

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**Contribuição ao controle biológico de
Rhynchophorus palmarum - atividade
de vôo, eficiência de autoinoculação e
caracterização molecular de isolados
de *Beauveria bassiana***

MARCELO DA COSTA MENDONÇA

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



Contribuição ao controle biológico de *Rhynchophorus palmarum* - atividade de vôo, eficiência de autoinoculação e caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana*

MARCELO DA COSTA MENDONÇA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Soares de Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio G. Sant'Ana

Maceió - Alagoas
Fevereiro de 2007

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Cláudio César Temóteo Galvino

M539c Mendonça, Marcelo da Costa.

Contribuição ao controle biológico de *Rhynchophorus palmarum* – atividade de vôo, eficiência de autoinoculação e caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana* / Marcelo da Costa Mendonça. – 2007.

[102] f. : il.

Orientador: Ivanildo Soares Lima.

Co-orientador: Antônio Euzébio Goulart de Sant'Ana.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. 2017.

Bibliografia: f. 82-97.

Anexos: f. [98-102].

1. Broca-do-olho-do-coqueiro. 2. Cocos nucifera. 3. Fungo entomopatogênico.
I. Título.

CDU: 595.76

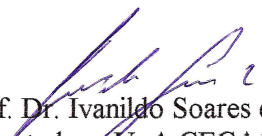



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil


Membros da Comissão Julgadora de Defesa de Tese de Doutorado de Marcelo da Costa Mendonça, intitulado: “**Contribuição ao Controle Biológico de *Rhynchophorus palmarum* - Atividade de Vôo, Eficiência de Autoinoculação e Caracterização Molecular de Isolados de *Beauveria bassiana***”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 28 de fevereiro de 2007, às 8:00 horas na sala de Multimeios do bloco 14.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Ivanildo Soares de Lima
Orientador - U. A CECA/UFAL.


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Co-Orientador - IQB/UFAL


Prof. Dr. José Vargas de Oliveira
UFRPE


Prof. Dr. Genésio Tâmara Ribeiro
UFS


Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
IQB/UFAL


Prof. Dr.ª Edna Peixoto da Rocha Amorim
U.A CECA/UFAL

agradeço a meus pais pelo eterno incentivo

ofereço a minha esposa **Rafaela** e as minhas **Marias** - **Luiza e Fernanda** – pela compreensão e apoio incondicional durante esses anos; dividindo, em todos os momentos, este sonho comigo...

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade”*

Raul Seixas

A felicidade seria completa com sua presença;
sem dizer adeus partiu, deixando a lembrança
dos momentos felizes que compartilhamos.

Por todo carinho dedico a você essa
conquista, minha “tia-mãe”...

Mab G. da Costa

Este trabalho contou com a parceria e o apoio financeiro das seguintes instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPÉAL, pela concessão da bolsa de doutorado

Banco do Nordeste – BN e a Interacta Química Ltda, pelo financiamento de parte dessa pesquisa, por meio de projeto aprovado no Edital ETENE/Fundeci

A estas Instituições os meus sinceros agradecimentos; espero que a conclusão e os resultados obtidos nessa Tese, seja mais um exemplo que reforce a importância em continuar investindo em pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Durante minha vida profissional, mesmo diante de tanta concorrência, encontrei pessoas que ainda não conhecia, contudo, não mediram esforços para contribuir com minha busca por uma melhor qualificação. No doutorado, três Professores/Pesquisadores têm os meus sinceros agradecimentos:

- O Professor Dr. Ivanildo S. de Lima, pela amizade, confiança e orientação durante a execução dessa pesquisa e ao Professor Euzébio pela co-orientação;
- A Professora Dra. Renata Mann (UFS), pela amizade, disponibilidade e “co-orientação” com valiosas sugestões nos trabalhos de caracterização molecular;
- A Pesquisadora Dra. Joana Maria S. Ferreira (Embrapa/CPATC), pela oportunidade e confiança, disponibilizando a estrutura do Laboratório de Entomologia e compartilhando parte do material de suas pesquisas para os experimentos;

Aos Professores do Instituto de Química (UFAL) pelos ensinamentos transmitidos durante o curso de pós-graduação;

Ao amigo e Pesquisador Dr. Luiz Mário (Deagro), pela revisão e valiosas sugestões;

Aos colegas do curso de pós-graduação, em especial, a Adriana Guimarães e M^a de Fátima Arrigoni Blank, pela amizade e convívio durante este período;

Ao amigo Péricles Gabriel e sua família, pela eterna amizade e pelo abrigo durante o início do curso, nunca esquecerei os momentos de convívio que ficaram marcados pelo nascimento da minha sobrinha;

À bibliotecária Josete Melo (Embrapa/CPATC) pela revisão das referências bibliográficas;

As estagiárias do Curso de Agronomia/Biologia (UFS): Renata, Michelle, Agna e Ísis, os meus sinceros agradecimentos. O convívio com vocês foi, também, muito importante para o meu aprendizado, sinto-me imensamente gratificado e realizado

por entender que os trabalhos desta tese, que desenvolvemos em conjunto, tenham contribuído como experiência e colaborado para conduzi-las a pós-graduação;

Ao amigo José Dantas (Laboratório de Entomologia/UFS), pelo convívio e auxílio nos experimentos;

Aos Técnicos do Laboratório de Entomologia Francisco e Vera (Embrapa/CPATC), pelo auxílio na produção do fungo;

Ao Departamento Estadual de Desenvolvimento Agropecuário de Sergipe (Deagro), por compreender que a qualificação dos seus técnicos, também, é importante para Instituição;

*Ao final, gostaria de agradecer a uma **energia** que conspira para o bem e que faz nossa vida dar certo e os nossos sonhos realizados... muitos a chamam de **Deus!***

SUMÁRIO

	página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ESQUEMA	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Importância econômica do <i>Rhynchophorus palmarum</i> Linnaeus, 1764	4
2.2 Atividade de vôo e flutuação populacional de insetos, um enfoque para o <i>Rhynchophorus palmarum</i> L.	7
2.3 Controle biológico com fungos entomopatogênicos	11
2.3.1 Fungo entomopatogênico deuteromiceto – <i>Beauveria bassiana</i> (Moniliales: Moniliaceae)	13
2.3.2 Controle biológico de <i>Rhynchophorus palmarum</i> com <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	15
2.4 Marcadores moleculares	17
2.4.1 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e suas aplicações	18
2.4.2 Marcadores baseados na amplificação de microssatélites e sua aplicação	20
2.4.3. Regiões ITS de DNA ribossomal	22
2.4.4 Marcadores isoenzimáticos na caracterização de microrganismos	24
3. CAPÍTULO I: ATIVIDADE DE VÔO E FLUTUAÇÃO POPULACIONAL	

DE <i>Rhynchophorus palmarum</i> (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM PLANTIO DE COQUEIRO.....	29
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1.1 Atividade de vôo de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	29
3.1.2 Flutuação populacional de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	30
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.2.1 Atividade de vôo de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	31
3.2.2 Flutuação populacional de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	34
3.3 CONCLUSÕES	36
4. CAPÍTULO II: EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS SOBRE A AUTOINOCULAÇÃO DE ADULTOS DE <i>Rhynchophorus palmarum</i> COM <i>Beauveria</i> <i>bassiana</i>	37
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1.1 Coleta de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	37
4.1.2 Bioensaio de autoinoculação para adultos de <i>Rhynchophorus</i> <i>palmarum</i> com <i>Beauveria bassiana</i> e viabilidade dos esporos do fungo	38
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.2.1 Coleta de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	43
4.2.2 Bioensaio de autoinoculação de adultos de <i>Rhynchophorus</i> <i>palmarum</i> com <i>Beauveria bassiana</i> e viabilidade dos esporos do fungo	44
4.3 CONCLUSÕES	53
5. CAPÍTULO III: MARCADORES RAPD, MICROSSATÉLITES, ITS- DNA _r E DE ISOENZIMAS NA CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>Beauveria bassiana</i> ..	54
5.1 MATERIAL E MÉTODOS	54
5.1.1 Obtenção e multiplicação dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	54
5.1.2 Extração de DNA	57
5.1.3 Amplificação de marcadores RAPD na análise da diversidade de <i>Beauveria bassiana</i>	60

5.1.4	Marcadores de microsátélites na análise da diversidade de <i>Beauveria bassiana</i>	61
5.1.5	Amplificação da região ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>) do DNAr	61
5.1.6	Restrição dos produtos de amplificação da região ITS-DNAr.....	62
5.1.7	Caracterização isoenzimática de isolados de <i>Beauveria bassiana</i>	62
5.1.8	Análise dos dados	63
5.2.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.2.1.	Diversidade de <i>Beauveria bassiana</i> pelo teste de RAPD	64
5.2.2.	Diversidade de <i>Beauveria bassiana</i> por meio de microsátélites ..	68
5.2.3.	Amplificação da região ITS do DNA ribossomal (DNAr)	74
5.2.4.	Caracterização isoenzimática	75
5.3	CONCLUSÕES	80
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Processo de infecção de <i>Beauveria bassiana</i> no inseto: estruturas do tegumento do inseto e a penetração do esporo do fungo (A) e o diagrama das etapas da infecção (B) (Fonte: Wan, 2003, adaptado).....	14
2 - Representação das regiões ITS do DNA ribossomal	23
3 - Dinâmica da atividade diária de vôo de <i>Rhynchophorus palmarum</i> em condições de campo, (A) percentual de insetos capturados/hora e (B) percentual acumulativo de insetos capturados/hora	33
4 - Flutuação populacional de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> durante quatro anos (A, B, C e D) de avaliação em plantio comercial de coco, em relação à precipitação pluviométrica.....	35
5 - Formação dos feixes de cana-de-açúcar (A) e imersão na solução do fungo <i>B. bassiana</i> (B)	38
6 - Adultos de <i>R. palmarum</i> agrupados em casais – fase anterior aos testes de autoinoculação (A) e na armadilha de autoinoculação em contato com os colmos de cana-de-açúcar infectados com o fungo <i>B. bassiana</i> (B)	39
7 - Insetos individualizados após os testes de autoinoculação, em colmos de cana-de-açúcar infectados com o fungo (A) e em câmara úmida, visando confirmação da mortalidade por fungo (B) ..	40
8 - Armadilha utilizada nos testes de viabilidade de esporos de <i>Beauveria bassiana</i>	42
9 - Percentual de mortalidade (Mc) de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> por <i>Beauveria bassiana</i> nas concentrações 10^7 (A), 10^8 (B) e 10^9 (C) esporos/mL de suspensão em função do tempo para autoinoculação (0,75; 1,5; 3,0; e 6,0 horas)	45
10 - Percentual de mortalidade diária e mortalidade acumulada de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> por <i>B. bassiana</i> no período de avaliação	50
11 - Evolução da infecção de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> pelo	

fungo <i>Beauveria bassiana</i>	51
12 - Avaliação da viabilidade de esporos de <i>Beauveria bassiana</i> em função da autoinoculação e mortalidade (corrigida) de <i>Rhynchophorus palmarum</i> pelo fungo	52
13 - Localidades de origem dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> para o Estado de Sergipe	55
14 - Cultura monospórica dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> da micoteca da Embrapa <i>Tabuleiros Costeiros</i>	56
15 - Produtos de amplificação de RAPD, em gel de agarose, de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (primer n° 16 Dialab). (Acessos: 1- BC.05, 2- 27.94, 3- 32.91, 4- 52.96, 5- 53.96, 6- 57.99, 7- 58.99, 8- 59.99, 9- 62.00, 10- 64.99, 11- 65.03)	65
16 - Dendograma de similaridades entre 11 acessos de <i>Beauveria bassiana</i> , para análise de RAPD, baseado no coeficiente de similaridade Jaccard (método UPGMA)	66
17 - Produtos de amplificação de microsátélites, em gel de agarose, de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> . (acessos: M- Marcador, 1- BC.05, 2- 27.94, 3- 32.91, 4- 52.96, 5- 53.96, 6- 57.99, 7- 58.99, 8- 59.99, 9- 62.00, 10- 64.99, 11- 65.03)	69
18 - Dendograma de similaridades entre 11 acessos de <i>Beauveria bassiana</i> , para microsátélites baseado no coeficiente de similaridade Jaccard (método UPGMA)	71
19 - Dendrograma de análise de consenso de agrupamentos entre 11 acessos de <i>Beauveria bassiana</i> , para RAPD e microsátélites baseado no coeficiente de Jaccard (método Strict)	73
20 - Produtos de amplificação de regiões <i>Internal Transcribed Spacer</i> - ITS de DNA ribossomal de <i>Beauveria bassiana</i>	74
21 - Produtos da restrição da região ITS de DNA ribossomal de <i>Beauveria bassiana</i> com <i>EcoRI</i> e <i>Hae III</i>	75
22 - Padrões isoenzimáticos em gel de poliacrilamida da enzima peroxidase – PO (A) e esterase – EST (B), obtidos do micélio de onze acessos de <i>B. bassiana</i>	76
23 - Dendograma de similaridades entre 11 acessos de <i>Beauveria</i>	

<i>bassiana</i> , para isoenzimas baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard (método UPGMA)	79
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 - Coeficientes de correlação de Spearman (r_s) para o número de machos (♂) e fêmeas (♀) de <i>Rhynchophorus palmarum</i> em relação a precipitação mensal (mm) para cada ano de avaliação (anos 1, 2, 3 e 4)	35
2 - Resumo da análise de variância para mortalidade total (MT) de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	46
3 - Valores médios da mortalidade de machos, fêmeas e total (macho + fêmeas) de <i>Rhynchophorus palmarum</i> , em função da concentração do fungo <i>Beauveria bassiana</i> e do tempo de autoinoculação	49
4 - Culturas monospóricas de <i>Beauveria bassiana</i> do Banco de Agentes Biológicos da Embrapa <i>Tabuleiros Costeiros</i>	57
5 - Seqüências dos <i>primers</i> decâmeros utilizados nas reações de RAPD	60
6 - Seqüência dos <i>primers</i> de microssatélites usados na caracterização genética de <i>Beauveria bassiana</i>	61
7 - <i>Primers</i> da região ITS-DNAr utilizados no estudo	62
8 - Similaridades genéticas (%) (posicionadas abaixo da diagonal) e erro padrão associado à similaridade (acima da diagonal) entre acessos de <i>Beauveria bassiana</i> baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard	67
9 - Similaridades genéticas (%) (abaixo da diagonal) e erro padrão associado à similaridade (acima da diagonal) entre isolados de <i>Beauveria bassiana</i> empregando microssatélites, baseado no coeficiente de similaridade Jaccard	72
10 - Estimativas de similaridade genética (%) – abaixo da diagonal – e erros associados – acima da diagonal – entre onze acessos de <i>B. bassiana</i> , baseados em perfis isoenzimáticos baseado no coeficiente de similaridade Jaccard	77

LISTA DE ESQUEMA

Esquema	Página
1 - Representação esquemática da metodologia de extração de DNA de <i>Beauveria bassiana</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
AP-PCR	<i>Arbitrarily amplified PCR</i> - PCR de Amplificação Arbitrária
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiamin.atetraacético
HCl	Ácido Clorídrico
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia de Polimerase
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
SCAR	<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i> – Regiões Amplificadas Caracterizadas por Seqüência
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio – Lauril Sulfato de Sódio
SSR	<i>Simple Sequence Repeats</i> – Seqüências Simples Repetidas
TE	Tris-EDTA
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> – Número Variável de Seqüências Repetidas em Acaso
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> - Método de Médias Aritméticas não Ponderadas
DNAr	DNA ribossomal
EST	Enzima esterase
PO	Enzima peroxidase

RESUMO

Autor: Marcelo da Costa Mendonça

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Soares de Lima

O coleóptero *Rhynchophorus palmarum* (L.), vulgarmente conhecido como broca-do-olho-do-coqueiro é considerado uma das principais pragas de palmeiras de importância econômica. Suas larvas destroem a estipe da planta e os adultos atuam como vetores do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* causador da doença “anel vermelho”. Com o objetivo de subsidiar as práticas de controle biológico do *R. palmarum* já empregadas, foram realizados testes visando: determinar a atividade de vôo do inseto em plantios de coco; validar a técnica de autoinoculação de adultos de *R. palmarum* usando armadilhas com iscas vegetais inoculadas com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* e caracterizar geneticamente isolados do fungo por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD, microssatélite e ITS-DNA. Para determinar a atividade de vôo do inseto foram instaladas, na periferia de pomares comerciais de coco, armadilhas de captura/monitoramento da população de adultos de *R. palmarum*, contendo atrativo alimentar (colmos de cana-de-açúcar) mais feromônio de agregação. Nos testes de autoinoculação utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4 (3 concentrações do fungo e 4 tempos de autoinoculação), com 4 repetições de 5 casais. Os insetos foram separados, limpos em água destilada e transferidos para baldes contendo cana-de-açúcar inoculada com *B. bassiana* nas concentrações padronizadas (10^7 , 10^8 e 10^9 esporos/mL de suspensão), permanecendo em contato com o inóculo por 45min.; 90min.; 3h00 e 6h00. Após o período de exposição ao fungo, os insetos foram individualizados, sendo a mortalidade/infecção avaliada por 20 dias. Na caracterização genética foram utilizados 11 isolados, para os quais foram obtidas culturas monospóricas que posteriormente foram repicadas, em meio líquido a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em agitação constante e no escuro. Após sete dias os micélios foram filtrados, liofilizados e em seguida seu DNA genômico extraído em tampão de extração SDS 10%. Foram testados 20 *primers* decâmeros de sequência arbitrária da marca IDT. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra/Unisciense) programado com temperatura inicial de 94°C por 5min. e 45 ciclos a 94°C por 1min., 36°C por 2min. e 72°C por 1min.. Para as análises de microssatélites foram empregados quatro pares de *primers*. As reações de amplificação foram feitas em um volume de $25\mu\text{L}$. As amplificações consistiram de um ciclo inicial de 94°C e 30 ciclos de: 94°C por 1min.; 50°C por 1min. e 72°C por 2min., ao final 1 ciclo de 72°C por 7min. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose, submetidos à eletroforese em tampão TBE, corados com brometo de etídio ($0,5\mu\text{g/mL}$) e visualizados sob luz UV. Observou-se que o inseto inicia sua atividade de vôo as 5h00 até às 18h00, ocorrendo um pico populacional máximo das 9h00 às 11h00. Verificou-se uma mortalidade crescente de

adultos de *R. palmarum* em função do aumento da concentração do fungo e dos tempos de exposição ao inóculo. O maior índice de mortalidade (53%) ocorreu nove dias após a autoinoculação do inseto. As análises de RAPD geraram 138 bandas polimórficas e 14 monomórficas, sendo os padrões empregados para o cálculo das similaridades genéticas que variaram de 2% a 77%. Os isolados 57.99 (Betume2-SE) e 53.96 (Moju-PA) apresentaram maior similaridade (77%), seguidos de 64.99 (Egito) e 53.96 (Moju-PA), com uma similaridade de 73% pelo teste de RAPD. Enquanto que para o microssatélite os isolados BC.05 e 32.91 apresentaram maior similaridade genética (82%), seguidos de 64.99 e 57.99 com similaridade genética de 80%. Não foram observadas variações na amplificação das regiões ITS de DNAr para os isolados de *B. bassiana*.

ABSTRACT

Author: Marcelo da Costa Mendonça
Adviser: Prof. Dr. Ivanildo Soares de Lima

The coleoptera *Rhynchophorus palmarum* (L.), vulgarly known as palm weevil is considered one of the main pests of several palm trees of economic importance. In coconut tree their larvae destroy the plant culms and their adults act like a vector of nematode *Bursaphelenchus cocophilus* that cause the red ring disease. With the objective of subsidize the practices of biological control of *R. palmarum* already utilized it was carried out tests aiming to determine the flight activity of the insect in coconut fields; to validate the technique of autoinoculation of adults of *R. palmarum* using traps like vegetal traps bait inoculated with the *Beauveria bassiana* entomopathogenic fungi; and to characterize genetically isolates of the fungi by molecular markers of RAPD, microsatellites and ITS-DNA. To determine the flight activity of the insect it was installed, around the commercial field, traps of capture/monitoring for population of *R. palmarum* adult's insect, containing attractive feed (culms of sugar cane) added with pheromone of aggregation. For the autoinoculation tests it was used the randomized statistical design, in a factorial scheme 3x4 (3 spores concentration of the fungi and 4 periods of autoinoculation), using four replications constituted by 5 pairs of males and females. The insects were separated, cleaned with distilled water and transfer to buckets with sugar cane culms inoculated with *B. bassiana* on concentrations 10^7 , 10^8 and 10^9 spores/mL of suspension), keeping in contact with the inoculums for 45min.; 90min.; 3h00 and 6h00. After this period of exposition the insects were individualized being the mortality/infection evaluated for 20 days. For genetic characterization it was used 11 isolates obtained from monospores cultures that posterior were inoculated in a liquid medium at $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ under constant shaking in dark conditions. After seven days the mycelium were filtered, lyophilized and after DNA extracted in SDS buffer at 10%. It was tested 20 decamer primers of arbitrary sequence of IDT Company. The amplifications were carried out in thermocycler (Biometra/Uniscience) programmed for initial temperature of 94°C for 5min. and 45 cycles of: 94°C for 1min., 36°C for 2min. and 72°C for 1min.. For microsatellites analyses it was used four pairs of primers. The amplification reactions were carried out using a volume of $25\mu\text{L}$. The amplifications consisted by one initial cycle of 94°C and 30 cycles of 94°C for 1min.; 50°C for 1min. and 72°C for 2min., and a end cycle of 72°C for 7min.. The amplified fragments were separated by electrophoresis in agarose gel using TBE buffer, and the gel stained with ethidium bromete ($0.5\mu\text{g}/\text{mL}$) after visualized under UV light. The insect initiates flight activity at 5h00 am through 6h00 pm o'clock occurring the population maximum at 9h00 am to 11h00 am. It was verified the mortality increase of adults of *R. palmarum* in accord to fungi concentration and period of exposition of the inoculums. The highest index of mortality (53%) occurred nine days after the autoinoculation by *B. bassiana*. The RAPD analysis generated 138 polymorphic and

14 monomorphic bands being the patterns used to calculate the genetic similarity that varies of 2% to 77%. The 57.99 (Betume2-SE) and 53.96 (Mojú-PA) isolates presented high similarity (77%), followed by 64.99 (Egypt) and 53.96 (Mojú-PA), with similarity of 73% by RAPD test. For microsatellite the BC.05 and 32.91 isolates presented genetic similarity of 82%, followed by 64.99 and 57.99 with genetic similarity of 80%. It was not observed amplifications variations using ITS regions for *B. bassiana* isolates.

1. INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira de importância econômica mundialmente reconhecida, sendo cultivado em mais de 86 países situados nos trópicos, tanto para consumo *in natura* como para fins industriais, com mais de 360 modalidades de aproveitamento. A cocoicultura brasileira, localizada inicialmente apenas na faixa litorânea, tem se expandido para outros estados, a exemplo de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e para regiões do interior, principalmente nos perímetros irrigados, com produtividade superior às obtidas nos cultivos tradicionais. A produção brasileira foi de 2.078.226.000 frutos (nordeste 1.467.822.000 frutos – 70% da produção do país) e ocupa uma área de 288.142 ha (IBGE, 2004). Nos últimos anos a cultura do coco verde, com produção voltada para o consumo *in natura*, atingiu a região Centro Sul e as regiões onde o desenvolvimento da fruticultura tem proporcionado a formação de pólos que apresentam condições climáticas favoráveis ao crescimento da produção agrícola.

Como toda atividade agrícola, a cultura do coqueiro está sujeita a vários problemas, dentre os quais se destacam os aspectos fitossanitários. A formação de agroecossistemas que se estabelecem em grandes plantações diminui a diversidade biológica e aumenta os riscos de ataques de pragas, que são responsáveis por grandes perdas e aumento dos custos de produção, interferindo negativamente na rentabilidade do produtor. A coleobroca *Rhynchophorus palmarum*, Linnaeus 1764 (Coleoptera: Curculionidae) causa importantes prejuízos a algumas arecáceas, principalmente aos coqueiros e dendezeiros, nas quais é responsável por danos

diretos, devido à destruição dos tecidos internos da planta pelas larvas, e indiretos, sendo o adulto o vetor do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard causador da doença “anel vermelho”.

Há uma baixa eficiência nas técnicas de controle químico para essa praga, via aplicação de produtos por pulverização. Este fato está associado ao comportamento desse inseto cujos adultos não permanecem nas plantas, apenas alimentam-se e ovipositam, e suas larvas completam o ciclo no interior dos tecidos vegetais; além disso, o coqueiro apresenta um porte elevado e uma conformação de copa que dificulta a veiculação e penetração de produtos. Aliado a esses fatos há uma tendência mundial de redução ao uso de técnicas de controle de pragas que poluam o ambiente e sejam tóxicas para homens e animais. Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que possibilitem, com eficiência e segurança, o controle das pragas.

O controle biológico trata da utilização racional de inimigos naturais visando manter a população das pragas em níveis abaixo do dano econômico sem conseqüências negativas para o ambiente. Os agentes de controle incluem os fungos, vírus, bactérias, nematóides e protozoários. Entre os agentes causais de infecção em insetos, os fungos ocupam um lugar de destaque sendo considerados eficientes reguladores de um grande número de pragas. Dentre as espécies de fungos mais conhecidos e estudados a *Beauveria bassiana* se sobressai por apresentar ocorrência generalizada em todos os países e por ser freqüentemente encontrada sobre insetos. A especificidade, diversidade de espécies e isolados e a facilidade de manipulação no momento da aplicação, por meio de pulverizações comumente empregadas no campo, tornam o uso desse microrganismo vantajoso em relação às demais técnicas de controle.

Existem inúmeros isolados desse fungo infectando diversos hospedeiros em diferentes regiões. Este fato caracteriza uma provável existência de elevada variabilidade genética. Atualmente, muitos métodos estão disponíveis para analisar a diversidade de plantas, insetos, fungos dentre outros. Os métodos fenotípicos, associados às técnicas de biologia molecular, apresentam-se como uma estratégia importante para a caracterização e identificação de germoplasmas microbiano (Oliveira *et al.*, 1999; Ferreira & Grattapaglia, 1996; Nour *et al.*, 1995).

Estas técnicas genéticas moleculares contribuem na resolução de problemas associados à taxonomia e a variação genética para muitas espécies de fungos entomopatogênicos, além de auxiliar no controle de qualidade de micoinseticidas, proteção de patentes, monitoramento ambiental e persistência do produto (Hegedus & Khachatourians, 1996a).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos:

- Determinar a atividade de vôo e flutuação populacional de *R. palmarum* em um agroecossistema coco;
- Identificar a razão de transmissão (tempo e concentração) de esporos de *B. bassiana* para adultos de *R. palmarum*;
- Determinar a eficiência de parasitismo de *B. bassiana* por meio de armadilhas de autoinoculação para adultos de *R. palmarum* e a viabilidade dos esporos;
- Caracterizar, por meio de marcadores moleculares de DNA, a variabilidade genética de isolados de *B. bassiana* originários de localidades e hospedeiros distintos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica e controle do *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus, 1764

O gênero *Rhynchophorus* é composto por cerca de 10 espécies, das quais sete são consideradas como as principais pragas nas áreas produtoras de coco (Wattanapongsiri, 1966). O coleóptero *R. palmarum*, vulgarmente conhecido como broca-do-olho-do-coqueiro, pertence à família Curculionidae e tem distribuição neotropical (Wattanapongsiri, 1966). É uma espécie que apresenta um longo ciclo de vida, principalmente na fase larval; Wilson (1963), citado por Ferreira *et al.* (1998), observou aspectos biológicos desta praga: período de incubação dos ovos – 64 a 88 horas; período larval – 33 a 62 dias (dependendo do substrato); período pupal – 11,8 dias; longevidade do adulto – macho: 127,5 dias/fêmeas: 44,8 dias. Este inseto é considerado uma das principais pragas das plantações comerciais de coco (*Cocos nucifera*, L.) e de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) na América Latina e no Caribe (Posada, 1988; Esser *et al.*, 1987; Griffith, 1987; Morin *et al.*, 1986; Hagley, 1965). Segundo Bedford *et al.* (1978), espécies de plantas pertencentes às famílias Caricaceae, Bromeliaceae e Musaceae também são consideradas hospedeiras de *R. palmarum*. As espécies mais comuns em coqueiro são: *R. palmarum* e *R. cruentatus*, no continente americano; *R. phoenicius*, no continente africano; *R. ferrugineus* e *R. vulneratus*, no sudeste da Ásia; *R. ferrugineus*, no Oriente Médio e *R. bilineatus*, nas Ilhas do Pacífico (Oceania) (Ferreira, 2004).

Hagley (1965) em uma revisão sobre a espécie *R. palmarum* citou observações realizadas por vários autores: Merian (1726) relatou a infestação de coqueiros por larvas deste coleóptero; Guilding (1828) e Schomburgk (1847) observaram, além da infestação severa de suas larvas em espécies de palmeiras, a oviposição e a alimentação dos insetos adultos em cana-de-açúcar; Blandford (1893) descreveu o comportamento e a extensão dos danos causados pelas larvas em plantações de coco nas Honduras Britânicas; Bondar (1922) fez a descrição completa deste curculionideo e de seu ciclo de vida no Brasil; Urich & Guppy (1911) foram os primeiros a registrarem *R. palmarum* como praga de coqueiro, em Trinidad e Wilson (1963) observou o ciclo de vida deste inseto em experimentos preliminares de laboratório.

