemolinfa (Capítulo 3). A extração foi realizada de acordo com o protocolo de Rogers & Bendich (1988) com poucas modificações, relatadas a seguir.

Para cada cabeça e protórax de *D. speciosa* foram utilizados 480 µL de tampão de extração, com concentração final de 200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 70 mM EDTA, 2 M NaCl e 1 % de β-mercaptoetanol, maceradas em microtubos com auxílio de pistilo. Na seqüência, adicionou-se 120 µL de CTAB (10 %), e após ser homogeneizado, foi levado em banho-maria (65 °C) por 5 minutos. Ao decorrer desse tempo, adicionou-se 6 µL de proteinase K (10 mg/mL), e novamente incubou-se em banho-maria (65 °C) por 60 minutos. Após esse período, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, e centrifugadas a 14.000 rpm durante 15

minutos. A fase aquosa foi recuperada e transferida para outro microtubo, adicionando o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após a leve homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, e em seguida recuperou-se a fase aquosa a qual foi transferida para outro microtubo, onde os ácidos nucleicos foram precipitados com 2 volumes de isopropanol 100 % gelado e 45 % do volume de NH₄OAc 10M. Esse material permaneceu duas horas a -20°C. As amostras foram centrifugadas após esse período, a 14.000 rpm por 15 minutos, descartando o sobrenadante e lavando o *pellet* com etanol 70 %. Após a centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos o etanol foi descartado e os *pellets* secos em estufa a 37 °C. Os *pellets* foram ressuspensos com tampão TE com RNase adicionada na concentração final de 40 µg/mL e mantidos a 37 °C por 30 minutos. As amostras foram mantidas a -20 °C até serem utilizadas para amplificação (Sosa-Gomez *et al.* 2004).

2.2.2. Quantificação de DNA

O DNA foi quantificado através de gel de agarose (0,8%) corado com 10mg/mL de brometo de etídio. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X (216 g de Tris; 110 g ácido bórico; 80 mL de EDTA 0,5M e água destilada para completar 2L) a 120V por 1 hora. A visualização do gel foi feita em transluminador THX-35M (Life Technologies) de luz ultravioleta (UV) e a aquisição das imagens em sistema Kodak Digital DC 290. No mesmo gel foram colocadas amostras de λ DNA com concentrações de 5, 10, 15 e 20 ng/µL, para que fosse possível estimar a concentração das amostras de *D. speciosa*.

2.2.3. Análise molecular do DNA através da técnica de RAPD

A amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 9 ng de DNA, previamente diluído, 14,6 µL de água Mili Q (bidestilada), 2,5 µL de tampão

10X, 1,0 µL de dNTP's (2,5 mM), 2,5 µL de iniciador (4 µM), 1,2 µL de MgCl₂ (50 mM) e 0,2 µL de enzima Taq polimerase (Gibco BRE) (5 unidades/µL) por microtubo de amplificação de PCR. Como controle negativo foi utilizada uma amostra que continha todos os reagentes, exceto DNA do inseto. As reações PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp-9600 (Perkin Elmer) com o seguinte programa: 45 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 35 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto; e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Entre quatorze iniciadores (Operon Technologies. Alameda, CA, USA) previamente testados, 11 foram selecionados para o estudo das populações de *D. speciosa*.

O resultado da amplificação de cada amostra (25 µL) foi aplicado em gel de agarose 1,3 % com 3,0 µL de brometo de etídio e submetida a eletroforese em tampão TBE 1X a 120V por 2,5 horas. A visualização do gel foi feita em transluminador THX-35M (Life Technologies) de luz ultravioleta (UV) e a aquisição das imagens em sistema Kodak Digital DC 290.

2.2.4. Análise dos Dados

Baseando-se nas fotografias dos géis apenas as bandas mais visíveis e reproduzíveis foram usadas como marcadores (Roderick 1996), sendo que bandas com mobilidade similar àsquelas registradas no controle negativo não foram registradas (Thormann *et al.* 1994). Para esse experimento foi gerada uma matriz binária (1 – presença de banda e 0 – ausência de banda) e, utilizando o programa NTSYS-pc versão 2.02 i (Rholff 1993), foram construídas matrizes de similaridade utilizando-se o índice de similaridade de Dice (1945).

2.3. Resultados e Discussão

As amplificações foram visíveis com a concentração de 9 ng de DNA de *D. speciosa*. Todos os 11 iniciadores selecionados possibilitaram a amplificação do DNA de *D. speciosa*, gerando bandas que variaram de 493 a 2409 pares de bases. O número de bandas produzidas variou de acordo com o iniciador utilizado na reação (Fig. 1 e 2). Dentre os iniciadores testados, os que produziram maiores números de bandas foram OPC-04 (20), OPE-11 (20) e OPH-02 (20), e o que produziu menor número de bandas foi o OPG-07 (13) (Tabela 2).

Tabela 2. Número de bandas geradas por cada iniciador utilizado no estudo de variabilidade entre populações de *D. speciosa*.

Iniciador ¹	Sequência	Número de bandas
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	19
OPC-04	5'-CCGCATCTAC-3'	20
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'	19
OPC-18	5'-TGAGTGGGTG-3'	17
OPE-11	5'-GAGTCTCAGG-3'	20
OPF-03	5'-CCTGATCACC-3'	20
OPG-07	5'-GAACCTGCGG-3'	13
OPH-02	5'-TCGGACGTGA-3'	20
OPJ-06	5'-TCGTTCCGCA-3'	17
OPJ-14	5'-CACCCGGATG-3'	19
OPN-07	5'-CAGCCCAGAG-3'	18

¹ - denominação usada pela empresa Operon Technologies

Pode ser observado na Figura 3 que a maioria dos indivíduos agrupam-se de acordo com a região geográfica onde foram coletados. As populações que apresentaram agrupamentos com maior homogeneidade foram as de Ponta Grossa e Paulínia, sendo a população da Warta que apresentou maior heterogeneidade de genótipos, com indivíduos apresentando índice de similaridade de 8 %. Os indivíduos que apresentaram maior semelhança genotípica foram os de Ponta Grossa (PG25 e PG27) e de Paulínia (Pau155 e

Pau161). Os indivíduos das populações de Florestópolis (PR), Primavera do Leste (MT), Paulínia (SP) e Ponta Grossa (PR) formaram agrupamentos com índices de similaridade próximos a 37 %.

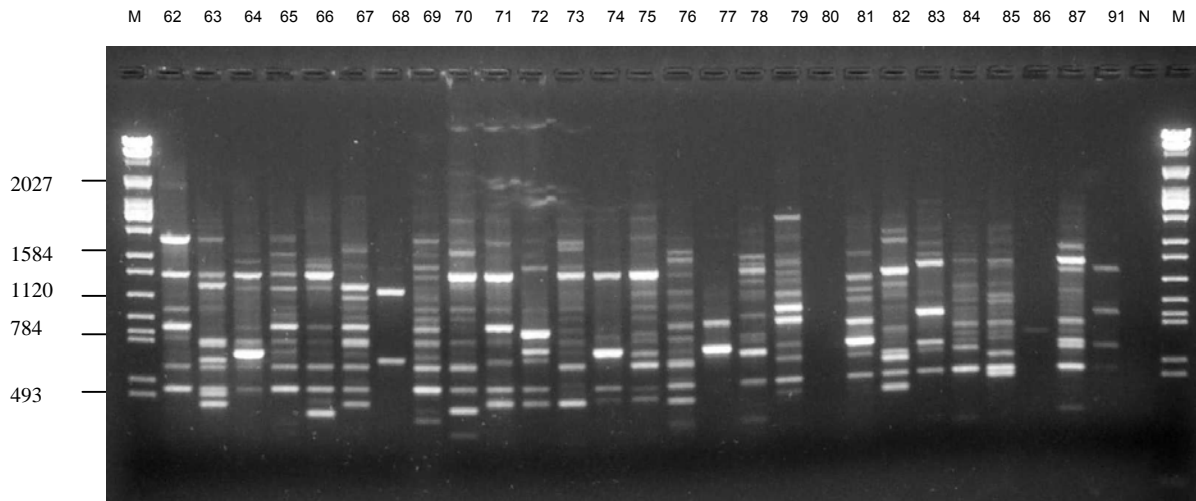


Figura 1. Amostras de DNA de *D. speciosa* da região de Warta, Londrina (PR) amplificadas com o iniciador OPC-04 através da técnica de RAPD. λ DNA foi utilizado como marcador molecular (M). Controle negativo (N).

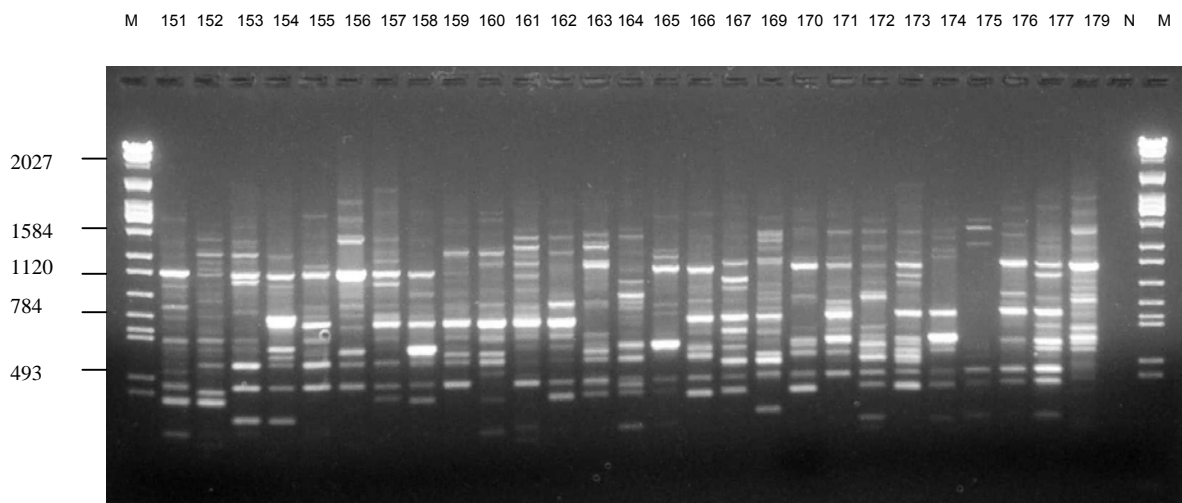


Figura 2. Amostras de DNA de *D. speciosa* da região de Paulínia (SP) amplificadas com o iniciador OPC-04 através da técnica de RAPD. λ DNA foi utilizado como marcador molecular (M). Controle negativo (N).

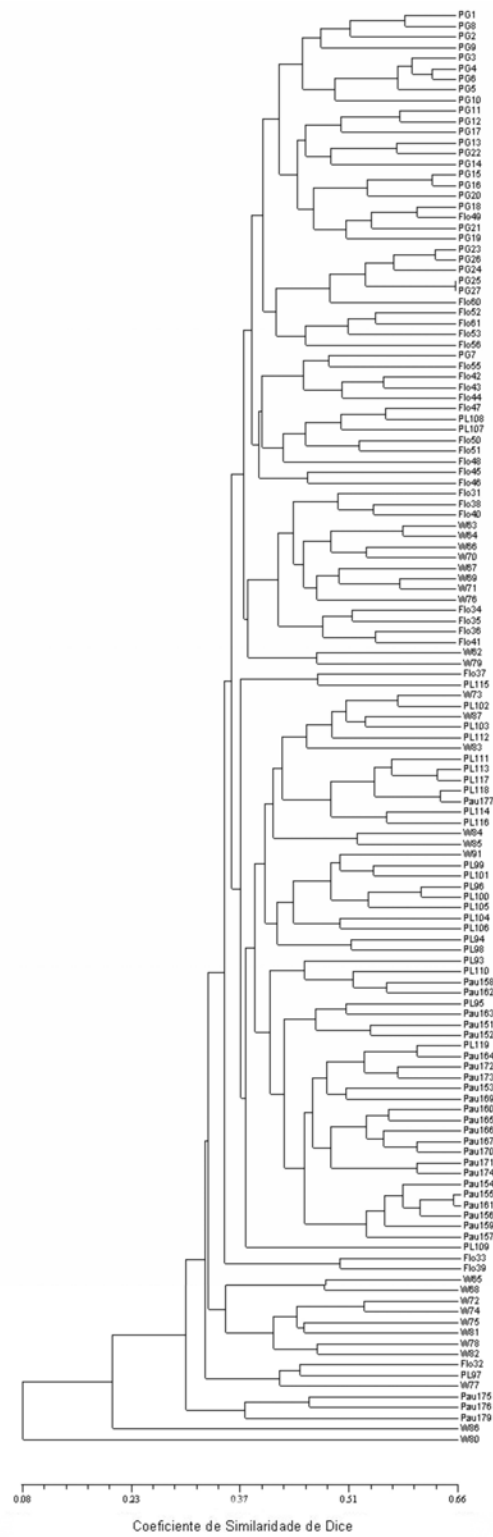


Figura 3 Dendrograma de populações de *Diabrotica speciosa* PG = Ponta Grossa (PR), Flo = Florestópolis (PR), W = Warta, Londrina (PR), Pau = Paulínia (SP) e PL = Primavera do Leste (MT)

Nos agrupamentos pode ser observada a ocorrência de indivíduos de outras regiões, indicando a seqüência elevada de migração desses insetos mesmo entre locais distantes, como Primavera do Leste (MT) e Paulínia (SP), distantes entre si 1.099 km (Tabela 3).

Esta migração ocorre porque *Diabrotica* possui elevada capacidade de vôo. Segundo Krysan (1999), a dispersão desses insetos através do vôo está relacionada com alimentação e oviposição e difere entre espécies. Desta maneira, deve ser considerado como “relocação”, visto que o objetivo ecológico é colocar a progênie em um lugar diferente, seja este próximo ou distante.

Os adultos de *Diabrotica* spp. possuem dois tipos de vôos: vôos “triviais” que duram menos que 20 ou 30 minutos, e “sustentados” com duração maior a 20 ou 30 minutos. Vôos “sustentados” ocorrem em $\frac{1}{4}$ de fêmeas mais jovens, e sua incidência diminui de acordo com a idade dos insetos. Estes vôos podem ser chamados de “vôos da síndrome da oogênese”, visto que é comum entre fêmeas “grávidas”. Podem durar de 30 a 230 minutos, atingindo um distância de até 35 Km por dia em *D. v. virgifera*. A maioria dos vôos é do tipo “trivial” com duração de 1 minuto ou menos, com 10 a 20 cm de distância, sendo que as paradas geralmente ocorrem para reorientação. A maioria dos vôos ocorre com ventos fracos, com picos pela manhã e sob temperaturas amenas (20 - 35° C). A diferença do vôo entre os sexos está relacionada com a duração e idade (Krysan 1999).

Tabela 3. Distância (km) entre as localidades onde foram coletadas as populações de *D. speciosa*.

Localidades	Primavera do Leste, MT	Paulínia, SP	Warta, Londrina, PR	Florestópolis, PR	Ponta Grossa, PR
Primavera do Leste, MT	0	-	-	-	-
Paulínia, SP	1098,7 km	0	-	-	-
Warta, Londrina, PR	932 km	411 km	0	-	-
Florestópolis, PR	875 km	431 km	57 km	0	-
Ponta Grossa, PR	1156 km	402 km	225	282 km	0

2.4. Conclusões

- Os indivíduos de *D. speciosa* formam grupos diferentes dentro de cada população geográfica, embora a presença de indivíduos de outras regiões nos agrupamentos indique a frequência elevada de migração entre locais distantes;
- As populações que apresentaram agrupamentos com maior homogeneidade foram as de Ponta Grossa e Paulínia, sendo a população da Warta que apresentou maior heterogeneidade de genótipos;
- Os indivíduos que apresentaram maior semelhança genotípica foram os de Ponta Grossa (PR) (PG25 e PG27) e de Paulínia (Pau155 e Pau161);
- Os indivíduos que apresentaram menor índice de similaridade (8 %) foram os indivíduos da Warta, Distrito de Londrina (PR).

2.5. Literatura citada

- Apostol, B.L., W.C. Black, P. Reiter & B.R. Miller. 1996.** Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325-334.
- Brown, R.J., C.A. Malcolm, P.L. Mason & R.A. Nichols. 1997.** Genetic differentiation between and within strains of the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) at RAPD loci. *Insect Mol. Biol.* 6: 285-289.
- Clark, T.L.; J. Meinke & J.E. Foster. 2001.** Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* 10: 303-314.
- Dice, L.R. 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Krysan, J.L. 1999.** Selected Topics in the Biology of *Diabrotica*. In: *Advances in Chrysomelidae Biology* 1. Cox, M.L. (eds.) Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp. 479-513.
- Krysan L.J. 1986.** Introduction: biology, distribution and identification of pest *Diabrotica*. P. 1-23. In Krysan, J.L. & T.A. Miller. (eds.), *Methods for the study of pest Diabrotica*. New York, Springer-Verlag, 260p.
- Sidorenko, A.P. & O.P. Berezovska. 2001.** Individual polymorphism for RAPD markers in spring generation of Colorado Potato Beetles *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Russ. J. Genet.* 37: 1130-1133.

- Sosa-Gómez, D.R. 2004.** Intraespecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Genetics and Molecular Biology* 27: 378-384.
- Sosa-Gomez, D.R., K.E. Delpin, A.M.R. Almeida & E. Hirose. 2004.** Genetic Differentiation among Brazilian Populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) Based on RAPD Analysis. *Neotrop. Entomol.* 33: 179-187.
- Stott, W., P.E. Ihssen & B.N. White. 1997.** Inheritance of RAPD molecular markers in Lake Trout *Salvelinus namaycush*. *Mol. Ecol.* 6: 609-613.
- Szalanski, A.L., R.L. Roehrdanz & D.B. Taylor. 2000.** Genetic Relationship among *Diabrotica* species (Coleoptera: Chrysomelidae) based on rDNA and mtDNA sequences. *Fla. Entomol.* 83: 262-267.
- Szalanski, A.L., R.L. Roehrdanz, D.B. Taylor & L. Chandler. 1999.** Genetic variation in geographical populations of western and Mexican corn rootworm. *Insect Molecular Biology* 8: 519-525.
- Szalanski, A.L. & T.O. Powers. 1996.** Molecular diagnostics of three *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) pest species. *Journal of the Kansas Entomological Society* 69: 260-266.
- Rholf, F.J. 1993.** NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02 i Exeter Software Setauket, New York, 31p.
- Roderick, G.K. 1996.** Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and the uses. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 325-352.

- Roehrdanz, R.L. 2003.** Multiplex polymerase chain reaction method for differentiating western and northern corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 669-672.
- Rogers, S.O. & A.J. Bendich. 1988.** Extraction of DNA from plant tissues, p.1-10. In: S.B. Gelvin & R.A. Schilperoort (eds.), *Plant molecular biology manual*, v.A6, Dordrecht, Belgium, Kluwer Academic Publisher, 1032p.
- Thormann, C.E., M.E. Ferreira, L.E.A. Camargo, J.G. Tivang & T.C. Osborn. 1994.** Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88: 973-980.
- Zucchi, R.A., S. Silveira Neto & O. Nakano. 1993.** (eds.) *Guia de identificação de pragas agrícolas*. Piracicaba, FEALQ, 139p.

Capítulo 3. Ocorrência de Protozoários, Parasitóides e Fungos em *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)

“A melhor maneira de evitar que os insetos tomem conta de todo o mundo é não impedir a guerra que eles travam entre si”.

Metcalf

Resumo

Foi avaliada a incidência de parasitóides, protozoários e fungos em populações de *Diabrotica speciosa*, em Londrina, PR e região. Para avaliação de moscas parasitóides e fungos, 25-30 indivíduos foram coletados e avaliados semanalmente durante o período da safra de soja (2003/04). A incidência de protozoários foi observada através de preparados microscópicos com alíquotas de hemolinfa e tubo digestivo durante um ano (agosto/2003 a agosto/2004). A flutuação da densidade do inóculo de fungos entomopatogênicos relacionada à área foliar foi avaliada através de diluições seriadas de lavagens de folíolos de soja plaqueadas em meio seletivo. As Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos fungos foram quantificadas mediante a contagem das colônias. A superfície de cada folíolo amostrado teve sua área medida em um integrador de área foliar, para o estabelecimento da relação UFC por mm² de área foliar. A maior incidência de parasitismo sobre *D. speciosa* foi durante os meses de fevereiro e março/2003, sendo que o protozoário *Gregarina* ocorreu em 97% dos indivíduos e adultos da mosca *Celatoria* sp. (Diptera: Tachinidae) ocorreram em 26 % de indivíduos observados. Foi registrada a ocorrência de uma mosca parasitóide do gênero *Strongygaster* sobre *Cerotoma arcuata*. Durante a safra de soja 2003/04 a maior ocorrência de fungos nos folíolos de soja foi do fungo *Beauveria* sp, resultado este, relacionado com a ocorrência desse fungo sobre adultos de *D. speciosa*.

Abstract

The occurrence of parasitoids, protozoa and entomopathogenic fungi was evaluated on *D. speciosa* populations in Londrina, PR in the North of Parana State. Samples of 25-30 insects were weekly collected in soybean fields (2003/04). The protozoa incidence was observed during one year (August/2003 - August/04). Fresh microscope preparations with mesenteron of each insect were analyzed. The entomopathogenic fungi density variation related to the leaflet area (Colony Forming Units/mm²) was evaluated through serial dilutions of washed leaflets plated on selective medium. The soybean leaflets area was measured to establish the CFU by mm². The major incidence of parasitism on *D. speciosa* was in February and March/2003. The protozoa *Gregarina* occurred on 97% of the insects and the adults of parasitoid *Celatoria* sp. (Diptera: Tachinidae) occurred on 26 % of the insects. During the soybean season, the fungus *Beauveria* sp. was prevalent that can be related to major occurrence of this fungus on adults of *D. speciosa*.