A importância econômica de *R. palmarum* está associada ao dano direto na planta, causado pelo ataque das larvas que abrem galerias destruindo os tecidos apicais internos, e ao dano indireto causado pelos adultos, que são vetores do nematóide *B. cocophilus* agente causal da doença conhecida por “anel-vermelho”, letal para o coqueiro e outras palmeiras (Ferreira *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 1992; Morales & Chinchilla, 1990). Os danos causados por *R. palmarum* podem ser observados desde a implantação da cultura. No entanto, a atividade das larvas da coleobroca é intensa durante a fase produtiva da planta. Em ambas as fases (vegetativa ou produtiva), as larvas alimentam-se dos tecidos vegetais, ocasionando a morte da planta. Os coqueiros estressados ou danificados são vulneráveis ao ataque da broca, pois liberam substâncias atrativas (caïromônios) (Morin *et al.*, 1986; Chittenden, 1902). Os odores da fermentação produzidos pelas plantas atraem adultos de *R. palmarum* que ovipositam nas cicatrizes recém-abertas (Duarte & Lima, 2001).

Fenwick (1967) e Griffith (1987) estudaram a interação entre o nematóide e o *R. palmarum* concluíram que uma população de 30 larvas em uma única planta adulta é suficiente para causar sua morte. Em plantas jovens é possível que um número menor de larvas provoque o mesmo efeito (Sánchez & Cerda 1993, citado por Duarte & Lima, 2001).

Inicialmente, o controle de *R. palmarum* era baseado na atração dos insetos pelos odores das plantas hospedeiras, que após o corte fermentavam dentro do

plântio de coco, atraindo os insetos que eram coletados manualmente (Franco, 1964; Bondar, 1940).

Outras táticas visando reduzir a população de *R. palmarum* em plantios de coco foram indicadas por Ferreira (1987) e Moura *et al.* (1991), dentre as quais: a utilização de armadilhas atrativas com cana-de-açúcar acrescidas de melaço de cana e a colocação de armadilhas no coqueiral com iscas confeccionadas com pedaços de estipe do coqueiro ou de palmeiras, cobertos com folhas secas e pulverizados com inseticida. Segundo Moura *et al.* (1998), a armadilha mais utilizada para a captura de insetos adultos de *R. palmarum* é a armadilha “tipo balde”; entretanto, estas apesar de eficazes são caras e facilmente subtraídas das plantações.

Baseando-se em estratégias citadas por vários autores, com utilização de semioquímicos no monitoramento e controle de coleopteros pragas de florestas e agroecossistemas, foi observado que os insetos machos da espécie *R. palmarum* produzem feromônio de agregação (Hardee (1982); Jansson *et al.* (1989); Riley *et al.* (1992); Borden (1993); citados por Oehlschlager *et al.* 1995). Este feromônio foi identificado como (2E)-6-metil-2-hepten-4-ol, substância que atrai machos e fêmeas para o coqueiral, contribuindo para o aumento da população da praga na cultura (Rochat *et al.*, 1991).

O método tradicional de controle, baseado na combinação de práticas culturais e na captura dos adultos de *R. palmarum* utilizando-se armadilhas (iscas atrativas acrescidas de feromônio de agregação) impregnadas com inseticidas foi estudado por Posada (1988), Morin *et al.* (1986) e Griffith (1987), sendo verificado através de testes de campo que a combinação do feromônio de agregação e o cairomônio produzido por plantas hospedeiras causam um efeito sinérgico na atratividade dos adultos de *R. palmarum*, superior ao uso individual das técnicas (Oehlschlager *et al.*, 1992). Técnicas baseadas na utilização de armadilhas e de feromônios de agregação para a captura de *Rhynchophorus* spp., tornaram-se populares nos últimos anos por apresentarem um controle satisfatório quando realizadas de forma sistêmica. Uma forma de aumentar a eficiência de controle de pragas é associar o feromônio e/ou atrativo alimentar a outra prática de controle, seja ela química, física ou biológica. Esta técnica é denominada *attract and killer* (atrair para matar), muito utilizada na supressão de diversas pragas. Ebbinghaus *et*

al. (2001) empregaram esta técnica para o controle da mariposa das frutas *Cydia pomonella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Tortricidae), associando feromônio sexual à aplicação de inseticida, obtendo 90% de mortalidade da praga. Vail *et al.* (1993) utilizaram armadilhas com feromônio para atrair machos adultos de *Plodia interpunctella* Hübner, 1813 e contaminá-los com vírus de granulosis (IMMGV - *Indian Meal Moth Granulosis Virus*).

Apesar dos recentes avanços, a ecologia química de *Rhynchophorus* spp. ainda não é entendida totalmente, dificultando o desenvolvimento de métodos de controle eficazes no campo (Weissling *et al.*, 1993). Esse contexto indica a necessidade de tornar mais eficientes as táticas de controle da praga, associando os conhecimentos existentes a cerca do feromônio de agregação e das armadilhas aos métodos de controle biológico de insetos.

2.2 Atividade de vôo e flutuação populacional de insetos, um enfoque para *Rhynchophorus palmarum* L.

As asas são os apêndices utilizados pelos insetos, principalmente, para sua locomoção aérea. Várias teorias tentam explicar a origem e função, ao menos inicial, das asas. Acredita-se que estas foram ainda nos primórdios utilizadas para camuflagem dos insetos, posteriormente, seriam empregadas nos vôos planados e com a evolução ganhariam articulação móvel para vôos a longas distâncias. Muitos autores atribuem ao sucesso da classe insecta a presença de asas, predominantemente, em um maior número nos pterygotas. O vôo para estes invertebrados possibilitou inúmeras atividades, dentre as quais, a ocupação de diferentes ecossistemas, que teve um papel fundamental no seu desenvolvimento. A possibilidade de conquistar e perpetuar-se em ambientes com condições variadas influenciou na diversificação de espécies de insetos, no seu aumento populacional e no desenvolvimento de estruturas e de comportamentos, que destaca a classe insecta como a mais abundante do filo artrópoda e, conseqüentemente, do reino animal.

A presença de asas, porém, não caracteriza uma relação de sobrevivência para os insetos, afinal há vários exemplos de espécies que desenvolvem alta população seus indivíduos são ápteros. Para algumas ordens, como é o caso dos

coleópteros, as asas têm uma função a mais do que a locomoção aérea. Esta ordem é caracterizada por possuir um par de asas, denominadas de élitros, que além de outras funções protegem estes insetos contra choques mecânicos e intempéries. A ordem diptera apresenta como principal característica a presença de apenas um par de asas, localizadas no mesotórax, o segundo par é modificado formando uma estrutura denominada de halteres ou balancis.

O vôo para os insetos, em especial para aqueles considerados pragas, favorece a disseminação das populações e a colonização dos plantios de espécies vegetais. Por razões fisiológicas o vôo somente ocorre sob condições particulares. O funcionamento dos músculos responsáveis pela movimentação das asas, depende do aumento da temperatura do corpo dos insetos que é influenciada por fatores externos (Chapman, 1982). O deslocamento do inseto, ou muitas vezes uma população deles, de uma região para outra ou dentro de uma mesma área de cultivo ocorre em épocas determinadas e é reconhecido como migração, sendo alvo de muitos trabalhos de pesquisa. A migração de insetos é de importância ecológica extrema, como um processo fundamental de uma população e dinâmica de comunidades, tendo implicações importantes para muitas linhas de pesquisa inclusive na modelagem de populações e nas interações inseto-planta (Ellingson, 2005). A mudança ou a direção de vôo de populações de insetos é influenciada ou limitada por diversos fatores abióticos e bióticos, ou pelo conjunto deles, tais como: correntes de ar/vento, temperatura, umidade, intensidade luminosa, atração do sexo oposto para acasalamento e reprodução e, em especial, pela riqueza e diversidade de alimento (Wenks, 1981).

Shirai & Kosugi (2000) avaliaram o efeito do sexo, idade, comportamento de acasalamento e temperatura na atividade de vôo de *Adoxophyes honmai* Yasuda, 1988 por um sistema de computadores e verificaram que o pico de atividade de vôo de ambos os sexos ocorreu aos dois dias de vida entre um e quatro dias de idade, não havendo diferença significativa na atividade de vôo entre os sexos, embora as fêmeas voem mais longe que machos entre cinco e oito dias. O comportamento de acasalamento não afetou a atividade de vôo das fêmeas, ou seja, ambos os sexos voaram mais ativamente a 23°C e a distância de seus vôos foi reduzida em temperaturas inferiores a 18°C.

O vento exerce marcada influência na disseminação dos insetos, arrastando a grandes distâncias não só os ovos, como também larvas e adultos de muitas espécies podendo transportar insetos adultos alados ou não (Silveira Neto *et al.*, 1976). Miranda *et al.* (2005) estudaram o comportamento e dispersão do gafanhoto *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn, 1906, e verificaram que os deslocamentos das suas populações realizaram-se em direções variadas, determinadas em 80% dos casos pela direção do vento. Muitos insetos tendem somente a voar quando a velocidade do vento é relativamente baixa, e quando a velocidade está alta aguardam momentos de calma (Chapman, 1982).

O conhecimento da dispersão e as temperaturas adequadas, que favorecem o vôo dos insetos-praga, têm sido importantes para estudos de redução de resistência a inseticidas (Georghiou, 1983, 1980), bem como no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Regniere & Sharov, 1999; Karaveia, 1986). Estudo objetivando relacionar os níveis populacionais de moscas-das-frutas com os fatores meteorológicos em Porto Alegre – RS, determinaram que os fatores climáticos mais intervenientes sobre a população de *Anastrepha fraterculus* Wied., 1830 foram evaporação, temperatura média, máxima e insolação, e para *Ceratitidis capitata* Wied., 1824 a temperatura média (Garcia & Corseuil, 1998/99).

Os níveis e variações da umidade podem determinar a ocupação ou a atividade dos insetos. Segundo Chapman (1982), é duvidoso o efeito da umidade como um fator de inibição do vôo dos insetos, embora exista casos que correlacionem a continuidade do vôo com este fator físico. Os insetos sociais, como os cup ins e as formigas, só realizam a enxameagem e vôo nupcial após chuvas intensas, que elevam a umidade do ar e do solo. A associação de fatores como umidade e temperatura reproduzem uma forma clássica de representar o clima, permitindo de uma forma simples e prática a comparação entre duas regiões. Esta associação cria ou delimita áreas para o desenvolvimento de determinadas espécies de insetos, as quais se deslocam voando em busca de condições mais favoráveis e adaptadas ao seu ciclo biológico.

O comportamento dos insetos pode ser considerado sob três pontos vista, ou seja: instinto, inteligência e tropismo. Este último, também denominado de tropotaxe, nada mais é que uma reação a um estímulo qualquer, quando este estímulo está relacionado à luz passa a ser chamado de fototropismo. Muitos insetos reagem

favoravelmente à luz voando em sua direção, são os chamados fototrópicos positivos, outros voam em direção oposta a luz, fototrópicos negativos (Silveira Neto *et al.*, 1976).

A luz é o fator ambiental mais importante que influencia o ritmo circadiano; a alternância de luz em regimes claros e escuros afeta os níveis diários do ritmo circadiano e a expressão de genes da cronobiologia dos insetos (Collett *et al.*, 2002; Sumova *et al.*, 2002).

O alimento, como um componente do meio ambiente, é extremamente importante, influenciando diretamente sobre a distribuição e abundância dos insetos. A função principal do inseto adulto está relacionada à reprodução e em muitos casos a dispersão. Estas funções dependem da interação e integração de processos fisiológicos e comportamentais, os quais estão intimamente correlacionados ao consumo e utilização dos alimentos (Parra, 1991). No alimento deve ser considerado não apenas sua qualidade, como a quantidade dos mesmos, atuando no comportamento populacional dos insetos e na sua fisiologia (Silveira Neto *et al.*, 1976). Este mesmo autor destaca o alimento como um fator importante na distribuição de insetos, devido, principalmente, à especificidade alimentar destes artrópodes. Vários autores estudaram a atividade de vôo de abelhas e verificaram que a abundância do alimento influenciou a ocupação de uma determinada área (Hilário *et al.*, 2000; Azevedo, 1997; Heard & Hendrikz, 1993).

Entre insetos e plantas são possíveis todas as interações, pelo menos em teoria, isto porque competição entre insetos e plantas, apesar de teoricamente possível, é muito pouco provável de ser encontrada na natureza. Os insetos encontram nas plantas não apenas uma fonte de alimento, mas também um local que possam viver e se reproduzir. Sendo dependentes das plantas, os insetos fitófagos estão sujeitos a todas as interações entre estas e meio ambiente (Pizzamiglio, 1991).

Os feromônios influenciam na atividade de vôo dos insetos por meio da atração do sexo oposto para o acasalamento através de substâncias químicas emitidas pelos insetos e por plantas ou pela combinação desses voláteis. A utilização de feromônio sexual para o monitoramento populacional de insetos tem sido uma das técnicas mais empregadas do método de controle de pragas por comportamento.

As abelhas produzem feromônios que são exemplos clássicos da influência dos odores no deslocamento e vôo dos insetos. As operárias produzem feromônios responsáveis por guiarem o enxame no vôo e no pouso, ao passo que, as rainhas produzem esta mesma substância com o objetivo de manter o enxame unido, além disso, atua na atração do sexo oposto para o acasalamento.

A atividade de vôo do gênero *Rhynchophorus*, em geral, é pouco relatada, apesar dos insetos serem encontrados em todas as épocas do ano. Chittenden (1902) observou *Rhynchophorus* voando 5 - 6 km em resposta a palmeiras com danos; contudo, são poucas as informações disponíveis sobre o comportamento de vôo desse inseto (Weissling *et al.*, 1994).

Sobre a dinâmica diária de *R. palmarum*, Sánchez *et al.* (1993) afirmam que os adultos apresentam dois picos de atividade bem definidos, que coincidem com a variação de temperatura durante o dia. Este termoperiodismo também foi influenciado pela umidade relativa do ar.

Segundo Hernández *et al.* (1992), Wattanapongsiri (1966) e Hagley (1965), *R. palmarum* não tolera altas temperaturas nem baixos níveis de umidade. O inseto realiza vôos de dispersão e colonização de novos hospedeiros apenas nos períodos com condições favoráveis.

A importância das informações sobre a atividade vôo desta praga e a carência de conhecimentos na literatura, sobre tudo sob as condições climáticas encontradas no local de desenvolvimento desta pesquisa no Estado de Sergipe (caracterizado como um pólo de produção e desenvolvimento de cocoicultura), fundamentaram a necessidade de desenvolver esta etapa.

2.3 Controle biológico com fungos entomopatogênicos

Apesar dos fungos terem sido descobertos como patógenos de insetos há cerca de 2000 anos, sua importância na patologia e controle microbiano de insetos só ocorreu a partir de 1834 com a atuação de Agostino Bassi, quando demonstrou a patogenicidade de *B. bassiana* para o bicho-da-seda (*Bombix mori*) (Alves, 1986).

O gênero *Metarhizium* é um dos mais conhecidos fungos entomopatogênicos. Esse deuteromiceto foi identificado pela primeira vez por Metchnikoff, em 1879, em

um coleóptero Scarabeidae como *Entomophthora anisopliae*. O potencial de uso desse fungo para controle biológico de pragas foi sugerido por Metchnikoff, quando em 1879 produziu *Metarhizium anisopliae* em larga escala para o controle da praga do trigo *Anisopliae austriaca* e de um curculionídeo da beterraba *Cleonus punctiventris*.

No Brasil, os fungos também foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados e vêm sendo estudados há mais de sessenta anos; a exemplo de outros países do mundo. Os gêneros *Beauveria* e *Metharhizium* são os mais estudados e utilizados devido à ampla faixa de ação e facilidade de produção em condições de laboratório (Marques, 1992).

Alves (1986) cita as experiências de vários autores com a utilização de fungos entomopatogênicos para controle de pragas: Pestana em 1923, fez referência ao *Metarhizium anisopliae*, o qual chamou de *Penicillium anisopliae*, para o controle de *Tomaspsis* sp.; Bittancourt (1934) relatou a ocorrência de alguns fungos entomopatogênicos em pragas de citros e, em 1939, Reininger e Gomes observaram um ataque de *Aschersonia aleyrodis* sobre *Aleurothrixus floccosus*.

No Brasil, o relato mais significativo de fungo como patógeno de insetos foi feito por Viégas em 1939, citado por Alves (1986), quando publicou dois trabalhos sobre a ocorrência de *Verticillium lecanii* em *Coccus viridis* e *Empusa dysdercus*, mencionando aspectos interessantes sobre os fungos.

Nos últimos 60 anos, foram publicados no Brasil cerca de 700 trabalhos na área de patologia e controle microbiano de insetos, aproximadamente, 56% destas publicações relacionam-se aos fungos entomopatogênicos.

É provável que a maioria dos fungos entomopatogênicos, que abrangem cerca de 700 espécies reunidas em 90 gêneros já foram constatados atacando insetos de importância agrícola.

A ampla preocupação com o ambiente e os riscos à saúde, associados ao uso indiscriminado de inseticidas químicos, estimularam a identificação e o desenvolvimento de agentes biológicos, com grande destaque para os fungos entomopatogênicos, para o controle de pragas agrícolas.

Os fungos distinguem-se dentre os agentes de controle biológico de insetos pela abundância de gêneros e espécies no controle de pragas de importância econômica, pela possibilidade de produção e de armazenamento e pela facilidade

de aplicação no campo. Cerca de 80% das doenças em insetos têm como agentes etiológicos os fungos e estes são particularmente importantes para o controle de coleópteras, já que doenças virais e bacterianas são raras nessa ordem (Alves, 1998; Zimmerman, 1993; Veen, 1968). Apesar disso, das 700 espécies de fungos entomopatogênicos de ocorrência conhecida, apenas 10 espécies foram ou estão sendo desenvolvidas para controle de pragas e o potencial entomopatogênico destas não têm sido completamente abordado (Hajek & St. Leger, 1994).

2.3.1 Fungo entomopatogênico deuteromiceto - *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

O fungo *B. bassiana* pertence à classe de fungos entomopatogênicos Deuteromicetos (fungos imperfeitos), apresentando um modo de crescimento dimórfico. Na ausência de insetos hospedeiros específicos, passa por um ciclo vegetativo assexuado que inclui germinação, crescimento filamentosos e formação de simpódulo conídios. Já na presença do hospedeiro passa para o ciclo patogênico. Os conidiósporos germinam na superfície da cutícula, formam o apressório e os tubos hifais penetram diretamente na cutícula do inseto. Em seguida, o fungo altera sua morfologia de crescimento para uma fase de levedura e produz hifas, que circulam na hemolinfa e se proliferam (Figura 1). Após a morte do hospedeiro, o crescimento do fungo se reverte para a forma hifal típica (estádio saprotrófico). A habilidade de mudar de fase pode ser um pré-requisito para a patogenicidade (Riba & Silvy, 1989).

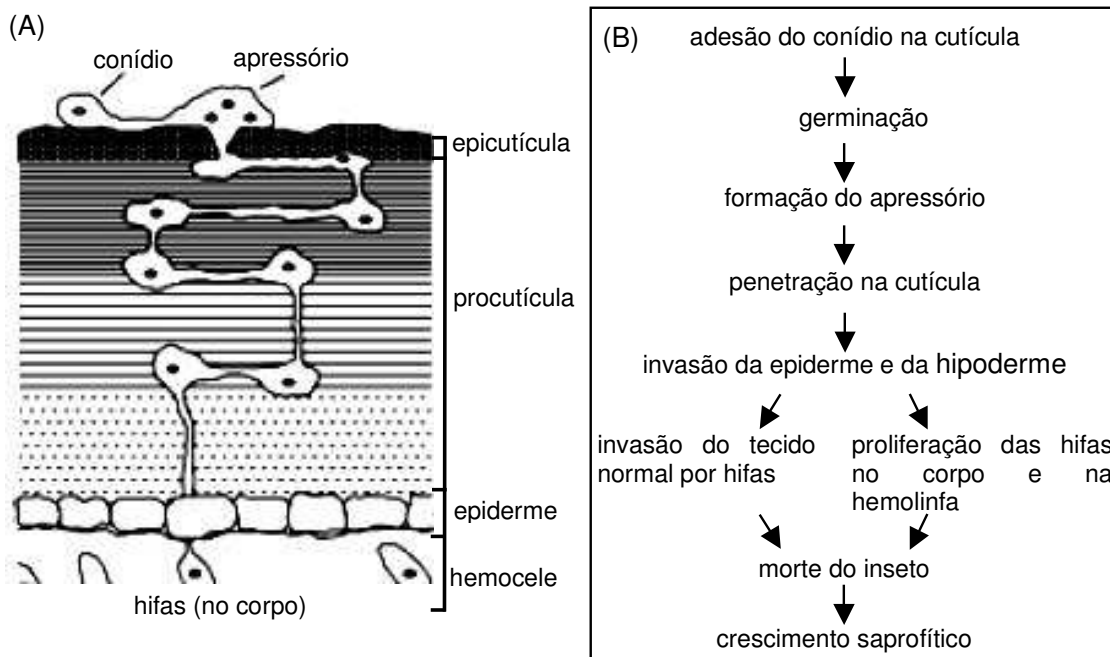


Figura 1 – Processo de infecção de *Beauveria bassiana* no inseto: estruturas do tegumento do inseto e a penetração do esporo do fungo (A) e o diagrama das etapas da infecção (B) (Fonte: Wan, 2003, adaptado).

Em contraste com as bactérias e os vírus, que atravessam a parede do intestino contaminando os insetos e provocando septicemia, os fungos têm um modo peculiar de infecção. Eles alcançam a hemocele pelo tegumento (cutícula) ou possivelmente via cavidade bucal. Os esporos do fungo quando ingeridos não germinam no intestino e sim na cavidade do corpo. A morte do inseto resulta de uma combinação de fatores: dano mecânico, que é o resultado de invasão de tecido; depleção de recursos nutricionais e ação tóxica das micotoxinas liberadas no organismo do inseto (Wan, 2003).

As diferentes espécies de *Beauveria* são altamente adaptadas a hospedeiros específicos. Muitas espécies têm sido isoladas de uma diversidade de insetos de todo o mundo e possuem importância na medicina e na agricultura. Uma característica interessante de muitos isolados é a enorme especificidade de hospedeiros. Além disso, o alto nível de persistência na população de hospedeiros e no meio ambiente causam efeitos em longo prazo do fungo entomopatogênico na supressão dos insetos.

O fungo *B. bassiana* é empregado em escala comercial em alguns países, entre eles os Estados Unidos e o México. Na China, *B. bassiana* é utilizado contra a

lagarta do pinheiro (*Dendrolimus* spp.), a broca do milho (*Ostrinia nubilalis*), e a esperança verde (*Nephotettix* sp.) (Wang *et al.*, 2004).

Volumes consideráveis desse fungo foram comercializados no Brasil para o controle de ácaros do mamão e da broca-do-café (Castrillo & Brooks, 1998), além de um volume menor ter sido destinado ao controle de cochonilhas. Esse fungo tem-se mostrado igualmente eficiente no controle de cupins, muito embora, do ponto de vista comercial, ainda seja desejável o desenvolvimento de metodologias de aplicação de maior praticidade. Apresentam ainda potencial para o controle de pragas como o moleque-da-bananeira e a mosca branca. Para o moleque-da-bananeira, os esporos do fungo podem ser associados a iscas à base de pseudocaule da bananeira para uso em pequenas propriedades, como já ocorre no Estado de São Paulo (Faria & Magalhães, 2001).

Doenças causadas por fungos entomopatogênicos são comuns em insetos e difundidas entre suas populações por meio de epizootias. O entendimento da transmissão no campo de esporos para os insetos é importante para o desenvolvimento de técnicas que empregam os fungos como agentes de controle biológico. A epizootiologia estuda os fatores que determinam ou controlam o desenvolvimento das doenças em populações de insetos em um determinado ecossistema ou agroecossistema, envolvendo as causas da variação do nível da doença, em diferentes épocas e locais. Uma epizootia é caracterizada pelo elevado índice de doença, em consequência da multiplicação e disseminação do inóculo produzido nos focos primários (Alves, 1998).

2.3.2 Controle biológico de *Rhynchophorus palmarum* com *Beauveria bassiana*

O fungo, *B. bassiana* é empregado no controle de pragas como o moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), a broca dos citros (*Diploschema rotundicolle*), a broca da batata-doce (*Cylas formicarius*), o cupim de montículo (*Cornitermes cumulans*), a mariposa dos pinos (*Panolis flammea*) e o curculionídeo aquático (*Neochetina bruchi* Hustache), sendo o seu potencial também avaliado em diversos laboratórios para o controle de outras pragas (Chikwenhere & Vestergaard, 2001; Hicks *et al.*, 2001; Rath, 2000; Marcano *et al.*, 1999; Alves, 1998).

O potencial do fungo entomopatogênico *B. bassiana* como agente biológico de controle está relacionado com as condições adequadas de concentração de esporos, temperatura e umidade, fatores determinantes para infecção dos insetos e germinação do fungo (Searle & Doberski, 1984). Testes de laboratório realizados por Santana & Lima (1992) atingiram 100% de mortalidade para os insetos adultos de *R. palmarum* infestados com *B. bassiana*.

A aplicação de fungos entomopatogênicos em plantações comerciais de coco para o controle de *R. palmarum*, enfrenta barreiras relacionadas com o comportamento da praga e a viabilidade do patógeno em campo. Este fato sugere a necessidade de identificar técnicas de controle capazes de superar tais limitações.

Um possível mecanismo desenvolvido para disseminação de fungos é o uso do próprio inseto no transporte dos esporos após ser infectado pelo patógeno (Jackson *et al.*, 1992; Pell *et al.*, 1993; Lacey *et al.*, 1994). A técnica de autodisseminação foi definida por Ignoff (1978) e citada por Furlong *et al.* (1995) como sendo o uso de insetos para introdução e expansão de entomopatógenos nos ecossistemas. O fundamento da autodisseminação está no estabelecimento da infecção e dependência da sobrevivência do inseto para disseminação de patógenos visando atingir sua população em grande escala (Soper 1978, citado por Vail *et al.*, 1993).

Conhecer o comportamento do inseto para o emprego eficaz da autodisseminação como tática de controle é imprescindível, pois este conhecimento é a base para desenvolver as estratégias de autoinfecção da praga pelo patógeno, tornando-a uma fonte de inóculo capaz de induzir o processo infeccioso. Jackson *et al.* (1992) demonstraram que machos de *Heliothis virescens* (F.), inseto praga de tabaco, quando contaminados com vírus e unidos a fêmeas sadias promovem transmissão substancial de *Autographa californica* NPV (AcNPV). Armadilhas foram desenvolvidas com feromônio para facilitar a autodisseminação de *Zoophthora radicans* por *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), praga de brássicas (Furlong *et al.*, 1995) e com atrativo alimentar (batata-doce) em sistemas de autoinoculação para *Cylas formicarius* por *B. bassiana* (Yasuda, 1999). Estes autores concluíram que os machos uma vez infectados retornavam ao seu habitat natural, acelerando a dispersão do entomopatógeno. A relação patógeno-hospedeiro é também fundamental para esta prática, Weseloh (2004) estudou a dispersão de

conídios do fungo patogênico *Entomophaga maimaiga* na sobrevivência das larvas de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), verificando que os conídios produzidos pela esporulação nos cadáveres do hospedeiro são os responsáveis por infecções freqüentes e maciças nas larvas.

Apesar da eficiência comprovada dos fungos entomopatogênicos para o controle das pragas, com enfoque para a espécie *B. bassiana*, a escassez de informações sobre os impactos na dinâmica populacional do *R. palmarum* no agroecossistema coco apresenta-se como um dos principais obstáculos para a utilização mais ampla desse agente de controle biológico; tornando-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que enfoquem aspectos referentes ao processo de infecção do fungo e ao comportamento do hospedeiro infectado, relacionando-os à concentração dos esporos e ao tempo de autoinoculação dos insetos adultos.

2.4 Marcadores moleculares

O desenvolvimento de marcadores moleculares possibilitou a utilização da variabilidade genética existente no DNA para identificar genes de importância econômica. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos: aqueles baseados na hibridização do DNA genômico com sondas ou na amplificação de fragmentos de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia de Polimerase). Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) e Minissatélites, ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats* – Número Variável de Sequências Repetidas em Tandem). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions* – Regiões Amplificadas Caracterizadas por Sequência), Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats* – Sequências Simples Repetidas) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) (Rezende, 2004).

2.4.1 Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e suas aplicações

Atualmente, muitos métodos estão disponíveis para analisar a diversidade de plantas, insetos, fungos e outros. Essas metodologias diferenciam-se pela técnica utilizada para revelar a variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade (Milach, 1998).

A técnica de RAPD (Williams *et al.*, 1990) tem sido escolhida para muitos estudos, uma vez que é relativamente sensível, rápida e simples, além de não requerer informações acerca da seqüência nucleotídica do DNA genômico. O RAPD tem sido amplamente utilizado para o estudo de diversos grupos de seres vivos (Alfenas, 1991).

O RAPD, também conhecido por AP-PCR (Arbitrarily amplified PCR/PCR de Amplificação Arbitrária) (Welsh & McClelland, 1990) é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintivas: utiliza um *primer* único ao invés de um par de *primers* e esse tem seqüência arbitrária, portanto, sua seqüência alvo é desconhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Além de não requerer o conhecimento prévio da seqüência alvo a ser amplificada, os marcadores RAPD apresentam a não utilização de radioatividade, necessita de pequenas quantidades de DNA e é aplicável a qualquer espécie, dentre outras vantagens (Zucchi, 2002).

Entretanto, os marcadores RAPD também apresentam limitações destacando-se o baixo conteúdo de informação genética por loco. O segmento que é amplificado é detectado como um alelo, enquanto que as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como alelo nulo (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os marcadores RAPD possuem caráter dominante, limitando seu uso na estimação de parâmetros genéticos, além de apresentar problemas de reprodutibilidade (Karp *et al.*, 1996). No entanto, sua escolha se baseia no custo e na facilidade de uso.

Para que haja amplificação de fragmento RAPD no genoma analisado, duas seqüências de DNA complementares ao “*primer*” arbitrário devem estar suficientemente adjacentes (<4000 pares de bases) e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de uma banda num gel de eletroforese,

que é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídio em luz ultravioleta. Tipicamente, cada *primer* arbitrário utilizado dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando assim em várias bandas no gel (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O uso de marcadores RAPD tem permitido o estudo da diversidade genética inter e intra-específica, caracterização de raças fisiológicas e classificação detalhada de isolados de fungos (Faleiro *et al.*, 1998; Brioso *et al.*, 2001).

O marcador genético RAPD foi utilizado para diferenciar 24 isolados de *B. bassiana* coletados do besouro negro, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) da Carolina do Norte e oeste de Virginia. Dez *primers* de RAPD que foram selecionados de 72 que foram testados, produziram 141 bandas para os 24 isolados e separou cada um como uma única classe. Isoenzimas também foram utilizadas para diferenciar estes isolados, mas o marcador RAPD apresentou melhor resolução na diferenciação. A variação foi detectada não somente dentro e entre isolados de diferentes regiões, mas também entre isolados coletados do inseto hospedeiro (Castrilho & Brooks, 1998).

Trichoderma stromaticum é um fungo antagonista a *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. Bezerra *et al.* (2003), objetivando demonstrar a conexão entre *T. stromaticum* e a *Hypocrea* sp., extraiu o DNA genômico de colônias provenientes de ascósporos desta *Hypocrea* sp., de conídios de *T. stromaticum* e de *Fusarium* sp. (controle negativo) e em seguida amplificou com oito "*primers*" decâmeros para obtenção de marcadores RAPD. Observaram-se similaridades genéticas de 82% a 96% entre os isolados ascospóricos e conidiais com base nos marcadores RAPD e de 6% a 9% entre estes e o isolado de *Fusarium* sp.

Teixeira *et al.* (2004) caracterizaram e dimensionaram a diversidade genética de dez isolados de *Acremonium strictum* obtidos de sementes de milho, provenientes de diferentes regiões produtoras brasileiras, por meio da análise do DNA genômico (RAPD). O trabalho objetivou ainda, diferenciar os isolados de *A. strictum* de *Fusarium verticillioides* por meio da técnica citada. Pela análise do DNA, 25 *primers* geraram polimorfismos, os quais tornaram possíveis e seguro o agrupamento de isolados de *A. strictum* e sua diferenciação de *F. verticillioides*. Os isolados de *A. strictum* apresentaram variabilidade intraespecífica entre 3,4% e

44,4%. Para a maioria dos casos não foi possível correlacionar à similaridade genotípica e a origem geográfica dos isolados de *A. strictum*.

Os fungos causadores da antracnose (*Colletotrichum gossypii*) e da ramulose (*C. gossypii* var. *cephalosporioides*) em algodoeiro são de difícil diferenciação por métodos convencionais. No trabalho desenvolvido por Silva-Mann *et al.* (2002), associou-se informações do teste de patogenicidade com marcadores bioquímicos e moleculares de DNA/RAPD, visando à identificação e diferenciação do complexo *Colletotrichum*. Foram usados dez isolados, sendo três classificados como causadores de antracnose e sete de ramulose, pelo teste de patogenicidade. A análise de RAPD confirmou a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

Vargas *et al.* (2003) caracterizaram cinco linhagens de *Nomuraea rileyi* por análise de RAPD, por avaliação da virulência e atividade enzimática (quitinolítica e proteolítica). A técnica distinguiu as cinco linhagens avaliadas em dois grupos com similaridade genética de 76%.

A técnica de RAPD tem sido utilizada na análise da variabilidade genética de isolados de *B. bassiana*, por ser de fácil execução, de custo relativamente reduzido e eficiente na detecção de polimorfismo (Castrillo *et al.*, 1999; Castrillo e Brooks, 1998; Berretta *et al.*, 1998; Bidochka *et al.*, 1994).

2.4.2 Marcadores baseados na amplificação de microssatélites e sua aplicação

Os marcadores de microssatélites são seqüências de dois a seis nucleotídeos, repetidas ao longo do genoma, altamente polimórficas, codominantes e flanqueadas por regiões conservadas e não repetidas de DNA. Essas seqüências são distribuídas de maneira aleatória em genomas de organismos eucariotos (Hearne *et al.*, 1992). As seqüências são comumente repetidas de 10 a 60 vezes (Gupta *et al.*, 1996), centenas de vezes (Mörchen *et al.*, 1996) ou milhares de vezes (Brown *et al.*, 1996)

Estes locos altamente polimórficos, amplificados via PCR foram também denominados de STMS – *Sequence Tagged Microsatellite Sites* (Beckmann & Soller, 1990), ou seja, sítios de microssatélites marcados por seqüência, e constituem uma das classes mais polimórficas de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Microssatélites são normalmente flanqueados por segmentos de DNA únicos e conservados. Dessa forma torna-se possível a escolha de *primers* que amplificam especificamente um único loco de microssatélite. O comprimento do segmento amplificado normalmente se encontra entre 50 e 300 pares de base (pb) (Tautz *et al.*, 1986).

Regiões contendo seqüências simples repetidas são amplificadas individualmente por meio de PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos (de 20 a 30 bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite. Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A natureza altamente mutável de locos microssatélites aumenta o número de variantes alélicas em cada loco (Tautz *et al.*, 1986). Assim cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Ou seja, devido a alterações nas seqüências nucleotídicas durante a replicação do DNA, diferentes indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar um número variado de repetições dentro de um mesmo microssatélite, os quais constituem diferentes alelos (Alzate-Marin *et al.*, 2005).

Microssatélites possuem a vantagem de apresentarem herança Mendeliana e de serem altamente reproduzíveis, com locos específicos, codominantes e hipervariáveis. Eles permitem, virtualmente, a utilização de qualquer população segregante para estudos de ligação (Chin *et al.*, 1996). Entretanto, a maior limitação da tecnologia de microssatélites é a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para que o microssatélite seja útil como marcador, ele deve ser inicialmente clonado, seqüenciado e amplificado a partir de *primers* que o flanqueiem. Em seguida, os produtos de amplificação são separados por eletroforese e visualizados. Na maioria das vezes, a eletroforese deve ser feita em gel de poliacrilamida devido à pequena diferença de tamanho entre os fragmentos alélicos (Alzate-Marin *et al.*, 2005).

A amplificação de regiões de microssatélites tem sido apontada como uma das mais eficientes estratégias de utilização de marcadores moleculares de DNA para distinguir genótipos de uma mesma espécie (Disconzi, 2002).

Rehner & Buckley (2003) descreveram o isolamento e caracterização de oito locos de microssatélites que amplificam com sucesso alguns isolados representativos da diversidade filogenética no complexo *B. bassiana*.

O heteróptero *Ligus hesperus* é uma importante praga de ocorrência no leste dos Estados Unidos e Canadá. Marcadores de microssatélite foram utilizados com sucesso na determinação e caracterização de *B. bassiana*, visando à seleção de isolados para o controle biológico dessa praga (McGuire *et al.*, 2005).

Enkerli, *et al.* (2004) utilizaram microssatélite para caracterização genética de isolados de *B. brongniartii* aplicados durante um longo período para controle biológico de *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae), verificando que após 14 anos alguns isolados persistiam no ambiente e novas populações haviam surgido, co-existindo no mesmo habitat.

O alto poder de discriminação e identificação de marcadores do tipo microssatélites torna-o uma valiosa ferramenta, adequada para caracterização e identificação de raças de *B. brongniartii* usadas como agente de controle biológico. Além disso, esses marcadores podem ser aplicados para o monitoramento das raças desse fungo usadas no campo para o controle biológico de pragas, possibilitando verificar a interação com os isolados que ocorrem naturalmente em campo (Enkerli, *et al.*, 2001).

2.4.3. Regiões ITS de DNA ribossomal

As análises de seqüências por meio de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Fragmentos de Restrição) são ferramentas que podem ser utilizadas nos estudos de DNA. O DNA é cortado em fragmentos de restrição por enzimas endonucleases, que somente cortam onde existem seqüências de DNA específicas, reconhecidas pelas mesmas. Os fragmentos de restrição são então separados, de acordo com o comprimento (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As variações no tamanho de fragmentos gerados por distintas amostras de DNA após clivagem com enzimas de restrição podem ser avaliadas pela comparação entre o número e o tamanho dos fragmentos produzidos pela digestão do DNA com ou sem uma posterior etapa de hibridização com sondas marcadas (Marques *et al.*, 2002).

Uma alternativa para a identificação e diferenciação intraespecífica de fungos envolve utilização de *primers* específicos. Hegedus & Khachatourians (1996b) utilizaram *primers*, correspondentes a segmentos de DNA específicos de *B. bassiana*, para identificação e diferenciação intraespecífica deste fungo por meio das técnicas de PCR e SSCP (“Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis) em isolados deste entomopatógeno, infectando *Melanoplus sanguinipes* (gafanhotos migratórios). O perfil de restrição dos produtos de PCR, sequenciamento e SSCP permitiram a diferenciação positiva de um isolado particular de *B. bassiana* em relação a outros.

Outro marcador molecular amplamente utilizado na identificação e diferenciação de espécies são as regiões do DNA ribossomal (DNAr). Os DNAr nos eucariotos estão presentes repetidas vezes e cada unidade consiste de regiões codificadas para os genes RNAr 18S, 5.8S e 28S, e dois espaços internos – *Internal Transcribed Spacers* (ITS) que separam essas regiões. Cada unidade do DNAr é separada por um espaço intergênico – *Inter Genic Spacers* (IGS). A unidade de DNAr apresenta componentes em sua seqüência que envolve variações e podem ser usadas em estudos de sistemática para diferentes níveis taxonômicos (Fouly *et. al*, 1997), pois são conservadas ao longo da evolução (Figura 2).

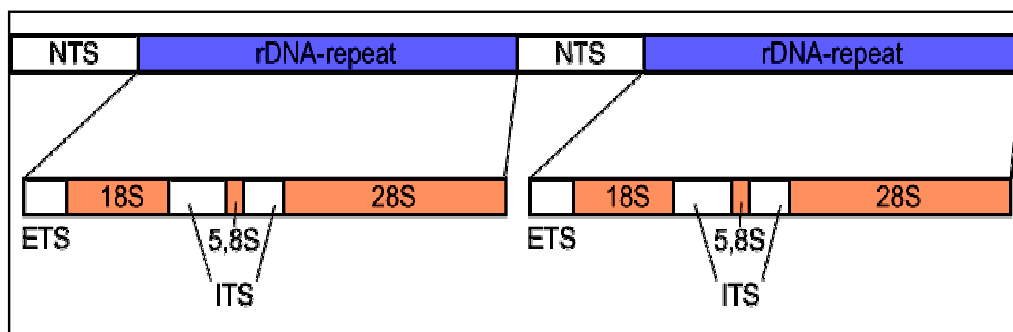


Figura 2 - Representação das regiões ITS do DNA ribossomal. (Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Eucaryot_rdna.png)

A região ITS tem sido a região de DNA mais seqüenciada nos fungos, pois se mostra altamente útil para sistemática molecular em nível de espécie e mesmo dentro de uma espécie, isto é, na identificação de raças geográficas, devido ao seu mais alto grau de variação, quando comparada com regiões gênicas. Em adição, os padrões ITS 1 e ITS 4 obtidos com *primers* específicos têm sido descritos como

ferramentas seletivas para identificação de fungos auxiliando em trabalhos de diversidade entre isolados (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Berbee & Taylor (1995) enfatizaram que as regiões do DNAr 18S e 28S são muito conservadas e podem ser utilizadas para diferenciação em nível de gênero e espécie, pois são conservadas durante a evolução. Por outro lado, as regiões espaçadoras ITS e IGS acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies ou entre linhagens da mesma espécie (Ristaino *et al.*, 1998).

Ristaino *et al.* (1998) estudaram um método rápido de identificação para seis grupos taxonômicos do patógeno de plantas, *Phytophthora*, utilizando a comparação visual dos padrões de bandas de restrição para as enzimas *RsaI*, *MspI* e *Hae III*. A digestão do produto ITS obtido com as enzimas de restrição revelou perfis diferentes dentre as espécies testadas possibilitando, em todos os casos, a diferenciação inter e intra-específica. Os isolados foram caracterizados anteriormente por métodos tradicionais, por meio de características morfológicas. Os métodos moleculares foram, segundo os autores, ferramentas rápidas e fáceis para a identificação de espécies dentro desse gênero.

Além das informações relatadas, anteriormente, com o uso de marcadores moleculares, sugere-se que o alto grau de sensibilidade e precisão das técnicas moleculares ainda permitem que fungos entomopatogênicos possam ser monitorados com segurança no ambiente de acordo com sua origem e especificidade (Hegedus & Khachatourians, 1996b).

2.4.4 Marcadores isoenzimáticos na caracterização de microrganismos

O termo isoenzima define um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma delas (Moss, 1982). O princípio básico da técnica reside no uso de eletroforese (Smithies, 1955) e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos (Hunter & Markert, 1957). A difusão de seu uso ocorreu por meio do desenvolvimento de métodos eficientes para visualização do produto enzimático e da aplicabilidade imediata encontrada em várias áreas de biologia. As isoenzimas têm sido utilizadas no estudo de dispersão de espécies, na análise de filogenias, no melhoramento de plantas, possibilitando a detecção de

ligação gênica com caracteres mono e poligênicos, identificação de variedades, na seleção indireta de caracteres agrônômicos, introgressão gênica e avaliação de germoplasma (Borba, 2002).

As isoenzimas desempenham a mesma atividade catalítica, mas podem ter diferentes propriedades cinéticas e ser separadas por processos bioquímicos. O número de isoenzimas de uma determinada enzima está relacionado ao número de compartimentos subcelulares onde a mesma reação catalítica é realizada (Gottlieb, 1982).

A premissa básica adotada ao se utilizar dados enzimáticos é que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças em nível de sequências de DNA que codificam tais enzimas. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que estas diferenças possuam base genética e sejam herdáveis (Murphy *et al.*, 1990). Para interpretar os padrões de bandas resultantes, é importante ter um conhecimento prévio sobre o número de subunidades da enzima – enzimas monoméricas são formadas por um polipeptídeo, enquanto as diméricas por dois. Indivíduos heterozigotos para uma enzima dimérica, além de duas bandas correspondentes aos dois polipeptídeos, apresentam uma terceira banda intermediária, produto da conjugação dos dois polipeptídeos. É comum observar-se mais de um loco gênico em um mesmo gel e a migração das bandas de cada loco é visualizada em zonas diferentes. As subunidades de uma enzima podem ser codificadas por locos genéticos distintos, tornando mais complexa à análise do padrão de bandas isoenzimáticas.

A detecção de marcadores isoenzimáticos envolve basicamente três etapas: extração de proteínas, separação destas proteínas por meio de eletroforese e coloração histoquímica do gel, o que permite a visualização do produto em forma de uma “banda”. Uma vez identificado o tecido, este é macerado na presença de um tampão que permita a extração das proteínas, a manutenção de sua atividade catalítica e a prevenção de oxidação de compostos fenólicos associados. O extrato é então separado em gel de eletroforese. Após a eletroforese, as isoenzimas são visualizadas por uso de corantes histoquímicos específicos, os quais fornecem um substrato para as enzimas. A eletroforese é uma entre várias formas de caracterização de isoenzimas e muitas variações podem não ser detectadas por esta técnica.

Os marcadores isoenzimáticos apresentam vantagens e limitações quando do seu uso. Geralmente fornecem ampla informação genética para diversas aplicações, sua técnica é relativamente barata e acessível. Embora em número limitado, vários locos isoenzimáticos podem ser analisados rápida e simultaneamente. Por isso, mesmo hoje, com técnicas mais modernas, as isoenzimas continuam sendo uma classe de marcadores muito útil para análises genéticas que não requeiram uma amostragem ampla do genoma. Alelos isoenzimáticos são co-dominantes, isto é, genótipos heterozigotos e homozigotos de um determinado loco são facilmente identificados, permitindo estimar parâmetros tais como frequências genótípicas e alélicas e a partir destes coeficientes de diversidade gênica e heterozigosidade (Borba, 2002).

Porém, quando a investigação requer uma cobertura mais ampla do genoma, como no caso de mapeamento genético ou caracterização detalhada de germoplasma, as isoenzimas apresentam duas limitações básicas: o número total de locos que podem ser detectados no genoma e o número de alelos por loco, isto é, o nível de polimorfismo genético detectável em cada loco é pequeno quando comparado com marcadores de DNA. Outras limitações das isoenzimas como marcadores dizem respeito a: modificações pós-tradução das enzimas, produzindo as “isoenzimas conformacionais”, as quais diferem em estruturas secundárias e terciárias; polimorfismo enzimático em resposta a condições ambientais; diferenças na atividade isoenzimática associadas a estádios diferentes de desenvolvimento, dentre outras (Graça, 2002).

As isoenzimas de maneira geral são bons marcadores, pois, como sua herança é co-dominante, o heterozigoto é facilmente reconhecido e a segregação pode ser acompanhada de maneira confiável (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Kesseli & Michelmore (1986) e Falcão & Contel (1991) abordaram que as variações protéicas são de grande importância nos estudos genéticos como indicadores dos níveis de polimorfismo e relacionamento filogenético, bem como na identificação de raças, espécies e populações, representando, desse modo, uma valiosa ferramenta para estudos evolutivos e taxonômicos. Além disso, a diversidade alélica varia grandemente de loco para loco, sendo grande a variabilidade isoenzimática em organismos diplóides.

Cavalli-Molina (1984) destacou que numerosos estudos de locos enzimáticos mostraram a existência de níveis significativos da variação gênica intra e

interpopulacional em uma mesma espécie, além de uma diferenciação considerável entre espécies no grau de heterogeneidade isoenzimática intrapopulacional.

Numerosas aplicações da eletroforese de isoenzimas têm sido feitas. Entre algumas dessas, pode-se ressaltar a distinção entre variedades de interesse econômico, a identificação do genoma das espécies, o estudo das isoenzimas e suas relações entre patógenos-hospedeiros, os estudos filogenéticos, a investigação das relações entre as espécies e a resolução da origem e natureza de poliplóides de muitos gêneros.

A irrestrita adoção de marcadores isoenzimáticos no diagnóstico e determinação da diversidade genética de fitopatógenos deve-se, principalmente, à sua simplicidade de uso, rapidez, segurança e amplitude dos resultados obtidos (Teixeira *et al.*, 2004). Estes marcadores distinguiram satisfatoriamente isolados de *Colletotrichum gossypii* South de *Colletotrichum gossypii* (South) var. *cephalosporioides* A. S. Costa obtidos de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (Vieira, 1996; Silva-Mann, 2002).

Podem ser citados também experimentos que objetivaram dimensionar a variabilidade genética de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Snyder & Hansen (Andrade *et al.*, 1997), *Fusarium moniliforme* Sheldon (Camargo *et al.*, 1997), *Botryodiplodia theobromae* Pat. (Lima *et al.*, 1997), *Myrothecium roridum* Tode ex. Fr. (Machado *et al.*, 1997) e *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque (Véras *et al.*, 1997).

Foi possível agrupar isolados de *Pisolithus* spp. quanto à taxa de divergência, utilizando marcadores morfológicos e enzimáticos. Para ambos, observou-se grandes distâncias entre os grupos formados, o que propiciou maiores ganhos na seleção de cruzamentos realizados entre isolados de grupos diferentes (Souza *et al.*, 2001).

Dois marcadores genéticos naturais que têm sido usados para patógenos de insetos são isoenzimas e ampliação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Isoenzimas são marcadores valiosos que têm sido usados para testar o polimorfismo genético em raças dos dois mais comuns fungos entomopatogênicos, *B. bassiana* (Poprawski *et al.*, 1988; Bridge *et al.*, 1990; St. Leger *et al.*, 1992) e *Metarhizium anisopliae* (Riba & Silvy, 1986; St. Leger *et al.*, 1992). Isoenzimas, no entanto, podem subestimar a diversidade genética medida pelo fato de refletirem mudanças em apenas alguns aminoácidos, assim limitando a quantidade de variação

detectável para menos de um terço de todas as substituições de aminoácidos (Lewontin, 1974).

3. CAPÍTULO I: ATIVIDADE DE VÔO E FLUTUAÇÃO POPULACIONAL DE *Rhynchophorus palmarum* (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM PLANTIO DE COQUEIRO

Esta primeira fase do trabalho foi essencial para se conhecer a atividade de vôo e a flutuação populacional de *R. palmarum*. A utilização e a eficiência da armadilha composta por atrativo alimentar e feromônio, para captura dos insetos adultos em plantio de coco, já foi comprovada em trabalhos de pesquisa realizados por outros autores. No entanto, informações referentes ao horário de vôo e períodos de maior ocorrência do inseto não eram conhecidos. Essas informações seriam necessárias para complementar os trabalhos que têm como objetivo a utilização da armadilha de captura em um sistema de autoinoculação do inseto com a *B. bassiana*, através da inoculação do fungo na cana-de-açúcar, utilizada como atrativo alimentar.

3.1 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em duas etapas: a primeira, referente à atividade de vôo do *R. palmarum*, foi instalada em plantio comercial de coco localizado no município de Arauá-SE, região com condições edafoclimáticas predominando um clima tropical chuvoso com verão seco, temperatura média em torno de 25,6°C, precipitação de 1.500 mm e solos de areia quartzosa com relevo plano a levemente ondulado. O plantio é formado por plantas de cultivar híbrida com idade entre 8 a 10 anos. A segunda etapa, onde se monitorou a flutuação populacional do inseto, foi realizada em plantios de coco no município de Aracaju-SE, cujas condições climáticas são semelhantes às aquelas descritas acima. O plantio de coco limita-se a uma pequena reserva de Mata Atlântica e é formado por 20 ha da variedade Gigante, apresentando solo com estrutura de areias quartzosas e áreas de “piçarra”.

3.1.1 Atividade de vôo de *Rhynchophorus palmarum*

Utilizou-se armadilhas confeccionadas com baldes plásticos (8 L) com duas aberturas nas laterais de 75 cm². No interior das armadilhas foram colocados colmos de cana-de-açúcar (15 cm) e uma cápsula de feromônio (Rincoforol® - (2(E)-6-metil-

2-hepten-4-ol), formulado no Laboratório de Síntese Orgânica/Universidade Federal de Alagoas/UFAL. O feromônio foi acondicionado em micro tubos do tipo “Eppendoff safe-lock®” com taxa de liberação diária de 4,3 mg, conforme quantificação realizada por Duarte & Lima (2001). Durante um ano, a cada vinte dias e em dois dias consecutivos, instalou-se na periferia do plantio de coco duas armadilhas distanciadas em 300 m e fixadas no estipe do coqueiro a 1,50 m de altura. O monitoramento dos insetos foi realizado no período de 5h00 às 18h00. Os insetos capturados nas armadilhas foram sexados, quantificados e identificado o horário da sua coleta. Os resultados possibilitaram verificar a dinâmica diária de vôo do *R. palmarum* no pomar por meio do percentual de insetos capturados em cada armadilha/dia/fração de hora no período de avaliação. Além disso, foi observado visualmente pelos avaliadores, o vôo e o deslocamento dos insetos entre plantas e a atração pela armadilha.

3.1.2 Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum*

Para captura dos insetos adultos utilizou-se armadilhas “tipo balde” conforme modelo descrito por Moura *et al.* (1990, 1998), composta por balde de plástico (20 L), e na tampa foram feitos três furos e instalados funis, com a parte mais estreita cortada e voltada para dentro da armadilha, visando facilitar a entrada e evitar a saída dos insetos. No interior da armadilha foram colocados pedaços de 40cm de colmos de cana-de-açúcar (atrativo alimentar) cortados ao meio no sentido longitudinal e uma cápsula do feromônio sintético (Rincoforol®), fixada na tampa. Foram utilizadas quatro armadilhas, instaladas a uma distância de 500m entre si. As coletas dos insetos foram realizadas durante quatro anos (2001 – 2004) quinzenalmente, e a cápsula de feromônio substituída a cada três meses.

Os valores referentes ao número de insetos machos e fêmeas capturados pelas armadilhas foram submetidos à análise estatística não-paramétrica por meio da correlação de Spearman, onde a flutuação populacional do *R. palmarum* foi correlacionada com a precipitação pluviométrica mensal para cada ano de avaliação, visando estimar sua possível influencia na dinâmica populacional do inseto.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Atividade de vôo de *Rhynchophorus palmarum*

A dinâmica da atividade diária de vôo para adultos de *R. palmarum* em um pomar comercial de coco encontra-se na Figura 3, sendo os resultados referentes ao percentual de insetos capturados/armadilha/hora, do total coletado durante cada dia avaliado.

A atividade diária de vôo de *R. palmarum* ocorreu das 5h00 até às 18h00, sendo o período de maior atividade das 9h00 até às 14h00 quando se capturou o maior percentual de insetos nas armadilhas (66,4%). O pico de maior captura (32%) ocorreu das 9h00 às 11h00. A partir das 12h00 ocorreu uma redução do vôo dos insetos chegando a um percentual baixo às 16h00. Entre as 16h00 e 17h00 houve um retorno, com uma pequena atividade de vôo, que reduziu das 17h00 às 18h00 (Figura 3A). Estudo semelhante realizado por Hagley (1965) na Índia demonstrou que *R. palmarum* apresentou um comportamento de vôo com maior atividade entre 9h00 – 11h00 e 17h00 – 19h00. Nirula (1956), citado por Hagley (1965), observou que a atividade máxima de vôo para a espécie *R. ferrugineus* ocorreu entre o nascer do sol e 9 horas e entre as 17h00 e o pôr-do-sol. O *R. palmarum* apresenta atividade diurna, embora eventualmente, possam ser capturados insetos durante a noite, provavelmente, pela ação do atrativo alimentar e o feromônio contidos no interior da armadilha.

Hagley (1965) & Sánchez *et al.* (1993) observaram padrões na atividade de vôo de *R. palmarum*, cuja abundância está condicionada à temperatura, pluviosidade, umidade relativa do ar, além de outros fatores como a idade e disponibilidade de plantas vulneráveis. Nesse estudo, dentre as condicionantes referenciadas pelos autores e associado ao horário de maior captura dos insetos (9h00 – 11h00), verificou-se que a temperatura teve uma maior influência na atividade de vôo. De acordo com Giles (1969), para a espécie *Sitophilus zeamais* o pico de atividade de vôo, medido por meio da captura dos insetos com armadilhas de sucção, ocorreu entre 15h00 e 17h00. Este mesmo autor analisou a população de outras cinco espécies, relatando que em temperaturas acima do limiar para essas espécies a atividade de vôo foi inibida.

Sánchez *et al.* (1993) verificaram que durante as horas de maior temperatura diária (12h00 às 16h00), não é encontrado insetos de *R. palmarum* voando. Estes resultados corroboram em parte com os observados nessa pesquisa. Embora as altas temperaturas, observadas no local onde foi desenvolvido este experimento, tenham reduzido a atividade de vôo da praga no coqueiral, ainda foram capturados insetos adultos de ambos os sexos durante o período de maior intensidade calórica. O *R. palmarum* durante as horas mais quentes do dia tende a permanecer protegido na coroa da palmeira, onde as condições climáticas são mais favoráveis.

Os insetos machos são os primeiros a chegarem ao plantio, sendo capturados a partir das 5h00 da manhã. A população de machos foi maior até as 9h00, quando então foi superada pela das fêmeas (Figura 3A). Contudo, ao final das avaliações (18h00) para todas as coletas, a razão sexual entre machos e fêmeas foi semelhante, 49,3% e 50,7% (Figura 3B). Os machos feromônio de agregação, que contribui para aumentar a população dessa praga na cultura do coco, atraindo outros indivíduos de ambos os sexos (Rochat, *et al.*, 1991). Segundo Duarte & Lima (2001), esta atração também está associada aos odores da fermentação produzidos pelas plantas infestadas ou estressadas, devido aos ferimentos causados durante a colheita, já que os insetos ovipositam nas cicatrizes recém abertas.