3.1. Introdução

O gênero *Diabrotica* possui 15 espécies e subespécies identificadas como pragas de 61 tipos de plantas cultivadas. A espécie mais conhecida desse gênero e com ampla distribuição na América do Sul é *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Krysan 1986), conhecida popularmente como vaquinha patriota.

No Brasil, *D. speciosa* encontra-se distribuída em todo o território nacional (Magalhães e Carvalho 1988), sendo considerada praga principal de várias culturas, em especial leguminosas, curcubitáceas, solanáceas e gramíneas (Zucchi *et al.* 1993). Os adultos atacam as folhas novas das plantas, fazendo um grande número de pequenas perfurações, que afetam o desenvolvimento da planta. As larvas atacam as raízes, provocando redução do sistema radicular e, portanto, atraso no desenvolvimento e secamento da planta. Também danificam os tubérculos de batatinha (*Solanum tuberosum* L.), abrindo buracos e depreciando-os comercialmente. Quando as larvas atacam as raízes adventícias do milho (*Zea mays* L.) causam um crescimento irregular das plantas, que se tornam recurvadas. Esse sintoma é conhecido como “pescoço de ganso” ou “milho ajoelhado” (Gallo *et al.* 2002).

Não existe uma estimativa dos danos causados por esse inseto no Brasil, mas Metcalf (1986) estimou em um bilhão de dólares os gastos com inseticidas e as perdas na produção devido ao ataque de *Diabrotica* sp. nos EUA.

Por esse motivo, conhecer os inimigos naturais dessa espécie praga, pode fornecer informações para o aprimoramento de técnicas de controle. O uso de agentes biológicos em programas de controle de pragas é uma das estratégias do manejo integrado de pragas (Batista Filho *et al.* 2003).

Para que os inimigos naturais sejam capazes de reduzir ou prevenir o aumento populacional das pragas, deve-se estimular a ocorrência natural desses agentes de controle biológico, não só preservando o potencial já existente, mas ainda propiciando condições para sua efetivação. Portanto, o uso de inseticidas deve ser restringido às condições de ocorrência de pragas apenas quando há níveis de danos econômicos, utilizando doses mínimas e, se possível, produtos

seletivos, evitando o controle preventivo de pragas. Boetel *et al.* (2003) observaram que aplicações apropriadas de inseticidas propiciaram maior proteção de raízes de milho *Zea mays* (L.) ao ataque de *D. virgifera*. Além disso, o uso restrito de inseticidas e a utilização de agentes biológicos no manejo integrado de pragas é ação efetiva no retardamento do desenvolvimento da resistência dos insetos a inseticidas (Huang *et al.* 1994). Os agroecossistemas precisam ser manejados de forma inteligente, através dos mais variados métodos de controle (Metcalf & Luckman 1982).

Há diversas referências sobre a ocorrência de inimigos naturais de *D. speciosa* na América do Sul, conforme apresentado na Tabela 1.

O objetivo deste trabalho foi obter informações sobre a ocorrência e flutuação de inimigos naturais de *D. speciosa* em cultura de soja na região de Londrina, PR, enfatizando a flutuação de inóculos de fungos entomopatogênicos nos folíolos de soja.

Tabela 1. Lista de inimigos naturais de *Diabrotica speciosa* registrados para a América do Sul.

Espécie	Ordem: Família	Local	Referência
<i>Chrysopa</i> sp.	Neuroptera: Chrysopidae		Bercellini & Malacalza 1994
<i>Eriopis</i> sp.	Coleoptera: Coccinelidae		Bercellini & Malacalza 1994
<i>Lebia concinna</i> <i>Brullé</i>	Coleoptera: Carabidae	Brasil	Milanez 1984
<i>Nabis</i> sp.	Heteroptera: Nabidae	Brasil	Milanez 1984
<i>Cycloneda sanguinea</i> (L.)	Coleoptera: Coccinelidae	Brasil	Hohmann 1989
<i>Doru lineare</i> (<i>Eschsholtz</i>)	Dermaptera: Forficulidae	Brasil	Milanez 1984
<i>Scymnus</i> sp.	Coleoptera: Coccinelidae	Brasil	Hohmann 1989
<i>Celatoria bosqi</i> <i>Blanchard</i>	Diptera: Tachinidae	Argentina, Uruguai, Brasil	Magalhães & Quintela 1987, Heineck-Leonel & Salles 1997
<i>Centistes gasseni</i> <i>Shaw</i>	Hymenoptera: Braconidae	Brasil	Heineck-Leonel & Salles 1997, Walsh <i>et al.</i> 2003
<i>Beauveria bassiana</i> (<i>Bals.</i>) <i>Vuill.</i>	Hyphomycetes: Moniliaceae	Brasil	Hohmann & Carvalho 1989, Heineck-Leonel & Salles 1997
<i>Metarhizium anisopliae</i> (<i>Metsch.</i>) <i>Sorok.</i>	Hyphomycetes: Moniliaceae	Brasil	Heineck-Leonel & Salles 1997
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>		Brasil	Tigano-Milani <i>et al.</i> 1995
<i>Paecilomyces lilacinus</i>		Brasil	Tigano-Milani <i>et al.</i> 1995
<i>Hexameris</i> sp.	Nematoda: Mermithidae	Peru, Brasil	Nickle <i>et al.</i> 1984, Heineck-Leonel & Salles 1997
<i>Micoletzkyia vidalae</i> <i>Stock, 1993</i>	Nematoda: Diplogasteridae	Argentina	Stock 1993

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Avaliação de inimigos naturais em populações de campo de *D. speciosa*

Para avaliação das moscas parasitóides e fungos, amostras de 25 - 30 indivíduos foram observados periodicamente durante o período da safra de soja (2003/04). Os insetos coletados em cultura de soja do campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Soja – CNPSo, localizado no Distrito de Warta, Londrina (PR), foram mantidos dentro de gaiolas teladas (15 cm X 15 cm X 15 cm) durante 15 dias em condições controladas de temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 80 %UR e fotofase de 14 horas. A avaliação de mortalidade foi realizada diariamente.

Para observação da prevalência de protozoários, amostras de 25 - 30 indivíduos coletados em cultura de soja do campo experimental da Embrapa Soja foram observadas semanalmente ou quinzenalmente durante um ano (agosto/2003 a agosto/2004), imediatamente dissecados para preparados microscópicos de alíquotas de hemolinfa e tubo digestivo de cada indivíduo.

3.2.2. Densidade do inóculo de fungos entomopatogênicos relacionada à área foliar

Foram realizadas amostras semanais de 15 folíolos de soja no campo experimental da Embrapa Soja. Os folíolos foram armazenados a -18°C até o momento da retirada do inóculo mediante lavagens em água destilada estéril com Tween 80 (15 $\mu\text{L/L}$). As suspensões resultantes dessa lavagem foram diluídas seriadamente (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) e plaqueadas (0,2 mL/placa de Petri) em meio seletivo à base do fungicida dodine: água de fervura com 20g de aveia, 20g de ágar, 0,46g de dodine, 0,01g de cristal violeta e 0,25mg de benlate (Chase *et al.* 1986). As UFC (Unidades Formadoras de Colônia) dos fungos entomopatogênicos foram quantificadas mediante contagem das colônias que se desenvolveram sobre

o meio seletivo após 12 a 20 dias a $26 \pm 1,5^\circ \text{C}$. Foi determinada a superfície de cada folíolo amostrado, em um integrador de área foliar (modelo Stationary LI 3100), para o estabelecimento da relação U.F.C. por mm^2 de área foliar.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Avaliação de inimigos naturais de *D. speciosa* em populações de campo

Os inimigos naturais encontrados em *D. speciosa* foram moscas parasitóides do gênero *Celatoria* Coquillett, 1890 (Diptera: Tachinidae), protozoários do gênero *Gregarina* (Dufour, 1828) (Apicomplexa: Eugregarinida) e o fungo entomopatogênico *Beauveria* sp. Vuillemin

A maior ocorrência natural do parasitóide *Celatoria* sp. (Fig. 1) foi de 26 % durante o mês de março/2004. Durante a safra de soja, 691 indivíduos foram observados (Fig. 2). Foi constatada a ocorrência de apenas um indivíduo do gênero *Strongygaster* Macquart, 1834 (Diptera: Tachinidae) (Fig. 3) sobre um adulto de *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1791), em 25 de março de 2004, embora não tenha sido realizada a avaliação constante de inimigos naturais sobre este inseto. Esse indivíduo de *C. arcuata* foi coletado em cultura de soja, no campo experimental da Embrapa Soja.

O protozoário *Gregarina* sp. (Fig. 4) ocorreu em 97 % dos indivíduos avaliados em março/2004 (Fig. 5), concordando com os resultados de Kuhlmann & van der Burgt (1998), onde as amostragens ocasionais em campo indicaram variação da incidência de *Gregarina* sp. entre 5 a 100 %. Durante agosto/2003 a agosto/2004, 792 indivíduos foram observados.



Figura 1. Mosca parasitóide *Celatoria* sp. (Diptera: Tachinidae).

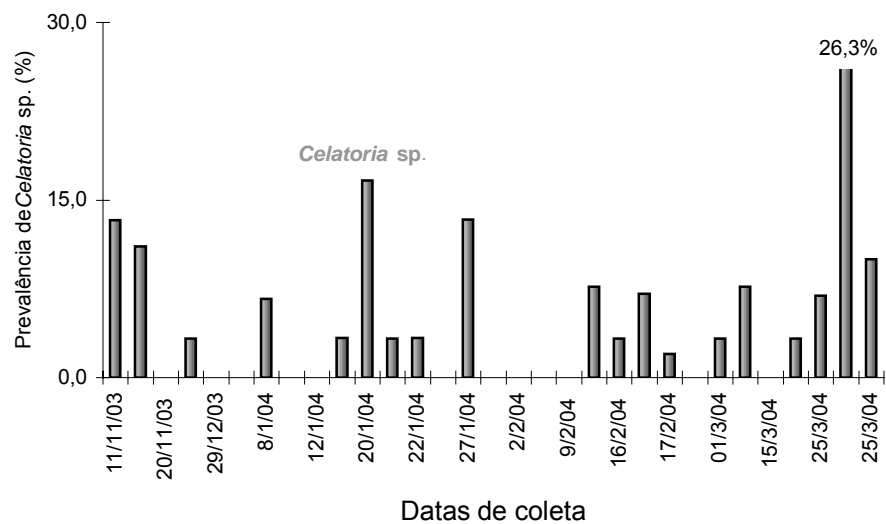


Figura 2. Prevalência (%) de *Celatoria* sp. sobre populações de *D. speciosa* durante a safra de soja (2003/04) em Londrina, PR.



Figura 3. Mosca parasitóide *Strongygaster* sp. (Diptera: Tachinidae) registrada em adulto de *Cerotoma arcuata*, em Londrina, PR.

O fungo *Beauveria* sp. teve maior ocorrência sobre *D. speciosa* durante o mês de fevereiro/2004 (10 %) (Fig. 2). O fungo *Metarhizium. anisopliae* (Metsch.) Sorok. não foi observado em alguns meses do ano, e sua maior ocorrência sobre os insetos foi de apenas 3,3 % durante o mês de fevereiro. Essa maior prevalência de *Beauveria* sp. durante o mês de fevereiro pode ser devido aos maiores níveis de inóculo, dados já constatados por Sosa-Gómez *et al.* (2001) na mesma região.

Ao contrário dos índices de parasitismo (26,3 %) de *Celatoria* sp. em *D. speciosa* encontrados neste trabalho, Heineck-Leonel e Salles (1997) encontraram índices próximos a 60% de parasitismo de *Celatoria bosqi* Blanchard em *D. speciosa* na região de Pelotas (RS), coletados em diferentes plantas olerícolas, entre os meses de maio a setembro, diminuindo entre os meses de outubro e fevereiro, e o maior percentual encontrado foi 84,5 % durante o mês de abril.

Esse parasitóide abandona o hospedeiro na forma de larva, empupando logo a seguir no solo ou, por vezes, dentro do corpo do inseto, que fica oco. O inseto permanece vivo até momentos antes da saída do parasitóide.

Não foram encontrados na literatura, dados sobre a ocorrência de moscas parasitóides do gênero *Strongygaster* em *Cerotoma arcuata*. Nalepa & Kidd (2002) registraram a ocorrência de *Strongygaster triangulifer* (Loew) sobre adultos de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) na Carolina do Norte (EUA) com 14,2 % de parasitismo. A primeira ocorrência de *S. triangulifer* em *H. axyridis* foi relatada por Katsoyannos & Aliniázeze na América do Norte (1998). Esses autores afirmam que a espécie *S. triangulifer* está amplamente distribuída na América do Norte e parasita insetos das Ordens Coleoptera, Lepidoptera, Dermaptera e Hemiptera.

As espécies de *Celatoria* têm sido freqüentemente descritas parasitando *Cerotoma* sp. Danielson *et al.* (2000) encontraram adultos de *Cerotoma trifurcata* (Forster) parasitados por moscas *Celatoria* sp. em Nebraska (América do Norte). Herzog (1977) e Marrone *et al.* (1983) encontraram adultos de *C. trifurcata* parasitados por *Celatoria diabroticae* (Shimer). No Brasil, Magalhães e Quintela (1987) relataram a ocorrência de *C. bosqi* como parasitóide de *C. arcuata*.

Com relação às infecções causadas por protozoários, Brooks & Jackson (1990) afirmam que infecções por *Gregarina* sp. aumentam a mortalidade de adultos de *D. speciosa* e inibem o desenvolvimento normal dos ovários. Entre os insetos avaliados nesta pesquisa, não foi verificada mudança aparente de comportamento daqueles indivíduos em que foi confirmada a infecção por protozoários.

O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Gregarina* é comum para todas as espécies que parasitam *Diabrotica*, mas o desenvolvimento pode variar de acordo com a espécie, alimentação e intensidade da infecção. Os insetos ingerem oocistos (Fig. 6) quando se alimentam das folhas, depois de quatro dias já apresentam gametocistos livres na hemolinfa. Os gametocistos são liberados juntamente com as fezes dos insetos e, dentro de 24 a 48 horas, liberam seus oocistos caso a temperatura esteja próxima de 25 - 26 °C e 70 % U.R. Os adultos

podem livrar-se da infecção dentro de duas semanas, a menos que oocistos adicionais sejam ingeridos.

Embora existam relatos superficiais do efeito nocivo desses protozoários sobre a fecundidade e longevidade de *Diabrotica* sp. (Brooks & Jackson 1990), não existem referências sobre o impacto na biologia, fisiologia ou comportamento desses protozoários. Considerando os elevados índices de prevalência desses protozoários, estudos adicionais sobre sua importância como reguladores das populações naturais de *D. speciosa* são necessários.



Figura 4. Trofozoítos do protozoário *Gregarina* sp. encontrados na hemolinfa de *Diabrotica speciosa* (aumento 100X).

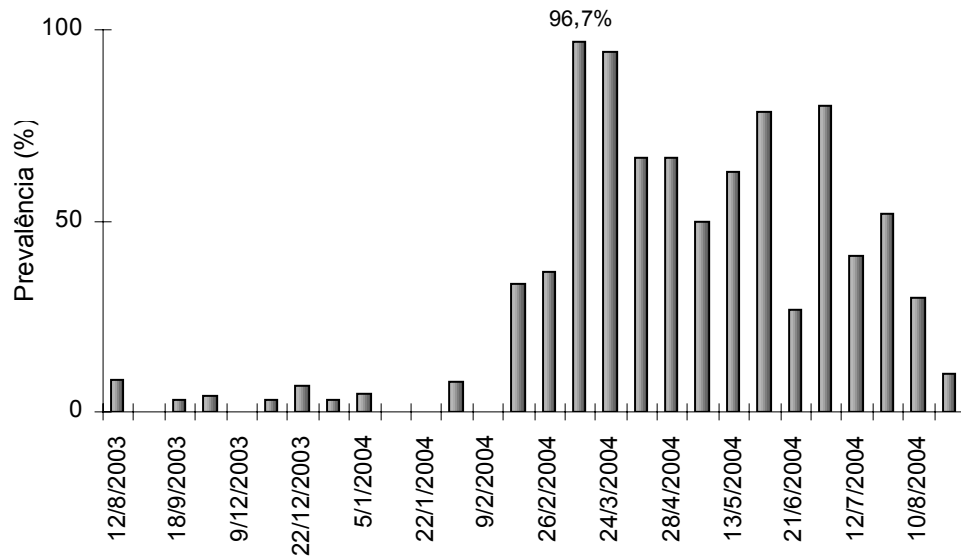


Figura 5. Prevalência (%) de *Gregarina* sp. em populações de *Diabrotica speciosa* durante a safra de soja (2003/04), em Londrina, PR.

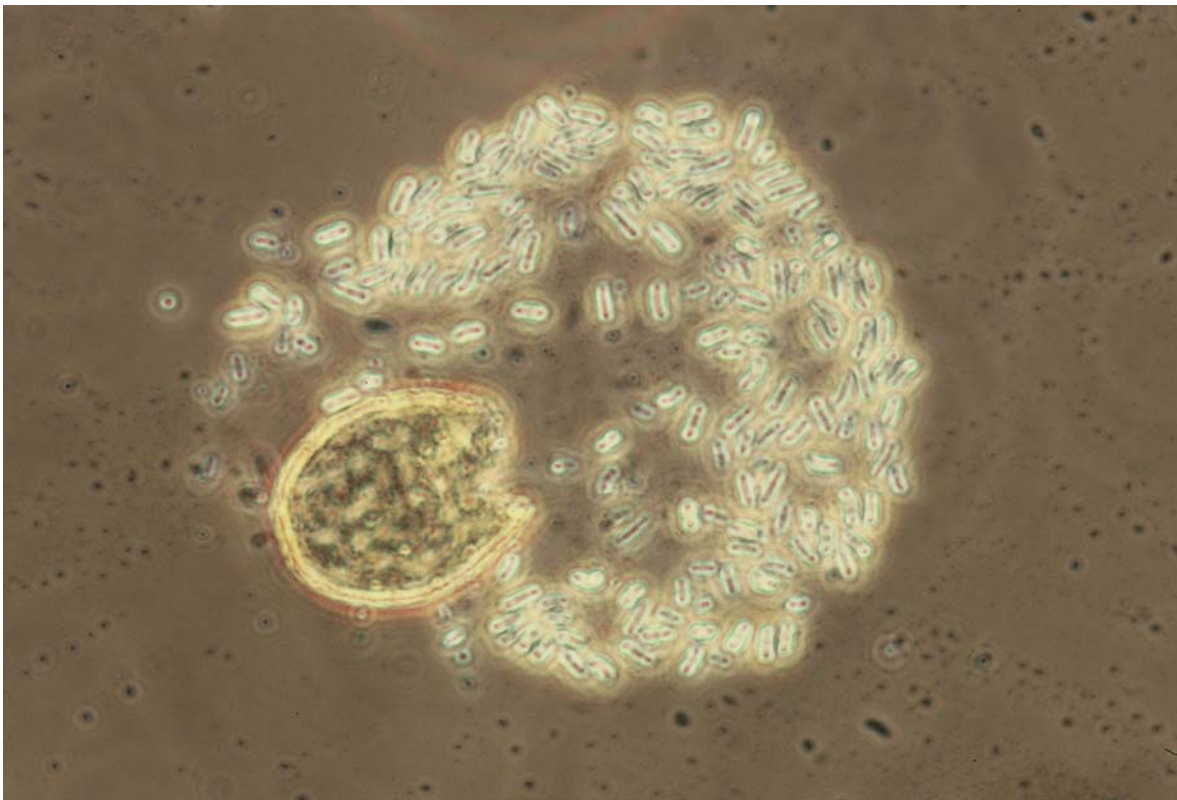


Figura 6. Oocisto de *Gregarina* encontrado na hemolinfa de *Diabrotica speciosa* (aumento 400X).

A ocorrência natural de *Beauveria* sp. sobre adultos de *D. speciosa* chegou a 10 % no mês de fevereiro/2004, enquanto que a ocorrência de *M. anisopliae* foi de apenas 3,3 %. Os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. possuem distribuição global e têm sido relatados como causa de mortalidade natural de *Diabrotica* sp. (Daoust & Pereira 1986, Shimazu *et al.* 1994, Sosa-Gómez *et al.* 2001). Heineck-Leonel e Salles (1997) encontraram a ocorrência do fungo *B. bassiana* de até 77,9% durante o mês de dezembro na região de Pelotas (RS), devido ao aumento da temperatura média do mês e à umidade relativamente alta durante maior parte do ano nessa região.

3.3.2. Flutuação da densidade do inóculo de fungos entomopatogênicos relacionada à área foliar

Durante a safra de soja 2003/04, a maior ocorrência no fitoplano das plantas de soja, foi do fungo *Beauveria* sp. (Fig. 7). Esse resultado está relacionado com a ocorrência natural de *Beauveria* sp. sobre *D. speciosa*. A ocorrência do fungo *Beauveria* sp. sobre as folhas de soja aumentaram entre os meses de fevereiro e março/2004, correspondendo às maiores porcentagens de insetos com sinais do patógeno. O fungo *M. anisopliae* foi observado com reduzida frequência sobre as folhas de soja, correspondendo à baixa porcentagem de indivíduos com sinais desse patógeno. Apesar da pouca incidência de *M. anisopliae* sobre *D. speciosa*, essa pequena porcentagem de indivíduos infectados foi exatamente no mês de maior ocorrência desse fungo sobre folhas de soja, durante o mês de fevereiro. A maior prevalência de *Beauveria* sp. sobre as populações de *D. speciosa* pode ser explicada pela elevada pressão de inóculo que ocorre nesse período, a maior suscetibilidade a essa espécie e a senescência das populações desse inseto.

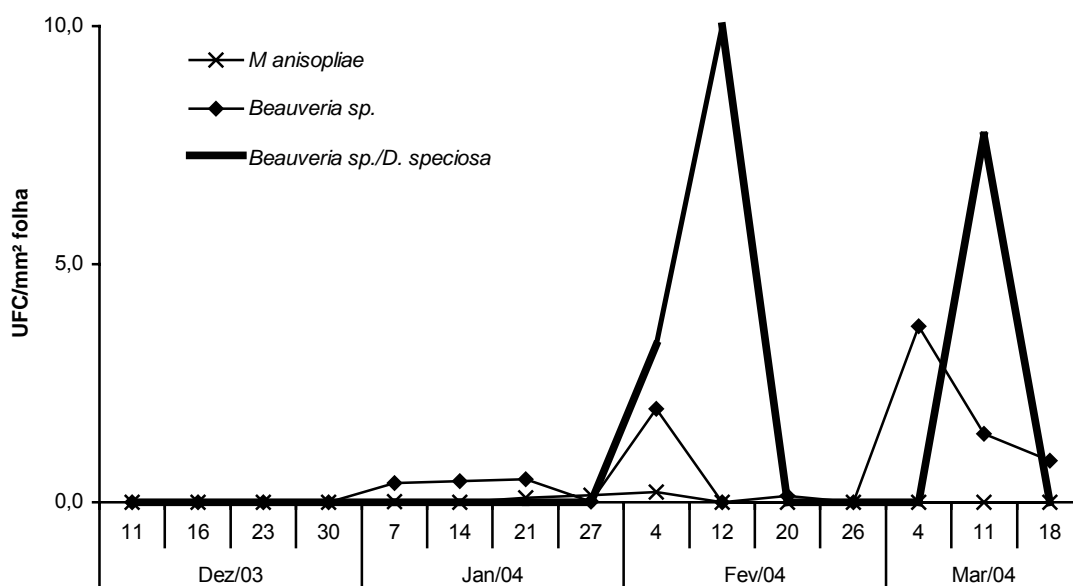


Figura 7. Densidade do inóculo dos fungos entomopatogênicos *Beauveria sp.* e *Metarhizium anisopliae* (UFC) em folíolos de soja ao longo da safra de soja 2003/04 em Londrina, PR.

3.4. Conclusões

- Os protozoários do gênero *Gregarina* e as moscas parasitóides do gênero *Celatoria* foram os inimigos naturais de maior prevalência sobre *D. speciosa*;
- As maiores densidades de *Beauveria sp.* sobre as folhas de soja foram constatadas durante os meses de fevereiro e março, correspondendo às maiores porcentagens de adultos de *D. speciosa* com sinais de infecção causada por esse patógeno;
- Foi constatada, pela primeira vez, a ocorrência de um taquinídeo do gênero *Strongygaster* parasitando *C. arcuata*.

3.5. Literatura citada

Batista Filho, A., Z.A. Ramiro, J.E.M. Almeida, L.G. Leite, E.R.R. Cintra & C. Lamas. 2003. Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. Arq. Inst. Biol. 70: 61-67.

Boetel, M.A., B.W. Fuller & P.D. Evenson. 2003. Emergence of adult northern and western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae) following reduced soil insecticide applications. J. Econ. Entomol. 96: 714-729.

Brooks, W.M. & J.J. Jackson. 1990. Eugregarines: current status as pathogens, illustrated in corn rootworms p.512-515. In Glen Osmond (eds). Proceedings of the Vth International Colloquium of Invertebrate Pathology and Microbial Control, Australia.

Chase, A.R., L.S. Osborne & V.M. Ferguson. 1986. Selective isolation of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, from an artificial potting medium. Fla. Entomol. 69: 285-292.

Danielson, S.D., J.R. Brandle & L. Hodges. 2000. Parasitoids of the bean leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) found in Nebraska soybean fields. J. Kans. Entomol. Soc. 73: 242-244.

Daoust, R.A. & R.M. Pereira. 1986. Survival of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes: Moniliales) conidia on cadavers of cowpea pests stored outdoors and in laboratory in Brazil. Environ. Entomol. 15: 642-647.

Gallo, D. (*in memoriam*), O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. de Baptista, E.Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002. (eds.) Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.

- Heineck-Leonel, M.A. & L.A.B. Salles. 1997.** Incidência de parasitóides e patógenos em adultos de *Diabrotica speciosa* (Germ.) (Coleoptera: Chrysomelidae) na região de Pelotas, RS. An. Soc. Entomol. Brasil. 26: 81-85.
- Herzog, D.C. 1977.** Bean leaf beetle: parasitism by *Celatoria diabroticae* (Shimer) and *Hyalomyodes triangulifer* (Leow.). J. Georgia. Entomol. Soc. 12: 64-68.
- Hohmann, C.L. & S.M. Carvalho. 1989.** Pragas e seu controle. In O feijão no Paraná. Circular Técnico 63: IAPAR. 303p.
- Huang, H., Z. Smilowitz, M.C. Saunders & R. Weisz. 1994.** Field evaluation of insecticide application strategies on development of insecticide resistance by colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol. 87: 847-857.
- Katsoyannos, P. & M.T. Aliniaze. 1998.** First record of *Strongygaster triangulifera* (Loew) (Diptera: Tachinidae) as a parasitoid of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinelidae) in western north America. Can. Entomol. 130: 905-906.
- Krysan, J.L. 1986.** Introduction: biology, distribution, and identification of pest *Diabrotica*, p. 1-23. In J.L. Krysan & T.A. Miller (eds.). Methods for the study of pest *Diabrotica*. New York, Springer-Verlag, 260p.
- Kuhlmann, U., van der Burgt, W.A.C.M. 1998.** Possibilities for biological control of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte, in Central Europe. Biocontrol News and Information 19: 59-68.
- Magalhães, B.P. & S.M. Carvalho. 1988.** Insetos associados à cultura. p. 573-589. In: Zimmermann, M.J.O., M. Rocha & T. Yamada (eds.). Cultura do

feijoeiro - fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, Associação Brasileira para pesquisa da potassa e do fosfato, 589p.

Magalhães, B.P. & E.D. Quintela. 1987. Níveis de parasitismo de *Urosigalphus chalcodermi* Wilkinson sobre *Chalcodermus bimaculatus* Fiedler e de *Celatoria bosqi* Blanchard sobre *Cerotoma arcuata* Olivier em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em Goiás. An. Soc. Entomol. Brasil 16: 235-238.

Marrone, P.G., W.M. Brooks & R.E. Stinner. 1983. The incidence of tachinidae parasites and pathogens in adult populations of the bean leaf beetle, *Cerotoma trifurcata* (Forster) (Coleoptera: Chrysomelidae) in North Carolina. J. Georgia Entomol. Soc. 18: 261-266.

Meinke, A.J., B.D. Siegfried, R.J. Wright & L.D. Chandler. 1998. Adult susceptibility of Nebraska western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) populations to selected insecticides. J. Econ. Entomol. 91: 594-600.

Metcalf, R.L. 1986. Foreword, p. vii-xvi. In J.L. Krysan & T.A. Miller (eds.). Methods for the study of *Diabrotica*. New York, Springer-Verlag, 260p.

Metcalf, R.L. & W.H. Luckman (eds.) 1982. Introduction to insect pest management. 2^a ed. New York, Wiley, 577p.

Nalepa, C.A. & K.A. Kidd. 2002. Parasitism of the multicolored asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) by *Strongygaster triangulifer* (Diptera: Tachinidae) in North Carolina. J. Entomol. Sci. 37: 124-127.

Olson, E.R., G.P. Dively & J.O. Nelson. 2000. Baseline susceptibility to imidacloprid and cross resistance patterns in colorado potato beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) populations. J. Econ. Entomol. 93: 447-458.

- Roberts, D.W. & A.S. Campbell. 1977.** Stability of entomopathogenic fungi, pp. 19-76. In Ignoffo C.M & D.L. Hostetter (eds.). Environmental stability of microbial insecticides. Misc. Publ. Entomol. Soc. Am. 10.
- Roush, R.T., C.W. Hoy, D.N. Ferro & W.M. Tingey. 1990.** Insecticide resistance in the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): influence of crop rotation and insecticide use. J. Econ. Entomol. 83: 315-319.
- Shimazu, M., R.T. Alves. & K. Kishino. 1994.** Investigation on entomogenous fungi in the cerrado region and their utilization for microbial control of pests. Relatório Técnico do Projeto Nipo-Brasileiro de Cooperação em Pesquisa Agrícola 1987/1992. Embrapa – CPAC. pp. 203-214.
- Sosa-Gómez, D.R., K.E. Delpin, F. Moscardi, & J.R.B. Farias. 2001.** Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium*, *Beauveria* and *Paecilomyces* in soybean under till and no-till cultivation systems. Neotrop. Entomol. 30: 407-410.
- Sosa-Gómez, D.R. & F. Moscardi. 1994.** Effect of till and no-till soybean cultivation on dynamics of entomopathogenic fungi in the soil. Fla. Entomol. 77: 284-287.
- Tigano-Milani, M.S., R.G. Carneiro, M.R. de Faria, H.S. Frazao & C.W. McCoy. 1995.** Isozyme characteristics and pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* and *P. lilacinus* to *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Meloidogyne javanica* (Nematoda: Tylenchidae). Biol. Cont. 5: 378-382.
- Cabrera Walsh, G., M.M. Athanas, L.A.B. Salles, R.F.W. Schroder. 2003.** Distribution, host range, and climatic constraints on *Centistes gasseni*

(Hymenoptera: Braconidae), a South American parasitoid of cucumber beetles, *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Bul. Entomol. Res.* 93: 561-567.

Wilson, F. 1970. The nature and advantages of Biological Control. *Advance Sci.* 26: 374-378.

Zucchi, R.A., S. Silveira Neto & O. Nakano. 1993. (eds.) Guia de identificação de pragas agrícolas. Piracicaba, FEALQ, 139p.

Capítulo 4. Eficiência de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em mistura com inseticidas no controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Resumo

O impacto nas populações de insetos causado por epizootias naturais, especialmente por fungos e vírus, demonstrou o potencial dos organismos microbiológicos para o controle de pragas. Todavia, considerando o elevado custo da produção de fungos entomopatogênicos e sua eficiência dependente das condições ambientais, a utilização conjunta do inseticida químico em baixas dosagens e o agente de controle biológico poderia compensar essas deficiências com um menor impacto ambiental. Esse trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o potencial de controle de isolados de fungos entomopatogênicos em mistura com baixas dosagens de inseticidas sobre a vaquinha patriota. Suspensões de conídios (32.010 ± 6.632 conídios/inseto) de nove isolados de *Beauveria bassiana* e quatro isolados de *Metarhizium anisopliae* foram utilizados nos testes de patogenicidade. Os isolados que apresentaram maior virulência foram utilizados nos ensaios de compatibilidade com os inseticidas fipronil e imidacloprid. Os ensaios foram realizados em laboratório e em casa de vegetação. Apesar de a germinação dos fungos não ter sido afetada pelos inseticidas, os tratamentos fungo + inseticida não apresentaram efeito sinérgico no controle de *D. speciosa*. Foi observado em casa de vegetação que os insetos alimentaram-se mais das plantas que receberam tratamento com o inseticida fipronil do que daquelas com imidacloprid. Em laboratório, após 48 horas de contato, as maiores áreas consumidas por *D. speciosa* ocorreram em trifólios de soja pulverizadas com fungos, com o inseticida fipronil em mistura com CNPSo-Bb61 e na testemunha. Bioensaios realizados com *C. arcuata* revelam baixa virulência de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a esse inseto, porém foi observado efeito sinérgico entre o isolado de *B. bassiana* CNPSo-Bb61 e imidacloprid.

Abstract

The impact on insect populations caused by natural epizootics, specially by fungi and viruses, shows the microorganism potential on pest control. However, considering the entomopathogenic fungi high cost production and its efficiency depending on environmental conditions, the use of low dosages of chemical insecticide with the microbial agent, could compensate these deficiencies with a minimum of environmental impact. The aim of this work was to evaluate the potential of entomopathogenic fungi associated with low dosages of insecticides to control *D. speciosa*. Conidia suspensions (32.010 ± 6.632 conidia per insect) of nine isolates of *Beauveria bassiana* and four of *Metarhizium anisopliae* were tested. The most virulent isolates were tested with fipronil and imidacloprid insecticides. The bioassays were carried out in controlled environments (laboratory and greenhouse). Insecticides did not affect the germination of the fungi. The mixture of fungi and insecticide treatments did not show synergistic effect to control *D. speciosa*. The feeding activity was enhanced by fipronil applications carried out in greenhouse. Leaves consumption was greater on leaflets pulverized with fungi, insecticide with the isolate of *B. bassiana* CNPSo-Bb61 and leaflets not pulverized. Bioassays with *C. arcuata* showed low virulence of the fungi to this insect, but when the isolate of *B. bassiana* CNPSo-Bb61 was applied with imidacloprid synergistic effect was observed.

4.1. Introdução

Diabrotica speciosa (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) é um inseto altamente polífago conhecido popularmente como vaquinha patriota. A fase larval deste inseto causa danos consideráveis ao sistema radicular de milho (*Zea mays* L.) e vem sendo causa de preocupação a agricultores de soja da região Oeste e Sudoeste do Paraná (Hoffmann-Campo *et al.* 2000). Por não serem geralmente alarmantes, não existem trabalhos referentes aos danos causados por este inseto em áreas de soja no Brasil.

Os insetos em geral, têm suas populações controladas naturalmente por predadores, parasitóides e doenças, quando o uso restrito de inseticidas possibilita a ocorrência desses inimigos naturais no sistema agrícola. Em especial, os fungos e vírus têm demonstrado potencial de controle de populações de insetos praga. A vantagem do uso de fungos em programas de controle biológico, é que esses podem invadir seus hospedeiros diretamente através de áreas intersegmentares do exoesqueleto.

Com o objetivo de controlar larvas de *Diabrotica undecimpunctata* Mannerheim, uma importante praga do milho nos EUA, Krueger & Roberts (1997) incorporaram propágulos dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* no solo e demonstraram que através de baixas concentrações dos fungos no solo foi possível proteger as raízes de milho do ataque das larvas desse inseto.

Na Argentina, Consolo *et al.* (2003) avaliaram a patogenicidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a larvas de *D. speciosa* e observaram que os isolados de *B. bassiana* foram mais virulentos ao inseto em comparação com os isolados de *M. anisopliae*.

No Brasil, Silva-Werneck *et al.* (1995) avaliaram isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* para o controle de larvas de *D. speciosa* em laboratório e obteve-se baixos índices de infecção dos fungos sobre o inseto. Pianoski *et al.* (1990) avaliaram a eficiência de *B. bassiana* sobre *D. speciosa* na cultura de feijão com diferentes adubações e concluíram que *B. bassiana* foi mais eficiente no controle do inseto quando aplicado em áreas sem adubação. Os autores inferiram que a

planta subnutrida pode ter alterado alguma característica do inseto, facilitando a ação do patógeno.

Entretanto, sabe-se que os fungos possuem fatores limitantes à sua eficiência de controle, como umidade relativa, temperatura, concentração do inóculo e fatores químicos e físicos que impedem a adesão dos conídios à cutícula do inseto. Por esse motivo, algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas para aumentar a eficiência dos fungos no controle de insetos, entre as quais a utilização de fungos em mistura com baixas dosagens de inseticidas (Quintela & McCoy 1998, Moino Jr. & Alves 1998, Furlong & Groden 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* e sua compatibilidade com inseticidas para o controle de adultos de *D. speciosa* em laboratório e casa de vegetação, de maneira a reduzir o uso de pesticidas químicos e proporcionar o controle natural desse inseto através de inimigos naturais. O consumo de plantas de soja tratadas com fungos e inseticidas por *D. speciosa* também foi avaliado.

4.2. Material e Métodos

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Soja, em Londrina, Paraná; seguindo os protocolos adotados por esse laboratório para os testes realizados neste trabalho.

4.2.1. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Diabrotica speciosa*

Foram obtidas culturas puras de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* do Banco de Fungos da Embrapa Soja (Tabela 1). Para tanto, os isolados estocados a -20°C em sílica gel foram multiplicados em placas de Petri com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e sulfato de streptomicina. As placas foram incubadas em condições controladas a 26 ± 1 °C, escotofase 24 horas, durante o período de

12 a 14 dias. Após esporulação, os conídios foram coletados por raspagem da superfície do meio de cultura com auxílio de uma espátula e transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada estéril com espalhante adesivo - Tween® 80 (15 µL/L). As suspensões foram filtradas para eliminação do micélio e homogeneizadas em agitador de tubos para contagem de conídios em hemocitômetro (Câmara de Neubauer). Para avaliação da viabilidade dos conídios, as suspensões foram nebulizadas durante um minuto, com auxílio de um nebulizador (ST SUPER-NS) sobre lâminas contendo meio de cultura BDA e sulfato de streptomina. As lâminas foram colocadas em caixas Gerbox (3 cm X 3 cm X 11 cm) e acondicionadas em condições controladas a 26 ± 1 °C, escotofase 24 horas e condições de umidade dentro da caixa Gerbox próxima à saturação. Após 24 horas, os conídios germinados foram contados. Foram avaliados nove isolados de *B. bassiana* e quatro isolados de *M. anisopliae* (Tabela 1) nos bioensaios de patogenicidade com *D. speciosa*. Foram realizadas três repetições de 30 insetos para cada isolado.

Os insetos adultos utilizados nos bioensaios foram coletados com rede entomológica em áreas cultivadas com soja, feijão e curcubitáceas, localizadas no campo experimental da Embrapa Soja, em Londrina, Paraná. Após a coleta, os insetos foram transferidos para gaiolas teladas (50 cm X 50 cm X 70 cm) onde permaneciam até a inoculação. As concentrações das suspensões foram calibradas para aproximadamente 1×10^7 /mL. Com auxílio de uma seringa acoplada a um micropipetador automático (modelo Arnold LV6 da Burkard Manufacturing Co. Ltda), 2 µL de suspensão foram inoculados no metaesterno (região ventral), sendo que cada inseto recebeu aproximadamente 32.010 ± 6.632 conídios. Os insetos inoculados eram acondicionados em caixas Gerbox (cada uma com 10 insetos) forradas com papel filtro estéril, mantidas em BOD a 26 ± 1 °C e 60 %U.R. e fotofase de 14 horas. Em cada Gerbox foram colocados pedaços de cenoura e algodão umedecido com água destilada estéril para manter a alimentação dos insetos, os quais eram trocados diariamente ou assim que houvesse necessidade. O grupo testemunha recebeu 2 µL de água destilada estéril com espalhante adesivo - Tween® 80 (15 µL/L) e foram acondicionados

nas mesmas condições dos grupos que receberam tratamento com fungos. A mortalidade foi avaliada diariamente até 15 dias após inoculação. Os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida (placa de Petri plástica contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril), mantida sob condições controladas a 26 °C e escotofase de 24 horas para confirmação dos insetos mortos por fungo.

A escolha dos isolados para realização dos testes de dose letal média (DL₅₀) foi realizada considerando os dados de mortalidade confirmada (insetos com sinais do patógeno), visto que um dos fatores considerados na utilização de fungos em controle biológico é a boa exteriorização do fungo em cadáveres de insetos, garantindo dessa forma a presença do inóculo no ambiente e aumentando a capacidade de transmissão horizontal do patógeno (Mulock & Chandler 2001).

Dois isolados de *Beauveria bassiana* (CNPSo-Bb61 e CNPSo-Bb467) (Tabela 1) foram avaliados quanto à patogenicidade em *C. arcuata*. Foram realizadas duas repetições de 30 insetos para cada isolado. Somente esses dois isolados foram avaliados devido ao número de insetos disponíveis em campo para os bioensaios.

Os resultados dos bioensaios foram submetidos aos testes de normalidade e heterocedasticidade e analisados mediante teste de comparação de médias de Student utilizando o software estatístico Sigmastat (Kuo *et al.* 1992).

Tabela 1. Lista dos isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos ensaios.