As observações de campo evidenciam que os adultos de *R. palmarum* possuem hábito diurno, mas evitam voar nas horas mais quentes do dia, ou quando está chovendo. Em dias nublados, com brisa suave e temperatura em torno de 25°C, os besouros podem ser vistos voando a qualquer hora do dia. Weissling *et al.* (1994), verificaram em testes de laboratório que a temperatura e a umidade relativa afetam significativamente a atividade inicial de vôo da espécie *R. cruentatus*. No entanto, neste trabalho, não se verificou variação significativa para o início de vôo do *R. palmarum* durante o dia. Foram observados vôos dos insetos no campo desde as primeiras horas da manhã até o início da noite.

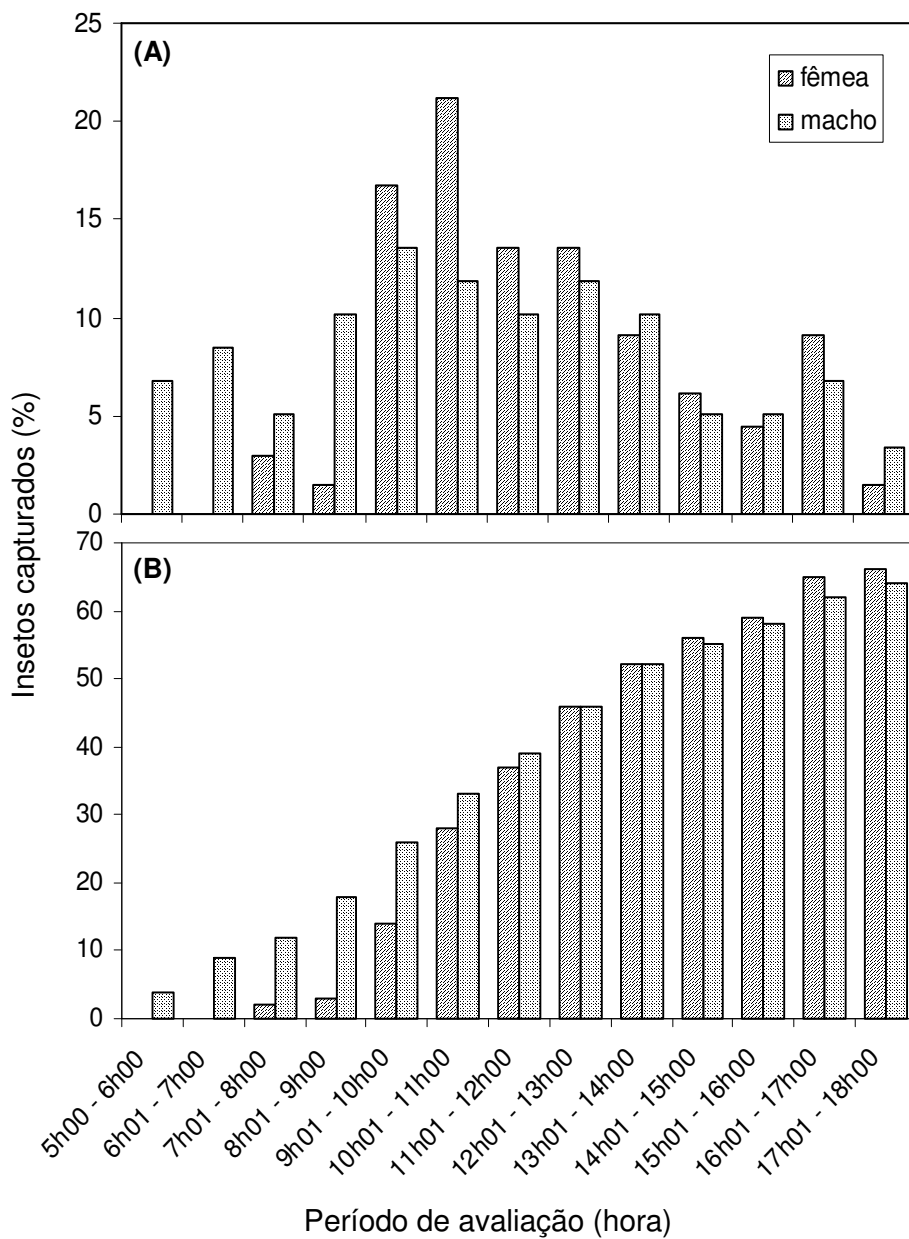


Figura 3 - Dinâmica da atividade diária de vôo de *Rhynchophorus palmarum* em condições de campo, (A) percentual de insetos capturados/hora e (B) percentual acumulativo de insetos capturados/hora.

3.2.2 Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum*

Durante os quatro anos de avaliação, de 2001 a 2004, foram capturados insetos em todos os meses, totalizando 11.096 adultos; sendo coletados 17,5%, 16,7%, 31,9% e 33,8% no primeiro, segundo, terceiro e quarto ano, respectivamente. A percentagem entre machos (55,1%) e fêmeas (44,9%), para o total de insetos capturados, foi muito semelhante em todos os anos de avaliação. A densidade populacional variou ao longo dos anos. O maior número de insetos foi capturado no último ano de avaliação (3.751 insetos). A flutuação de *R. palmarum* apresentou picos durante os quatro anos de avaliação, frequentemente, com um aumento da densidade populacional nos meses de setembro a novembro e uma redução nos meses de janeiro a março e junho a julho (Figura 4), com exceção do segundo ano de avaliação que apresentou nos meses de janeiro a março elevada densidade populacional (Figura 4B).

Segundo Müller *et al.* (1998), a população de *R. palmarum* em dendezaís no município de Igarapé-Açu foi maior no período chuvoso (janeiro a julho), com uma média de 25,03 insetos/quinzena/armadilha. Esse resultado concorda com aqueles encontrados neste estudo, em que considerando a precipitação total/ano verifica-se que nos anos de menor pluviosidade a população de *R. palmarum* capturada também foi reduzida.

O maior número de insetos foi capturado nos dois últimos anos de avaliação, quando os índices pluviométricos foram maiores, 1.351 mm e 1.549 mm, respectivamente. Entretanto, por meio da Correlação de Spearman, observou-se uma associação entre a redução da população dos insetos ao longo dos anos, nos meses com maior precipitação pluviométrica (Tabela 1). Este fato está bem caracterizado na avaliação da flutuação populacional dos dois primeiros anos. Para esses dois anos, os meses de chuvas foram bem definidos iniciando-se em abril e terminando no final de julho (Figura 4A e 4B). No entanto, para os dois últimos anos de avaliação as chuvas foram mais distribuídas durante os meses, propiciando um maior período com condições favoráveis ao crescimento da população de *R. palmarum* (Figura 4C e 4D).

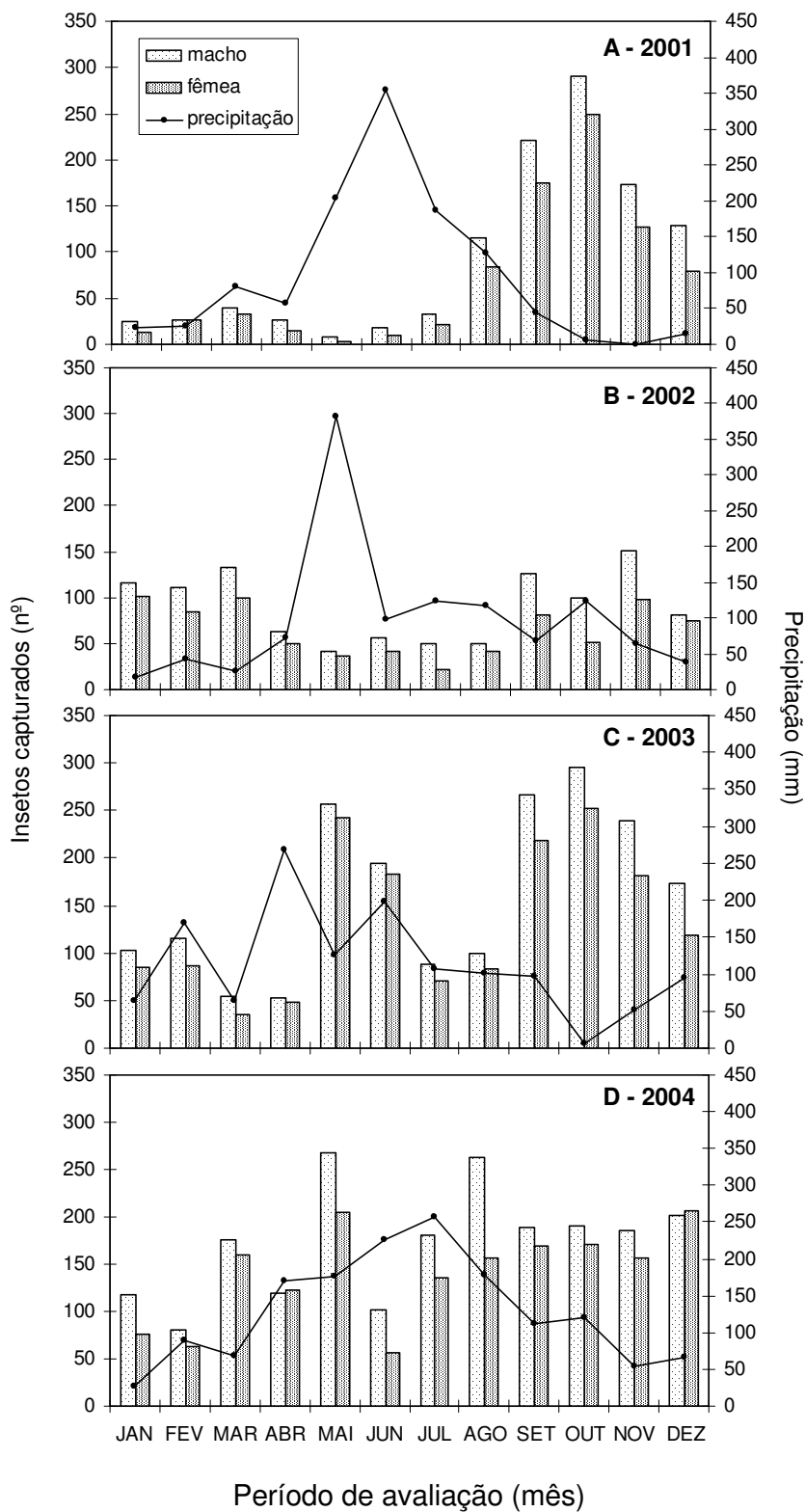


Figura 4 - Flutuação populacional de adultos de *Rhynchophorus palmarum* durante quatro anos (A, B, C e D) de avaliação em plantio comercial de coco, em relação à precipitação pluviométrica.

A variação da densidade populacional de *R. palmarum* no plantio de coco é relacionada à atração dos insetos pelos voláteis liberados dos tecidos de plantas que foram cortadas ou estão doentes (Oehlschlager *et al.*, 1995; Giblin-Davis *et al.*, 1996). Observação semelhante foi feita por Weissling *et al.* (1994), para essa mesma espécie, verificando que a abundância desse curculionídeo pode depender das chuvas ou de outros fatores, como a disponibilidade de plantas feridas ou doentes. No entanto, nessa pesquisa, verificou-se a marcante influência de fatores climáticos, com destaque para a precipitação, na interferência do vôo e na densidade populacional da praga em plantio comercial de coco.

Tabela 1 - Coeficientes de correlação de Spearman (r_s) para o número de machos (♂) e fêmeas (♀) de *Rhynchophorus palmarum* em relação à precipitação mensal (mm) para cada ano de avaliação.

Característica	2001		2002		2003		2004	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Coeficiente								
r_s	-0,63	-0,63	-0,75	-0,90	-0,34	-0,20	0,13	-0,12
t (n-2)	2,61*	2,60*	3,64**	6,61**	1,16	0,65	0,44	0,40

*significância ao nível de 5% - ** significância ao nível de 1%

3.3. CONCLUSÕES

- Os insetos machos de *R. palmarum* são os primeiros a iniciarem a atividade de vôo, a partir de 5h00 da manhã, em plantio de coco;
- A maior população de adultos de *R. palmarum* é encontrada no plantio de coco das 9h00 às 11h00 h da manhã e, ao final do dia às 18h00 h, a população de machos e fêmeas é semelhante;
- A precipitação pluviométrica influencia na população de adultos de *R. palmarum*, que é reduzida nos períodos de maior precipitação.

4. CAPÍTULO II: EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ESPOROS DE *Beauveria bassiana* SOBRE A AUTOINOCULAÇÃO E MORTALIDADE DE ADULTOS DE *Rhynchophorus palmarum*

A interação patógeno/hospedeiro, influenciada por diferentes fatores associados a esses organismos e ao ambiente, é alvo de estudo em trabalhos que utilizam fungos entomopatogênicos para o controle de insetos pragas. Vários autores testaram com sucesso diferentes espécies de patógenos no controle biológico de pragas. O objetivo desse trabalho foi conhecer a patogenicidade do fungo, veiculado por meio de colmos de cana-de-açúcar infectados com *B. bassiana*, sobre adultos de *R. palmarum*, determinando o tempo necessário para a infecção e a concentração de esporos mais eficiente. Os resultados obtidos nessa pesquisa viabilizarão, a partir da metodologia empregada na armadilha de captura do inseto, um novo modelo de armadilha que visa à disseminação dos esporos do patógeno por meio da autoinoculação, contribuindo para redução da população da praga nos plantios de coco.

4.1 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido em três etapas: a primeira compreendeu a preparação das suspensões de esporos de *B. bassiana*, realizada no Laboratório de Controle Biológico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Tabuleiros Costeiros (Embrapa – CPATC), localizado no município de Aracaju-SE; a segunda etapa abrangeu as coletas dos insetos nos pomares de coco e a terceira, os testes de concentração de esporos do fungo e o tempo para autoinoculação de *R. palmarum* com *B. bassiana*, realizados no Laboratório de Entomologia da Universidade Federal de Sergipe/UFS.

4.1.1 Coleta de adultos de *Rhynchophorus palmarum*

Os insetos foram coletados em quatro pomares comerciais de coco localizados no Pólo de Fruticultura do Platô de Neópolis, no município de Neópolis – SE. Para captura de adultos utilizaram-se armadilhas “tipo balde” descritas por

Ferreira *et al.* (1998), compostas por baldes de plástico (50 L), em cujas tampas foram feitos três furos e instalados funis, com a parte mais estreita cortada e voltada para dentro das armadilhas, para a entrada e evitar saída dos insetos. Dentro dos baldes foram colocados colmos de cana-de-açúcar (atrativo alimentar) mais cápsula do feromônio comercial (Rincoforol®). As armadilhas foram dispostas na periferia do plantio de coco distantes 350 m entre si. Os insetos adultos foram coletados quinzenalmente, quando era trocado o atrativo alimentar. Os feromônios foram substituídos a cada 30 dias.

4.1.2 Bioensaio de autoinoculação para adultos de *Rhynchophorus palmarum* com *Beauveria bassiana* e viabilidade dos esporos do fungo

Preparação das suspensões de esporos de *B. bassiana*: a suspensão-padrão foi obtida da cultura original do fungo (isolado CPATC/032) em arroz, submetendo-o a duas lavagens consecutivas com água destilada com adição de Tween 80 (0,05%). A partir dessa suspensão foram realizadas diluições sucessivas para permitir a contagem direta dos esporos em microscópio ótico, empregando-se Câmara de Neubauer. Depois de determinada a concentração de esporos da suspensão-padrão equivalente a $2,86 \times 10^9$ esporos/mL de suspensão, foram realizadas novas diluições em água destilada acrescida de Tween 80 (0,05%), visando padronizar as concentrações empregadas no experimento (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios/mL de suspensão).

A suspensão de esporos foi utilizada após a padronização das concentrações, não sendo necessário empregar técnicas de armazenagem do fungo.

Bioensaios de autoinoculação: em média de quatro colmos de cana-de-açúcar foram cortados e abertos longitudinalmente formando feixes com 13 cm de comprimento (Figura 5A). Os feixes foram imersos em suspensões padronizadas de esporos do fungo *B. bassiana* nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 esporos/mL de suspensão, por um período de 30 minutos (Figura 5B).

Adultos de *R. palmarum* foram separados em grupos de cinco casais (Figura 6A) limpos em água destilada e transferidos para baldes (15 L) contendo os colmos de cana-de-açúcar, previamente infectados pelo fungo (armadilha de autoinoculação) (Figura 6B). Os insetos permaneceram em contato com o inóculo

durante diferentes períodos: 45 min., 1h30, 3h00 e 6h00, correspondente aos quatro tratamentos. Os tratamentos foram constituídos por quatro repetições compostas por 10 insetos cada, totalizando 160 insetos adultos/concentração de fungo. Na testemunha, os insetos permaneceram nos colmos de cana-de-açúcar pelo mesmo período dos tratamentos, sendo os colmos imersos somente em água destilada. Durante o experimento a temperatura foi de $26,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$, a umidade relativa 75% e a fotofase de 12h.

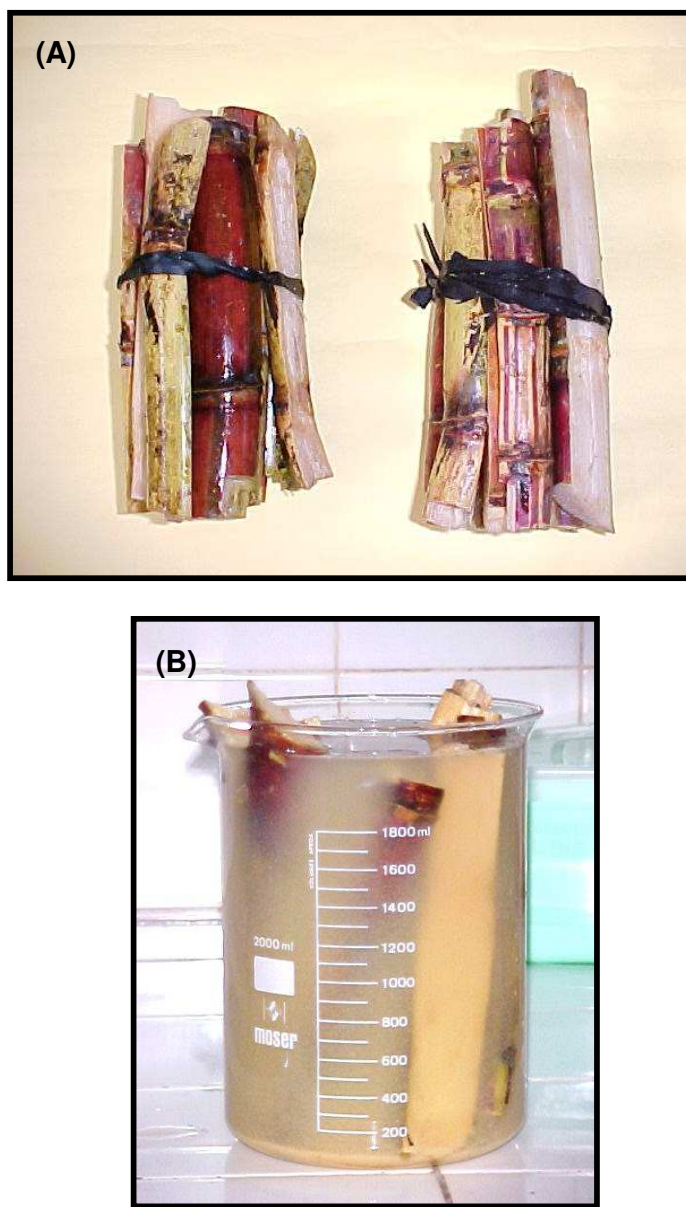


Figura 5 - Formação dos feixes de cana-de-açúcar (A) e imersão na solução do fungo *Beauveria bassiana* (B).

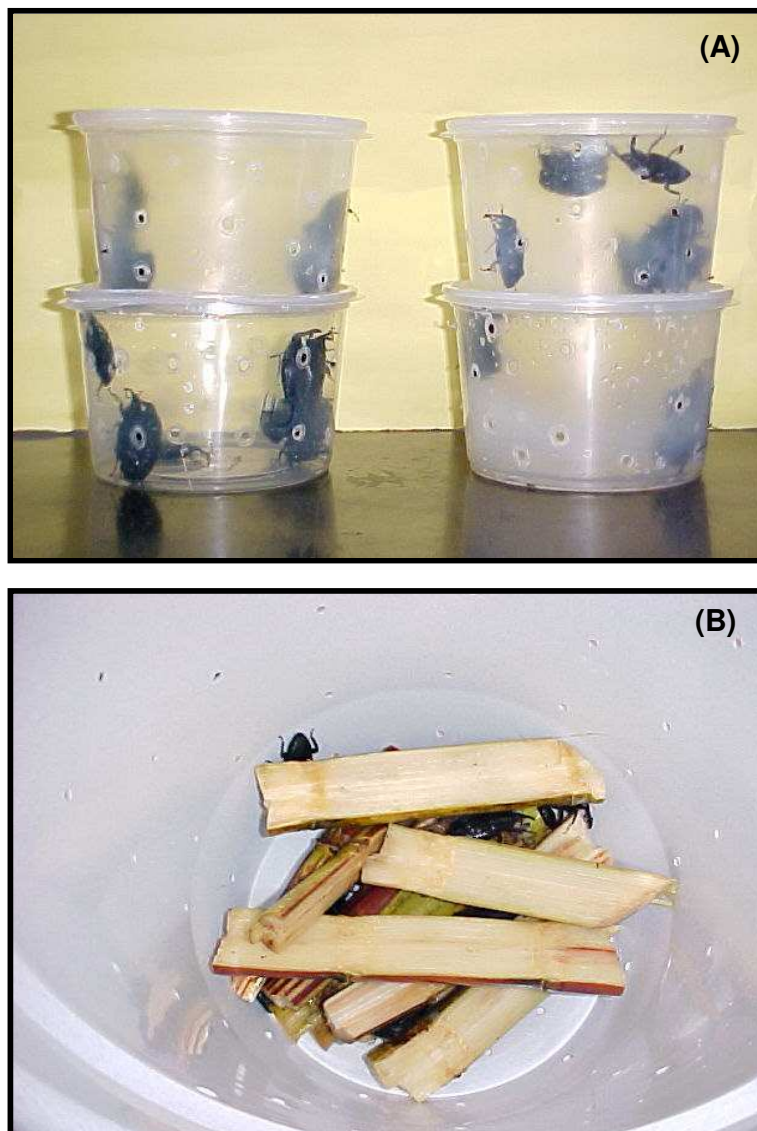


Figura 6 - Adultos de *Rhynchophorus palmarum* agrupados em casais – fase anterior aos testes de autoinoculação (A) e na armadilha de autoinoculação em contato com os colmos de cana-de-açúcar infectados com o fungo *Beauveria bassiana* (B).

Após o período de autoinoculação, os insetos foram individualizados em garrafas plásticas (200 mL) com pedaços de cana-de-açúcar utilizados para alimentação, substituídos a cada três dias (Figura 7A). As avaliações foram realizadas diariamente por um período de 20 dias. Os insetos mortos foram isolados

em potes plásticos (250mL) contendo papel filtro umedecido, visando confirmar a infecção por meio da esporulação do fungo (Figura 7B).



Figura 7 - Insetos individualizados após os testes de autoinoculação, em colmos de cana-de-açúcar infectados com o fungo (A) e em câmara úmida, visando confirmação da mortalidade por fungo (B).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em fatorial 3x4 (três concentrações do fungo e quatro tempos de autoinoculação), com 4 repetições compostas por 10 insetos de cada, mais a testemunha. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

O percentual de insetos mortos pelo fungo foi determinado por meio da mortalidade corrigida (Mc) em relação à testemunha, pela fórmula de Abbott (Abbott, 1925):

onde,

$$Mc = \frac{x - y}{x} \times 100$$

Mc (%)= mortalidade corrigida

X= % de sobrevivência do grupo controle

Y= % de sobrevivência do grupo de tratamentos

Avaliação da viabilidade de esporos de *B. bassiana* na armadilha de autoinoculação: a viabilidade dos esporos do fungo foi avaliada por meio da mortalidade dos insetos em uma armadilha adaptada do modelo de autoinoculação. No modelo da armadilha utilizada nos bioensaios de autoinoculação foram abertos três janelas (5cmx15cm) ao redor das paredes do balde (15 L) (Figura 8). Os colmos de cana-de-açúcar foram imersos por 30 minutos em suspensão do fungo na concentração de 10^9 esporos/mL de suspensão, e após esse período permaneceram em repouso por mais cinco minutos para escorrer o excesso da suspensão. Foram instaladas cinco armadilhas, contendo no seu interior colmos de cana-de-açúcar infectados e 20 insetos adultos/armadilha, permanecendo por um período de 24 horas. Em seguida, os insetos foram retirados da armadilha e individualizados em garrafas plásticas contendo alimento e avaliados por 20 dias (conforme metodologia descrita no item anterior - bioensaios de autoinoculação). Os insetos foram substituídos por outros da criação estoque a cada 24 horas durante 14 dias, sem trocar o colmo de cana-de-açúcar infectado com fungo. Para testemunha utilizou-se a mesma metodologia anterior, porém, os colmos de cana-de-açúcar foram imersos em água destilada.

Os procedimentos para confirmação da infecção dos insetos mortos com o fungo e a avaliação do percentual de mortalidade (mortalidade corrigida), seguiram a metodologia descrita nos bioensaios de autoinoculação (do item 4.1.2). Os resultados foram submetidos à análise de variância e a mortalidade média diária foi comparada pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).



Figura 8 – Armadilha utilizada nos testes de viabilidade de esporos de *Beauveria bassiana*.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Coleta de adultos de *Rhynchophorus palmarum*

O número médio de insetos em cada coleta, realizada nos quatro pomares comerciais de coco, foi de 300 adultos; desses foram utilizados nos testes de autoinoculação somente insetos (machos e fêmeas) que se apresentavam sadios e de tamanho uniforme.

Não foi possível utilizar insetos adultos originados de criação em laboratório. O *R. palmarum* é uma espécie que apresenta um longo ciclo de vida, principalmente na fase larval, o que demandaria maior tempo para a realização dos experimentos. Este fato não influenciou os resultados obtidos neste experimento, haja vista, que as testemunhas usadas nos testes de autoinoculação apresentaram baixa mortalidade. Além disso, para efeito de cálculo, todos os valores de mortalidade foram corrigidos levando-se em consideração a testemunha.

4.2.2 Bioensaio de autoinoculação de adultos de *Rhynchophorus palmarum* com *Beauveria bassiana* e viabilidade dos esporos do fungo

Na Figura 9 observa-se um efeito linear crescente para os parâmetros avaliados, tempo de exposição (autoinoculação) e concentração do fungo. A mortalidade dos insetos foi diretamente proporcional ao aumento do tempo de exposição dos insetos aos colmos de cana-de-açúcar infectados com o fungo (45min; 1h30; 3h00 e 6h00) e as concentrações de esporos (10^7 , 10^8 , e 10^9 esporos/mL de suspensão). Os altos valores de R^2 ($\geq 0,90$) indicam o ajuste das equações aos resultados encontrados nesse experimento.

Verificou-se uma tendência no aumento da mortalidade dos insetos em função do maior tempo de permanência desses nas armadilhas de autoinoculação. Os maiores índices de mortalidade (M_c) ocorreram no tempo de 6h de exposição dos insetos aos colmos infectados com fungo para todas as concentrações avaliadas (Figura 9). Furlong *et al.* (1995) relataram um tempo de cinco minutos para autodisseminação do fungo entomopatogênico *Zoopthora radicans* por *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) utilizando armadilhas com feromônio. Wenzel *et al.* (2003) avaliaram a patogenicidade dos fungos *B. bassiana* (isolado IBCB 66) e *Metharzhizium anisopliae* (isolado IBCB) na concentração de 10^8 conídios/placa sobre adultos de *R. palmarum*. Os fungos, utilizados, foram colocados em placas de Petri onde os insetos caminharam por três minutos. Em seguida foram mantidos sob condições controladas de laboratório e avaliados diariamente durante 20 dias, obtendo-se uma porcentagem de mortalidade de 51% e 27% para *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Confrontando os resultados obtidos nessa pesquisa com de outros autores, cujos objetivos foram semelhantes, verifica-se que o contato dos insetos com o substrato contaminado com fungo torna os resultados de infecção mais eficientes, principalmente, em função da relação existente entre a concentração de esporos do fungo e o tempo de exposição (contato) do inseto ao substrato. No entanto, como se trata de organismos vivos em uma relação patógeno-hospedeiro, outras fatores devem influenciar a infecção, tais como: comportamento das espécies, concentração e virulência do fungo, condições físicas do ambiente e a viabilidade do patógeno no substrato.

Na prática, o emprego de armadilhas com microrganismos patogênicos para autoinoculação, além de causar mortalidade direta dos insetos capturados contribui para dispersão do patógeno para outros insetos de ambos os sexos e para outras gerações. Ferreira *et al.* (1996) relataram a transmissão de *B. bassiana* entre indivíduos adultos de *R. palmarum*, sendo o nível de propagação da infecção de 1:3,5 (inseto infectado:inseto sadio) e a mortalidade de 88,7% nos insetos infectados via transmissão. Vail *et al.* (1993) verificaram mortalidade de 60 e 50% da primeira e segunda gerações de *Plodia interpunctella*.