Acesso	Espécie	Hospedeiro Nome Científico	Ordem: Família	Local de Coleta	País	Acesso outras coleções
CNPSo-Ma12	<i>M. anisopliae</i>	solo		Londrina, PR	Brasil	
CNPSo-Ma468	<i>M. anisopliae</i>	<i>Timbraca</i>	Hemíptera:	Goiânia, GO	Brasil	CG-168 ¹
		<i>limbativentris</i>	Pentatomidae			
CNPSo-Ma469	<i>M. anisopliae</i>	<i>Ancognatha</i>	Coleoptera:	Madri,	Colombia	CG-293 ¹
		<i>scarabaeides</i>	Scarabaeidae	Cundinamarca		ARSEF-797
CNPSo-Ma473	<i>M. anisopliae</i>	<i>Diabrotica</i>	Coleoptera:	Santa Maria, RS	Brasil	
		<i>speciosa</i>	Chrysomelidae			
CNPSo-Bb13	<i>B. bassiana</i>	<i>Diabrotica</i>	Coleoptera:	Blanco Pozo,	Argentina	ESALQ-499 ²
		<i>speciosa</i>	Chrysomelidae	Tucumán		ARSEF-2515 ³
CNPSo-Bb21	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Diabrotica</i> sp.	Coleoptera:	Londrina, PR	Brasil	
			Chrysomelidae			
CNPSo-Bb25	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Diabrotica</i> sp.	Coleoptera:	Londrina, PR	Brasil	
			Chrysomelidae			
CNPSo-Bb59	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Diabrotica</i> sp.	Coleoptera:	Londrina, PR	Brasil	
			Chrysomelidae			
CNPSo-Bb61	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Diabrotica</i> sp.	Coleoptera:	Mangueirinha,	Brasil	
			Chrysomelidae	PR		
CNPSo-Bb71	<i>Beauveria</i> sp.	<i>Diabrotica</i> sp.	Coleoptera:	Mariópolis, PR	Brasil	
			Chrysomelidae			
CNPSo-Bb357	<i>B. bassiana</i>	<i>Diabrotica</i> sp.	Coleoptera:	Brasília-DF	Brasil	CG-61 ¹
			Chrysomelidae			
CNPSo-Bb467	<i>B. bassiana</i>	<i>Diabrotica</i>	Coleoptera:	Warta, Londrina,	Brasil	
		<i>speciosa</i>	Chrysomelidae	PR		
CNPSo-Bb470	<i>B. bassiana</i>	<i>Maecolaspis</i>	Coleoptera:	La Virginia	Argentina	CG-79 ¹
		<i>monrosi</i>	Chrysomelidae			ESALQ-501 ²

¹ - Coleção de Fungos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), SAIN - Parque Rural - Caixa Postal 02372, 70849-970, Brasília, DF - Brasil

² - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Departamento de Entomologia. Caixa Postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP - Brasil

³ - ARSEF - USDA Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures Plant Protection Research Unit - US Plant, Soil & Nutrition Laboratory. Tower Road, Ithaca NY 14853-2901 USA

4.2.2. Determinação da DL₅₀ dos isolados de *Beauveria bassiana* em *Diabrotica speciosa*

Dentre os fungos avaliados, três isolados de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb 59, CNPSo-Bb 61 e CNPSo-Bb 467, foram selecionados para determinação da

DL₅₀. Os métodos de multiplicação, acondicionamento e avaliação de viabilidade dos conídios foram os mesmos utilizados no item 4.2.1.

Os insetos foram inoculados através de aplicação tópica com doses que variaram entre 4.050 a 4.050.000 conídios por inseto. Os insetos inoculados foram acondicionados conforme descrição no item 4.2.1. Foram realizadas três repetições para cada isolado.

Os resultados de mortalidade total acumulada (insetos com e sem sinais do patógeno) foram analisados para estimativa da DL₅₀ pelo programa Polo-PC (LeOra Software, 1987).

4.2.3. Determinação da DL₅ dos inseticidas em *Diabrotica speciosa*

Foram utilizados dois produtos comerciais: fipronil (Regent 800 WG) e imidacloprid (Provado 200 SC). Para determinação da DL₅ de fipronil foram utilizadas doses que variaram entre 1,5 ng a 2000,0 ng de i.a. por inseto. Foram realizadas três repetições para cada dose, utilizando 30 insetos por repetição. Os insetos inoculados eram acondicionados conforme item 4.2.1. A mortalidade foi avaliada diariamente até 96h após a inoculação. Os resultados de mortalidade total foram analisados pelo programa Polo-PC (LeOra Software, 1987).

Nos ensaios com imidacloprid, foram utilizadas doses que variaram entre 0,000061 ng a 2 ng de i.a. por inseto. Foram realizadas duas repetições para cada dose, com 10 insetos em cada repetição. Os insetos inoculados eram acondicionados conforme descrição no item 4.2.1. A mortalidade foi avaliada diariamente até 96h após a inoculação. Os resultados foram analisados através do método 50% endpoint (Reed & Muench 1937) por não se adequarem ao modelo de Probit.

4.2.4. Efeito de *Beauveria bassiana* em mistura com inseticidas na infecção de *Diabrotica speciosa*

4.2.4.1. Infecção de *Diabrotica speciosa* após aplicação de *Beauveria bassiana* em mistura com inseticidas em laboratório

Foram realizados quatro tratamentos em laboratório (fungo, fungo + inseticida, inseticida e testemunha). O efeito dos inseticidas fipronil e imidacloprid em mistura com os três isolados de *B. bassiana* (CNPSo-Bb59, CNPSo-Bb61 e CNPSo-Bb467) foram avaliados sobre *D. speciosa*. Foi utilizada a DL₅₀ de cada isolado e a DL₅ de cada inseticida. A DL₅₀ utilizada foi calculada com os resultados de mortalidade total (com e sem sinais do patógeno) (Tabela 4). Para cada tratamento foram feitas três repetições, utilizando 30 insetos adultos em cada repetição, com 10 indivíduos em cada caixa Gerbox. A inoculação dos insetos foi realizada conforme descrição no item 4.2.1. Os insetos inoculados foram mantidos em condições controladas a 26 ± 1 °C, 60 %U.R. e fotofase de 14 horas. Em cada Gerbox foram colocados pedaços de cenoura como fonte de alimento e algodão umedecido com água destilada, trocados diariamente. A mortalidade foi avaliada diariamente até 15 dias após inoculação. Os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida (placa de Petri plástica contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril) mantida sob condições controladas a 26 °C, escotofase de 24 horas e umidade próxima da saturação, para confirmação dos insetos mortos por fungo.

A viabilidade dos conídios no tratamento com os inseticidas foi avaliada conforme descrição do item 4.2.1. Antes da nebulização sobre as lâminas, as suspensões permaneceram em agitação durante 4 horas em misturas com os inseticidas (Sosa-Gómez *et al.* 2003).

Baseando-se nos resultados dos bioensaios realizados com *D. speciosa*, dois isolados foram escolhidos para realização do experimento em casa de vegetação. Esses dois isolados foram avaliados novamente para verificar a

compatibilidade com os inseticidas, através de um método mais agressivo, discutido a seguir.

Os isolados foram inoculados em placas de Petri com meio BDA e sulfato de streptomina. As placas foram mantidas em condições controladas a 26 °C e 60 %U.R. por um período de 12 a 14 dias. Após esse período, porções das colônias (4 mm X 4 mm) foram recortadas das placas e colocadas em Erlenmeyers contendo 50 mL de meio líquido batata-dextrose e sulfato de streptomina. Em cada Erlenmeyer foram colocadas três porções das colônias. As concentrações utilizadas dos produtos comerciais foram as mesmas utilizadas no experimento em casa de vegetação (item 4.2.4.2.). Foram realizadas quatro repetições de cada inseticida mais a testemunha. Os tratamentos permaneceram em agitação durante dez dias, a 100 rpm por minuto, em sala climatizada a 25 ± 2 °C. Após esse período, alíquotas de meio de cultura de cada tratamento foram avaliadas sob microscópio óptico para verificação da ocorrência de contaminação. Os micélios foram então filtrados a vácuo, utilizando papel de filtração rápida, e pesados para determinação do peso úmido e seco.

Somente um isolado de *B. bassiana* (CNPSo-Bb61) e o inseticida imidacloprid foram avaliados em bioensaios com *Cerotoma arcuata*. Foi utilizada a dose 1×10^7 conídios por indivíduo de CNPSo-Bb61 e a DL_5 de Provado 200 SC avaliada em *D. speciosa*. Para cada tratamento foram utilizados 15 insetos adultos acondicionados em caixas Gerbox e 3 repetições.

Os resultados que apresentaram normalidade e heterocedasticidade foram submetidos à análise de variância (ANVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados que não apresentaram os requisitos para ANVA foram analisados pela análise de variância de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Os testes estatísticos foram realizados através do software Sigmastat (Kuo *et al.* 1992).

4.2.4.2. Infecção de *Diabrotica speciosa* após aplicação de *Beauveria bassiana* em mistura com inseticidas em casa de vegetação

Em casa de vegetação, foram realizados nove tratamentos (CNPSo-Bb59, CNPSo-Bb61, imidacloprid, fipronil, CNPSo-Bb59 + imidacloprid, CNPSo-Bb59 + fipronil, CNPSo-Bb61 + imidacloprid, CNPSo-Bb61 + fipronil e testemunha). Foram realizadas quatro repetições para cada tratamento. Nos tratamentos com inseticidas, a concentração utilizada foi 1/5 da dose recomendada para campo em 150 L de água. A concentração de fipronil utilizada foi 20 g PC/ha. Como não há recomendação de Provado 200 SC para o controle de *D. speciosa*, a concentração utilizada (105 mL PC/ha) foi equivalente à recomendada para Confidor 700 GRDa, que possui o mesmo ingrediente ativo (imidacloprid). As suspensões de fungos foram preparadas com a concentração correspondente a 1×10^{12} conídios/mL para 1 ha, adicionando-se Tween® 80 (15 µL/L) como espalhante adesivo. Os tratamentos foram pulverizados sobre vasos com plantas de soja (cultivar Paraná). A vazão do pulverizador foi 260 mL/min, com um bico cônico (Conejet TX-4) e pressão de 40 psi. Para cada repetição foi utilizado um vaso com quatro plantas de soja em estágio vegetativo V3-V4. Após pulverização, cada vaso de soja foi colocado dentro de uma gaiola telada (50 cm X 50 cm X 70 cm) onde foram liberados 30 insetos adultos de *D. speciosa*. O experimento foi realizado em casa de vegetação telada. Para registro da temperatura e umidade foram colocados dentro da casa de vegetação um termohigrógrafo e um psicrômetro. A mortalidade foi avaliada diariamente até 15 dias após pulverização. Os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida, conforme descrito no item 4.2.1, para confirmação dos insetos mortos por fungo.

Os resultados que apresentaram normalidade e heterocedasticidade foram analisados pela análise de variância (ANVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados que não apresentaram os requisitos para ANVA foram analisados pela análise de variância de Kruskal-Wallis. O software estatístico utilizado foi Sigmastat (Kuo *et al.* 1992).

4.2.5. Consumo foliar de *Diabrotica speciosa* em trifólios de soja tratados com fungos e inseticidas

O consumo foliar foi avaliado da seguinte maneira: foram oferecidos a *D. speciosa* trifólios de soja com os mesmos tratamentos realizados em casa de vegetação (item 4.2.4.2). A área foliar dos trifólios foi medida antes do consumo em um integrador de área foliar (modelo Stationary LI 3100), e após 24 e 48 horas de consumo. Os insetos foram acondicionados em caixas Gerbox (cada uma com cinco insetos) conforme item 4.2.1. Após 48 horas, os trifólios de soja tratados com fungos e inseticidas foram trocados por trifólios de soja sem tratamento, os quais eram trocados diariamente ou assim que houvesse necessidade. A mortalidade foi avaliada diariamente até 15 dias após aplicação. Os insetos mortos foram acondicionados em câmara úmida (placa de Petri plástica contendo papel filtro umedecido com água destilada estéril), mantida sob condições controladas de BOD a 26 °C, escotofase 24 horas e umidade próxima à saturação, para confirmação dos insetos mortos por fungo.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Seleção de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre *D. speciosa* e *C. arcuata*

Os isolados de *B. bassiana* CNPSo-Bb59, CNPSo-Bb61 (Tabela 2) foram os que causaram mortalidade total (com e sem sinais do patógeno) com diferença estatística ($p < 0,05$) da mortalidade total observada na testemunha. O isolado CNPSo-Bb59 apresenta valores de mortalidade total com diferença estatística dos valores da testemunha a partir do 11^o dia após inoculação com o fungo, enquanto o isolado CNPSo-Bb61 apresentou essa diferença 13 dias após inoculação. Esses isolados causaram valores elevados (%) de mortalidade confirmada (com sinais do patógeno), em relação a maioria dos isolados (Tabela 2). Os valores de

mortalidade confirmada foram 60 % para o isolado CNPSo-Bb59 e 54 % para o isolado CNPSo-Bb61. Entretanto, o isolado que causou maior porcentagem de mortalidade confirmada foi CNPSo-Bb467 (66,4 %), porém, os valores de mortalidade total não diferem estatisticamente da testemunha, embora o valor de mortalidade confirmada corrigida (55,3 %) seja maior que o valor de mortalidade confirmada corrigida do isolado CNPSo-Bb61. Esses resultados revelam que o isolado de CNPSo-Bb61 não esporula bem nos cadáveres dos insetos. O isolado CNPSo-Bb71 causou mortalidade total elevada (95 %), porém esse valor não difere estatisticamente ($p < 0,05$) da testemunha (63 %).

Através da análise dos resultados, observa-se que os isolados de *B. bassiana* são mais virulentos a *D. speciosa* em comparação com os isolados de *M. anisopliae*, concordando com os resultados obtidos por Consolo *et al.* (2003). Ao contrário, Silva-Werneck *et al.* (1995) encontraram maiores porcentagens de mortalidade com isolados de *M. anisopliae* onde o isolado CG293 de *M. anisopliae* causou maior porcentagem de mortalidade confirmada (30 %). Esse mesmo isolado foi utilizado para os ensaios de patogenicidade (CNPSo-Ma469) e causou mortalidade confirmada de 18,9 %. Não é possível comparar os resultados obtidos devido à diferente metodologia utilizada, visto que Silva-Werneck *et al.* (1995) usaram a técnica de imersão de larvas em suspensão de 10^8 conídios/mL.

A mortalidade causada pelos fungos utilizados ocorreu predominantemente entre os dias 5 - 13. Poucos indivíduos (< 5 %) morreram após o 13º dia.

A vantagem de trabalhar com dose letal é que os resultados podem ser facilmente comparados entre experimentos. Nos trabalhos realizados com concentração letal média (CL_{50}), não é possível estabelecer precisamente o número de conídios que entraram em contato com cada inseto, dificultando a comparação entre experimentos realizados com diferentes métodos.



Figura 1. Adulto de *Diabrotica speciosa* com conidiogênese de (a) *Beauveria bassiana* e (b) *Metarhizium anisopliae*.

Tabela 2. Mortalidade total e confirmada (% média ± EP) de adultos de *Diabrotica speciosa* durante 15 dias após inoculação com isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb13	3,6±3,6	4,8±4,8	4,8±4,8	7,0±5,6	15,2±8,8	18,7±9,5	29,3±14,7	40,5±14,0	43,8±14,0	48,4±12,5	56,4±11,6	58,7±12,0	63,2±11,1	65,4±10,9	67,6±8,9
Testemunha	1,1±1,1	2,2±2,2	3,3±1,9	6,7±3,4	6,6±3,4	6,6±3,4	6,6±3,4	13,3±3,9	16,7±5,1	20,0±1,9	28,9±4,0	31,1±3,0	37,8±3,0	45,6±3,0	51,1±3,0
Teste t	0,7	0,5	0,3		0,9	1,2	1,5	1,9	1,8	2,3	2,3	2,2	2,2	1,8	1,8
	a	a	a	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	a	a	a	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb13	0,0	0,0	0,0	1,2±1,2	4,7±2,4	5,9±3,2	14,0±7,1	15,1±6,0	19,8±7,5	19,8±7,5	24,1±4,7	25,3±4,8	26,4±3,8	28,6±3,9	29,7±3,1
Testemunha	0,0	0,0	0,0	1,1±1,1	1,1±1,1	1,1±1,1	1,1±1,1	2,2±2,2	3,3±3,4	4,4±3,0	8,9±7,4	10,0±7,0	11,1±7,0	11,1±6,2	13,4±6,7
Teste t					1,4	1,4	1,8	2,0	2,0	1,9	1,8	1,8	2,1	2,4	2,2
	ns	ns	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	ns	ns	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb21	1,2±1,2	7,9±6,2	11,6±4,8	22,0±9,7	22,0±9,7	26,9±10,0	35,5±8,9	44,2±12,1	47,9±9,5	50,4±10,1	71,1±11,9	79,0±11,9	79,0±11,9	82,7±9,7	82,7±9,7
Testemunha	1,1±1,1	2,2±1,1	4,5±2,3	10,0±3,4	11,1±4,2	11,1±4,2	16,8±8,1	22,2±4,6	24,4±5,4	26,6±5,8	36,5±6,6	37,6±5,7	41,9±3,7	52,0±9,0	56,4±8,9
Teste t		0,9	1,4	1,2	1,0	1,5	1,6	1,7	2,2	2,1	3,4	3,2		2,3	2,0
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	ns	a	a
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	ns	a	a

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb21	0,0	6,7±6,7	6,7±6,7	6,7±6,7	6,7±6,7	6,7±6,7	9,1±5,9	14,1±7,1	14,1±7,1	15,3±7,9	31,1±17,5	39,0±22,4	39,0±22,4	40,2±22,3	40,2±22,3
Testemunha	0,0	0,0	0,0	1,1±1,1	1,1±1,1	1,1±1,1	1,1±1,1	2,2±2,2	3,2±3,3	3,2±3,3	7,5±7,6	7,5±7,6	7,5±7,6	7,5±7,6	8,6±8,7
Teste t				0,8	0,8	0,8	1,4	1,6	1,4	1,4	1,2	1,3	1,3	1,4	1,3
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a

continua...

Tabela 2. Continuação...

		Mortalidade total														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb25	1,1±1,2 a	1,1±1,2 a	12,9±7,5 a	14,0±8,7 a	28,0±12,3 a	31,4±15,7 a	54,6±15,3 a	66,6±11,1 a	66,6±11,1 a	78,8±10,5 a	84,7±8,3 a	85,8±7,2 a	89,3±4,0 a	90,4±5,1 a	90,4±5,1 a	
Testemunha	7,0±3,2 a	11,4±7,7 a	16,1±10,5 a	25,3±16,2 a	37,5±28,4 a	37,5±28,4 a	41,2±28,2 a	46,3±25,5 a	46,3±25,5 a	50,2±23,6 a	52,8±22,2 a	58±19,7 a	60±18,3 a	62±17,7 a	63±17,2 a	
Teste t	-1,7	-1,7	-0,2	-0,6	-0,3	-0,2	0,4	0,7	0,7	1,1	1,4	1,3	1,5	1,6	1,5	

		Mortalidade confirmada														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb25	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	2,3±2,3 ns	3,4±3,5 ns	15,7±8,0 ns	22,9±5,0 ns	26,3±2,2 ns	33,9±8,2 a	38,6±7,9 a	39,8±7,7 a	43,2±8,1 a	44,4±6,9 a	44,4±6,9 a	
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	
teste t										4,0	4,7	5,0	5,2	6,2	6,2	

		Mortalidade total														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb59	0,0 ns	4,4±4,5 a	7,0±3,9 a	7,0±3,9 a	7,0±3,9 a	20,3±13,3 a	33,2±17,3 a	50,8±19,0 a	53,0±21,1 a	67,2±13,9 a	76,4±8,6 a	78,6±10,8 a	84,4±8,2 a	84,4±8,2 a	85,5±7,9 a	
Testemunha	1,1±0,9 ns	1,1±0,9 a	5,5±2,2 a	9,9±4,2 a	9,9±4,2 a	19,9±7,1 a	23,5±5,7 a	26,1±4,3 a	31,2±5,0 a	33,4±4,4 a	35,5±3,1 b	36,6±2,7 b	38,8±2,8 b	39,8±3,3 b	40,9±4,0 b	
teste t		0,7	0,3	-0,4	-0,4	0,0	0,5	1,1	0,9	2,1	3,6	3,3	4,6	4,5	4,6	

		Mortalidade confirmada														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb59	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	12,2±10,7 ns	17,2±8,3 ns	29,9±8,5 ns	34,3±9,6 ns	43,9±4,8 ns	52,0±3,1 ns	54,3±4,2 ns	58,9±4,9 ns	58,9±4,9 ns	60,0±5,8 ns	
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	
teste t																

continua...

Tabela 2. Continuação ...

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb61	0,0 ns	1,1±1,1 a	1,1±1,1 a	17,8±14,7 a	32,2±23,2 a	44,8±19,3 a	50,4±20,2 a	59,8±14,2 a	62,0±15,0 a	63,2±14,1 a	68,7±13,9 a	71,0±14,5 a	77,9±10,9 a	84,8±8,6 a	88,3±6,8 a
Testemunha	1,1±1,1 ns	3,3±1,9 a	3,3±1,9 a	5,5±4,0 a	5,5±4,0 a	16,7±5,1 a	18,9±5,6 a	24,4±8,1 a	30,0±10,1 a	31,1±11,2 a	36,7±8,5 a	37,8±8,1 a	41,1±6,2 b	51,1±3,0 b	54,5±2,2 b
teste t		-1,0	-1,0	0,8	1,1	1,4	1,5	2,2	1,8	1,8	2,0	2,0	2,0	3,8	4,8
Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb61	1,1±1,1 ns	1,1±1,1 ns	1,1±1,1 ns	7,9±7,9 ns	18,9±14,3 ns	27,9±12,5 ns	32,4±14,4 a	37,0±12,5 a	39,2±13,5 a	39,2±13,5 a	43,7±14,9 a	45,9±16,0 a	49,3±15,9 a	52,8±14,2 a	53,9±14,6 a
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	1,1±1,1 a	4,4±3,0 a	4,4±3,0 a	5,5±2,2 a	8,9±5,6 a	11,1±6,2 a	11,1±6,2 a	13,3±8,5 a	14,4±9,6 a
teste t							2,2	2,6	2,5	2,5	2,2	2,0	2,3	2,4	2,3
Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb71	2 ±1,1 a	2 ±1,1 a	8±3,0 a	14±5,9 a	25±10,8 a	41±11,3 a	61±10,9 a	76±8,4 a	76±8,4 a	84±6,3 a	89±2,7 a	93±2,0 a	94±3,1 a	94±3,1 a	95±2,9 a
Testemunha	7±3,2 a	11±7,7 a	16±10,5 a	25±16,2 a	37±28,4 a	37±28,4 a	41±28,2 a	46±25,5 a	46±25,5 a	50±23,6 a	53±22,2 a	58±19,7 a	60±18,3 a	62±17,7 a	63±17,2 a
teste t	-1,4	-1,2	-0,7	-0,7	-0,4	0,1	0,6	1,1	1,1	1,4	1,6	1,8	1,8	1,8	1,9
Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb71	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	1,3±1,3 ns	7,6±4,2 ns	22,8±4,6 ns	35,1±9,3 ns	35,1±9,3 ns	39,1±12,5 a	42,8±14,8 a	45,5±17,2 a	45,5±17,2 a	46,7±16,2 a	48,0±17,5 a
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 a a	1,3±1,3 a	1,3±1,3 b	1,3±1,3 a
teste t										3,0	2,8	2,6	2,6	2,8	2,7

continua...

Tabela 2. Continuação ...

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb357	1,1±1,1	3,5±0,1	9,3±1,3	10,6±2,3	18,4±5,9	26,9±8,3	29,3±10,0	41,2±13,2	49,3±13,5	55,0±14,0	55,0±14,0	56,1±14,4	61,0±15,9	61,0±15,9	63,4±15,8
Testemunha	0,0	0,0	4,6±2,9	7,1±1,8	9,3±3,8	11,9±2,7	11,9±2,7	15,7±2,4	16,8±2,8	18,0±1,6	19,2±0,43	20,5±1,3	28,0±4,1	34,1±4,5	36,4±3,6
teste t	ns	ns	a	a	a	a	a	ns	a	a	a	a	a	a	a
			1,5	1,2	1,3	1,7	1,7		2,3	2,6	2,5	2,5	2,0	1,6	1,7

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb357	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7±3,7	6,2±6,2	12,0±7,0	14,3±6,5	17,7±4,6	19,0±5,7	19,0±5,7	23,8±9,0	23,8±9,0	23,8±9,0
Testemunha	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
teste t	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb467	0,0	0,0	0,0	4,9±5,0	7,1±3,9	16,8±10,2	33,0±11,5	47,2±17,3	58,3±11,9	61,6±10,1	67,2±8,2	72,7±4,5	84,2±5,8	86,6±5,7	87,7±4,8
Testemunha	0,0	0,0	0,0	2,5±2,5	4,7±1,4	6,9±0,2	16,9±4,9	23,7±6,4	34,8±12,1	39,4±12,4	46,2±14,5	51,7±16,8	64,4±16,2	65,6±16,5	67,9±15,7
teste t	ns	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
				-0,4	-0,6	1,0	-1,3	-1,3	-1,4	-1,4	-1,3	-1,2	-1,2	-1,2	-1,2

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb467	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,6±1,1	19,6±1,6	33,8±7,2	43,8±3,6	47,2±0,5	52,7±5,4	58,3±5,5	63,0±4,2	65,3±4,2	66,4±5,3
Testemunha	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1±1,1	3,3±3,4	3,3±3,4	3,3±3,4	6,7±6,7	7,8±7,9	7,8±7,9	10,0±10,1	11,1±11,2
teste t	ns	ns	ns	ns	ns	ns	b	b	b	b	ns	b	b	b	b
							9,5	3,9	8,3	13,0		5,3	6,3	5,1	4,5

continua...

Tabela 2. Continuação

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb470	1,2±1,2 ns	1,2±1,2 ns	1,2±1,2 a	2,4±2,4 a	5,9±3,2 a	7,1±3,6 a	8,3±4,3 a	17,9±2,1 ns	27,4±5,2 a	32,2±5,5 a	35,7±4,2 a	39,3±3,6 a	50,0±4,2 a	51,2±3,2 a	57,1±7,2 a
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	4,4±3,0 a	4,4±3,0 a	6,7±5,1 a	6,7±5,1 a	9,2±4,0 a	12,9±3,2 ns	19,2±7,0 a	22,5±4,3 a	24,7±3,2 a	26,9±3,5 a	28,0±4,1 b	32,5±4,0 b	35,8±5,5 a
teste t			-1,0	0,5	-0,7	0,1	-0,1	1,3	0,9	1,4	2,1	2,5	3,8	3,7	

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb470	1,2±1,2 ns	1,2±1,2 ns	1,2±1,2 ns	1,2±1,2 ns	2,4±1,2 ns	3,6±2,1 ns	3,6±2,1 ns	9,5±2,4 ns	15,5±4,3 ns	17,9±3,6 ns	17,9±3,6 ns	21,4± ns	28,6±8,3 a	28,6±8,3 a	33,3±12,7 a
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	1,1±1,1 b	1,1±1,1 b	2,2±2,2 a
teste t													3,3	3,3	2,4

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma12	2,1±1,1 a	4,4±1,2 a	8,5±3,7 a	15,9±9,3 a	17,0±10,4 a	25,6±11,8 a	28,8±13,6 a	34,3±15,4 a	39,8±11,5 a	50,7±9,2 a	52,9±8,1 a	58,2±11,6 a	62,7±10,2 a	64,9±8,5 a	67,1±8,1 a
Testemunha	1,1±1,1 a	2,2±1,1 a	7,8±1,1 a	14,5±1,1 a	15,6±1,4 a	25,6±10,7 a	31,3±8,9 a	31,3±8,9 a	32,4±9,0 a	35,8±9,0 a	41,4±7,9 a	42,4±6,8 a	44,6±4,6 a	52,6±8,9 a	54,8±9,2 a
teste t	0,7	1,3	0,2	0,1	0,1	0,0	-0,1	0,2	0,5	1,2	1,0	1,2	1,6	1,0	1,0

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma12	0,0 ns	1,1±1,1 ns	1,1±1,1 ns	2,2±1,1 ns	3,3±0,1 ns	6,5±1,9 ns	8,7±2,9 ns	13,0±5,0 ns	18,5±2,4 ns	26,2±2,4 ns	26,2±2,4 ns	26,2±2,4 ns	27,3±2,7 ns	27,3±2,7 ns	28,4±3,4 ns
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
teste t															

continua...

Tabela 2. Continuação ...

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma468	6±4,2 a	8±3,1 a	22±4,0 a	31±7,9 a	46±7,8 a	51±7,5 a	57±6,6 a	59±7,6 a	59±7,6 a	66±7,4 a	74±6,3 a	76±6,2 a	79±5,2 a	80±4,2 a	81±5,1 a
Testemunha	7±3,2 a	11±7,7 a	16±10,5 a	25±16,2 a	37±28,4 a	37±28,4 a	41±28,2 a	46±25,5 a	32±25,5 a	50±23,6 a	53±22,2 a	58±19,7 a	60±18,3 a	62±17,7 a	63±17,2 a
teste t	-0,3	-0,4	0,6	0,3	0,3	0,5	0,6	0,5	0,5	0,6	0,9	0,9	1,0	1,0	1,0

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma468	1,1±1,2 ns	1,1±1,2 ns	2,3±1,1 ns	3,4±1,9 ns	6,8±2,0 ns	7,9±3,1 ns	12,5±6,2 ns	17,0±5,4 ns	17,0±5,4 ns	23,7±7,4 a	24,8±7,2 a	28,2±6,7 a	28,2±6,7 a	29,4±7,9 a	29,4±7,9 a
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b	1,3±1,3 b
teste t										3,0	3,2	4,0	4,0	3,6	3,6

Mortalidade total															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma469	0,9±0,9 ns	2,1±1,0 ns	2,1±1,0 a	3,2±1,93 a	7,9±5,0 a	14,6±4,0 a	19,7±4,9 a	28,3±5,9 a	32,5±6,8 a	40,1±6,9 a	42,4±9,0 a	47,8±6,2 a	56,0±5,3 a	58,2±5,9 a	63,0±5,0 a
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	4,6±2,9 a	6,8±5,0 a	6,8±5,0 a	19,4±14,0 a	20,6±13,2 a	23,2±12,6 a	23,2±12,6 a	24,3±13,6 a	24,3±13,6 a	25,6±13,5 a	28,1±13,5 a	32,0±14,4 a	32,0±14,4 a
teste t			-0,8	-0,7	0,1	-0,3	-0,9	0,4	0,6	1,0	1,1	1,5	1,9	1,7	2,0

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma469	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	1,1±1,1 ns	5,9±4,3 ns	9,2±3,2 ns	11,3±3,1 ns	15,7±1,2 ns	16,7±1,9 ns	18,9±2,9 ns	23,3±1,9 ns	25,2±1,0 ns	31,7±2,5 ns	35,1±4,3 ns	36,2±5,41 ns
Testemunha	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns	0,0 ns
teste t															

continua...

Tabela 2. Continuação ...

		Mortalidade total														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma473	0,0	3,3±0,0	6,7±1,92	6,7±1,9	8,9±1,1	24,4±11,1	33,3±13,5	38,9±14,5	41,1±18,2	44,4±20,0	46,7±22,2	50,0±20,4	54,5±21,5	55,6±21,1	55,6±21,1	
	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	
Testemunha	0,0	0,0	1,3±1,3	3,7±1,3	3,7±2,1	6,3±3,4	7,5±2,3	11,3±4,5	11,3±4,5	12,5±4,7	13,8±5,1	15,1±5,9	22,6±9,5	26,4±17,7	27,6±12,1	
	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	
teste t			2,3	1,0	2,1	1,6	1,9	1,5	1,6	1,5	1,4	1,6	1,4	1,2	1,1	

		Mortalidade confirmada														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Ma473	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3±1,9	4,4±2,9	4,4±2,9	5,5±2,2	10,0±6,7	11,1±6,2	14,4±7,8	16,7±8,4	16,7±8,4	
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Testemunha	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
teste t																

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Student

ns: não significativo

Os isolados avaliados em adultos de *C. arcuata*, CNPSo-Bb61 e CNPSo-Bb467, causaram mortalidade total e confirmada reduzida (Tabela 3), revelando que *C. arcuata* é menos suscetível ao ataque desses isolados de *B. bassiana* em comparação com *D. speciosa*. Cabe ressaltar, ainda, que o maior valor de mortalidade total foi 29 % 15 dias após a inoculação com o isolado CNPSo-Bb467. O valor de mortalidade confirmada desse isolado em *C. arcuata* foi 27 %, enquanto que em *D. speciosa* esse isolado causou o maior valor de mortalidade confirmada (66,4 %) entre todos os isolados avaliados. É evidente a necessidade de avaliar um número maior de isolados para *C. arcuata*. Segundo Fernandes *et al.* (1989), a virulência *B. bassiana* a *C. arcuata* foi influenciada pelo isolado utilizado e concentração do inóculo.

Tabela 3. Continuação ...

Mortalidade confirmada															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CNPSo-Bb467	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5±1,8	10,0±7,1	10,0±7,1	10,0±7,1	10,0±7,1	12,5±8,8	22,5±15,9	25,0±17,7	27,5±19,4
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a
testemunha	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a
Teste t	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Médias seguidas de mesma letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Student

4.3.2. Determinação da DL₅₀ dos isolados de *B. bassiana* sobre *D. speciosa*

O isolado CNPSo-Bb59 foi o isolado que apresentou menor número de conídios necessários para matar 50% dos insetos (697.300 conídios), com base nos resultados de mortalidade confirmada (com sinais do patógeno) referentes ao sétimo dia de avaliação (Tabela 5). O elevado número de conídios necessários para matar 50 % dos insetos testados confirma a baixa suscetibilidade de *D. speciosa* ao fungo *B. bassiana*, comparada com a DL₅₀ de *Metarhizium flavoviride* (8.900 conídios) para adultos do gafanhoto *Schistocerca gregaria* Forskål (Orthoptera: Acrididae) (Bateman *et al.* 1993) e com a DL₅₀ do isolado CNPSo-Ma 356 de *M. anisopliae* (129.794 conídios) para adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Chernaki-Leffer 2004).

Não foi possível comparar a suscetibilidade de *D. speciosa* com outros insetos, pelo fato que os artigos consultados (Magalhães 1988, Fernandes *et al.* 1989, Luz *et al.* 1998, Tamai 2002) utilizam o cálculo da CL₅₀ (concentração letal) para avaliar a suscetibilidade dos insetos aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Por motivo semelhante, não foi possível comparar os resultados obtidos com estudos que avaliaram a suscetibilidade de *D. speciosa* a outros isolados de fungos (Consolo *et al.* 2003, Silva-Werneck *et al.* 1995). Cabe ressaltar que alguns trabalhos utilizam erroneamente a denominação de dose letal (DL₅₀) para valores de concentração letal (CL₅₀). Como exemplo, o estudo realizado por Lawrence & Khan (2002), no qual observaram que $1,05 \times 10^7$ conídios/mL são necessários para matar 50 % de adultos de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) quando os insetos foram mergulhados em suspensões de fungos, e que concentrações de $7,31 \times 10^6$ conídios/mL são necessárias para matar 50 % dos insetos quando foram aplicadas sobre sementes e oferecidas aos insetos. Da mesma maneira, Monteiro *et al.* (1998) utilizaram erroneamente a denominação DL₉₀ para concentrações patogênicas de *M. anisopliae* ($3,5 \times 10^5$ conídios/mL) a larvas de *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Acari: Ixodidae).

Tabela 4. DL₅₀ de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Diabrotica speciosa* expostos a diferentes doses de conídios, com base na mortalidade total (com e sem sinais do patógeno) 7 dias após inoculação.

Isolado	n	DL ₅₀ (IC _{95%})	Coef. Ang. (± DP)	χ ²	g.l.
CNPSo-Bb59	586	67.635 (32.218 – 122.090)	0,8 ± 0,5	21,1 ^{n.s.}	15
CNPSo-Bb61	673	89.492 (39.360 – 166.220)	0,7 ± 0,5	28,4 ^{n.s.}	21
CNPSo-Bb467	585	110.470 (80.711 – 147.160)	1,1 ± 0,6	10,5 ^{n.s.}	15

n.: número de insetos/tratamento; n.s.: não significativo

Tabela 5. DL₅₀ de *Beauveria bassiana* sobre adultos de *Diabrotica speciosa* expostos a diferentes doses de conídios, com base na mortalidade confirmada (com sinais do patógeno) 7 dias após inoculação.

Isolado	n	DL ₅₀ (IC _{95%})	Coef. Ang. (± DP)	χ ²	g.l.
CNPSo-Bb59	559	697.300 (454.497 – 1.210.700)	0,5 ± 0,4	16,9 ^{n.s.}	17
CNPSo-Bb61	467	569.510 (380.910 - 938.770)	0,7 ± 0,4	17,4 ^{n.s.}	14
CNPSo-Bb467	501	1.143.300 (620.960 - 302.210)	0,6 ± 0,5	16,5 ^{n.s.}	15

n.: número de insetos/tratamento

n.s.: não significativo

4.3.3. Determinação da DL₅ dos inseticidas sobre *D. speciosa*

Para o inseticida fipronil o valor da DL₅ foi ajustado de 1,426 ng para 1,5 ng i.a./inseto (Tabela 6). Segundo Scharf & Siegfried (1999), fipronil foi tóxico em

baixas dosagens ($DL_{50} = 0,6$ ng i.a./inseto) para adultos de *D. v. virgifera*, em tratamento tópico.

O valor da DL_5 do inseticida imidacloprid é a dose em aplicação tópica que causou 4,5 % de mortalidade dos insetos (0,000061 ng i.a./inseto) (Tabela 7).

Tabela 6. Doses (ng i.a./inseto) de fipronil sobre adultos de *Diabrotica speciosa* após 96 horas de avaliação.

Doses	N	ng i.a./inseto	Coef. Ang. (± DP)	χ^2
DL_5	90	1,426	$5,5 \pm 1,3$	2,4 ^{n.s.}
DL_{50}	90	8,341	$5,5 \pm 1,3$	2,4 ^{n.s.}
DL_{90}	90	33,024	$5,5 \pm 1,3$	2,4 ^{n.s.}

n.: número de insetos testados

n.s.: não significativo

Tabela 7. Doses (ng i.a./inseto) de imidacloprid sobre adultos de *Diabrotica speciosa* após 96 horas de avaliação.

Doses	n	vivos (a)	Mortos (b)	total		%
				vivos (c)	mortos (d)	mortalidade (e)
0,000061	20	14	6	123	6	4,6
0,00018	20	12	8	109	14	11,3
0,00054	19	18	1	97	15	13,4
0,0016	20	18	2	79	17	17,7
0,0049	21	13	8	61	25	29,1
0,0148	21	15	6	48	31	39,2
0,0156	10	6	4	33	35	51,5
0,0312	21	10	11	27	46	63,0
0,044	19	8	11	17	57	77,0
0,062	21	9	12	9	69	88,5
0,125	21	0	21	0	90	100,0

Com base nesses resultados, observa-se que imidacloprid é mais tóxico a *D. speciosa* comparado com fipronil, visto que uma quantidade menor de produto é necessária para matar o mesmo número de insetos inoculados com fipronil.

4.3.4. Efeito de *B. bassiana* em mistura com inseticidas na infecção de *D. speciosa* e *C. arcuata*

4.3.4.1. Infecção de *D. speciosa* e *C. arcuata* após aplicação de *B. bassiana* em mistura com inseticidas em laboratório

A mortalidade total (com e sem sinais de patógeno) de adultos de *D. speciosa* que receberam o tratamento de fipronil em mistura com os fungos não difere ($p < 0,05$) dos valores de mortalidade total daqueles insetos que receberam aplicação somente com o tratamento de inseticida fipronil (Fig. 3). Em contrapartida, a mortalidade total dos insetos que receberam aplicação com imidacloprid em mistura com os fungos foi maior comparada com a mortalidade total dos insetos que receberam aplicação somente com os fungos. Porém, essa diferença não foi significativa ($p < 0,05$). Através desses resultados, observamos que os fungos em mistura com os inseticidas não apresentaram efeito aditivo, nem mesmo sinérgico no controle de *D. speciosa*. Nota-se que o inseticida fipronil provocou mortalidade elevada em comparação com o inseticida imidacloprid, concordando com os resultados obtidos por Moino Jr. & Alves (1998), os quais observaram que o inseticida fipronil causou mortalidade precoce de *Heterotermes tenuis* (Hagen).

Quintela & McCoy (1997), no entanto, observaram efeito sinérgico entre *M. anisopliae* e imidacloprid para o controle de *Diaprepes abbreviatus* (Linnaeus) (Coleoptera: Curculionidae) quando aplicados via oral ou através de contato. Porém, quando doses maiores de imidacloprid foram utilizadas, a conidiogênese sobre o inseto diminuiu. Quintela & McCoy (1998a) obtiveram aumento sinérgico da mortalidade de larvas de *D. abbreviatus* (L.) quando incorporaram ao solo

misturas de imidacloprid com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, comparando com os valores de mortalidade obtidos quando aplicaram somente os fungos ou o inseticida.

Os baixos índices de mortalidade de *D. speciosa* tratadas com fungos em mistura com os inseticidas deve-se, em parte, à baixa suscetibilidade desses insetos aos fungos utilizados, como foi verificado nos testes de patogenicidade do item 4.3.1., ou pela falta de efeito aditivo ou sinérgico entre esses agentes de controle.

Moino Jr. & Alves (1998) verificaram que imidacloprid provoca alteração no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae), permitindo que um maior número de conídios fique aderido ao tegumento dos insetos. Esse comportamento não foi observado para o inseticida fipronil. Essa diferença pode estar relacionada com o modo de ação dos dois produtos. Imidacloprid é um inseticida sistêmico do grupo das nitroguanidinas, com ação de contato e ingestão, o qual atua como uma neurotoxina, ligando-se ao receptor nicotínico da acetilcolina. Fipronil é um inseticida do grupo fenilpirazol, que também atua sobre o sistema nervoso central, porém, como um inibidor reversível do receptor GABA (ácido gama-aminobutírico).

Além da alteração no comportamento dos insetos causada pelos produtos químicos, alguns estudos sugerem que os componentes inertes dos inseticidas, como detergentes, solventes e proteínas com alto peso molecular, interferem na adesão do conídio ao tegumento do inseto, neutralizando as interações hidrofóbicas e dessa forma reduzem a adesão do conídio quando em suspensão com inseticidas (Boucias *et al.* 1991, Quintela & McCoy 1998b).

Não foi observada inibição na germinação dos isolados de *B. bassiana* em contato com o inseticida fipronil (Tabela 8) porém, foi observada uma pequena inibição na germinação do isolado CNPSo-Bb61 quando colocado em contato com o inseticida imidacloprid (Tabela 9), porém esse efeito não foi observado no peso micelial desse isolado utilizando um método mais agressivo de contato (Tabela 10). Podemos afirmar que o inseticida imidacloprid não afetou a viabilidade do isolado CNPSo-Bb61, visto que a maior porcentagem de insetos com sinais do

patógeno, foi quando esse isolado foi aplicado em mistura com imidacloprid sobre *D. speciosa* (Tabela 15), comparando com os valores de mortalidade confirmada (com sinais do patógeno) dos isolados CNPSo-Bb59 e CNPSo-Bb467 em mistura com imidacloprid. De modo geral, imidacloprid não teve efeito fungitóxico sobre o fungo *B. bassiana*, concordando com os resultados obtidos por Neves *et al.* 2001, Cavalcanti *et al.* 2002, Loureiro *et al.* 2002, Tamai *et al.* 2002. A maior parte desses estudos utiliza a metodologia sugerida por Alves *et al.* (1998a) para padronização dos testes de compatibilidade entre fungos e inseticidas. Esse sistema baseia-se na adição do produto químico ao meio de cultura ainda não solidificado e posterior inoculação do fungo ao meio de cultura sólido. Os valores médios de porcentagem de conidiogênese e crescimento vegetativo das colônias dos fungos são utilizados para calcular o índice de compatibilidade do fungo com o inseticida.