Observou-se uma relação positiva entre a concentração de esporos da suspensão e a mortalidade (Mc) de *R. palmarum*, atingindo valores equivalentes a 60,5%; 65,8% e 84,2% nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 esporos/mL de suspensão, respectivamente (Figura 9). Mulock & Chandler (2001a) constataram uma mortalidade de 10%, 29% e 50% de adultos de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) em relação às concentrações de *B. bassiana* 7×10^{12} , 2×10^{13} (duas aplicações) e 5×10^{13} (uma aplicação) conídios/ha, concentrações superiores às testadas neste experimento. Em trabalhos de infecção direta de *R. palmarum* com *B. bassiana*, isolado 032/CPATC, Lima *et al.* (1996) afirmaram que a concentração 10^8 esporos/mL foi a mais eficiente, provocando uma mortalidade de 96% nos insetos adultos, enquanto que, a concentração 10^5 atingiu apenas 40% da população de *R. palmarum*, com mortalidade equivalente de machos e fêmeas para ambas concentrações.

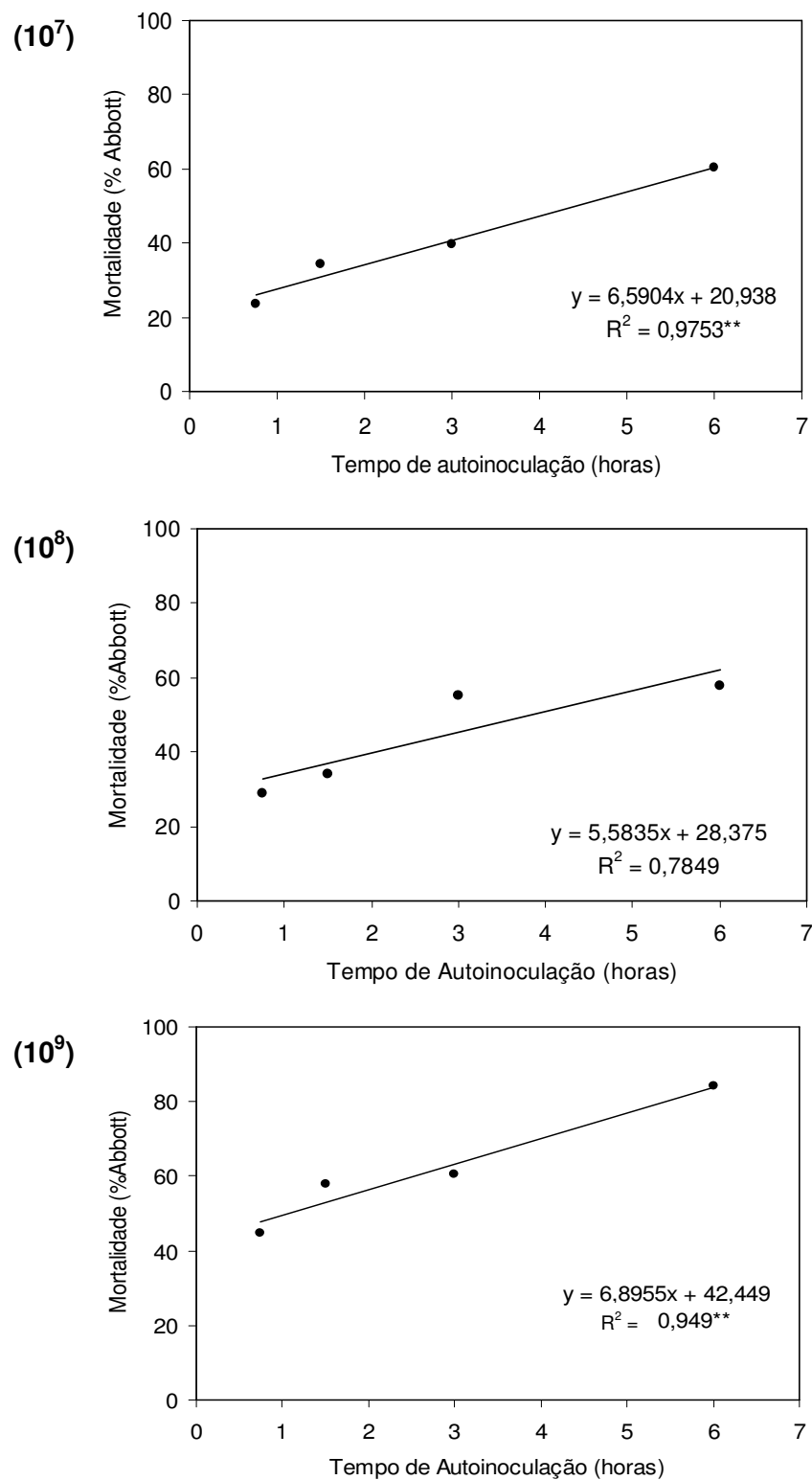


Figura 9 - Percentual de mortalidade (Mc) de adultos de *Rhynchophorus palmarum* por *Beauveria bassiana* e concentrações 10^7 , 10^8 e 10^9 esporos/mL de

suspensão em função do tempo para autoinoculação (45min, 1h30, 3h00 e 6h00).

O resumo da análise de variância dos parâmetros avaliados em função da concentração do fungo e do tempo de autoinoculação está representado no Tabela 2. A maior mortalidade de adultos ocorreu na concentração 10^9 esporos/mL. Esta concentração não apresentou diferença significativa, pelo Teste de Tukey, para a concentração 10^8 (mortalidade de fêmeas). A menor mortalidade foi verificada na concentração 10^7 esporos/mL, não havendo diferença significativa em relação a 10^8 esporos/mL. Não houve diferença significativa no percentual de mortalidade entre os tempos 45min, 1h30 e 3h00 de autoinoculação. Os insetos submetidos ao contato com os colmos de cana-de-açúcar inoculados com o fungo por um período de 6h00, apresentaram mortalidade igual ou superior a 80,0%. Contudo, esse tempo não diferiu significativamente para os tempos de 3h00, nos machos, e 3h00 e 1h30, nas fêmeas (Tabela 3).

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para mortalidade total (MT) de *Rhynchophorus palmarum*.

Causas de variação	GL	QM ¹		
		Macho	Fêmea	Total
Concentração do fungo (A)	2	9347,260**	3315,598**	6218,842**
Tempo de autoinoculação (B)	3	10490,21**	12579,52**	11261,48**
A x B	6	901,4933*	1236,841	821,4911**
Resíduo	36	338,4257	644,5372	220,5792
CV (%)		38,8	47,1	29,3

¹ **, * significativo ao nível de 1 e 5% de probabilidade pelo Teste F.

A mortalidade de adultos de *R. palmarum* foi avaliada diariamente durante o período do experimento de autoinoculação (20 dias). Observou-se um pico de mortalidade confirmada (porcentagem de indivíduos nos quais ocorreu a conidiogênese do fungo) no 9º dia de avaliação, com uma mortalidade de 53% do total de insetos tratados com o fungo. Considerando-se a mortalidade acumulada a

cada cinco dias, verificou-se que os maiores percentuais ocorreram entre o 10^o e o 15^o dia de avaliação (Figura 10). Estes resultados concordam com os encontrados por Lima *et al.* (1996), que relataram a morte de *R. palmarum* por *B. bassiana* entre o 9^o e o 12^o dia após a inoculação. Entretanto, este período é bastante variável. Todas as fases do ciclo das relações patógeno-hospedeiro, principalmente a germinação, penetração e reprodução são muito dependentes das condições ambientais: temperatura, umidade e radiação ultravioleta. Furlong *et al.* (1995) verificaram que o tempo de desenvolvimento do fungo *Z. radicans* infectando adultos de *P. xylostella* está relacionado à variação da temperatura, pois adultos inoculados com conídios primários morreram com 72h na temperatura entre 18 a 25°C e após 120h na temperatura entre 16 a 23°C.

Tabela 3 - Valores médios da mortalidade de machos, fêmeas e total (macho + fêmeas) de *Rhynchophorus palmarum*, em função da concentração do fungo *Beauveria bassiana* e do tempo de autoinoculação.

Mortalidade (%)	Concentração (esporos/mL de suspensão)			Tempo de autoinoculação			
	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹	45min	1h30	3h00	6h00
Machos	34,0 a	35,7 a	72,3 b	44,5 a	52,6 a	59,7 ab	80,0 b
Fêmeas	40,2 a	55,5 ab	65,8 b	50,4 a	68,7 ab	66,3 ab	83,8 b
Total	36,6 a	44,5 a	70,3 b	48,7 a	60,7 a	61,4 a	81,7 b

Valores com letras iguais na linha, para cada tratamento (concentração e tempo de autoinoculação), não diferem entre si pelo Teste de Tukey.

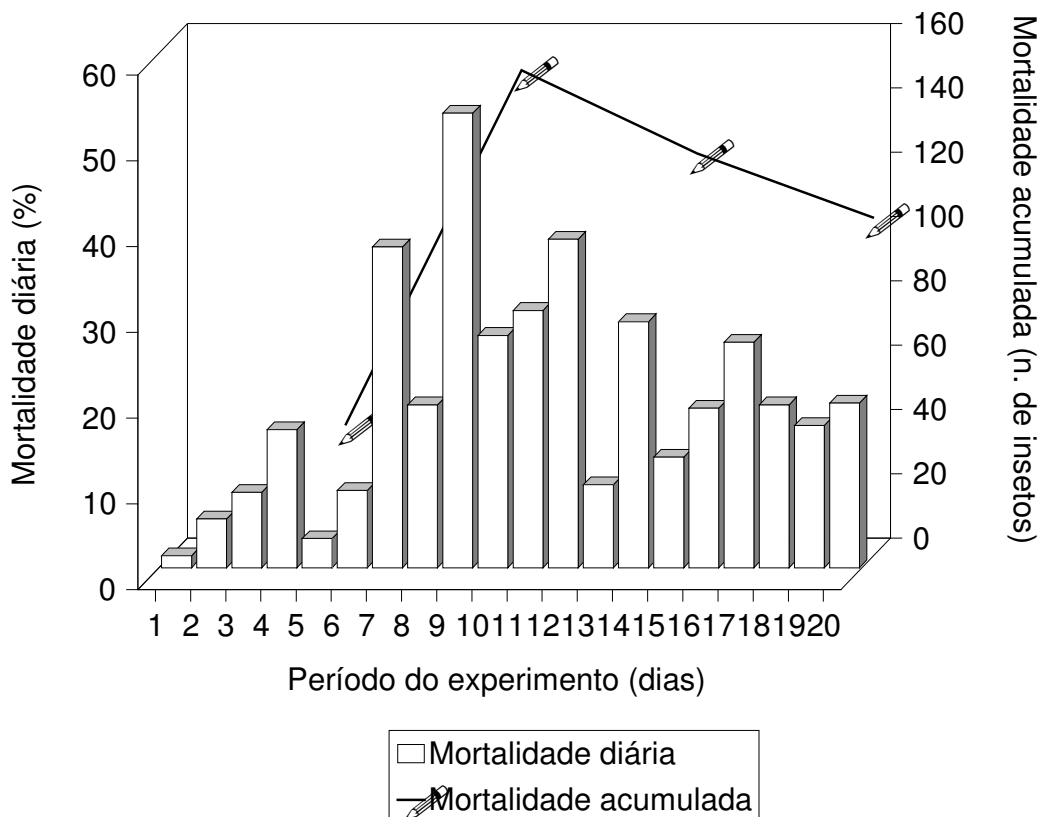


Figura 10 - Percentual de mortalidade diária e mortalidade acumulada de adultos de *Rhynchophorus palmarum* por *Beauveria bassiana* no período de avaliação.

Após a morte do inseto pela ação do fungo, as hifas começam a emergir. Sob condições ambientais favoráveis, inicia-se, associada ao crescimento micelial, a esporulação ou conidiogênese do fungo, esta última caracterizada por uma formação pulverulenta que recobre todo o corpo do inseto (Figura 11).

Vários fatores devem ser considerados para se atingir melhorias na eficácia dos fungos entomopatogênicos no campo. Um aumento na dosagem das aplicações pode ser praticável experimentalmente, mas inviável comercialmente devido ao custo da produção massal de conídios. Entretanto, este não é um fator limitante na autoinoculação de adultos de *R. palmarum*, pois a quantidade necessária de esporos é baixa.



Figura 11 – Evolução da infecção de adultos de *Rhynchophorus palmarum* pelo fungo *Beauveria bassiana*.

A busca por avanços direcionados à atividade residual do fungo nas aplicações em campo, seja por meio da adição de adjuvantes como protetores UV, de formulações modificadas e/ou da autodisseminação de fungos por armadilhas e substratos infectados, deve ser contínua e destinada ao aperfeiçoamento das práticas de controle e manejo de pragas de importância agrônômica.

A viabilidade dos esporos foi avaliada por meio da patogenicidade do fungo nos insetos, os quais foram infectados durante o contato com os colmos de cana-de-açúcar inoculados com *B. bassiana*. Vários autores estudaram o efeito de diferentes substâncias na esporulação, crescimento radial e taxa de germinação de fungos entomopatogênicos. A maioria desses estudos teve o objetivo de avaliar a viabilidade das espécies de fungo em diferentes composições de meios de cultura ou em mistura com outros produtos, óleos vegetais ou minerais e inseticidas químicos, para o controle de pragas em condições de laboratório ou em campo. No entanto, pouco se sabe sobre a viabilidade de fungos entomopatogênicos inoculados em substratos vegetais e da interação existente entre eles.

Na Figura 12 encontra-se os resultados referentes à viabilidade dos esporos de *B. bassiana* avaliados pela da infecção e mortalidade dos insetos. Os maiores percentuais de mortalidade ocorreram no primeiro (54,0%) e terceiro (49,7%) dia de contato dos insetos adultos com os colmos de cana-de-açúcar inoculado com *B. bassiana*. No entanto, o percentual de mortalidade até o oitavo dia não apresentou diferença significativa em relação aos primeiros dias de avaliação. Nos primeiros

dias verificou-se uma alta variação no percentual de mortalidade (min. e máx.) dos insetos. No primeiro dia, por exemplo, a mortalidade média foi 54% variando entre 76,9% a 23,1%, já nos últimos dias a variação foi menor (11,1% a 0%) (Figura 12). Este fato pode está relacionado à complexa interação existente entre os esporos do fungo, pela sua capacidade de germinar e esporular no substrato vegetal; a cana-de-açúcar, pois o processo de fermentação que pode ter afetado o desenvolvimento do fungo e do inseto, além que os exemplares podem ter apresentado graus de tolerância diferentes ao patógeno.

Mulock & Chandler, (2001b) testaram a eficiência de *B. bassiana* no controle de adultos de *Diabrotica virgifera virgifera* utilizando suspensões de conídios aplicados em plantas de milho obtendo mortalidades de até 50%. Os autores concluíram que não houve diferença significativa na mortalidade de besouros coletados aos três dias quando comparados com cinco dias após aplicação, comprovando a persistência dos esporos do fungo no campo.

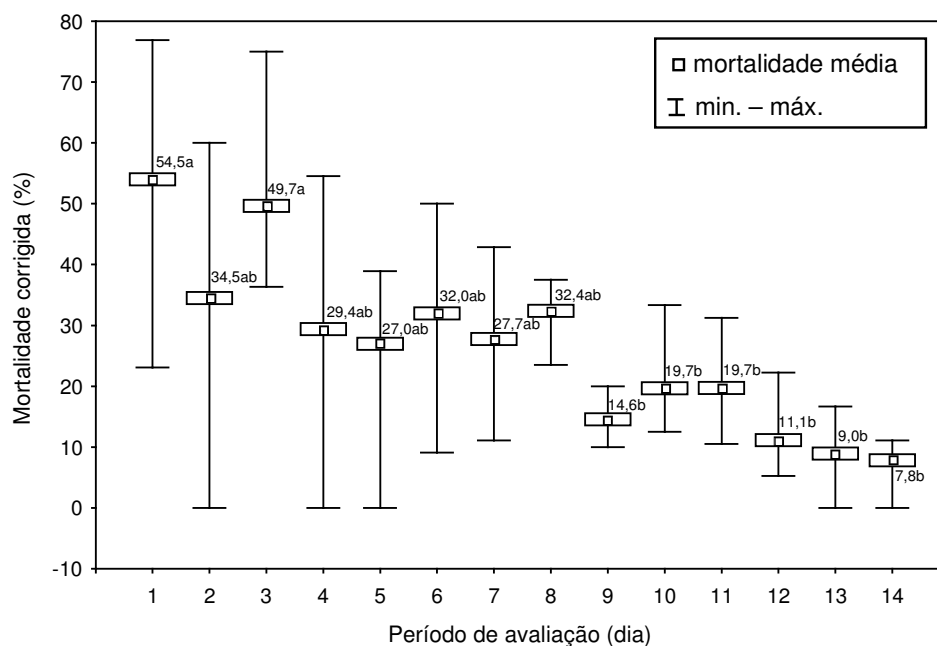


Figura 12 – Avaliação da viabilidade de esporos de *Beauveria bassiana* em função da autoinoculação e mortalidade (corrigida) de *Rhynchophorus palmarum* pelo fungo. (valores com letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey)

4.3. CONCLUSÕES

- O isolado 032.91 do fungo *Beauveria bassiana*, transmitido por meio de colmos de cana-de-açúcar infectado, é altamente patogênico para adultos de *Rhynchophorus palmarum*;
- A concentração de 10^9 esporos/mL de suspensão causa maior mortalidade de adultos de *Rhynchophorus palmarum*, não diferenciando da concentração 10^8 esporos/mL de suspensão para a mortalidade de machos e fêmeas;
- O contato de adultos de *Rhynchophorus palmarum* com colmos de cana-de-açúcar infectados com *Beauveria bassiana* por 3h00 e 6h00, causa uma maior mortalidade desse inseto;
- Esporos de *Beauveria bassiana*, em armadilhas de autoinoculação, apresentam viabilidade semelhante até o oitavo dia, após a inoculação dos colmos de cana-de-açúcar com o fungo.

5. CAPÍTULO III: MARCADORES RAPD, MICROSSATÉLITES, ITS-DNAr E DE ISOENZIMAS NA CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Beauveria bassiana*

No aspecto fitossanitário, o coqueiro sofre o ataque de inúmeras pragas, dentre as quais se destaca o *R. palmarum*, que causa danos de importância econômica para a cultura, reduzindo a produtividade dos pomares e, em condições de alta infestação, levando as plantas à morte. No Estado de Sergipe, muitos trabalhos foram realizados objetivando o estudo dessa praga, principalmente, relacionados à biologia, comportamento e controle. Dentre os métodos de controle estudados, despontaram as pesquisas com a utilização de fungos entomopatogênicos pelos numerosos casos de observação e coleta em campo, nas diferentes localidades do estado, de espécies de pragas mortas por infecção com *B. bassiana*. Além disso, por se tratar de um método de controle de comprovada eficiência e baixo impacto ao meio ambiente. A mortalidade natural de diferentes espécies de insetos com *B. bassiana* permitiu a formação de uma coleção de isolados desse fungo de origem diversa, em relação ao local de coleta e ao hospedeiro.

Desta forma, realizou-se a caracterização genética de *B. bassiana* de isolados coletados em Sergipe e em outras localidades visando verificar a similaridade destes por meio de marcadores moleculares e correlacionar com dados de origem, local de coleta e espécie de hospedeiro.

5.1 MATERIAL E MÉTODO

5.1.1 Obtenção e multiplicação dos isolados de *Beauveria bassiana*

Foram utilizados 11 isolados do fungo entomopatogênico *B. bassiana*, coletados de diferentes espécies de insetos, a maioria pragas de coqueiro, parasitados naturalmente em campo. Esses isolados foram originários de diferentes regiões do Estado de Sergipe (Figura 13) e de outras localidades (Tabela 4).

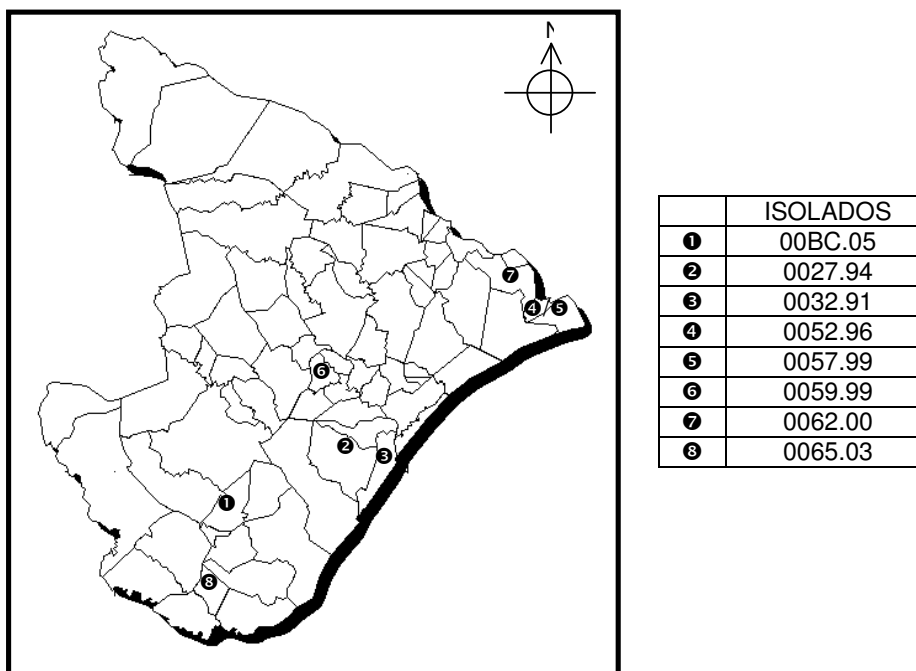


Figura 13 – Localidades de origem dos isolados de *Beauveria bassiana* no Estado de Sergipe.

Os isolados, provenientes de cultura monospórica do Banco de Agentes Biológicos da Embrapa *Tabuleiros Costeiros* (Figura 14), foram repicados para meio líquido (40 mL) [sacarose – 10g.L^{-1} , L-asparagina – 2g.L^{-1} , extrato de levedura – 2g.L^{-1} , KH_2PO_4 – 1g.L^{-1} , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,1\text{g.L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – $0,44\text{mg.L}^{-1}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – $0,48\text{mg.L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $0,36\text{mg.L}^{-1}$] (Alfenas, 1991), sendo mantidos a uma temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por sete dias, em mesa agitadora a 80 rpm e no escuro. Após esse período, os micélios foram filtrados a vácuo em funil de Büchner e armazenados a -21°C em freezer, em seguida liofilizados em equipamento tipo Benchtop, Virtis, NY, USA.

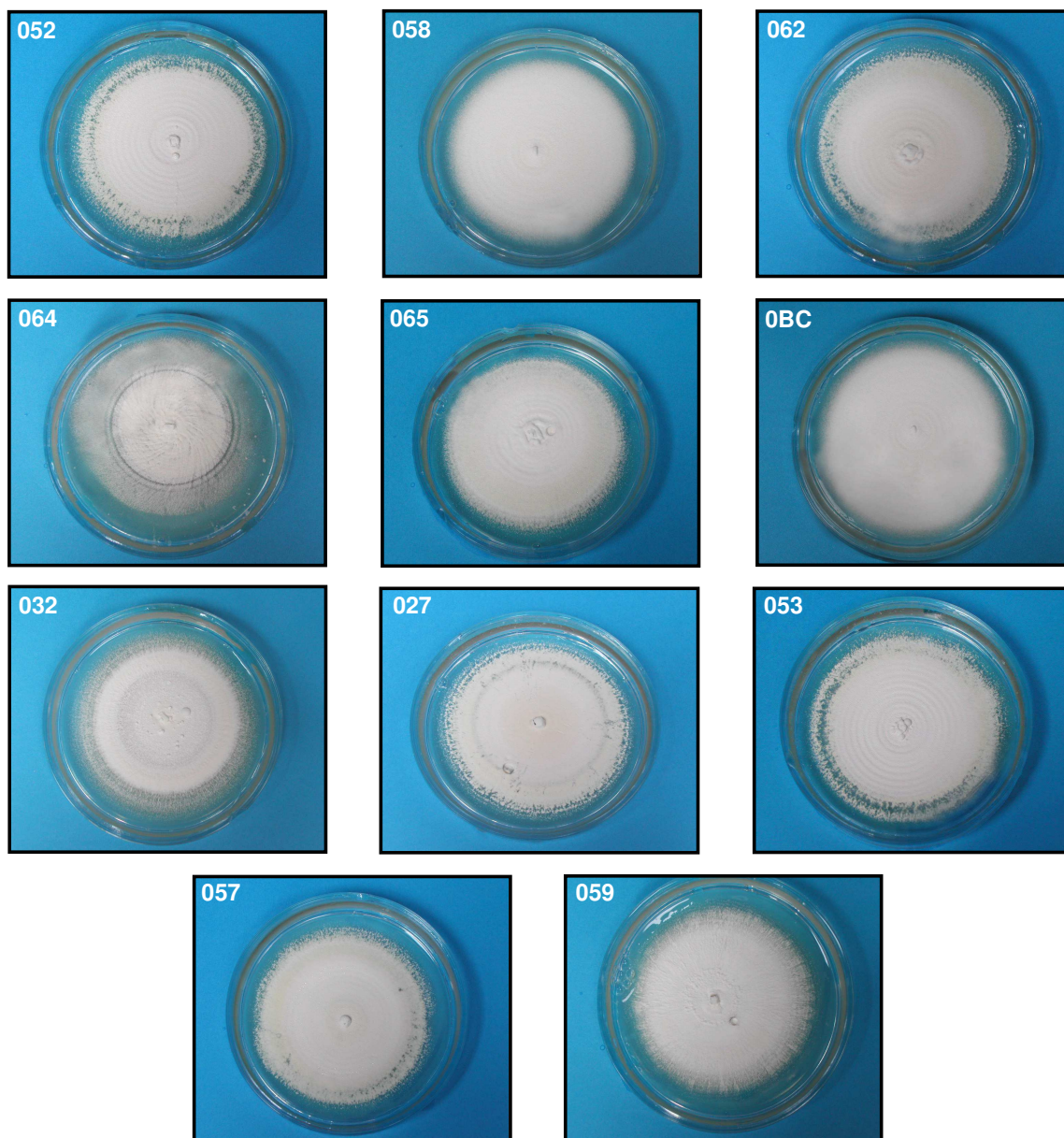


Figura 14 – Cultura monospórica dos isolados de *Beauveria bassiana* da micoteca da Embrapa *Tabuleiros Costeiros*.

Tabela 4 - Culturas monospóricas de *Beauveria bassiana* do Banco de Agentes Biológicos da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Isolados	Local de origem	Hospedeiros	Instituição
BC.05	Boquim/SE – C	<i>Cratosomus flavofasciatus</i>	Embrapa - CPATC
027.94	São Cristóvão/SE – C	<i>Rhinostomus barbirostris</i>	Embrapa - CPATC
032.91	Aracaju/SE – C	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	Embrapa - CPATC
052.96	Betume1/SE – C	<i>Homalinotus coriaceus</i>	Embrapa - CPATC
053.96	Mojú/PA – I	<i>Brassolis sophorae</i>	Embrapa - CPATC
057.99	Betume2/SE – C	<i>Homalinotus coriaceus</i>	Embrapa - CPATC
058.99	Saquarema/RJ – I	<i>Homalinotus coriaceus</i>	Embrapa - CPATC
059.99	Malhador/SE – C	<i>Rhynchophorus palmarum</i>	Embrapa - CPATC
062.00	Neópolis/SE – C	<i>Coraliomela brunnea</i>	Embrapa - CPATC
064.99	Egito – I	<i>Rhynchophorus ferruginus</i>	Embrapa - CPATC
065.03	Umbaúba/SE – C	<i>Rhinostomus barbirostris</i>	Embrapa - CPATC

C – Coletado; I – Intercambiado

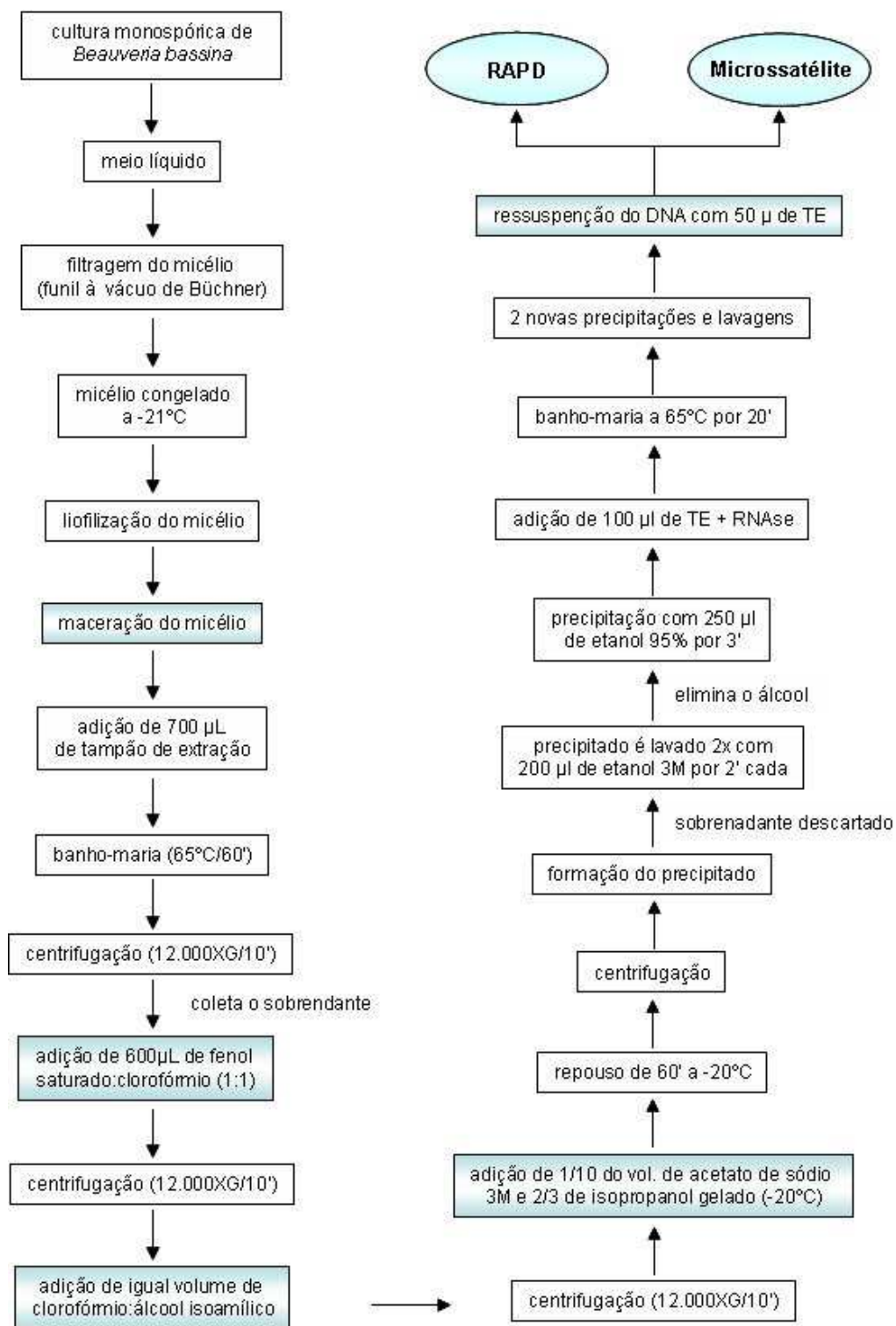
5.1.2 Extração de DNA

Na extração do DNA genômico, o micélio previamente macerado em nitrogênio líquido foi colocado em microtubo de 2 mL, ao qual se adicionou 700 µL de solução extratora (549 µL de água estéril, 300 µL de SDS 10%, 100 µL EDTA 0,5M pH 8, 50 µL de Tris-HCl 1M pH 8 e 2-mercaptoetanol/amostra), que foi agitado até a homogeneização e mantido em banho-maria a 65°C por 60 minutos.

Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 12.000 XG por 10 minutos e o sobrenadante recolhido. A seguir, adicionou-se 600 µL de fenol saturado e clorofórmio (1:1) e a mistura foi centrifugada no mesmo tempo e rotação. O sobrenadante obtido foi transferido para novo microtubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio e álcool isoamílico (1:1). A mistura foi centrifugada e o sobrenadante retirado, sendo adicionado 1/10 do seu volume de acetato de sódio 3M e 2/3 de isopropanol gelado (-20°C).

Após repouso de no mínimo 60 minutos a -20°C, a mistura foi centrifugada e observada a formação do precipitado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 200 µL de etanol 70%, sendo cada lavagem de dois minutos. O álcool foi desprezado e o precipitado lavado com 250 µL de etanol 95% por 3 minutos. Passado este tempo, procedeu-se nova lavagem com álcool 70%.

O precipitado foi ressuspendido com 100 μ L de TE (tampão Tris-EDTA) acrescido de RNase e incubado a 65°C por 20 minutos. Realizou-se duas novas precipitações e lavagens, sendo que ao final, o precipitado foi ressuspendido com a adição de 50 μ L TE (Esquema 1).



Esquema 1 – Representação esquemática do protocolo de extração de DNA de *Beauveria bassiana*.

5.1.3 Amplificação de marcadores RAPD na análise da diversidade de *Beauveria bassiana*

A reação de amplificação apresentou um volume de 25 μL [14,3 μL de água destilada autoclavada, 3 μL de tampão 10X, 0,6 μL de d-NTP's (10mM), 0,9 μL de MgCl_2 (50mM), 0,2 μL de *taq* polimerase (2U), 3 μL de *primer* e 3 μL de DNA]. Foram testados 20 *primers* decâmeros de seqüência arbitrária da marca IDT (Tabela 5).

A amplificação foi realizada utilizando-se termociclador (Biometra/Unisciense) com temperatura inicial de 94°C por 5 min. seguida por 45 ciclos de amplificação a 94°C por 1 min., visando à desnaturação do DNA; 36°C por 2 min, para o anelamento de um *primer* decâmero de amplificação aleatória; e 72°C por 1 min., visando a extensão do seguimento de DNA realizada pela enzima DNA polimerase (*Taq*), a partir da adição de nucleotídeos.

Os produtos de amplificação do DNA foram separados em gel de agarose 0,8%, submetidos à eletroforese em tampão TBE 0,5X (90mM Tris-borato, 1mM EDTA, pH 8,0) a 100V por 1 hora e meia, corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e visualizados sob luz ultra violeta (UV).

Tabela 5 - Seqüências dos *primers* decâmeros utilizados nas reações de RAPD.

Primers	Seqüência 5' – 3'
01	CAG GCC CTT C
02	TGC CGA GCT G
03	GTT TCG CTC C
04	TGA TCC CTG G
05	TTC GAG CCA G
06	GTG AGG CGT C
07	ACC GCG AAG G
08	GGA CCC AAC C
09	CCC AAG GTC C
10	GGT GCG GGA A
11	ACG GAT CCT G
12	GAG GAT CCC T
13	CTA CGG AGG A
14	GGC ACT GAG G
15	GGT CGG AGA A
16	TCG GAC GTG A
17	ACC TGG ACA C
18	GGA GGA GAG G
19	CCC GGC ATA A
20	AAA GTT GGG A

5.1.4 Marcadores de microssatélites na análise da diversidade de *Beauveria bassiana*

O DNA extraído dos 11 isolados de *B. bassiana* foi submetido a reações de PCR, utilizando 4 pares de *primers* baseados em marcadores de microssatélites (Tabela 6). Esses oligonucleotídeos foram escolhidos de acordo com o estudo realizado por Rehner & Buckley (2003).

As reações de amplificação foram feitas em um volume de 25µL [3µL de tampão 10X, 0,9µL de MgCl₂ (50mM), 0,6µL de d-NTP's (10mM), 0,4µL de *taq* polimerase (2U), 18,1µL de água ultra-pura, 0,5µL de cada *primer* (senso e anti-senso a 0,2 µM) e 1 µL (30ng) de DNA].

A amplificação do DNA foi realizada em termociclador (Biometra/Unisciense) programado para aquecimento a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 min., 50°C por 1 min. e 72°C por 2 min. Ao final de cada reação, as amplificações foram submetidas à temperatura de 72°C por 7 min. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,5%, submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X (Tris-Borato 90mM, EDTA 2mM, pH 8,0) a 80V por três horas, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz UV.

Tabela 6 – Seqüência dos *primers* de microssatélites usados na caracterização genética de *Beauveria bassiana*.

Lócus	Seqüência repetida	Seqüência do <i>primer</i>
Ba01 (AY212020)	(CA) ₁₄	F: CCAACCCAATCAATCGTCAT R: GAGAGGCGGAGCTAAGCA
Ba02 (AY212021)	(CA) ₂₀	F: AACGCTATGCCTTGACGAC R: GACGCCGAGCAATGTAACA
Ba03 (AY212022)	(CA) ₂₆	F: GCATAGATATGTCTCGCACC R: ACTACCCTGTCCCGCTGA
Ba05 (AY212023)	(GAT) ₁₅	F: AGGCAATACCGAGGTTGGC R: ATCCATGGCGAGCCGTC

F: forward R: reverse

5.1.5. Amplificação da região ITS (*Inetrnal Transcribed Sequence*) do DNAr

Os *primers* utilizados para amplificação do gene da região intergênica ITS foram sintetizados pela GIBCO (Life Technologies) e encontram-se listados na

Tabela 7. Eles foram suspensos em água Mili-Q esterilizada para concentração final de 200 µM. As soluções de trabalho foram utilizadas na concentração de 20 a 30 µM.

As ampliações de DNA foram realizadas em termociclador Biometra/Unisciense. As reações de amplificação foram efetuadas em volumes de 25 µL [16,4 µL de água ultra-pura; 2,5 µL de tampão 10x; 2,5 µL de MgCl₂; 0,5 µL de d-NTP's; 0,5 µL de cada *primer* e 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase por reação e, 3 µL do DNA]. O programa de amplificação constituiu de um ciclo de desnaturação inicial a 95°C/3 min.; seguido de 32 ciclos a 94°C/1 min., 57°C/1 min. e 72°C/1 min.; e um ciclo a 72°C/3 min..

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em TBE 1X, corados com brometo de etídeo, visualizados em fonte de luz U.V. e registrados.

Tabela 7. *Primers* da região ITS-DNAr utilizados no estudo.

Primer	Seqüência (5' para 3')	Região	No. pb	Referência
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	região intergênica	19	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	região intergênica	20	White <i>et al.</i> , 1990

5.1.6. Restrição dos produtos de amplificação da região ITS-DNAr

O produto da região ITS amplificada por PCR foi digerido com as enzimas de restrição *HaeIII* e *EcoRI* (5µL), por quatro horas a 37°C. A partir do produto digerido foi realizada a corrida eletroforética a 80V e 80mA, por três horas, em gel de agarose 1,5%, usando tampão TBE 1X (Tris-Borato 90mM, EDTA 2mM, pH 8,0), sendo em seguida corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados sob luz UV.

5.1.7 Caracterização isoenzimática de isolados de *Beauveria bassiana*

Para extração das isoenzimas foram utilizados 500 mg de micélio dos isolados do fungo, macerados em nitrogênio líquido acrescido de 1.000 µL de tampão de extração (fosfato de sódio bibásico 0,034 M; sacarose 0,2 M;

polivinilpolipirrolidona 2,56%; 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio-brometo (MTT) 3m M; ácido ascórbico 5,7 mM; bissulfito de sódio 2,6 mM; borato de sódio 2,5 mM; β -mercaptoetanol 0,2%; e polietilenoglicol-6.000 1%) (Alfenas, 1991). O homogeneizado foi centrifugado a 16.000 XG a 4°C por 60 minutos.

Em seguida, 20 μ L do sobrenadante de cada acesso foi aplicado em géis de poli(acrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador), em sistema descontínuo. O gel separador foi composto de Tris-HCl pH 8,9, solução de acrilamida 7,5%, solução de persulfato de amônia a 10%, tetrametiletilenodiamina (TEMED), e para o gel concentrador Tris-HCl pH 6,8 e a solução de acrilamida 4,5%.

As isoenzimas foram separadas por eletroforese por aproximadamente três horas a 8°C, com corrente constante de 150V, em tampão de corrida Tris-glicina pH 8,9. As enzimas foram reveladas para os sistemas Esterase (EST - EC 3.1.1.1.), Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT - EC 2.6.1.1.), e Peroxidase (PO EC - 1.11.1.7.), utilizando, no mínimo de três repetições para cada sistema.

A revelação dos seguintes sistemas foi realizada no escuro a aproximadamente 37°C, utilizando-se soluções contendo:

- EST - α e β -naftil-acetato 1% em acetona 50%, 100 mg *fast blue* RR, 100 mL tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,1;
- GOT - 150 mg de ácido L-aspártico, 100 mg de ácido α -cetoglurárico, 5 mg de piridoxal-5'-fosfato, 100 mg *fast blue* BB sal e 100 mL de tampão tris-HCl 0,2 M pH 8,0;
- PO - 32 mg de *o*-dianisidina 2 HCl, 2 mL de H₂O₂ 3% e 100 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5.

5.1.8 Análise dos dados

Na avaliação dos géis, a presença (1) e ausência (0) de bandas foram usadas para a construção de matrizes. As estimativas das similaridades genéticas (S_{gij}) entre cada par de genótipos foram efetuadas empregando o coeficiente de similaridade de Jaccard por meio da expressão: $S_{gij} = a/a+b+c$. As variáveis das expressões foram obtidas conforme o seguinte esquema:

		Isolado i	
		1	0
Isolado j	1	a (1, 1)	b (1, 0)
	0	c (0, 1)	d (0, 0)

As similaridades foram obtidas usando o pacote estatístico NTSYS-pc versão 2.1 e o agrupamento, empregando o método de médias aritméticas não ponderadas UPGMA (Rohlf, 2000). E os erros associados às similaridades estimados segundo Skroch *et al.* (1992), pelas seguintes expressões:

$V = ns(1-s)(n-1)$, erro padrão estimado $(V/n)^{1/2}$ em que:

V= variância da similaridade genética entre cada par de isolados;

s= similaridade genética entre cada par de isolados;

n= número total de bandas utilizadas na estimativa das similaridades.

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1. Diversidade de *Beauveria bassiana* pelo teste de RAPD

Na análise de RAPD, as reações de amplificação dos fragmentos de DNA geraram 138 bandas polimórficas e 14 monomórficas. Verificou-se que algumas bandas foram exclusivas para os diferentes isolados do fungo.

Os padrões de bandas de DNA (Figura 15) foram empregados para o cálculo dos valores de similaridade genética, que variaram entre um valor mínimo de 2% e máximo de 77%.

Observou-se para os acessos de *B. bassiana*, similaridade média de 38,6%, com a formação de grupos distintos no dendrograma, mesmo entre aqueles isolados provenientes de hospedeiros comuns (Figura 16), sendo o isolado 0065.03 o mais divergente quando comparado com os demais. Infere-se, com isso, que o acesso 0065.03 (*R. barbirostris*/Umbaúba-SE) possui em seu genoma seqüências bastante distintas em relação aos outros isolados dessa espécie, sugerindo prováveis mutações devido às pressões de seleção ao longo da evolução.

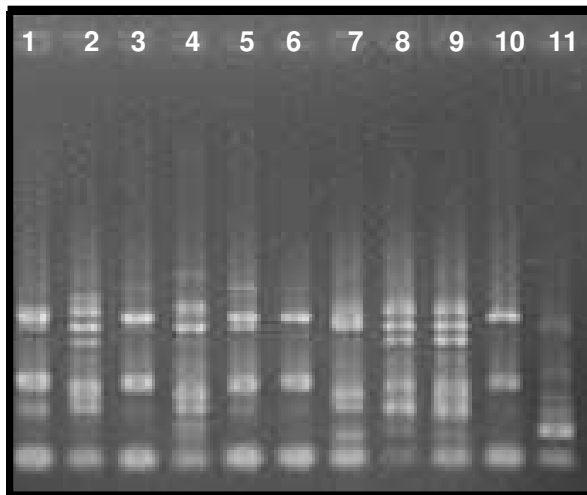


Figura 15 - Produtos de amplificação de RAPD, em gel de agarose, de isolados de *Beauveria bassiana* (primer n° 16 Dialab). (Acessos: 1- BC.05, 2- 27.94, 3- 32.91, 4- 52.96, 5- 53.96, 6- 57.99, 7- 58.99, 8- 59.99, 9- 62.00, 10- 64.99, 11- 65.03).

De acordo com as similaridades genéticas entre os genótipos analisados (Tabela 8), os isolados 0057.99 (Betume2-SE) e 0053.96 (Mojú-PA) apresentaram maior similaridade (77%), seguidos de 64.99 (Egito) e 0053.96 (Mojú-PA), com uma similaridade de 73%.

Ferreira *et al.*, (2001) realizaram bioensaios comparando a patogenicidade dos isolados 0057.99 e 0053.96 sobre *B. sophorae* (lagarta-das-folhas-do-coqueiro). A virulência apresentada pelos isolados no controle desse inseto foi semelhante, em torno de 92,5%, concordando com os resultados do teste de RAPD, no qual foi observado o maior valor de similaridade (77%). Este fato comprova a utilidade da aplicação de técnicas moleculares no monitoramento de isolados de fungos entomopatogênicos, contribuindo para a identificação de genótipos mais eficientes no controle de pragas.

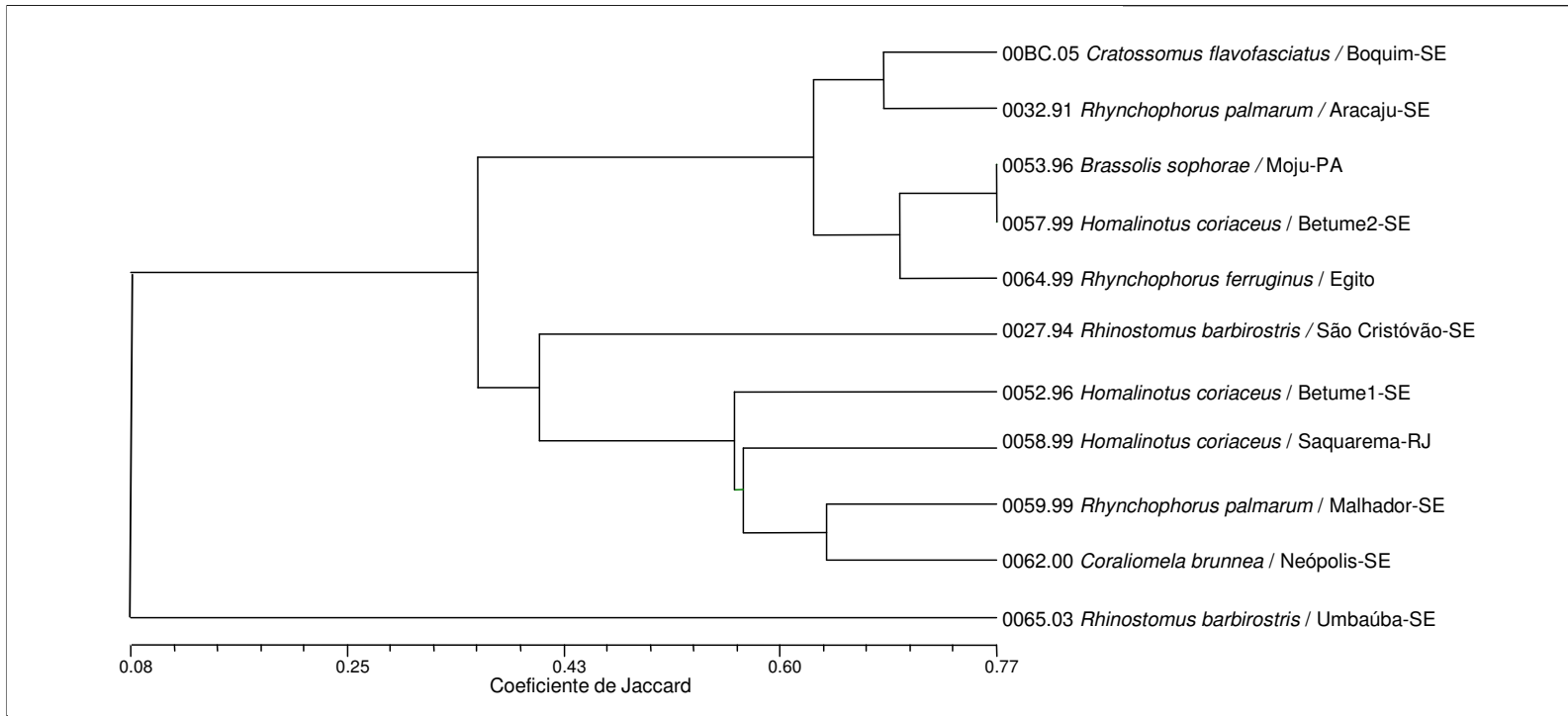


Figura 16 – Dendrograma de similaridades entre 11 acessos de *Beauveria bassiana*, para análise de RAPD, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

O acesso de *B. bassiana* 0057.99, também demonstrou potencial no controle de biológico de outras pragas de coqueiro, tais como: *H. coriaceus* – broca-da-ráquis-foliar (87%), *R. palmarum* - broca-do-olho-do-coqueiro (91,5%) e o *R. barbirostris* - broca-do-estipe (95,3%) (Ferreira et al, 2001).

Tabela 8 - Similaridades genéticas (%) (posicionadas abaixo da diagonal) e erro padrão associado à similaridade (acima da diagonal) entre acessos de *Beauveria bassiana* baseado no coeficiente de Jaccard.

Isolados	BC05	27.94	32.91	52.96	53.96	57.99	58.99	59.99	62.00	64.99	65.03
BC05		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001
27.94	44		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,001
32.91	68	37		0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001
52.96	43	47	46		0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001
53.96	55	33	68	44		0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,001
57.99	64	34	69	37	77		0,002	0,003	0,003	0,003	0,001
58.99	33	43	35	55	35	30		0,003	0,003	0,002	0,0004
59.99	32	35	38	56	38	32	58		0,003	0,003	0,0002
62.00	36	37	36	57	36	32	55	64		0,002	0,0006
64.99	51	30	67	35	73	66	29	32	30		0,001
65.03	11	9	8	9	10	10	4	2	5	8	

Os isolados 0052.96, 0057.99 e 0058.99, obtidos do mesmo hospedeiro (*H. coriaceus*) apresentaram-se pouco similares, sendo o 0057.99 e o 0058.99 os mais divergentes, com apenas 30% de similaridade. Embora os isolados 0032.91 e 0059.99 tenham sido obtidos do mesmo hospedeiro, *R. palmarum*, observou-se 38% de similaridade genética entre eles. Comparado aos outros acessos de *B. bassiana* o 0032.91 é o que tem se mostrado mais virulento para essa espécie causando, em testes de laboratório, uma mortalidade de adultos de *R. palmarum* de até 100%, seguido do 0059.99, e dos acessos 0057.99 e 0058.99 (Ferreira et al, 2001).

Dentre os acessos originários de Sergipe, os que apresentaram maior similaridade genética foram BC.05 (Boquim) e 0032.91 (Aracaju) (68%), sendo estes obtidos de insetos pragas de diferentes culturas (*Citros* e *Cocus nucifera*), porém, pertencentes a mesma família (Curculionidae). Enquanto que os de menor similaridade foram 0065.03 (Umbaúba) e 0059.99 (Malhador), ambos isolados de praga de coqueiro.

O acesso 0032.91 possui fiáldes com a parte basal dilatada bem definida e terminando em zig-zague, conídios globosos ou subglobosos com (2 a 3) x (2 a

2,5) μm e conídios formando densos cachos, característicos da espécie (Ferreira *et al.*, 2001). Atualmente, em testes de laboratório, para este isolado tem sido alcançado uma mortalidade de adultos de *R. palmarum* de até 100%, sendo que nesse trabalho a maior mortalidade dos adultos ocorreu no 7º e 9º dia, após a inoculação. O isolado BC.05 foi coletado em 2005, até o momento não foram realizados testes de avaliação de sua patogenicidade. No entanto, devido a alta proximidade genética com o isolado 0032.91, este pode ter um potencial no controle biológico do *R. palmarum*, uma vez que foi obtido de um inseto, *C. flavofasciatus*, da mesma família (Curculionidae). Da mesma forma, pode-se sugerir uma potencialidade do isolado 0032.91 no controle de *C. flavofasciatus*.

Quando comparado aos outros acessos de *B. bassiana*, o 0032.91 é o que tem se mostrado mais virulento seguido do 0059.99. Assim, o conhecimento da distribuição e magnitude da variação genética entre e dentro de populações é de grande importância em termos de entendimento da biologia e da população do fungo, este pode ser usado para inferir o impacto potencial de diferentes fatores ecológicos que influenciam o processo evolucionário (Wang, *et al.*, 2003).

Os isolados que apresentaram menor valor de similaridade foram os 0065.03 e o 0059.99 (2%) (Tabela 8). Estes foram obtidos de regiões edafoclimáticas distintas, sendo um de Umbaúba-SE (latitude 11º23'00" Sul/longitude 37º39'28" Oeste), estando a uma altitude de 130 metros e Malhador-SE (latitude 10º39'28" Sul/longitude 37º18'17" Oeste), a uma altitude de 251 metros, com regime pluviométrico e temperaturas médias que variam nestas regiões (SEPLANTEC, 2006), podendo estes fatores agir como pressão de seleção para que ocorram mutações entre isolados.

5.2.2 Diversidade de *Beauveria bassiana* por meio de microssatélites - SSR

As análises de microssatélites para *B. bassiana* geraram 41 bandas, todas polimórficas. Foram constatadas algumas diferenças em relação às distâncias de migração eletroforética entre os produtos de amplificação obtidos neste trabalho e as populações descritas por Mc Guire *et al.* (2005), possivelmente devido às diferentes procedências e aos hospedeiros dos isolados que foram empregados na análise.

Para a seqüência de *primer* Ba01 observou-se um total de 20 bandas amplificadas, apresentando maior polimorfismo em relação à seqüência do *primer* Ba05, com apenas duas bandas amplificadas (Figura 17).

O comprimento dos fragmentos amplificados variou de 100 a 2.000 pb.. Rehner e Buckley (2003), avaliando uma ampla população geográfica de *B. bassiana*, observaram que o tamanho dos fragmentos amplificados pela seqüência Ba05 variou de 110 a 175 pb.

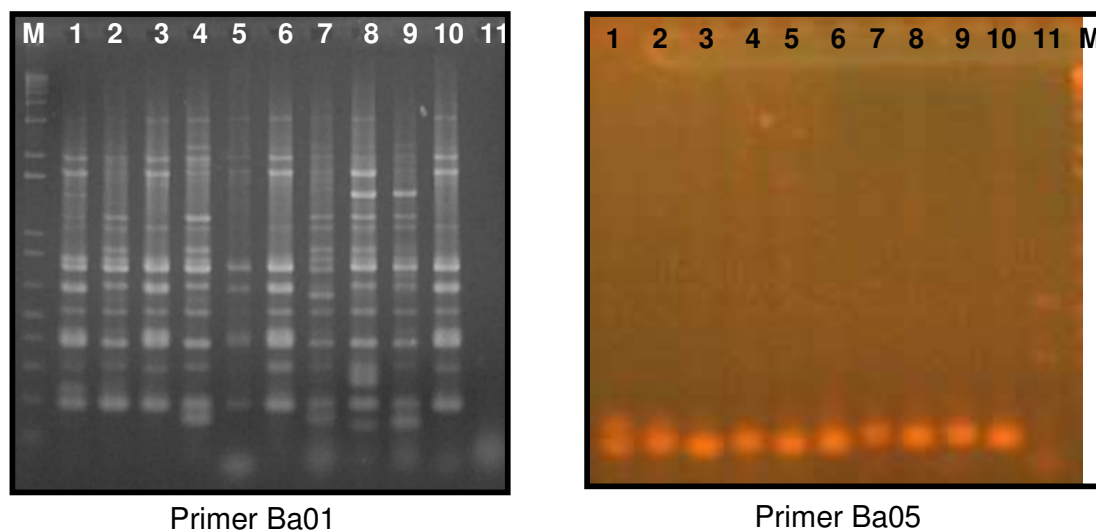


Figura 17 – Produtos de amplificação de microsatélites, em gel de agarose, de isolados de *Beauveria bassiana*. (M – Marcador de peso molecular – 100 pb, acessos: 1- BC.05, 2- 27.94, 3- 32.91, 4- 52.96, 5- 53.96, 6- 57.99, 7- 58.99, 8- 59.99, 9- 62.00, 10- 64.99, 11- 65.03).

Os padrões de bandas de DNA (Figura 17) foram empregados para o cálculo dos valores de similaridade genética, os quais variaram entre um valor mínimo de 0% e máximo de 82% (Figura 18).

Os maiores valores de similaridade genética observados entre os genótipos analisados (Tabela 9), foram de 82% para os pares BC.05 (Boquim - SE) e 0032.91 (Aracaju - SE) e 80% para o 0064.99 (Egito) e o 0057.99 (Betume2-SE). Para o primeiro par, os microsatélites confirmaram os resultados na análise de RAPD, onde, também foi observado maior valor de similaridade genética, sendo ambos originários de Sergipe.

Os isolados provenientes de *R. palmarum* (0032.91 e 0059.99) apresentaram similaridade genética de 50%, sendo o mesmo valor observado para os de *H. coriaceus* (0052.96 e 0058.99), ou seja, quando obtidos de um mesmo hospedeiro apresentaram similaridade baixa.

Os isolados que apresentaram menor valor de similaridade foram os 0065.03 e o 0059.99, os quais foram obtidos de regiões edafoclimáticas distintas, sendo um de Umbaúba (latitude 11°23'00" Sul/longitude 37°39'28" Oeste), estando a uma altitude de 130 metros e Malhador (latitude 10°39'28" Sul/longitude 37°18'17" Oeste), a uma altitude de 251 metros. O regime pluviométrico e temperaturas médias que variam nestas regiões (SEPLANTEC, 2004), podem ter contribuído com pressão de seleção para a ocorrência de mutações entre isolados. Wang *et al.* (2003), trabalhando com marcadores de microssatélites, observaram que a relação genética entre os isolados de *B. bassiana* foi mais associada com a localização geográfica do que com a espécie de inseto hospedeiro, sugerindo o fator localização como pressão de seleção. Neste trabalho, não se observou uma relação direta entre dados de similaridade, localização geográfica e hospedeiro como foi sugerido anteriormente por Wang *et al.* (2003). Contudo, conforme este mesmo autor, o conhecimento da distribuição e magnitude da variação genética é de grande importância dentro de populações para compreensão da biologia de fungos; isto pode ser útil para se inferir sobre diferentes fatores ecológicos que influenciam no processo evolucionário.