A metodologia proposta por Alves *et al.* (1998a) foi utilizada por Duarte *et al.* (1992) para avaliar a compatibilidade de *M. anisopliae* com inseticidas, de modo que esses autores sugerem que a formulação do produto pode afetar a compatibilidade entre fungos e inseticidas. Utilizando o mesmo método, Tamai *et al.* (2002) encontraram diferença na compatibilidade entre diferentes formulações do inseticida betacyflutrin e *B. bassiana*. Porém, essa técnica não permite total contato do fungo com o inseticida, uma vez que o produto utilizado pode precipitar no meio de cultura (Sosa-Gómez, comun. pess.).

Portanto, existem outros métodos para avaliação da compatibilidade de fungos e inseticidas, entre os quais a avaliação do crescimento do patógeno em meio líquido contendo o produto a ser avaliado e a implantação de pedaços de papel impregnados com os produtos no meio de cultura (Alves *et al.* 1998a). Cabe ressaltar que estudos *in vitro* expõem ao máximo o microrganismo à ação do produto, fato que não ocorre em condições de campo. Assim constatada a inocuidade de um produto em laboratório, espera-se que o mesmo seja seletivo no campo. Por outro lado, a alta toxicidade de um produto *in vitro* nem sempre indica a sua elevada toxicidade em campo, mas sim a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza (Moino Jr. & Alves 1998).

Para evitar que problemas de interpretação ocorram, mais de um método pode ser utilizado para avaliar a compatibilidade entre fungos e produtos químicos, como por exemplo o trabalho de Gardner & Kinard (1998), onde os autores avaliaram a compatibilidade dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* com o inseticida imidacloprid utilizando metodologias diferentes. No primeiro método, adicionaram doses de imidacloprid ao meio de cultura (SDA) e após a solidificação do meio inocularam suspensões dos isolados de fungos. A viabilidade dos conídios germinados e não germinados foi avaliada após 24 horas. No segundo método, os autores avaliaram o crescimento micelial inoculando suspensões de conídios em meio líquido, deixando em agitação contínua durante sete dias a 27 °C. Os autores concluíram que não houve diferença na resposta dos fungos ao inseticida imidacloprid em ambos os métodos.

Tabela 8. Germinação dos conídios de *Beauveria bassiana* após 24 horas. Os conídios foram nebulizados sobre lâminas com meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) e sulfato de streptomina após 4 horas de contato com o inseticida fipronil.

Tratamentos	conídios germinados (%) ± DP
CNPSo-Bb59	96,9 ± 4,13 a
CNPSo-Bb61	97,7 ± 2,25 a
CNPSo-Bb467	90,5 ± 5,46 a
CNPSo-Bb59 + fipronil	94,9 ± 4,04 a
CNPSo-Bb61 + fipronil	90,6 ± 3,70 a
CNPSo-Bb467 + fipronil	87,1 ± 5,92 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05)

Tabela 9. Germinação dos conídios de *Beauveria bassiana* após 24 horas. Os conídios foram nebulizados sobre lâminas com meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e sulfato de streptomicina após 4 horas de contato com o inseticida imidacloprid.

Tratamentos	conídios germinados (%) ± DP
CNPSo-Bb59	98,2 ± 0,45 c
CNPSo-Bb61	98,4 ± 0,55 c
CNPSo-Bb467	88,8 ± 2,77 abc
CNPSo-Bb59 + imidacloprid	96,4 ± 1,95 bc
CNPSo-Bb61 + imidacloprid	83,7 ± 12,93 a
CNPSo-Bb467 + imidacloprid	87,6 ± 3,56 ab

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$)

Tabela 10. Peso micelial (g) de isolados de *Beauveria bassiana* em meio de cultura líquido batata-dextrose e sulfato de streptomicina, após 10 dias de agitação contínua.

CNPSo-Bb59		CNPSo-Bb61	
Tratamentos	Média (g) ± DP	Tratamentos	Média (g) ± DP
Fungo	0,21 ± 0,006 a b	Fungo	0,14 ± 0,029 a
Fungo + fipronil	0,22 ± 0,004 a	Fungo + fipronil	0,15 ± 0,021 a
Fungo + imidacloprid	0,21 ± 0,006 b	Fungo + imidacloprid	0,16 ± 0,027 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 11. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSO-Bb59 e sua compatibilidade com fipronil durante 10 dias de avaliação em laboratório.

Mortalidade total										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb59	1,1 \pm 1,91	5,5 \pm 3,88	7,7 \pm 7,73	9,9 \pm 8,86	14,3 \pm 7,79	22,1 \pm 8,62	37,4 \pm 4,47	41,9 \pm 10,66	50,6 \pm 9,05	59,5 \pm 10,81
	a	a	a	a	a	a	ab	ab	ab	ab
Fipronil	16,2 \pm 19,54	22,2 \pm 13,65	29,2 \pm 16,63	45,8 \pm 9,74	51,7 \pm 8,05	62,2 \pm 13,87	64,6 \pm 13,24	68,1 \pm 11,08	71,6 \pm 9,80	72,8 \pm 9,31
	a	a	a	b	b	a	c	ab	ab	ab
CNPSO-Bb59 + Fipronil	19,2 \pm 12,39	25,9 \pm 21,18	31,5 \pm 22,37	36,1 \pm 20,99	40,7 \pm 7,07	47,6 \pm 11,29	61,2 \pm 11,04	70,3 \pm 14,19	74,8 \pm 17,84	80,6 \pm 16,03
	a	a	a	ab	ab	a	bc	b	b	b
Testemunha	2,3 \pm 3,98	7,0 \pm 6,89	8,2 \pm 7,24	11,8 \pm 5,00	18,9 \pm 0,69	24,9 \pm 10,47	33,2 \pm 10,38	40,4 \pm 6,60	44,0 \pm 5,17	45,3 \pm 4,36
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Mortalidade confirmada										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb59	0,00	1,1 \pm 1,85	1,1 \pm 1,85	2,2 \pm 1,88	4,3 \pm 4,93	9,9 \pm 3,30	20,9 \pm 3,62	24,2 \pm 2,19	28,6 \pm 2,42	36,3 \pm 6,35
	ns	a	a	a	a	a	a	b	b	b
Fipronil	0,00	2,4 \pm 2,08	4,7 \pm 2,08	5,9 \pm 4,16	8,3 \pm 5,54	9,4 \pm 4,22	9,4 \pm 4,22	10,6 \pm 6,29	10,6 \pm 6,29	11,8 \pm 5,59
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CNPSO-Bb59 + Fipronil	3,40	3,4 \pm 3,45	3,4 \pm 3,45	4,6 \pm 3,98	6,9 \pm 5,95	9,2 \pm 7,97	19,4 \pm 8,14	25,1 \pm 1,47	27,3 \pm 3,86	33,1 \pm 9,13
	ns	a	a	a	a	a	a	b	b	b
Testemunha	0,00	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	5,9 \pm 1,91	8,3 \pm 2,06	10,7 \pm 0,40	13,1 \pm 2,14	14,3 \pm 3,93	14,3 \pm 3,93
	ns	a	a	a	a	a	a	ab	a	a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

ns: não significativo

Tabela 12. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb61 em compatibilidade com fipronil durante 10 dias de avaliação em laboratório.

Mortalidade total										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb61	2,2 \pm 3,85	6,6 \pm 11,55	7,8 \pm 10,72	11,2 \pm 10,66	19,1 \pm 15,68	39,2 \pm 11,23	48,2 \pm 12,86	62,7 \pm 15,59	67,2 \pm 13,56	70,7 \pm 10,45
	ns	ns	a	a	a	ab	ab	a	a	bc
Fipronil	16,0 \pm 19,66	21,8 \pm 13,93	30,0 \pm 13,93	46,1 \pm 9,28	51,8 \pm 7,80	62,3 \pm 13,73	64,6 \pm 13,24	68,0 \pm 11,30	71,3 \pm 10,19	72,5 \pm 9,80
	ns	ns	a	b	b	b	b	a	a	c
CNPSO-Bb61 + Fipronil	2,3 \pm 1,96	8,1 \pm 7,96	10,3 \pm 7,24	13,7 \pm 8,94	21,7 \pm 6,54	26,2 \pm 10,39	33,2 \pm 10,43	40,0 \pm 13,01	43,4 \pm 16,15	48,1 \pm 10,75
	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	ab
Testemunha	2,3 \pm 3,98	7,0 \pm 6,90	8,2 \pm 7,24	11,8 \pm 4,99	18,9 \pm 10,71	24,9 \pm 10,47	33,2 \pm 10,38	40,4 \pm 6,61	44,0 \pm 5,18	45,3 \pm 4,37
	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	a

Mortalidade confirmada										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb59	1,1 \pm 1,92	4,4 \pm 7,68	5,5 \pm 6,93	6,7 \pm 8,84	7,8 \pm 10,71	15,6 \pm 10,10	21,2 \pm 13,77	27,9 \pm 13,65	31,4 \pm 13,61	32,5 \pm 12,37
	ns	a	a	a	ns	a	a	a	a	b
Fipronil	1,1 \pm 1,92	2,3 \pm 2,00	4,6 \pm 1,85	5,7 \pm 3,75	8,0 \pm 4,99	9,1 \pm 3,64	9,1 \pm 3,64	10,2 \pm 5,60	10,2 \pm 5,60	11,4 \pm 4,94
	ns	a	a	a	ns	a	a	a	a	a
CNPSO-Bb59 + Fipronil	1,1 \pm 1,99	4,6 \pm 5,23	4,6 \pm 5,23	6,9 \pm 3,35	10,3 \pm 0,36	14,9 \pm 3,62	17,2 \pm 3,23	19,5 \pm 4,92	21,7 \pm 6,79	26,4 \pm 1,32
	ns	a	a	a	ns	a	a	a	a	ab
Testemunha	1,1 \pm 1,99	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	5,9 \pm 1,92	8,3 \pm 2,06	10,7 \pm 0,40	13,1 \pm 2,14	14,3 \pm 3,93	14,3 \pm 3,93
	ns	a	a	a	ns	a	a	a	a	ab

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

ns - não significativo

Tabela 13. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb467 em compatibilidade com fipronil durante 10 dias de avaliação em laboratório.

Mortalidade total										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb467	0,0 \pm 0,00	6,5 \pm 6,05	10,0 \pm 6,00	17,6 \pm 13,31	21,2 \pm 10,10	31,0 \pm 9,54	43,3 \pm 11,7	51,5 \pm 4,66	59,0 \pm 7,91	67,1 \pm 6,83
	ns	a	a	ab	ab	ab	a	ab	ab	b
Fipronil	16,0 \pm 19,66	21,8 \pm 13,92	29,8 \pm 16,22	46,1 \pm 9,25	51,8 \pm 7,80	62,3 \pm 13,72	64,6 \pm 13,24	68,0 \pm 11,30	71,3 \pm 10,19	72,5 \pm 9,80
	ns	a	a	b	b	b	a	b	b	b
CNPSO-Bb467 + Fipronil	6,6 \pm 11,55	13,8 \pm 14,25	16,0 \pm 18,08	17,1 \pm 19,97	26,5 \pm 17,53	33,5 \pm 17,12	41,5 \pm 19,00	49,8 \pm 15,58	55,8 \pm 11,38	62,0 \pm 5,47
	ns	a	a	ab	ab	ab	a	ab	ab	ab
Testemunha	2,3 \pm 3,98	7,0 \pm 6,90	8,2 \pm 7,24	11,8 \pm 4,99	18,9 \pm 10,71	24,9 \pm 10,47	33,2 \pm 10,38	40,4 \pm 6,61	44,0 \pm 5,18	45,3 \pm 4,37
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Mortalidade confirmada										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb467	0,0 \pm 0,00	5,2 \pm 6,15	5,2 \pm 6,15	6,5 \pm 6,05	10,2 \pm 8,70	17,8 \pm 12,92	23,9 \pm 14,15	31,2 \pm 14,59	37,4 \pm 16,14	41,9 \pm 13,28
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	ns
Fipronil	1,1 \pm 1,92	2,3 \pm 2,00	4,6 \pm 1,85	5,7 \pm 3,75	7,9 \pm 5,00	9,10 \pm 3,64	9,1 \pm 3,64	10,2 \pm 5,60	10,2 \pm 5,60	11,4 \pm 4,94
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	ns
CNPSO-Bb467 + Fipronil	0,0 \pm 0,00	1,3 \pm 2,31	1,3 \pm 2,31	1,3 \pm 2,31	4,7 \pm 5,03	6,9 \pm 8,72	11,5 \pm 10,46	18,7 \pm 16,86	23,5 \pm 20,00	28,4 \pm 23,53
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	ns
Testemunha	1,1 \pm 1,99	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	5,9 \pm 1,92	8,3 \pm 2,06	10,7 \pm 0,40	13,1 \pm 2,14	14,3 \pm 3,93	14,3 \pm 3,93
	ns	a	a	a	a	a	a	a	a	ns

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

ns - não significativo

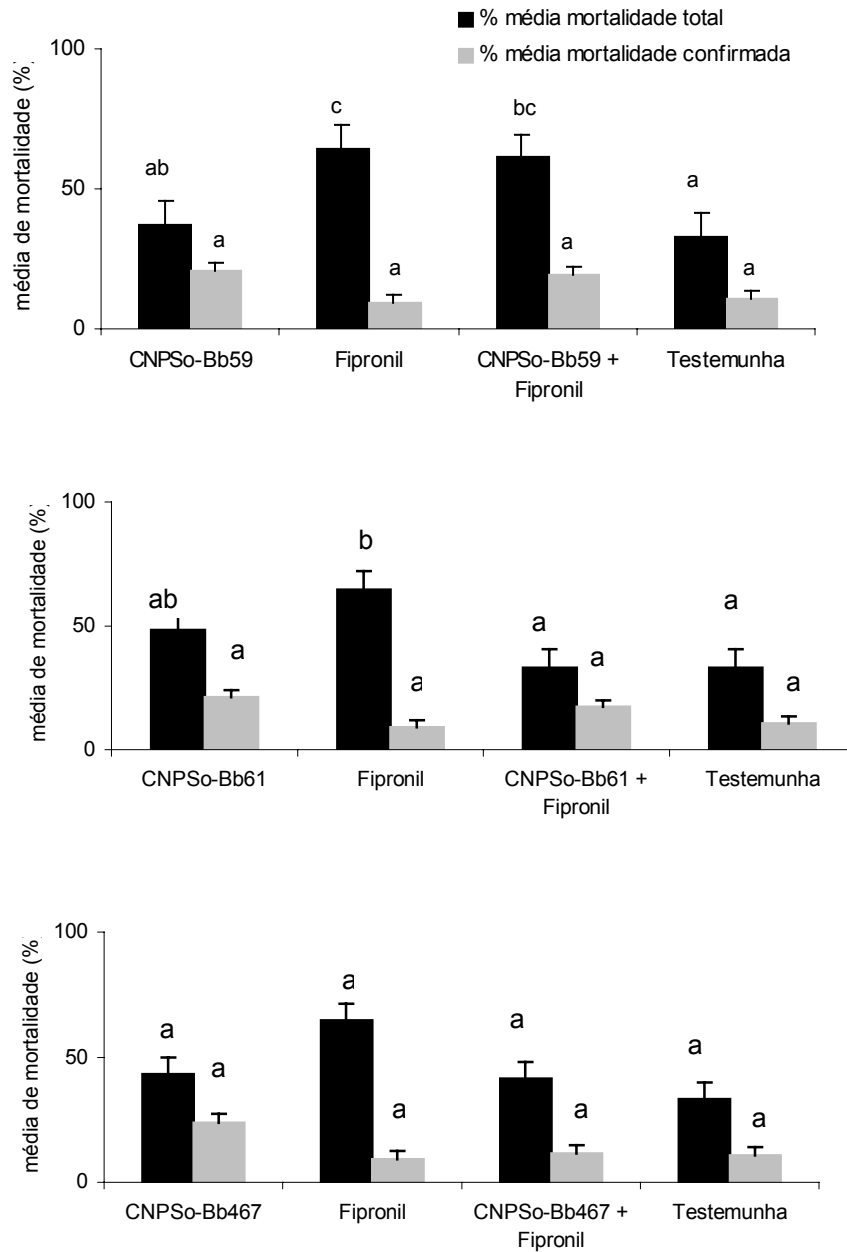


Figura 2. Mortalidade média (%) de *Diabrotica speciosa* nos tratamentos com *Beauveria bassiana* em mistura com fipronil, 7 dias após inoculação. Médias seguidas de mesma letra nas barras de mesma cor, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 14. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb59 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.

Mortalidade total										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb59	1,1 \pm 1,91	5,5 \pm 3,90	7,7 \pm 7,73	10,0 \pm 8,86	14,3 \pm 7,77	22,1 \pm 8,62	37,4 \pm 4,45	41,9 \pm 10,62	50,6 \pm 9,07	59,5 \pm 10,81
	a	a	a	a	a	a	ab	ab	ab	b
Imidacloprid	2,5 \pm 2,14	2,5 \pm 2,14	4,7 \pm 2,06	7,3 \pm 4,10	9,8 \pm 6,10	15,5 \pm 2,30	20,4 \pm 3,32	23,9 \pm 2,79	28,7 \pm 2,05	28,7 \pm 2,05
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CNPSO-Bb59 + Imidacloprid	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	7,2 \pm 9,47	10,6 \pm 9,51	15,6 \pm 7,52	25,9 \pm 8,47	43,6 \pm 6,08	48,3 \pm 7,71	59,0 \pm 14,14	60,1 \pm 12,94
	a	a	a	a	a	a	b	b	b	b
Testemunha	2,3 \pm 3,98	7,0 \pm 6,90	8,17 \pm 7,24	11,8 \pm 4,99	18,9 \pm 10,71	24,9 \pm 10,47	33,2 \pm 10,41	40,4 \pm 6,61	44,0 \pm 5,18	45,3 \pm 4,37
	a	a	a	a	a	a	ab	ab	ab	ab

Mortalidade confirmada										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb59	0,0 \pm 0,00	1,1 \pm 1,85	1,1 \pm 1,85	2,2 \pm 1,89	4,3 \pm 4,93	9,9 \pm 3,30	20,9 \pm 3,65	24,2 \pm 2,19	28,6 \pm 2,42	36,3 \pm 6,35
	ns	a	a	ns	a	a	ns	b	b	b
Imidacloprid	1,2 \pm 2,06	1,2 \pm 2,08	1,2 \pm 2,08	2,5 \pm 2,14	2,5 \pm 2,14	5,9 \pm 1,80	7,2 \pm 0,51	7,2 \pm 0,50	9,53 \pm 2,24	9,5 \pm 2,24
	ns	a	a	ns	a	a	ns	a	a	a
CNPSO-Bb59 + Imidacloprid	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	2,4 \pm 2,08	2,4 \pm 2,06	3,6 \pm 3,55	11,8 \pm 4,27	23,5 \pm 1,86	25,9 \pm 3,90	31,8 \pm 3,61	32,9 \pm 3,80
	ns	a	a	ns	a	a	ns	b	b	b
Testemunha	1,1 \pm 1,99	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	3,5 \pm 3,45	5,9 \pm 1,91	8,3 \pm 2,06	10,7 \pm 0,38	13,1 \pm 2,14	14,3 \pm 3,93	14,3 \pm 3,93
	ns	a	a	ns	a	a	ns	a	a	a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

ns - não significativo

Tabela 15. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSO-Bb61 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.

Mortalidade total										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb61	17,9 \pm 4,69	31,9 \pm 11,79	37,5 \pm 13,33	48,8 \pm 11,25	61,5 \pm 5,24	72,7 \pm 5,72	80,7 \pm 3,36	88,7 \pm 5,25	89,9 \pm 5,75	93,4 \pm 3,17
	a	a	a	a	ab	bc	b	b	b	b
Imidacloprid	24,1 \pm 19,27	30,9 \pm 25,00	38,8 \pm 20,18	46,6 \pm 14,10	47,8 \pm 12,70	50,1 \pm 10,45	58,0 \pm 6,99	64,8 \pm 9,61	66,0 \pm 11,57	68,2 \pm 12,83
	a	a	a	a	ab	ab	a	a	a	ab
CNPSO-Bb61 + Imidacloprid	23,4 \pm 11,91	38,7 \pm 17,09	44,3 \pm 13,70	61,4 \pm 15,42	69,3 \pm 10,65	79,8 \pm 10,91	87,5 \pm 6,36	92,2 \pm 8,06	93,4 \pm 8,43	95,5 \pm 4,90
	a	a	a	a	b	c	b	b	b	b
Testemunha	15,0 \pm 4,09	17,3 \pm 0,60	28,6 \pm 10,11	34,4 \pm 8,45	37,9 \pm 6,43	37,9 \pm 6,43	45,8 \pm 8,79	48,1 \pm 11,57	49,3 \pm 9,67	58,3 \pm 17,10
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Mortalidade confirmada										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb61	5,8 \pm 2,12	13,4 \pm 3,16	16,7 \pm 4,59	21,3 \pm 4,24	32,9 \pm 6,79	40,9 \pm 9,75	45,4 \pm 8,84	53,3 \pm 12,05	54,6 \pm 14,12	58,0 \pm 13,91
	a	a	ab	ns	b	b	b	b	b	b
Imidacloprid	3,4 \pm 3,4	4,6 \pm 5,25	5,7 \pm 4,01	6,8 \pm 3,45	6,8 \pm 3,45	6,8 \pm 3,45	7,9 \pm 3,90	11,4 \pm 2,11	11,4 \pm 2,11	12,5 \pm 4,07
	a	a	a	ns	a	a	a	a	a	a
CNPSO-Bb61 + Imidacloprid	9,5 \pm 7,9	22,5 \pm 13,7	29,3 \pm 13,28	36,1 \pm 11,26	45,3 \pm 12,13	55,9 \pm 19,31	63,6 \pm 13,20	68,2 \pm 11,9	69,4 \pm 13,97	71,6 \pm 13,31
	a	a	b	ns	b	b	b	b	b	b
Testemunha	2,3 \pm 2,0	2,3 \pm 2,02	3,43 \pm 0,15	4,6 \pm 1,99	5,8 \pm 2,14	5,7 \pm 2,14	9,1 \pm 3,64	9,1 \pm 3,64	9,1 \pm 3,64	10,2 \pm 5,60
	a	a	a	ns	a	a	a	a	a	a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

ns - não significativo

Tabela 16. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb467 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.

Tratamentos	Mortalidade total									
	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb467	0,00 \pm 0,00	3,2 \pm 5,48	13,0 \pm 8,81	14,7 \pm 11,36	14,7 \pm 11,36	23,0 \pm 12,09	36,0 \pm 10,00	49,1 \pm 17,78	62,3 \pm 9,53	66,7 \pm 7,22
	ns	a	ns	a	a	a	a	ab	b	b
Imidacloprid	6,0 \pm 4,42	9,6 \pm 4,55	15,4 \pm 2,85	20,3 \pm 6,70	26,3 \pm 9,05	32,2 \pm 9,10	35,7 \pm 11,35	40,2 \pm 6,88	44,8 \pm 9,64	49,5 \pm 5,68
	ns	a	ns	a	a	a	a	ab	ab	ab
CNPSO-Bb467 + Imidacloprid	3,4 \pm 3,34	8,0 \pm 3,73	17,3 \pm 2,59	24,5 \pm 4,58	30,3 \pm 3,35	36,4 \pm 10,83	51,6 \pm 13,51	63,2 \pm 14,30	66,6 \pm 15,02	74,6 \pm 14,8
	ns	a	ns	a	a	a	a	b	b	b
Testemunha	0,0 \pm 0,00	4,5 \pm 1,88	7,9 \pm 1,80	11,4 \pm 5,03	12,6 \pm 5,22	18,2 \pm 7,19	21,8 \pm 11,13	24,0 \pm 9,68	26,3 \pm 8,35	37,8 \pm 11,69
	ns	a	ns	a	a	a	a	a	a	a

Tratamentos	Mortalidade confirmada									
	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb467	0,0 \pm 0,00	1,6 \pm 2,75	4,6 \pm 0,87	6,3 \pm 3,69	6,3 \pm 3,69	11,6 \pm 5,97	20,1 \pm 5,42	30,2 \pm 18,17	41,7 \pm 17,48	41,9 \pm 17,48
	ns	ns	a	a	a	a	b	a	b	ns
Imidacloprid	3,7 \pm 6,41	3,7 \pm 6,41	6,0 \pm 4,42	9,7 \pm 6,93	13,3 \pm 6,15	14,3 \pm 4,42	15,6 \pm 5,08	15,6 \pm 5,08	18,9 \pm 3,07	20,0 \pm 1,94
	ns	ns	a	a	a	a	ab	a	ab	ns
CNPSO-Bb467 + Imidacloprid	2,2 \pm 3,85	2,2 \pm 3,85	8,0 \pm 4,89	8,0 \pm 4,89	11,5 \pm 4,76	12,7 \pm 3,49	25,6 \pm 2,17	30,2 \pm 6,71	31,3 \pm 8,73	35,9 \pm 19,87
	ns	ns	a	a	a	a	b	a	ab	ns
Testemunha	0,0 \pm 0,00	1,1 \pm 1,92	3,4 \pm 3,35	5,7 \pm 1,79	5,7 \pm 1,79	9,0 \pm 1,67	9,03 \pm 1,67	10,1 \pm 3,10	10,1 \pm 3,10	11,3 \pm 1,75
	ns	ns	a	a	a	a	a	a	a	ns

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

ns - não significativo

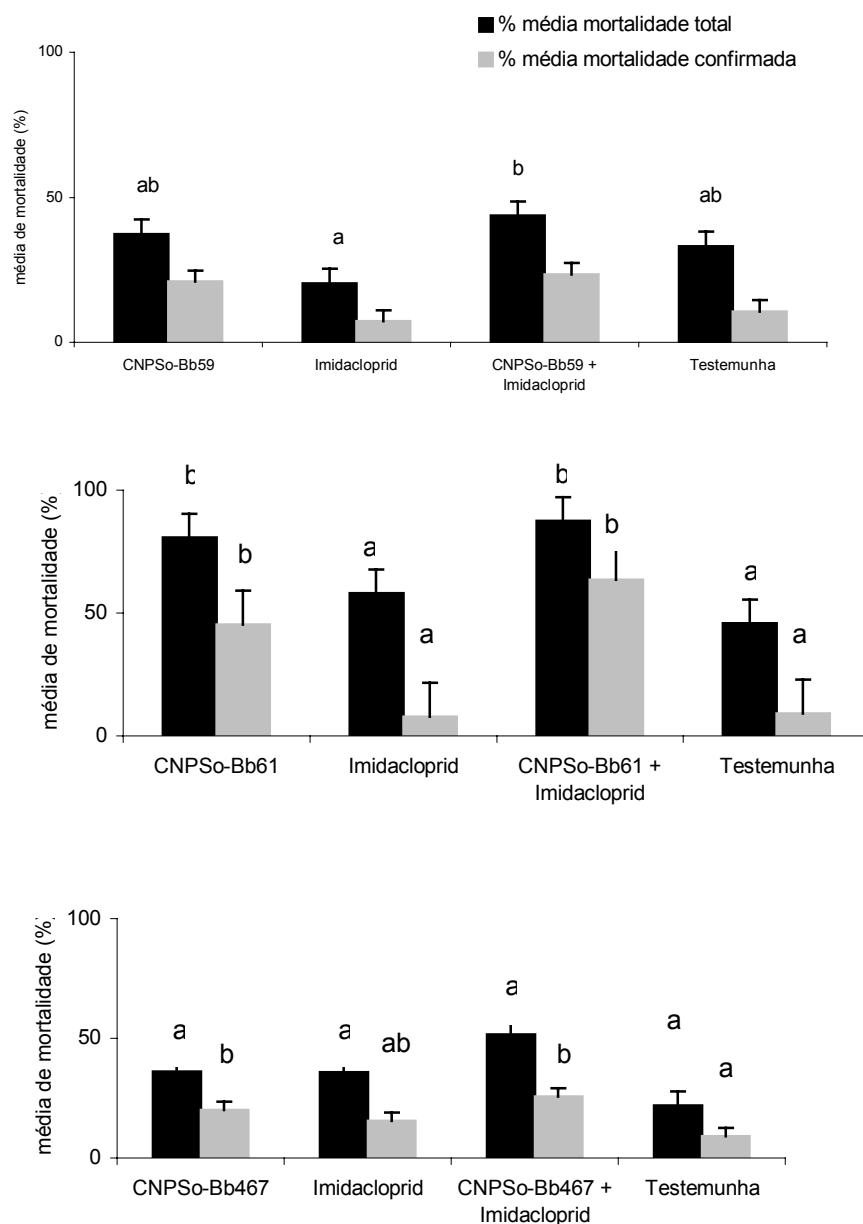


Figura 3. Mortalidade média (%) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos de *Beauveria bassiana* em compatibilidade com imidacloprid 7 dias de avaliação. Médias seguidas de mesma letra nas barras de mesma cor, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em comparação com os resultados de mortalidade *D. speciosa*, nos tratamentos com o isolado CNPSo-Bb61 em mistura com imidacloprid, observamos que esses mesmo tratamento causou efeito sinérgico na mortalidade de *C. arcuata* (Tabela 17). A mortalidade total de *D. speciosa*, 7 dias após a inoculação do tratamento foi 87 %, valor que não difere significativamente do valor de mortalidade causada pela aplicação somente com o fungo (80 %) (Fig. 4). Entretanto, a mortalidade total de *C. arcuata* causada pela aplicação do fungo em mistura com inseticida foi 68 %, e o valor da mortalidade onde somente o fungo foi aplicado, 11 % (Fig. 5).

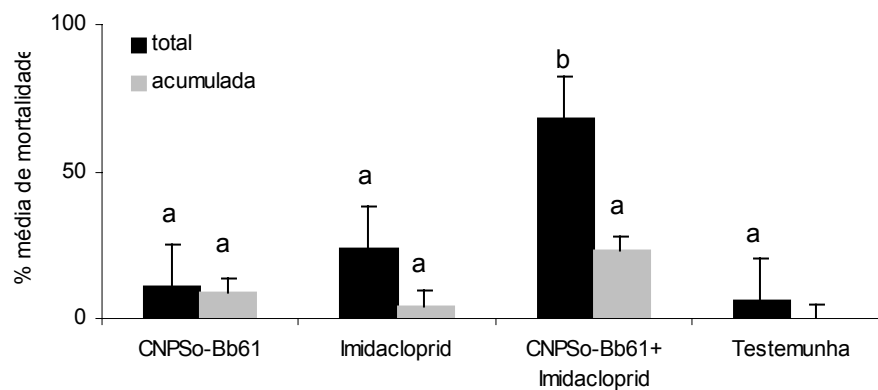


Figura 4. Mortalidade média (%) de *Cerotoma arcuata* nos tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb61, imidacloprid, CNPSo-Bb61 + imidacloprid, e testemunha aos 7 dias de avaliação em laboratório. Médias seguidas de mesma letra nas barras de mesma cor, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 17. Mortalidade total e mortalidade confirmada (% média \pm DP) de *Cerotoma arcuata* em tratamentos com o isolado de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb61 em compatibilidade com imidacloprid durante 10 dias de avaliação em laboratório.

Mortalidade total										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb61	2,2 \pm 3,85	2,2 \pm 3,85	4,4 \pm 3,8	4,4 \pm 3,85	6,7 \pm 0,0	6,7 \pm 0,0	11,1 \pm 3,8	13,3 \pm 0,0	20,0 \pm 6,7	24,4 \pm 10,2
	ns	a	ns	a	ns	a	a	a	a	a
Imidacloprid	9,2 \pm 3,59	15,0 \pm 10,4	15,0 \pm 10,4	15,0 \pm 10,4	15,0 \pm 10,4	17,2 \pm 8,3	23,8 \pm 11,2	23,8 \pm 11,2	30,5 \pm 17,7	32,7 \pm 18,7
	ns	a	ns	a	ns	a	a	a	a	a
CNPSO-Bb61 + imidacloprid	33,8 \pm 22,7	54,4 \pm 17,1	54,4 \pm 17,1	59,0 \pm 13,4	63,5 \pm 8,6	65,7 \pm 8,1	68,1 \pm 4,7	68,1 \pm 4,7	70,5 \pm 3,43	70,5 \pm 3,43
	ns	a	ns	b	ns	b	b	b	b	b
Testemunha	1,7 \pm 2,88	3,1 \pm 2,7	3,1 \pm 2,7	6,4 \pm 7,7	6,4 \pm 7,7	6,4 \pm 7,7	6,4 \pm 7,7	6,4 \pm 7,7	6,4 \pm 7,7	6,4 \pm 7,7
	ns	a	ns	a	ns	a	a	a	a	a

Mortalidade confirmada										
Tratamentos	Dias									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSO-Bb61	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	2,2 \pm 3,8	2,2 \pm 3,8	4,4 \pm 3,8	4,4 \pm 3,8	8,9 \pm 7,7	11,1 \pm 3,8	17,8 \pm 10,2	22,2 \pm 13,9
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	a	ab	a	ns
Imidacloprid	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	4,4 \pm 7,7	4,4 \pm 7,7	11,1 \pm 13,9	13,3 \pm 13,3
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	a	ab	a	ns
CNPSO-Bb61 + Imidacloprid	4,8 \pm 8,2	9,2 \pm 4,4	9,2 \pm 4,4	13,8 \pm 7,4	18,2 \pm 10,4	20,5 \pm 13,4	22,9 \pm 14,2	22,9 \pm 14,2	27,6 \pm 18,8	27,6 \pm 18,8
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	a	b	a	ns
Testemunha	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

ns - não significativo

4.3.4.2. Infecção de *D. speciosa* após aplicação de *B. bassiana* em mistura com inseticidas em casa de vegetação

Com base nos resultados de mortalidade total obtidos em casa de vegetação (Tabela 18), pode-se observar que os maiores valores de mortalidade de *D. speciosa* foram ocasionados pela aplicação do inseticida fipronil, tanto nos ensaios onde os fungos foram aplicados em misturas com fipronil quanto nos ensaios onde apenas o inseticida foi aplicado. Em todos os ensaios onde o inseticida fipronil foi aplicado, a mortalidade de *D. speciosa* 10 dias após aplicação, foi de 100%, e já no quarto dia após a aplicação somente com o inseticida fipronil, a mortalidade chegou a 72 %. Esses resultados comprovam a eficiência do inseticida fipronil no controle de *D. speciosa*, como já observado nos três ensaios realizados em laboratório com fipronil, causando 65 % de mortalidade 10 dias após aplicação (Tabelas 11, 12 e 13). Ao contrário, pode-se observar que os valores de mortalidade de *D. speciosa* em casa de vegetação, onde somente o inseticida imidacloprid foi aplicado, foram superiores a 50 % somente 8 dias após aplicação (Tabela 18).

A baixa mortalidade causada pelos isolados de *Beauveria bassiana* em casa de vegetação, 32 % e 12 % respectivamente para os isolados CNPSo-Bb59 e CNPSo-Bb61, pode ter ocorrido devido a uma variedade de efeitos limitantes ao desenvolvimento do fungo, entre os quais e mais provável a baixa umidade relativa do ar. A umidade relativa dentro da casa de vegetação durante a realização do ensaio foi de 54 %, e esta pode ter afetado a germinação dos conídios.

O modo de aplicação também pode ter interferido nos resultados de mortalidade causada pelos fungos. Em laboratório, os insetos receberam aplicação tópica, enquanto que em casa de vegetação os tratamentos foram pulverizados sobre vasos com plantas de soja e depois os insetos foram liberados no interior das gaiolas que continham essas plantas. Dessa maneira, o contato do inseto com o fungo foi menor em casa de vegetação quando comparado com contato do inseto com o fungo em laboratório. Assim é possível que a

contaminação pelo fungo em casa de vegetação tenha ocorrido através do contato tarsal com os conídios depositados sobre a superfície das folhas.

Apesar de os valores de mortalidade confirmada terem sido reduzidos, comparados com os resultados obtidos em laboratório, os maiores valores de mortalidade confirmada observados em casa de vegetação ocorreram após aplicação do isolado CNPSo-Bb61 em mistura com o inseticida fipronil (16,5 %) e na aplicação somente do inseticida fipronil (14,3 %) (Tabela 19). Em laboratório, também observa-se índices de mortalidade confirmada nos tratamentos com aplicação somente do inseticida fipronil (Tabelas 11, 12 e 13). Esses resultados revelam contaminação dos insetos com fungos nos tratamentos apenas com inseticidas, tanto em laboratório quanto em casa de vegetação. Esses resultados também sugerem um possível efeito estressante causado pelo inseticida favorecendo a infecção com o fungo.

Foram observados nos ensaios realizados em laboratório e em casa de vegetação elevados valores de mortalidade dos insetos nos tratamentos testemunha, onde as plantas não receberam tratamento de fungos e inseticidas. Um dos aspectos que devem ser considerados para bioensaios envolvendo patógenos, de modo a reduzir a mortalidade na testemunha, é utilizar insetos saudáveis, criados em laboratório, com a mesma idade, peso e fase de desenvolvimento biológico (Alves *et al.* 1998b). Porém, os insetos utilizados em todos os ensaios, tanto em laboratório como em casa de vegetação foram coletados em campo, devido à dificuldade da manutenção desse inseto em laboratório. As larvas de *D. speciosa* possuem hábitos subterrâneos, e a sua criação em laboratório é difícil porque as condições em que o inseto se desenvolve nem sempre são passíveis de serem reproduzidas em condições controladas (Ávila *et al.* 2000). Segundo Jackson (1986), o sucesso da criação de *Diabrotica* sp. em laboratório não se deve apenas aos equipamentos e materiais utilizados, mas sim à experiência de manipulação da criação.

Tabela 18. Mortalidade total (com e sem sinais do patógeno) (média % \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com isolados de *Beauveria bassiana* em mistura com inseticidas durante 10 dias de avaliação em casa de vegetação.

Tratamentos	Dias Após a Inoculação									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSo-Bb59	3,6 \pm 7,14	5,3 \pm 10,71	8,9 \pm 17,86	10,2 \pm 17,19	13,7 \pm 24,28	19,1 \pm 34,96	20,3 \pm 34,37	24,6 \pm 36,53	29,3 \pm 32,91	31,7 \pm 31,30
	ns	ns	ns	ab	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb61	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	3,4 \pm 3,99	6,8 \pm 7,97	9,4 \pm 6,61	12,0 \pm 8,90
	ns	ns	ns	a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Imidacloprid	0,0 \pm 0,00	1,0 \pm 2,08	2,0 \pm 2,28	8,7 \pm 8,37	19,1 \pm 8,05	33,0 \pm 17,91	49,4 \pm 14,55	63,9 \pm 12,18	69,9 \pm 15,59	79,8 \pm 11,88
	ns	ns	ns	ab	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fipronil	0,0 \pm 0,00	11,2 \pm 9,38	44,9 \pm 10,88	71,6 \pm 10,78	85,7 \pm 9,72	95,4 \pm 4,27	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00	100,0 \pm 0,00
	ns	ns	ns	c	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb59 + imidacloprid	0,0 \pm 0,00	2,5 \pm 3,19	7,8 \pm 6,61	14,8 \pm 8,90	23,0 \pm 12,21	34,2 \pm 16,33	41,2 \pm 19,23	55,5 \pm 17,08	62,1 \pm 14,99	69,6 \pm 11,73
	ns	ns	ns	ab	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb61 + imidacloprid	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	1,2 \pm 2,38	5,2 \pm 1,35	13,7 \pm 11,10	26,6 \pm 14,33	54,3 \pm 12,77	61,8 \pm 14,31	65,5 \pm 12,46	72,2 \pm 14,95
	ns	ns	ns	a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb59 + fipronil	3,1 \pm 4,11	7,9 \pm 9,23	20,5 \pm 23,71	39,5 \pm 24,56	62,4 \pm 21,05	87,8 \pm 11,88	92,6 \pm 8,58	98,1 \pm 2,14	99,1 \pm 1,78	100,0 \pm 0,00
	ns	ns	ns	bc	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb61 + fipronil	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	42,6 \pm 13,19	67,5 \pm 23,02	81,0 \pm 12,91	94,7 \pm 3,64	97,6 \pm 2,83	97,6 \pm 2,83	99,0 \pm 2,00	100,0 \pm 0,00
	ns	ns	ns	c	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Testemunha	0,0 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	2,8 \pm 3,67	3,8 \pm 4,36	18,1 \pm 22,09	18,1 \pm 22,09	19,0 \pm 21,98	20,0 \pm 22,03	23,7 \pm 21,27	27,6 \pm 17,54
	ns	ns	ns	a	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os dados foram transformados para $\sqrt{x+0,5}$

ns: dados não significativos pelo teste de Kruskal-Wallis

Tabela 19. Mortalidade confirmada (com sinais do patógeno) (média % \pm DP) de *Diabrotica speciosa* em tratamentos com isolados de *Beauveria bassiana* em mistura com inseticidas durante 10 dias de avaliação em casa de vegetação.

Tratamentos	Dias Após a Inoculação									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CNPSo-Bb59	0,0 \pm 0,00	1,8 \pm 3,57	1,8 \pm 3,57	1,8 \pm 3,57	3,6 \pm 7,14	3,6 \pm 7,14	3,6 \pm 7,14	3,6 \pm 7,14	3,6 \pm 7,14	3,6 \pm 7,14
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb61	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	1,5 \pm 2,94	1,5 \pm 2,94	1,5 \pm 2,94
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Imidacloprid	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	1,0 \pm 1,92	1,0 \pm 1,92	2,1 \pm 2,51	2,1 \pm 2,51
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fipronil	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	2,5 \pm 5,00	2,5 \pm 5,00	2,5 \pm 5,00	2,5 \pm 5,00	2,5 \pm 5,00	14,3 \pm 3,93
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb59 + imidacloprid	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	1,6 \pm 3,33	1,6 \pm 3,33	1,6 \pm 3,33	1,6 \pm 3,33	3,3 \pm 3,85	4,5 \pm 3,15	4,5 \pm 3,15
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb61 + imidacloprid	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	2,3 \pm 2,85	4,0 \pm 2,99	6,6 \pm 4,92	6,6 \pm 4,92	6,6 \pm 4,92	7,5 \pm 6,09
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb59 + fipronil	1,8 \pm 2,14	1,8 \pm 2,14	6,3 \pm 10,23	6,3 \pm 10,23	6,3 \pm 10,23	9,2 \pm 0,54	9,2 \pm 10,54	9,2 \pm 0,54	9,2 \pm 10,54	9,2 \pm 0,54
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CNPSo-Bb61 + fipronil	0,0 \pm 0,00	5,5 \pm 11,11	14,7 \pm 17,03	14,7 \pm 17,03	14,7 \pm 17,03	16,5 \pm 15,20	16,5 \pm 15,20	16,5 \pm 15,20	16,5 \pm 15,20	16,5 \pm 15,20
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Testemunha	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00
	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: dados não significativos pelo teste de Kruskal-Wallis

4.3.5. Consumo foliar de *D. speciosa* em trifólios de soja tratados com fungos e inseticidas

Foi observado, durante os ensaios realizados em casa de vegetação, que os insetos se alimentaram mais das plantas de soja pulverizadas com o inseticida fipronil do que daquelas com o inseticida imidacloprid. (Fig. 6).