No entanto, não só fatores ecológicos podem influenciar nessa biologia. Enkerli, *et al.* (2004), que utilizaram marcadores de microssatélite para caracterização genética de isolados de *B. brongniartii* aplicados durante 14 anos para controle biológico de *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae), demonstraram que alguns isolados após esse período persistiam no ambiente e novas populações se derivaram, co-existindo no mesmo habitat. Esse fato, provavelmente, contribui para que outros fatores possam agir como pressão de seleção dessa espécie.

Na análise de microssatélites foi observado resultado semelhante aqueles da análise de RAPD para o isolado 0065.03, que não apresentou nenhuma similaridade genética com os isolados BC.05, 0032.91, 0053.96, 0057.99 e 0064.99. Este fato valida as informações obtidas com múltiplos marcadores moleculares para estudos de populações de fungos entomopatogênicos.

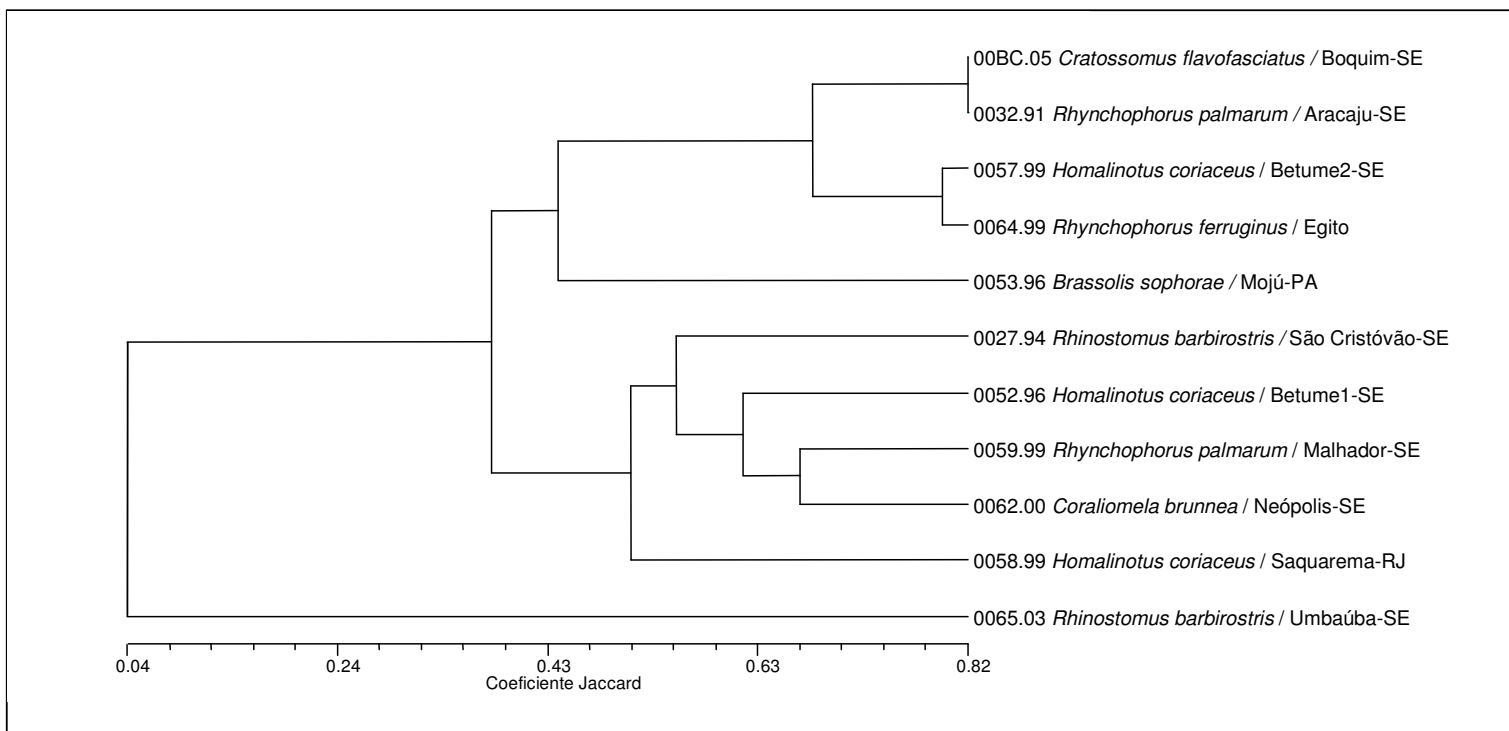


Figura 18 – Dendrograma de similaridades entre 11 acessos de *Beauveria bassiana*, para microssatélites baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

Para as condições de Sergipe, aplicações sucessivas de *B. bassiana* vêm sendo utilizadas para o controle biológico de pragas do coqueiro. Em condições favoráveis, o fungo persiste nesse ambiente por gerações de insetos ali presentes, podendo sofrer ação de diferentes práticas de manejo e condições ambientais que ao longo dos anos implicará em pressões de seleção gerando novos tipos genéticos.

O polimorfismo pode estar relacionado à ocorrência de mutações ou recombinação parassexual que pode ser conservada na seleção natural e transferida por reprodução sexuada dos organismos (Mc Donald *et al.*, 1989).

Tabela 9 - Similaridades genéticas (%) (abaixo da diagonal) e erro padrão associado à similaridade (acima da diagonal) entre isolados de *Beauveria bassiana* empregando microssatélites, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

Isolados	BC05	27.94	32.91	52.96	53.96	57.99	58.99	59.99	62.00	64.99	65.03
BC05		0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,000
27.94	54		0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,001
32.91	82	48		0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002	0,000
52.96	59	59	45		0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,0004
53.96	32	26	37	20		0,003	0,001	0,002	0,002	0,003	0,000
57.99	64	44	74	42	63		0,002	0,003	0,003	0,002	0,000
58.99	37	46	31	50	12	26		0,003	0,003	0,003	0,001
59.99	56	56	50	61	19	41	53		0,003	0,003	0,001
62.00	50	50	43	62	17	35	54	67		0,003	0,0004
64.99	62	36	72	40	45	80	32	44	37		0,000
65.03	0	9	0	4	0	0	14	8	4	0	

Na Figura 19 estão confrontados os dados de diversidade genética dos isolados de *B. bassiana* empregando-se os marcadores moleculares de RAPD e microssatélites na análise de consenso. Observa-se que foram formados dois grandes grupos, com aproximadamente 38,0% de divergência genética. Em um grupo estão os isolados BC.05, 0032.91, 0053.96, 0057.99 e 0064.99 e em outro, 0027.94, 0052.96, 0058.99, 0059.99 e 0062.00. O isolado 0065.03 formou um terceiro ramo independente com 80% de divergência, quando comparado com os demais.

A análise de consenso confirmou os resultados obtidos com os marcadores de RAPD e microssatélites.

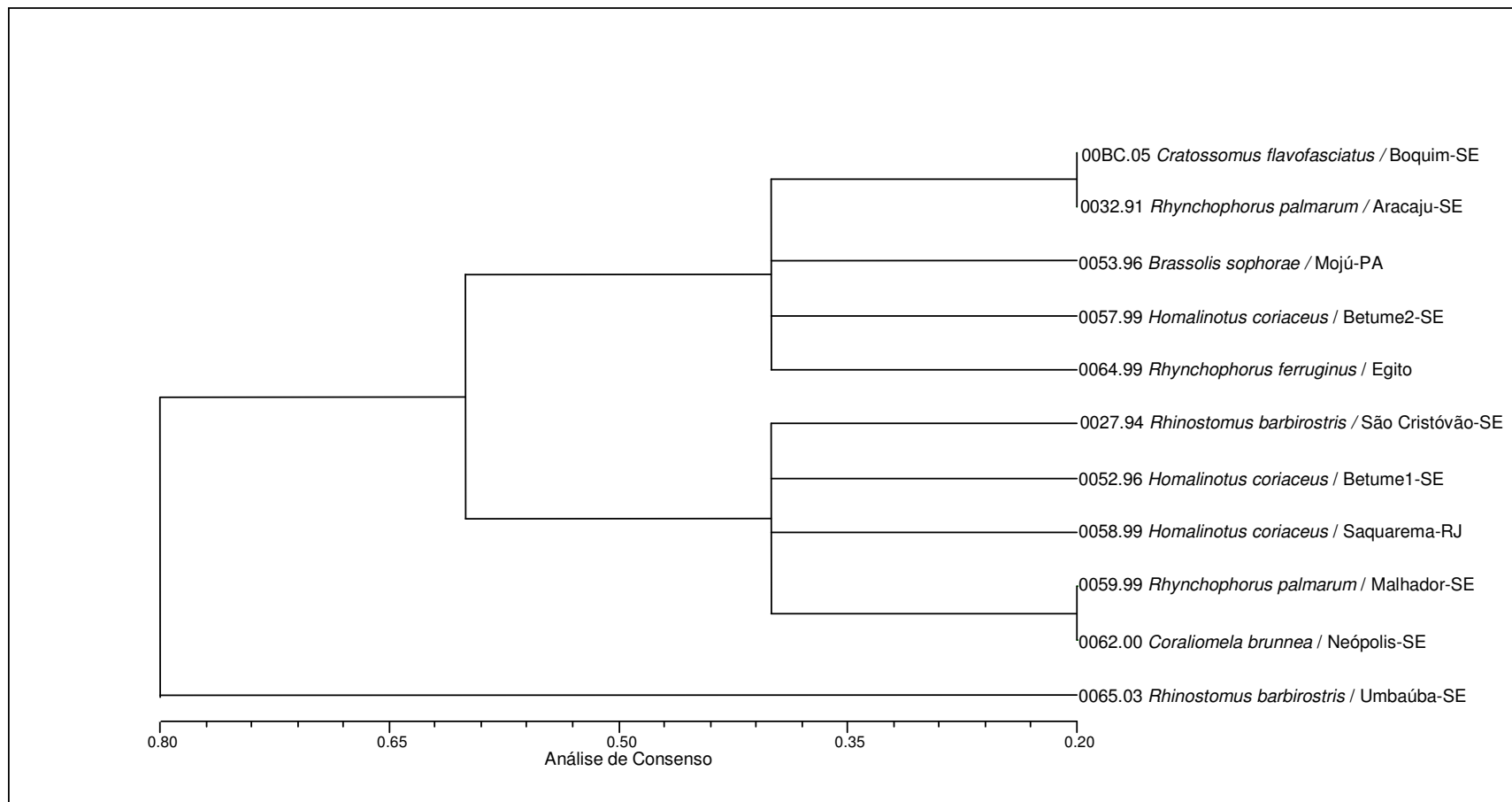


Figura 19 - Dendrograma de análise de consenso de agrupamentos entre 11 acessos de *Beauveria bassiana*, para RAPD e microssatélites baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard (método Strict).

5.2.3. Amplificação da região ITS do DNA ribossomal (DNAr)

Visando elucidar a posição taxonômica do isolado 0065.03 diante dos demais quanto as proximidades genéticas avaliadas por RAPD e microsstatelites, realizou-se o estudo da região ITS do DNAr, por ser esta região conservada dentro de uma espécie e variável entre espécies. Na análise de DNAr o *primer* permitiu a visualização de um fragmento único (uma banda) de aproximadamente 550 pb para todos os isolados e ocorrência de poucas bandas inespecíficas com pouca resolução (Figura 20).

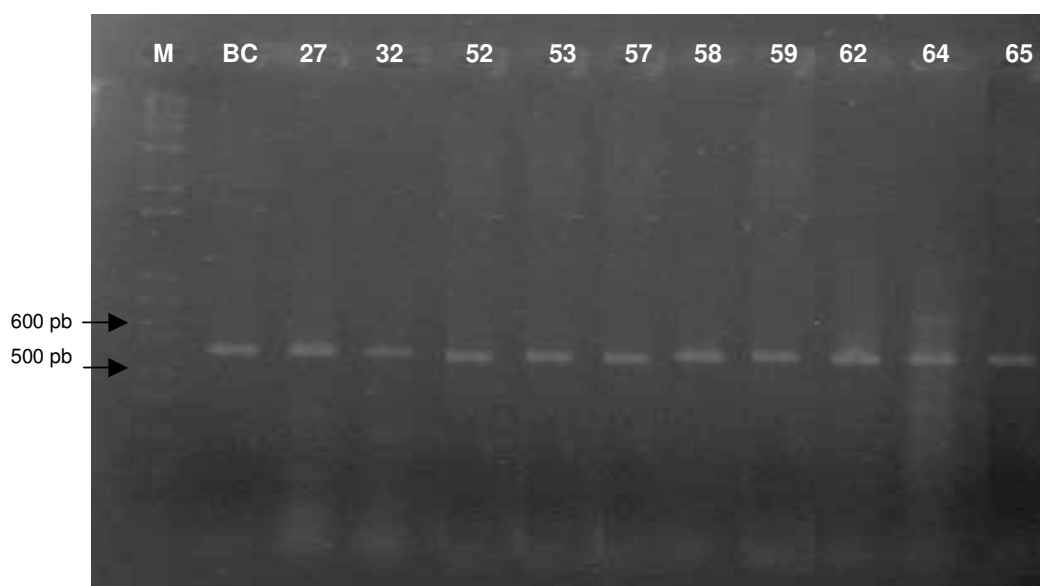


Figura 20 - Produtos de amplificação de regiões *Internal Transcribed Spacer* - ITS de DNA ribossomal de *Beauveria bassiana* em gel de agarose.

A região ITS é constituída de agrupamentos em tandem, ou seja, muitas cópias de unidades repetidas que incluem seqüências transcritas. A conservação durante a evolução dos organismos nestas regiões depende de mecanismos, tais como: conservação gênica ou uma permuta desigual que pode causar mutações que se espalham no grupo; e que, portanto, podem se tornar expostas às pressões de seleção (Lewin, 1997).

Como não foram observadas variações na amplificação das regiões ITS realizou-se a restrição dos produtos de amplificação para os diferentes isolados. Após restrição e visualização dos produtos, constatou-se a não ocorrência de

resultados que permitissem a diferenciação dos isolados. Os produtos foram semelhantes aos obtidos sem restrição (Figura 21).

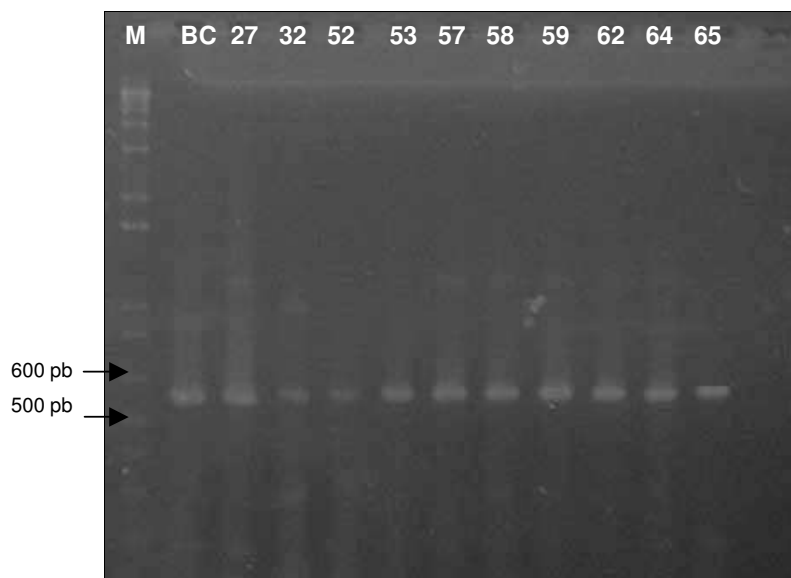


Figura 21 – Produtos da restrição da região ITS de DNA ribossomal de *Beauveria bassiana* com as enzimas *EcoRI* e *Hae III* em gel de agarose.

Novas perspectivas surgem e podem levar a necessidade de pesquisas para a identificação deste patógeno, principalmente quando em associação com outros hospedeiros das mais diversas culturas.

5.2.4 Caracterização isoenzimática

Os perfis eletroforéticos de Esterase (EST) e Peroxidase (PO) exibiram um total de 17 bandas polimórficas, sendo 16 observadas para o sistema EST e 1 para o sistema PO (Figura 22). Para o sistema Glutamato Oxalacetato Transaminase (GOT), não foi observada atividade isoenzimática para os isolados de *B. bassiana* (Figura 22B). No sistema PO foram observados padrões difusos para os isolados BC.05, 0052.96, 0057.99, 0058.99, 0059.99, 0062.00, 0064.99 e 0065.03, os quais apresentaram baixa resolução. No entanto, para os isolados 0027.94, 0032.91, e 0053.96 observou-se atividade de PO (Figura 22A).

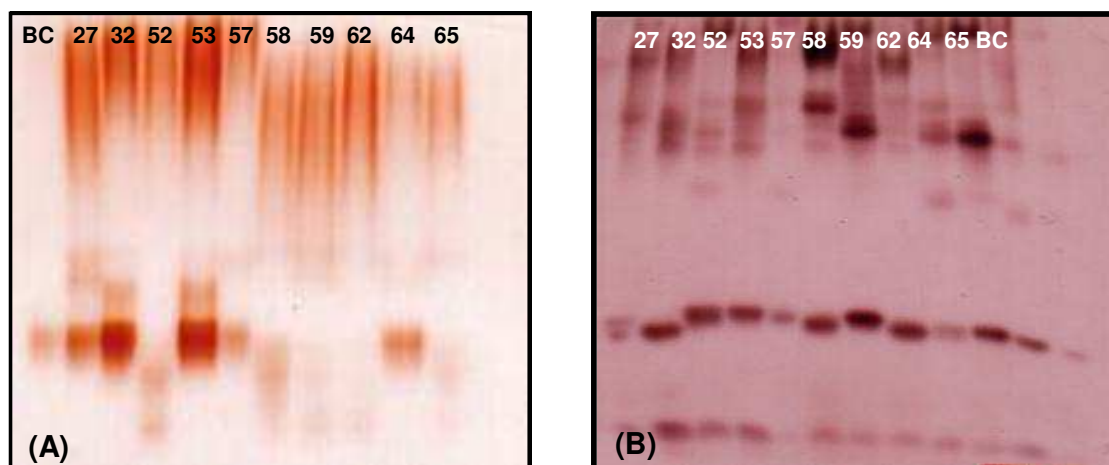


FIGURA 22 - Padrões isoenzimáticos em gel de poliacrilamida da enzima peroxidase – PO (A) e esterase – EST (B), obtidos do micélio de 11 acessos de *B. bassiana*.

Para a obtenção de valores de similaridade genética, envolvendo a combinação dos 11 acessos, tomados dois a dois, empregou-se o índice de similaridade de Jaccard, (Tabela 10), que variou entre um valor mínimo de 0% para os pares 0057.99 e 0058.99, 0057.99 e 0062.00, 0057.99; e 0065.03 e máximo de 80% para o par BC.05 (Boquim-SE) e 0032.91 (Aracaju-SE).

De acordo com as similaridades genéticas entre os genótipos analisados (Tabela 10), os isolados BC.05 (Boquim-SE) e 32.91 (Aracaju-SE) apresentaram maior similaridade (80%), seguidos de BC.05 (Boquim-SE) e 64.99 (Egito), com uma similaridade de 67%.

TABELA 10 - Estimativas de similaridade genética (%) – abaixo da diagonal – e erros associados – acima da diagonal – entre 11 acessos de *B. bassiana*, baseados em perfis isoenzimáticos de acordo com coeficiente de Jaccard.

Isolados	BC.05	27.94	32.91	52.96	53.96	57.99	58.99	59.99	62.00	64.99	65.03
BC.05		0,3	0,19	0,13	0,25	0,13	0,21	0,14	0,21	0,27	0,17
27.94	50,0		0,29	0,14	0,27	0,14	0,12	0,17	0,12	0,30	0,19
32.91	80,0	60,0		0,14	0,29	0,14	0,23	0,17	0,12	0,30	0,19
52.96	12,0	14,0	14,0		0,29	0,14	0,23	0,29	0,12	0,13	0,19
53.96	29,0	33,0	33,0	60,0		0,27	0,12	0,29	0,12	0,25	0,19
57.99	12,0	14,0	14,0	14,0	33,0		0,00	0,17	0,00	0,13	0,00
58.99	22,0	11,0	25,0	25,0	11,0	0,00		0,13	0,27	0,21	0,27
59.99	14,0	17,0	17,0	40,0	40,0	17,0	12,0		0,13	0,14	0,23
62.00	22,0	11,0	11,0	11,0	11,0	0,00	33,0	12,0		0,21	0,27
64.99	67,0	50,0	50,0	12,0	29,0	12,0	22,0	14,0	22,0		0,17
65.03	17,0	20,0	20,0	20,0	20,0	0,00	33,0	25,0	33,0	17,0	

Observou-se para os isolados de *B. bassiana* similaridade média de 24,0%, os quais formaram grupos distintos nos agrupamentos, mesmo entre aqueles isolados provenientes de hospedeiros comuns (Figura 23).

No dendrograma observou-se a formação de dois grandes grupos. O grupo 1 constituído pelos isolados BC.05, 0032.91, 0064.99, 0027.94, 0058.99, 0062.00 e 0065.03; e o grupo 2 pelos 0052.96, 0053.96, 0057.99 e 0059.99.

Avaliando-se os isolados originários de um mesmo gênero, *Rhynchophorus*, o 0032.91 (*R. palmarum*) e 0064.99 (*R. ferruginus*) apresentaram similaridade genética de 50%. Quando se considera em nível de espécies para este gênero, pode-se também observar valores de similaridade baixa como os relatados para os isolados 0032.91 e 0059.99, os quais apresentaram 17% de similaridade genética.

Fato semelhante foi encontrado na espécie *H. coriaceus*, que apresentou baixa similaridade genética intraespecífica do par 0052.96 e 0058.99 (25%), mesmo sendo obtidos de um mesmo hospedeiro.

Comparado a outros isolados de *B. bassiana*, obtidos de pragas de coqueiros, o 0032.91, tem sido relatado como o mais virulento (100% de eficiência), seguido por 0059.99, obtido de *R. palmarum* e por 0057.99 (87% de eficiência) e 0058.99 (80% de eficiência), ambos obtidos de adultos de *H. coriaceus*. No entanto, considerando

somente pragas de coqueiro, como por exemplo a *B. sophorae* e o *R. barbirostris*, o isolado 0057.99 apresentou eficiência de 92,5% e 95,3% (Ferreira *et al.*, 2001). Assim, conclui-se que estes isolados anteriormente citados apresentam altas eficiências no controle de insetos praga. Comparando estes dados com os valores de similaridade obtidos nesta investigação pode-se observar uma baixa similaridade genética entre estes fungos. Tal fato permite inferir que, mesmo os isolados tendo alta eficiência, estes se apresentam geneticamente pouco similares, evidenciando sobre a alta diversidade genética nestas populações presentes no Estado de Sergipe.

Dentre os isolados de Sergipe, os que apresentaram maior similaridade genética foram BC.05 (Boquim) e 0032.91 (Aracaju) com similaridade de 80%, sendo que esses foram isolados de insetos pragas de diferentes culturas (*Citrus* spp. e *Cocos nucifera*). Os de menor similaridade foram 0057.99 (Betume 2), 0065.03 (Umbaúba) e 0059.99 (Malhador), ambos isolados de praga de coqueiro. Estes isolados foram obtidos em regiões distantes uma das outras, o que permite dizer que os mesmos apresentam geneticamente divergência, e que possivelmente esta divergência se deva a um provável isolamento e/ou especiação dos mesmos. Estes isolados foram obtidos de regiões edafoclimáticas distintas, sendo Betume (Neópolis) localizado na margem direita do Rio São Francisco, no baixo vale, a uma latitude 10°19'12" Sul e a uma longitude 36°34'46" Oeste e a uma altitude de 30 metros; Malhador, localiza-se a uma latitude 10°39'28" Sul e a uma longitude 37°18'17" Oeste e a uma altitude de 251 metros e Umbaúba, a uma latitude 11°23'00" Sul e a uma longitude 37°39'28" Oeste e a uma altitude de 130 metros; com regime pluviométrico e temperaturas médias que variam entre estas regiões (SEPLANTEC, 2004).

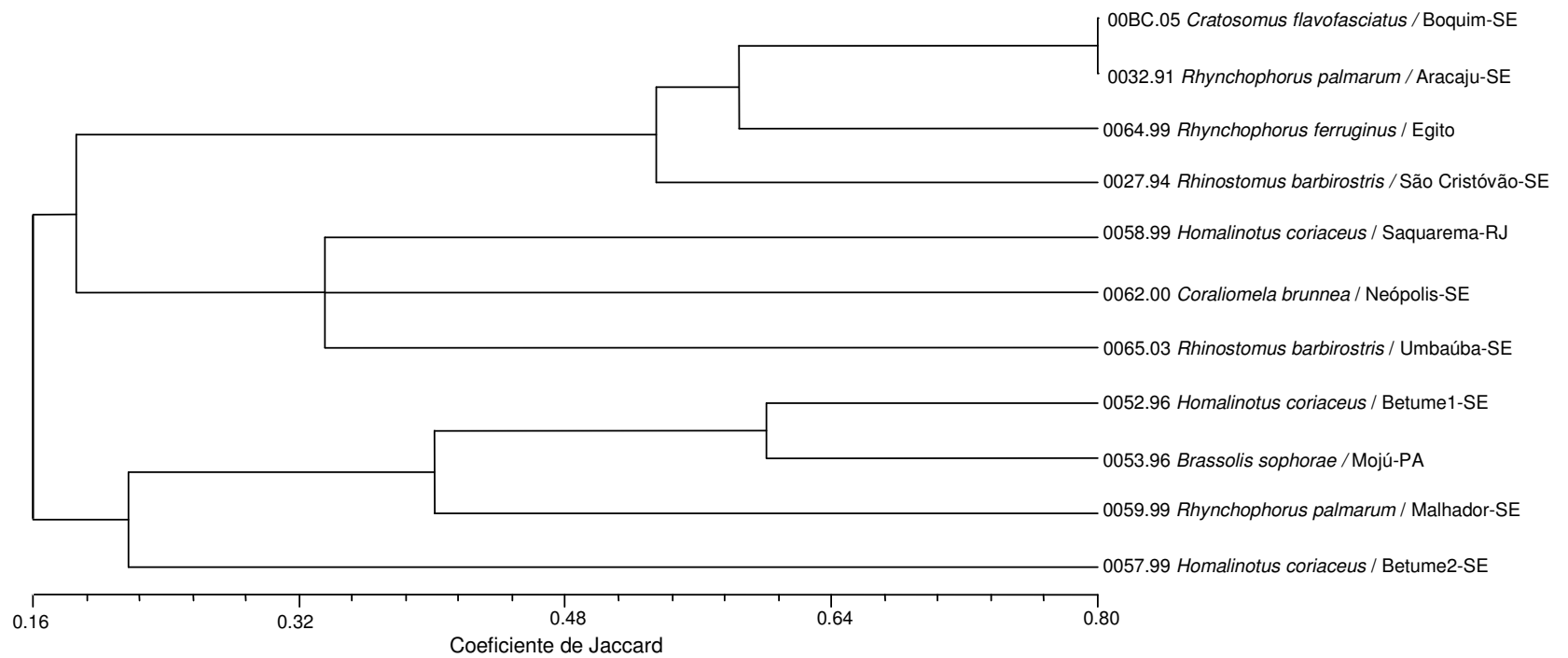


FIGURA 23 - Dendograma de similaridades entre 11 acessos de *Beauveria bassiana*, para isoenzimas baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

As populações de isolados do Estado de Sergipe apresentaram diversidade genética, sendo o conhecimento da distribuição e magnitude da variação genética intra e inter populacional de grande importância para o entendimento da biologia do fungo, o qual pode ser usado para inferir sobre o impacto potencial de diferentes fatores ecológicos que influenciam no processo evolucionário da espécie (Wang, *et al.*, 2003).

O polimorfismo observado pelos diferentes marcadores pode estar relacionado à ocorrência de mutações ou recombinação parassexual que pode ser conservada na seleção natural e transferida por reprodução sexuada dos organismos (Mc Donald *et al.*, 1989).

Novas perspectivas surgem e podem levar a necessidade de pesquisas para a identificação específica dos isolados mais divergentes deste patógeno, para as diversas culturas. Esta identificação pode sugerir uma nova posição taxonômica e a identificação de raças destes isolados de *B. bassiana*, que após caracterização poder-se-á identificar marcadores associados à patogenicidade, contribuindo para a seleção de tipos mais virulentos de forma mais rápida e precisa, associado à avaliação via inoculação e posterior determinação da mortalidade das pragas.