Analisando os resultados dos ensaios realizados em laboratório, o consumo de *D. speciosa* após 24 horas de contato com os trifólios de soja pulverizados com o inseticida fipronil em mistura com o fungo CNPSo-Bb61 foi maior (3,6 cm² de área foliar consumida) ($p < 0,05$) em comparação com os tratamentos com aplicação do inseticida imidacloprid em misturas com os fungos CNPSo-Bb59 e CNPSo-Bb61 (0,5 cm² e 0,6 cm² respectivamente) (Tabela 20). Após 48 horas de contato com os trifólios, as maiores áreas consumidas ocorreram em trifólios de soja tratados com fungos, com o inseticida fipronil em mistura com o isolado CNPSo-Bb61 e na testemunha.

As maiores mortalidades dos insetos ocorreram quando esses se alimentaram de trifólios de soja pulverizados com o inseticida fipronil (100 %) e com o isolado CNPSo-Bb59 em mistura com o inseticida fipronil (93 %) (Tabela 21). Nos tratamentos onde somente os isolados de fungos foram pulverizados sobre os trifólios de soja, a mortalidade dos insetos foi 16,7 % (CNPSo-Bb59) e 6,7 % (CNPSo-Bb61).

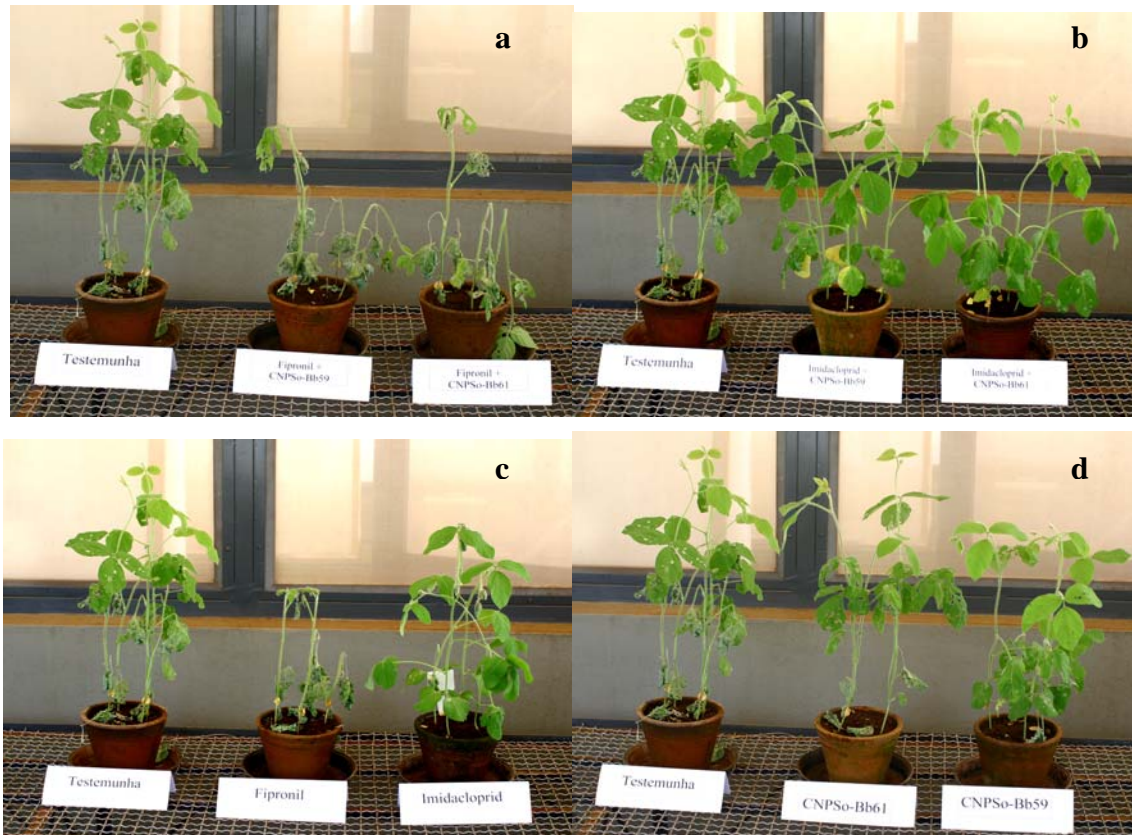


Figura 5. Consumo foliar de adultos de *Diabrotica speciosa* em plantas de soja (cultivar Paraná) pulverizadas com: (a) fungos em mistura com o inseticida fipronil comparadas com plantas sem tratamento; (b) fungos em mistura com o inseticida imidacloprid comparadas com plantas sem tratamento; (c) inseticidas comparadas com plantas sem tratamento; (d) fungos comparadas com plantas sem tratamento.

Tabela 20. Área foliar de soja consumida por 5 adultos de *Diabrotica speciosa* após períodos de 24 e 48 horas, sob condições controladas de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60 % UR e fotofase de 14 horas.

Tratamentos	Consumo após 24 horas média	Consumo após 48 horas
	\pm DP (cm^2)	média \pm DP (cm^2)
CNPSo-Bb59	2,5 \pm 1,65 ab	3,1 \pm 2,22 abcd
CNPSo-Bb61	3,3 \pm 2,03 ab	5,2 \pm 3,09 cd
Regent 800 WG	1,6 \pm 0,47 ab	0,3 \pm 0,50 a
Provado 200 SC	0,6 \pm 0,36 ab	1,8 \pm 0,75 abc
CNPSo-Bb59 + Regent 800 WG	1,2 \pm 1,11 ab	0,5 \pm 0,88 ab
CNPSo-Bb59 + Provado 200 SC	0,5 \pm 0,55 a	1,0 \pm 0,93 ab
CNPSo-Bb61 + Regent 800 WG	3,6 \pm 2,24 b	6,9 \pm 3,85 d
CNPSo-Bb61 + Provado 200 SC	0,6 \pm 0,36 a	1,2 \pm 1,15 abc
Testemunha	3,2 \pm 2,10 ab	4,5 \pm 2,80 bcd

Médias transformadas \sqrt{x} . Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey $p < 0,05$.

Tabela 21. Mortalidade média (%) de *D. speciosa* alimentada com trifólios de soja pulverizados com inseticidas e fungos, sob condições controladas de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 60 % UR e fotofase de 14 horas.

Tratamentos	Mortalidade total (média % \pm DP)	
	3 D.A.P	7 D.A.P.
CNPSo-Bb59	16,7 \pm 15,05 a	66,7 \pm 27,32 a
CNPSo-Bb61	6,7 \pm 10,33 a	70,0 \pm 32,86 a
Provado 200 SC	36,7 \pm 23,38 a	76,7 \pm 15,05 a
Regent 800 WG	100,0 \pm 0,00 b	100,0 \pm 0,00 b
CNPSo-Bb59 + Provado 200 SC	13,3 \pm 32,66 a	64,0 \pm 32,98 a
CNPSo-Bb59 + Regent 800 WG	93,3 \pm 16,33 b	96,7 \pm 8,16 b
CNPSo-Bb61 + Provado 200 SC	13,3 \pm 10,33 a	83,3 \pm 15,05 a
CNPSo-Bb61 + Regent 800 WG	3,3 \pm 8,16 a	70,0 \pm 35,21 a
Testemunha	13,3 \pm 10,33 a	66,7 \pm 20,65 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis
D.A.P. - dias após pulverização

Esses resultados confirmam que o inseticida fipronil possui maior eficiência de controle a *D. speciosa*, como já observado nos bioensaios realizados em laboratório e em casa de vegetação. Todavia, esse inseticida não protege a planta do ataque dos insetos adultos, visto que, de alguma maneira, interferiu na

alimentação (Fig. 6a). No entanto, os resultados obtidos com o isolado CNPSo-Bb59 em mistura com o inseticida fipronil revelam que esse tratamento não interferiu na alimentação dos insetos. Esses resultados deixam evidente a necessidade de que novos experimentos sejam realizados para avaliar o consumo. Parimi *et al.* (2003) avaliaram o consumo de *Diabrotica virgifera virgifera* utilizando iscas tratadas com inseticidas em mistura com um atrativo alimentar à base de curcubitacina. A maior área consumida pelos insetos foi em iscas tratadas com o atrativo alimentar, seguida pelas iscas tratadas com o inseticida fipronil em mistura com o atrativo químico. O autor não realizou tratamentos com aplicações somente do inseticida fipronil.

O resultado que merece ser destacado é reduzida alimentação dos insetos nos trifólios de soja pulverizados com o inseticida imidacloprid. Mesmo não tendo causado mortalidade elevada, impediu que os insetos se alimentassem.

James & Elzen (2001) observaram que imidacloprid inibiu a alimentação de *Bemisia argentifolli* Bellow & Perring (Homoptera: Aleyrodidae) em plantas que foram pulverizadas com o inseticida imidacloprid, pois observaram melhores níveis de controle do inseto em tratamentos com aplicação foliar de *B. bassiana* em relação àqueles onde foi aplicado o inseticida imidacloprid. Moino Jr. & Alves (1998) também observaram que imidacloprid pode provocar alterações no comportamento dos insetos. A alteração no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen) (Isoptera: Rhinotermitidae), provocada pelo inseticida imidacloprid permitiu que uma maior quantidade de conídios permanecesse sobre a cutícula dos insetos. Se imidacloprid provoca alterações no comportamento dos insetos, irá reduzir os níveis de infecção do patógeno, visto que o inseto com baixa mobilidade e alimentação reduzida terá menos contato com os conídios do fungo, quando aplicado em tratamento foliar (Pianoski *et al.* 1990, Hajek *et al.* 1987).

Moore *et al.* (1992) observaram que o gafanhoto *Schistocerca gregaria* deixa de se alimentar 24 horas depois de ter sido inoculado com altas dosagens de *Metarhizium flavoviride*. Porém, esse efeito não foi observado em *D. speciosa* quando os insetos foram tratados com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

4.4. Conclusões

- Os isolados de *B. bassiana* avaliados foram mais virulentos à *D. speciosa* em comparação aos isolados de *M. anisopliae*;
- *C. arcuata* foi menos suscetível aos isolados de *B. bassiana* em comparação com *D. speciosa*;
- O alto valor da DL₅₀ de *B. bassiana* revela a baixa suscetibilidade de *D. speciosa* aos isolados avaliados;
- Os inseticidas fipronil e imidacloprid não causaram efeito fungitóxico aos isolados de *B. bassiana*;
- A aplicação de fungos e inseticidas não causou efeito sinérgico, nem aditivo na mortalidade de adultos de *D. speciosa*;
- O isolado de *Beauveria bassiana* CNPSo-Bb61 em mistura com o inseticida imidacloprid causou efeito sinérgico na mortalidade de adultos de *C. arcuata*;
- O inseticida fipronil foi mais eficiente no controle de *D. speciosa* em comparação com o inseticida imidacloprid, tanto em aplicação tópica sobre o inseto como em aplicação foliar;
- O inseticida imidacloprid inibiu a alimentação de *D. speciosa* em plantas de soja;
- A rápida mortalidade dos insetos ocasionada pela aplicação do inseticida fipronil é importante quando se trata de pragas de importância econômica. Por outro lado, se imidacloprid inibiu a alimentação dos insetos, estes deixam de causar danos à planta, e dessa maneira esse inseticida pode ser considerado uma forma de se obter sucesso no controle de adultos de *D. speciosa*.

4.5. Literatura citada

- Ávila, C.J., A.C.P. Tabai & J.R.P. Parra. 2000.** Comparação de técnicas para criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em dietas natural e artificial. An. Soc. Entomol. Brasil 29: 257-267.
- Alves, S.B., A. Moino Jr. & J.E.M. Almeida. 1998a.** Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In Alves, S.B. (eds) Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ. pp. 217-238.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998b.** Técnicas de Laboratório. In Alves, S.B. (eds) Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ. pp.637-711.
- Bateman, R.P., M. Carey, D. Moore & C. Prior. 1993.** The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locust at low humidities. Ann. Appl. Biol. 122: 145-152.
- Boucias, D.G. & J.C. Pendland. 1991.** The fungal cell wall and its involvement in the pathogenic process in insect hosts. In Latgé, J.P. & D. Boucias (eds). Fungal cell wall and immune response. Berlin-Heidelberg, Springer-Verlag, p. 303-314.
- Cavalcanti, R.S., A. Moino Jr., G.C. de Souza & A. Arnosti. 2002.** Efeito dos produtos fitossanitários fenpropatrina, imidaclopride, iprodione e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arq. Inst. Biol. 69: 17-22.
- Chernaki-Leffer, A.M. 2004.** Dinâmica Populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e

a fungos entomopatogênicos. Tese de Doutorado. UFPR, Curitiba, Paraná. 128p.

Consolo, V.F. G.L. Salerno, & C.M. Beron. 2003. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. *BioControl* 48: 705-712.

Duarte, A., J.M. Menendez & N. Triguero. 1992. Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas químicos. *Rev. Baracoa* 22: 31-39.

Fernandes, P.M., S.B. Alves, B.P. Magalhães & J.C. Lord. 1989. Efeitos da combinação de temperatura, umidade relativa e concentração de inóculo de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. na mortalidade de *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1791) (Coleoptera: Chrysomelidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 18: 313-319.

Furlong, M.J. & E. Groden. 2001. Evaluation of synergistic interactions between the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) pathogen *Beauveria bassiana* and the insecticides, imidacloprid and cyromazine. *J. Econ. Entomol.* 94:344-356.

Hajek, A.E., R.S. Soper, D.W. Roberts, T.E. Anderson, K.D. Biever, D.N. Ferro, R.A. LeBrun & R.H. Storch. 1987. Foliar application of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for control of the colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae): An overview of pilot test results from the northern United States. *Can. Entomol.* 119: 959-974.

Hoffmann-Campo, C.B., F. Moscardi, B.S. Corrêa-Ferreira, L.J. Oliveira, D.R. Sosa-Gómez, A.R. Panizzi, I.C. Corso, D.L. Gazzoni & E.B. de Oliveira (in memoriam). 2000. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Circular Técnica 30, Embrapa Soja, 70p.

- Gardner, W.A. & D.J. Kinard. 1998.** *In Vitro* germination and growth response of two entomogenous fungi to imidacloprid. J. Entomol. Sci. 33: 322-324.
- James, R.R. & G.W. Elzen. 2001.** Antagonism between *Beauveria bassiana* and imidacloprid when combined for *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) control. J. Econ. Entomol. 94: 357-361.
- Jackson, J.J. 1986.** Rearing and handling of *Diabrotica virgifera* and *Diabrotica undecimpunctata howardi*. p. 25-47. In J.L. Krysan & T.A. Miller (eds.). Methods for the study of pest *Diabrotica*. New York, Springer-Verlag, 260p.
- Krueger, S.R. & D.W. Roberts. 1997.** Soil treatments with entomopathogenic fungi for corn rootworm (*Diabrotica* spp.) larval control. Biol. Cont. 9: 67-74.
- Kuo, J., E. Fox & S. MacDonald. 1992.** Sigmaplot: statistical software for working scientists. Users manual. Jandel Scientific, San Francisco.
- Lawrence, A.A. & A. Khan. 2002.** Comparison of the pathogenicity of the entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumoso-roseus* to *Callosobruchus maculatus*. International Pest Control 44: 125-127.
- LeOra Software. 1987.** POLO-PC. A user's guide to Probit or Logit analysis. LeOra Software, Berkeley, CA.
- Loureiro, E.S., A. Moino Jr, A. Arnosti & G.C. de Souza. 2002.** Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. Neotrop. Entomol. 31: 263-269.

- Luz, C., M.S. Tigano, I.G. Silva, C.M.T. Cordeiro & S.M. Aljanabi. 1998.** Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 93: 839-846.
- Magalhães, B.P., J.C. Lord, S.P. Wraight, R.A. Daoust & D.W. Roberts. 1988.** Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Zoophthora radicans* to the Coccinellid predators *Coleomegilla maculata* and *Eriopsis connexa*. J Invertebr Pathol. 52: 471-473.
- Moino Jr., A. & S.B. Alves. 1998.** Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). An. Soc. Entomol. Brasil 27: 611-619.
- Monteiro, S.G., V.R.E.P. Bittencourt, E. Daemon & J.L.H. Faccini. 1998.** Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). Rev. Bras. Parasitol. Vet. 7: 113-116.
- Moore, D., M. Reed, G. Le Patourel, Y.J. Abraham & C. Prior. 1992.** Reduction of feeding by the desert locust, *Schistocerca gregaria*, after infection with *Metarhizium flavoviride*. J. Invert. Path. 60: 304-307.
- Mulock, B.S. & L.D. Chandler. 2001.** *Beauveria bassiana* transmission in western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). Can. Entomol. 133: 105-107.
- Neves, P.M.O.J., E. Hirose, P.T. Tchujo & A. Moino Jr. 2001.** Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. Neotrop. Entomol. 30: 263-268.

- Parimi, S.; L.J. Meinke, T.M. Nowatzki, L.D. Chandler, B.W. French & B.D. Siegfried. 2003.** Toxicity of insecticide-bait mixtures to insecticide resistant and susceptible western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *Crop Protection* 22: 781-786.
- Pianoski, J., E. Bertucci, M.C. Capassi, E.A. Cirelli, M.H. Calafiori & N.T. Teixeira. 1990.** Eficiência da *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill no controle da *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) em feijoeiro, *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em diferentes adubações. *Ecosistema* 15: 24-35.
- Quintela, E.D. & C.W. McCoy. 1997.** Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environ. Entomol.* 26: 1173-1182.
- Quintela, E.D. & C.W. McCoy. 1998a.** Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *J. Econ. Entomol.* 91: 110-122.
- Quintela, E.D. & C.W. McCoy. 1998b.** Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 220-230.
- Reed, L.J. & H. Muench. 1937.** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497.
- Scharf, M.E. & B.D. Siegfried. 1999.** Toxicity and neurophysiological effects of fipronil and fipronil sulfone on the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 40: 150-156.

Silva-Werneck, J.O., M.R. Faria, J.R.M.V. Abreu Neto, B.P. Magalhães & F.G.V. Schmidt. 1995. Técnica de criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) para bioensaios com bacilos e fungos entomopatogênicos. An. Soc. Entomol. Brasil. 24: 45-52.

Sosa-Gómez, D.R., K.E. Delpin, F. Moscardi & M. de H. Nozaki. 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. Neotrop. Entomol. 32: 287-291.

Tamai, M.A. 2002. Controle de *Tetranychus urticae* Koch com fungos entomopatogênicos. Tese de Doutorado. Piracicaba, Esalq/USP, 144p.

Tamai, M.A., S.B. Alves, R.B. Lopes, M. Faion, L.F.L. Padulla. 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Arq. Inst. Biol. 69: 89-96.

Considerações finais

Através dos resultados obtidos podemos concluir que os indivíduos de *Diabrotica speciosa* agrupam-se de acordo com a região geográfica onde se encontram. Embora nos agrupamentos de uma determinada região ocorra a presença de indivíduos de outras regiões, indicando migração deste inseto.

Os inimigos naturais com maior prevalência sobre este inseto foram os protozoários do gênero *Gregarina* e as moscas parasitóides do gênero *Celatoria*. Com relação à presença de fungos entomopatogênicos sobre as folhas de soja, as maiores densidades de *Beauveria* sp. foram constatadas durante os meses de fevereiro e março, correspondendo às maiores porcentagens de adultos de *D. speciosa* com sinais de infecção causada por esse patógeno.

Avaliando a capacidade de controle dos fungos entomopatogênicos pode-se concluir que os isolados de *Beauveria bassiana* foram mais virulentos à este inseto em relação aos isolados de *Metarhizium anisopliae* avaliados.

Embora a associação de isolados de *B. bassiana* e os inseticidas fipronil e imidacloprid não tenham causado efeito sinérgico nem aditivo na mortalidade do inseto, esses inseticidas não causaram efeito fungitóxico aos isolados. Porém, o inseticida fipronil foi mais eficiente no controle de *D. speciosa* em comparação com o inseticida imidacloprid, tanto em aplicação tópica sobre o inseto como em aplicação foliar. A rápida mortalidade dos insetos ocasionada pela aplicação do inseticida fipronil é importante quando se trata de pragas de importância econômica. Por outro lado, o inseticida imidacloprid provocou inibição da alimentação dos insetos, portanto não causaram danos às plantas, dessa maneira esse inseticida pode ser considerado de interesse na redução do dano causado pelos adultos de *D. speciosa*.