5.3. CONCLUSÕES

- Os isolados de *Beauveria bassiana* apresentam similaridade média de 38,6% de acordo com a análise de RAPD;
- Os isolados 57.99 (Betume2-SE) e 53.96 (Moju-PA) foram os mais similares (77%) pela análise de RAPD;
- Pela análise de microssatélites, os acessos BC.05 (Boquim-SE) e 32.91 (Aracaju-SE) apresentam maior similaridade genética (82%);
- Os produtos de ITS, obtidos para os diferentes isolados de *Beauveria Bassiana*, comprovam a alta homologia dessas seqüências para os isolados analisados;
- Ocorre variação nas atividades das enzimas esterase (EST) e peroxidase (PO) para isolados de *B. Bassiana*.
- A variação diferencial das enzimas EST e PO pode auxiliar na seleção de tipos mais virulentos de *B. bassiana*, correlacionando dados de patogenicidade.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura do coqueiro sofre o ataque de diversas espécies de pragas que causam danos de importância econômica, afetando o desenvolvimento das plantas jovens, a produtividade e, em casos de altas infestações, provocar a morte da planta. O gênero *Rhynchophorus* possui uma forte interação com esta cultura, estando suas espécies associadas a plantios de coco em todo o mundo. O *R. palmarum*, encontra-se presente presente no Brasil desde o século XVI (Bondar (1940).

O método de controle com inseticida químico para maioria das pragas do coqueiro tem encontrado barreiras, devido ao hábito dos insetos, pelo número reduzido de produtos registrados para cultura, pela baixa seletividade a inimigos naturais e, principalmente, ao apelo atribuído à cultura/coco verde, pelo fato de a água de coco ser reconhecida como um produto natural, rico em nutrientes e de sabor agradável.

De forma alternativa ou associada ao método de controle químico, os fungos entomopatogênicos têm sido eficientes na redução populacional das pragas e pela possibilidade de persistir no ambiente, contribuindo no controle de gerações sucessivas das pragas. No entanto, estudos visando à preservação e utilização desses patógenos ainda são incipientes.

Essa pesquisa teve o objetivo de gerar informações que subsidiassem o manejo de *B. bassiana* por meio de técnicas de autoinoculação do fungo no *R. palmarum*. Com isso, pretende-se contribuir de forma prática com uma técnica que seja eficiente, de fácil uso e baixo custo, possibilitando a redução populacional da praga sem causar impacto ao ambiente. Além disso, ficou constatada a eficiência de marcadores moleculares do tipo RAPD e microsátélites, como uma ferramenta para seleção indireta de isolados mais patogênicos e, portanto, mais eficientes para o controle biológico de pragas.

Há necessidade de continuar com trabalhos de forma conjunta com outros profissionais, estendendo-se os conhecimentos cada vez mais sobre a patogenicidade, transmissão, efetividade e viabilidade no campo e a variabilidade genética de isolados de *B. bassiana* e de outros fungos entomopatogênicos que atuem como agentes de controle microbiano de pragas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal Economic Entomology**, College Park, MD, n.18, p. 265-286, 1925.

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991, 242 p.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. 407 p.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998. p. 289–370.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares (S.A.M.) visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijão e soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.

ANDRADE, D. E. G. T., ASSIS, T. C., MICHEREFF, S. J. & MENEZES, M. Variabilidade isoenzimática entre isolados de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* de uma área de plantio de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 243-251, 1997

AZEVEDO, G. G. **Atividade de vôo e determinação do número de instares larvais em *Partamona helleri* (Friese) (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae)**, Viçosa, 1997, 64 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, UFV.

BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellites sites. **Biotechnology**, Frankfurt, n. 8, p. 930-932, 1990.

BEDFORD, G.; OCAMPO, M.; REYES, F. Mexico red ring disease and *Rhynchophorus palmarum* on coconut palms. **Plant Protection Bulletin**, Taiwan, FAO, n. 26, p. 29, 1978.

BERBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. From 18S ribosomal sequence data to evolution of morphology among the fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 677-683, 1995.

BERRETTA, M. F.; LECUONA, R. E.; ZANDOMENI, R. O.; GRAU, O. Genotyping Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with Fluorescent Labels. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 71, p. 145–150, 1998.

BEZERRA, J.; COSTA, J. de C. do B.; BASTOS, C. N.; FALEIRO, F. G. *Hypocrea stromatica* sp. nov. teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 4, p. 408-412, 2003.

BIDOCHKA, M. J.; MCDONALD, M. A.; LEGER, R. J. ST.; ROBERTS, D. W. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Current Genetics**, New York, v. 25, n. 2, p. 107-113, 1994.

BONDAR, G. **Insetos nocivos e moléstias do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no Brasil**. Salvador: Tipografia Nacional, 1940, 156 p.

BORBA, V.S. **Marcadores moleculares**. Viçosa, 2002. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL005.htm>. Acesso em: 10 de maio de 2006.

BRIDGE, P. D., ABRAHAN, Y. J., CORNISH, M. C., PRIOR, C., MOORE, D. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Mycopathology**, n. 111, p. 85-90, 1990.

BRIOSO, P. S. T. ; POZZER, L.; MONTANO, H. G.; PIMENTEL, J. P. Uso atual e futuro da Biologia Molecular na Fitopatologia. Parte I - Aplicações em fitopatógenos e vetores. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, RS, v. 9, p. 79-118, 2001.

BROWN, S. M.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; KRESOVICH, S. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. In: JAUHAR, P. P. (Ed.). **Methods of genome analysis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1996. cap. 9, p. 147-159.

BRIDGE, P. D., ABRAHAN, Y. J., CORNISH, M. C., PRIOR, C., MOORE, D. The chemotaxonomy of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates from the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Mycopathology**, n. 111, p. 85-90, 1990.

CAMARGO, T. V.; MENEZES, M.; ASSIS, T. C. Caracterização de isolados de *Fusarium moniliforme* através da análise eletroforética em gel de poliacrilamida. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, p. 254- 263, 1997.

CASTRILLO, L. A.; WIEGMANN, B. M.; BROOKS, W. M. Genetic variation in *Beauveria bassiana* populations associated with the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 73, n. 3, p. 269-275, 1999.

CASTRILLO, L. A.; BROOKS, W. M. Differentiation of *Beauveria bassiana* isolates from the Darkling Beetle, *Alphitobius diaperinus*, using isozyme and RAPD analices. **Journal of Invertebrate Pathology**, North Carolina, n. 72, p.190-196, 1998.

CAVALLI-MOLINA, S. **Variabilidade genética em populações naturais de *Relbunium hypocarpium*** (Rubiaceae). Porto Alegre: UFRGS, 1984. 231p. Tese Doutorado.

CHAPMAN, R. F. **The insects structure and function**. 3. ed. Cambridge: Harvard University Press, 1982. 919 p.

CHIKWENHERE, G.P.; VESTERGAARD, S. Potencial effects of *Beauveria bassiana* (Balsmo) Vuillemin on *Neochetina bruchi* Hustache (Coleoptera: Curculionidae), a biological control agent of water hyacinth. **Biological Control**, San Diego, v. 21, p. 105-110, 2001.

CHIN, E. C. L.; SENIOR, M. L.; SMITH, J. S. C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 5, p. 866-873, oct. 1996.

CHITTENDEN, F. H. The palm and palmetto weevils. **Entomol. Bull. U. S. Dept. Agr.**, v. 38, p. 23–28, 1902.

COLLETT, M. A.; GARCEAU, N.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. Light and clock expression of the *Neurospora* clock gene *Frequency* is deferentially driven by but dependent on *WHITE COLLAR-2*. **Genetics**, Austin, US, v. 160, p.149–158, 2002.

DISCONZI, M. A. **Identificação de genes de resistência à brusone (*Magnaporthe grisea*) em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) utilizando marcadores moleculares**. Porto Alegre, 2002. Dissertação (Mestrado)–UFRGS, 2002.

DUARTE, A. G.; LIMA, I. S. Eficiência de diferentes taxas de liberação do feromônio de agregação na captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera:

Curculionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, PR , v. 30, n. 2, p. 217–221, 2001.

EBBINGHAUS, D.; LÖSEL, P. M.; CIANCIULLI-TELLER, M. G.; LEUSCH, H.; OLSZAK, R.; PLUCIENNIK, Z.; SCHERKENBECK, J. Appeal: efficacy and mode of action of attract and kill for codling moth control. Pheromones for Insects Control in Orchards and Vineyards, **IOBC WPRS Bulletin**, Crete, Greece, v. 24, n. 2, p. 95-99, 2001.

ELLINGSON, A. R. **Insect emigration in patchy habitats**: a review of the effects of patch geometry and context. Student Review Articles Insect Behavior, Colorado: Colorado State University, (EN 507) - 1997. Disponível em: <http://www.colostate.edu/Depts/Entomology/courses/en507/papers_1997/ellingson.html>. Acesso em: 22/07/2005.

ENKERLI, J.; WIDMER, F.; KELLER, S. Long-term field persistence of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against European cockchafer larvae in Switzerland. **Biological Control**, San Diego, CA, n. 29, p. 115-123, 2004.

ENKERLI, J.; WIDMER, F.; GESSLER, C.; KELLER, S. Strain-specific microsatellite markers in the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*. **Mycological Research**, Inglaterra, GB, n. 105, p. 1079-1087, 2001.

ESSER, R. P.; MEREDITH, J. A. **Red ring nematode**. [S.l.]: Fla. Dept. Agric., 1987. (Nematol. Cir. 141).

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; MESQUITA, A. G. G.; VINHADELLI, W. S.; PAULA JÚNIOR., T. J.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Diversidade genética de isolados de *Uromyces appendiculatus*, com a utilização de marcadores moleculares RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 23, p. 386-390, 1998.

FENWICK, D. W. The effect of weevil control on the p73 incidence of red ring disease. **Journal of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago**, Port Of Spain, TT, v. 67, p. 231–244, 1967.

FALCÃO, T.M.M.A; CONTEL, E.P.B. Genetic variability in populations of Brazilian social bees: III. Electrophoretic data for ME, GPD, SOD, and IDH. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, n.1, p.61-72, 1991.

FARIA, M. R. de; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, MG, n. 22, set./out. 2001.

FERREIRA, J. M. S.; ARAÚJO, R. P. C.; SARO, F. B. **Perspectivas para o uso de fungos entomopatogênicos no controle microbiano das pragas do coqueiro**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 26).

FERREIRA, J. M. S. **Broca-do-olho-do-coqueiro ou bicudo, *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera : Curculionidae)**. Disponível em: <<http://www.cpatc.embrapa.br/index.php?idpagina=artigos&artigo=2299>>. Acesso em: 10/02/2004).

FERREIRA, J. M. S. **Proteção fitossanitária do coqueiro III: Controle de pragas no campo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1987. 23 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 7).

FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F. de. Transmissão de *Beauveria bassiana* na população de *Rhynchophorus palmarum* através do contato entre indivíduos contaminados e não contaminados. IN: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO. 5. 1996. Foz do Iguaçu. **Anais...**, Foz do Iguaçu, PR, 1996. p. 188.

FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F. de; SANTANA, D. L. de Q.; MOURA, J. I. L.; SOUZA, L. A. Pragas de coqueiro. In: FERREIRA, J. M. S.; Warwick, D. R. N. Siqueira, L. A. (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Serviço de Produção de Informação; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1998. 189-267 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1996. 204 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 20).

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998, 220 p.

FOULY, H.; WILKINSON, H. T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. **Mycologia**, New York, v. 89, p. 590-597, 1997.

FRANCO, E. **Estudos sobre o anel vermelho do coqueiro**. Aracaju: Inspetoria de Defesa Sanitária Vegetal, 1964. 236 p.

FURLONG, M. J.; PELL, J. K.; CHOO, O. P.; RAHMAN, S. A. Field and laboratory evaluation of a sex pheromone trap for the autodissemination of the fungal entomopathogen *Zoophthora radicans* (Entomophthorales) by the diamond-back moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 85, p. 331-337, 1995.

GARCIA, F. R. M.; CORSEUIL, E. Influência de fatores climáticos sobre moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em pomares de pessegueiro em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, RS, v. 5/6, n. 1, p. 71-75, 1998/99.

GEORGHIO, G. P. Insecticide resistance and prospects for its management. **Residue Reviews**, Berlin, n. 76, p. 131-145, 1980.

GEORGHIO, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIO, G. P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest Resistance to Pesticides**. New York: Plenum Press, 1983.p. 769-792.

GIBLIN-DAVIS, R. M.; OEHLISCHLAGER, A. C.; PEREZ, A.; GRIES, G.; GRIES, R.; WEISSLING, T. J.; CHINCHILLA, C. M.; PENA, J. E.; PENA, R. H. X.; PIERCE JR., H. D. ;GONZALEZ, L. M. Chemical and behavioral ecology of palm weevils (curculionidae: rhynchophorinae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 79, n. 2, p.153 - 167, 1996.

GILES, P. H. Observation in Kenya on the flight activity of stored products insects, particularly *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 4, p. 317-329, 1969.

GOTTLIEBL, D., Conservation and duplication of isozymes in plants. **Science**, v. 216, p. 373-380, 1982.

GRAÇA, R.N. **Marcadores moleculares**. Viçosa, 2002. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL006.htm> Acesso em: 10 de maio de 2006.

GRIFFITH R. Red ring disease of coconut palm. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 2, p. 193-196, 1987.

GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, Bangalore, v. 70, n. 1, p. 45-54, jan. 1996.

HAGLEY, E. On the life history and habits of the palm weevil *R. palmarum* L.. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, n. 58, v. 1, p. 22-28, 1965.

HAJEK, A. E.; LEGER, R. J. ST. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 293-322, 1994.

HEARNE, C. M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 8, p. 288-294, 1992.

HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Identification and differentiation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using Polymerase Chain Reaction and single-strain conformation polymorphism analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 67, p. 289-299, 1996a.

HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* within infected migratory grasshoppers (*Melanoplus sanguipines*) using polymerase chain reaction and DNA probe. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 67, p. 21-27, 1996b.

HERNANDEZ, J. V.; CERDA, H.; JAFFE, K.; SANCHEZ, P. Localización hospedera, actividad diaria y optimización de la captura del picudo del cocoreto *R. palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae), mediante trampas inócuas. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 42, n. 3-4, p. 211-225, 1992.

HEARD, T. A.; HENDRIKZ, J. K. Factors influencing flight activity of colonies of the stingless bee *Trigona carbonaria* (Hymenoptera, Apidae). **Australian Journal of Zoology**, Vivtoria, v. 41, n. 4, p. 343-353, 1993.

HERNANDEZ, J. V.; CERDA, H.; JAFFE, K.; SANCHEZ, P. Localización hospedera, actividad diaria y optimización de la captura del picudo del cocoreto *R. palmarum* L. (coleoptera: curculionidae), mediante trampas inócuas. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 42, n. 3-4, p. 211-225, 1992.

HICKS, B. J.; WATT, A. D.; COSENS, D. The potencial of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) as a biological control agent against the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 149, p. 275-281, 2001.

HILÁRIO, S. D., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT, A. de M. P. Flight activity and colony strength in the stingless bee *Melipona bicolor bicolor* (Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 60, n.2, p. 299-306, 2000.

HUNTER, R. L. & MARKERT, C; L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, v. 125, p. 1294-1295, 1957.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=10>> Acesso em: 10/07/2006 – informações de 2004).

JACKSON, D. M.; BROWM, G. C.; NORDIN, G. I.; JOHSON, D. W. Autodissemination of a baculovirus for management of tobacco budworms (Lepidoptera: Noctuidae) on tobacco. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 710-719, 1992.

KARAVEIA, P. Trivial movement and foraging by crop colonizers. In: KOGAN, M. (Ed.). **Ecological theory and integrated pest management practice**. New York: Wiley-Interscience Publication, 1986. p. 59–82.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, London, v. 78, n. 2, p. 143-149, 1996.

KESSELI, R.V.; MICHELMORE, R.W. Genetic variation and phylogenesis detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. **The Journal of Heredity**, v.77, n.5, p.324-331, 1986.

LACEY, L. A.; AMARAL, J. J.; COUPLAND, J.; KLEIN, M. G. The influence of climatic factors on the flight activity of the Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae): Implications for use of a microbial control agent. **Biological Control**, San Diego, v. 4, p. 298-303, 1994.

LEWIN, B. GENOMES. In: **GENES VI**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 645-662.

LEWONTIN, R. C. **The genetic basis of evolutionary change**. Columbus Univ. Press, New York, 346 p., 1974.

LIMA, M. F. DE; FERREIRA, J. M. S.; SANTANA, D. L. Q. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de *Beauveria bassiana* (Cepa 032/CPATC), na mortalidade de adultos de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). IN: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5., Foz do Iguaçu, 1996. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR, 1996. p. 300.

LIMA, J. A. S.; MARTINS, L. S. S.; TAVARES, S. C. C. Caracterização isoenzimática de quinze isolados de *Botryodiplodia theobromae* Pat. Provenientes de diferentes hospedeiros. **Fitopatologia Brasileira**, n. 22, p. 322-327, 1997.

McGUIRE M. R.; ULLOA M.; PARK, Young-Hoon; HUDSON, N. Biological and molecular characteristics of *Beauveria bassiana* isolates from California *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) populations. **Biological Control**, San Diego, n. 33, p. 307-314, 2005.

MARCANO, D. A. de; MARCANO, A. J.; MORALES, M.; MARCANO, de D. A. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* to adults of sweet potato weevil *Cylas formicarius elegantulus* Summers (Curculionidae). **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo: Universidad del Zulia, v. 16, n. 1, p. 52-63, 1999.

MARQUES, E. J. Controle microbiano de cigarrinhas (Hemiptera: Cercopidae) com *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Soroz.: eficiência e limitações. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia. **Anais...** Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1992. p. 242.

MARQUES, E. K.; IKUTA, N.; LUNGE, V. R.; FONSECA, A. S. K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, A. M.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agropecuária**. Caixas do Sul: EDUCS, 2002. p. 101-130.

MCDONALD, B. A.; MCBERMOTT, J. M.; GOODWIN, S. B.; ALLARD, R. W. The population biology of host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, p. 77-94, 1989.

MCGUIRE, M. R.; ULLOA, M.; PARK, Y. H.; HUDSON, N. Biological and molecular characteristics of *Beauveria bassiana* isolates from California *Lygus Hesperus* (Hemiptera: Miridae) populations. **Biological Control**, San Diego, v. 33, p. 307-314, 2005.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141 p.

MIRANDA, E. E. de; LECOQ, M.; PIEROZZI JÚNIOR, I.; DURANTO, Jean-François; BATISTELLA, M. **Meio ambiente e gafanhotos pragas no Brasil**. Campinas, SP: Embrapa Monitoramento por Satélite, [1996]. Relatório final. Disponível em: <http://www.gafanhotos.cnpm.embrapa.br>. Acesso em: 22/07/2005.

MORALES, J. L., CHINCHILLA, C. Picudo de la palma y enfermedad del millo rojo/hoja pequena en uma plantación comercial em Costa Rica. **Rurrialba**, Costa Rica, v. 40, p. 478-485, 1990.

MORCHEN, M.; CUGUEN, J.; MICHAELIS, G.; HANNI, C.; SAUMITOU LAPADRE, P. Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, n. 3-4, p. 226-333, apr. 1996.

MORIN, J.; LUCHIANI, de F.; ERREIRA, J. M. S.; FRAGA, L. S. Control de *R. palmarum* mediante trampas p73 contruidas por pedazos de palma. **Oleagineux**, Paris, v. 41, n. 2, p. 91-63, 1986.

MOURA, J. I. L.; RESENDE, M. L. V.; LIMA, M. F. de; SANTANA, D. L. de Q. **Táticas para o controle integrado de *R. palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae)**. Ilhéus: CEPLAC, 1991, 16 p.

MOURA, J. I. L.; RESENDE, M. L. V. de; SGRILLO, R. B.; NASCIMENTO, L. A.; ROMANO, R. Diferentes tipos de armadilhas e iscas no controle de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae). **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 2, n. 3, p. 165-169, 1990.

MOURA, J. I. L.; VILELA, E. F.; FERREIRA, J. M. S. Uma trampa con feromona para el control de *Rhynchophorus palmarum* em palma africana. **Manejo Integrado de Plagas**, Costa Rica, v. 50, p. 55-59, 1998.

MOSS, D.W. **Isoenzymes**. Capman & Hall: London & New York, 1982, 200 p.

MÜLLER, A. A.; SOUZA, L. A.; SILVA, A. B.; OHASHI, O. S.; PAULO, R. B. **Monitoramento da população do besouro *Rhynchophorus palmarum* em dendezaís no município de Igarapé-Açu**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 1998. 4 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Pesquisa em Andamento, 198).

MULOCK, B. S; CHANDLER, L. D. Effect of *Beauveria bassiana* on the Fecundity of Western corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biological Control**, San Diego, v. 22, p. 16-21, 2001a.

MULOCK, B. S; CHANDLER, L. D. *Beauveria bassiana* transmission in western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Canadian Entomologist**, Ottawa, n. 133, p. 105-107, 2001b.

NOUR, S. M.; CLEYET-MAREL, J. C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M. P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chick-peas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rizobium mediterraneum* sp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 640-648, 1995.

OEHSCHLAGER, A. C.; MCDONALD, R. S.; CHINCHILA, C. M.; PATSCHKE, S. N. Influence of a pheromone-based mass-trapping system on the distribution of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) in oil palm. **Environmental Entomology**, College Park, v. 24, n. 5, p.1005-1012, 1995.

OEHSCHLAGER, A. C.; PIERCE, H. D.; MORGAN, B.; WINALARATNE, P. D. C.; SLESOR, K. N.; KING, G. S.; GRIWES, G.; GRIES, R.; BORDEN, J. H.; JIRON, L. F.; CHINCHILLA, C. M.; MEXON, R. Chirality and field testing of rhynchophorol, the aggregation pheromone of the american palm weevil. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 79, p. 134-135, 1992.

OLIVEIRA, V. M.; COUTINHO, H. L. C.; SOBRAL, B. W. S.; GUIMARÃES, C. T.; van ELSAS, J. D.; MANFLIO, G. P. Discrimination of *rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, p. 137-141, 1999.

Parra, J.R.P. 1991. Consumo e utilização de alimento por insetos. p. 9-65. In A.R. Panizzi & J.R.P. Parra (eds.) **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 359 p.

PELL, J. K.; MACAULAY, E. D. M.; WILDING, N. A pheromone trap for dispersal of the pathogen *Zoophthora radicans* Brefeld. (Zygomycetes: Entomophthorales) amongst populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (*Lepidoptera: Yponomeutidae*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 3, p. 315-320, 1993.

PIZZAMIGLIO, M. A. Ecologia da interação inseto planta. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). **Ecologia Nutricional de Insetos e suas Implicações no Manejo de Pragas**. São Paulo: Manole, 1991. p. 101 – 130

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

POSADA, F. **Manejo de vectores insectiles del anillo rojo en palma africana**. In: SEMINARIO SOBRE PROBLEMAS FITOSSANITARIOS DE LA PALMA AFRICANA, 6., 1988, Colombia. **Anais...** Colombia: IICA; BID; PROCIANDINO, 1988. p. 42-56.

RATH, A. C. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 563-581, 2000.

REGNIERE, J.; SHAROV, A. Simulating temperature-dependent ecological processes at the sub-continental scale: male gypsy moth flight phenology as an example. **International Journal of Biometereology**, Ottawa, n. 42, p. 146 – 152, 1999.

REHNER, S. A.; BUCKLEY, E. P. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, p. 409-411. 2003.

REZENDE, V. F. **Análise genética resistência à antracnose foliar em milho**. Piracicaba, 2004. 103 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RIBA, G. & SILVY, C. **Combattre les ravageurs des cultures. Enjeux et perspectives**. Paris: INRA, 230 p., 1989.

RISTAINO, J. B.; MADRITCH, M.; TROUT, C. L.; PARRA, G. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 948-954, 1998.

ROCHAT, D.; MALOSSE, C.; LETTERE, M.; DUCROT, P.; ZAGATTI, P.; RENO, M.; DESCOINS, C. Male-produced aggregation pheromone of the american palm weevil *R. palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae): Collection, identification, electrophysiological activity and laboratory bioassay. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 17, n. 11, p. 2127-2141, 1991.

ROHLF, F. J. **Numeral taxonomy and multivariate analysis system – version 2.10**. New York: [s.n.], 2000.

SÁNCHEZ, P. A.; LAFFÉ, K.; HERNANDEZ, J. V.; CERDA, H. Biología y comportamiento del picudo del cocotero *R. palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Boletim de Entomologia Venezuelana**, Maracay, v. 8, n. 1, p. 83-93, 1993.

SANTANA, D.L.Q.; LIMA, M.F. de Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a adultos de *Rynchophorus palmarum* (L.). In: SIMPÓSIO DE

CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia. **Anais...** Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 1992. p. 242.

SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationship using RAPD marker data. In: INTERNATIONAL UNION OF FORESTRY RESEARCH ORGANIZATIONS. **Proceedings of IUFRO International Conference**, Cali: Breeding tropical trees, 1992. p.26-30 (Section 202-08).

SEARLE, T.; DOBERSKI, J. Na investigação de um fungo entomogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. como agente de controle biológico de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 17-23, 1984.

SEPLANTEC - SUPERINTENDENCIA DE RECURSOS HIDRICOS DO ESTADO DE SERGIPE. Análise sazonal. Disponível em: <<http://www.seplantec-srh.se.gov.br>> Acesso em 12 maio 2006.

SHIRAI, Y.; KOSUGI, Y. Flight activity of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 35, n. 4, p. 459-466, 2000.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO, J. C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 27-32, 2002.

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; NOVA, N. A. V. **Manual de ecologia dos insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419 p.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal adults. **Biochemical J.**, n. 61, p. 629-641, 1955.

SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. da S.; SALES, N. de L. P. Caracterização morfológica e isoenzimática de isolados de *Pisolithus* spp. **CERNE**, v. 07, n. 2, p. 022-034, 2001.

SUMOVA, A.; SLADEK, M.; JAC, M.; ILLNEROVA, H. The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in day length. **Brain Research**, Amsterdam, v. 947, p. 260-270, 2002.

ST. LEGER, R. J.; MAY, B.; ALLEE, L. L.; FRANK, D. C.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D. W. Genetic differences in allozymes and in formation of infection

structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisoplae*. **Journal Invertebrate Pathology**, n. 65, p. 206-210, 1995.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, London, v. 322, p. 652-656, aug. 1986.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. G. G. C.; MACHADO J. C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 29, p. 651-655, 2004.

VAIL, P. V.; HOFFMANN, D. F.; STEVEN TEBBETS, J. Autodissemination of *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) granulosis virus by healthy adults. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 29, p. 71-74, 1993.

VARGAS, L. R. B.; ROSSATO, M.; RIBEIRO, R. T. S.; BARROS, N. M. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 1, p.13-19, 2003.

VEEN, K. H. **Recherches sur la maladie, due a *Metarhizium anisoplae*, chez criquet pelerin**. Wageningen: [s.n.], 1968. 77 p. (Commucation, 150).

VÉRAS, S. M. de, GASPAROTTO, L. & MENEZES, M. Avaliação isoenzimática de *Colletotrichum guaranicola*. **Fitopatologia Brasileira**, n. 22, p. 323-330, 1997.

VIEIRA, M.G.C.G. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. Lavras: UFLA, 1996,127 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras.

WAN, H. **Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformation**. 2003. 147 f. Tese (Doutorado) – University of Heidelberg, Germany, 2003.

WANG, C.; SHAH, F. A.; PATEL, N.; LI, Z.; BUTT, T. M. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 10, p. 908-915, 2003.

WANG, C.; FAN, M.; LI, Z.; BUTT, T.M. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China. **Journal Application Microbiology**, v. 96, n. 4, p. 861-70, 2004.

WATTANAPONGSIRI, A. **A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis***. Bangkok: Depart. Agric. Sc. Bul., 1966. v. 1, 185 p.

WEISLING, T. J.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; CENTER, B. J.; HIYAKAWA, T. Flight behavior and seasonal trapping of *Rhynchophorus cruentatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 87, n. 5, p. 641-647, 1994.

WEISLING, T. J.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; SCHEFFRAHN, R. H. Laboratory and field evidence for male-produced aggregation pheromone in *Rhynchophorus cruentatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, p. 1195-1203, 1993.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WENKS, P. Bionomics of adult blackflies. In: LAIRD, M. (Ed.). **Blackflies: the future for biological methods in integrated control**. New York: Academic Press, 1981. p. 259-276.

WENZEL, I. M.; BATISTA FILHO, A.; TAKADA, A. G.; CARVALHO, A. G.; LEITE, L. G.; ALMEIDA, J. E. M.; RODRIGUES, L. T. B. Avaliação da patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* e *Metharzhizium anisopliae* sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, 2003. Artigo apresentado na 16ª Reunião Anual do Instituto Biológico, 2003.

WESELOH, R. M. Effect of conidial dispersal of the fungal pathogen *Entomophaga maimaiga* (Zygomycetes: Entomophthorales) on survival of its gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) host. **Biological Control**, San Diego, v. 29, p. 138-144, 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. C. DNA polymorphisms amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. AND WHITE T.J. (Eds.) **PCR Protocols - A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, London, 1990, 315 – 322 p..

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**, 2002, 130 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2002.

ZIMMERMAN, G. The entomopathogenic fungus *Mearhizium anisopliae* and its potencial as a biocontrol agent. **Pesticide Science**, v. 37, p. 375 – 379, 1993.

YASUDA, K. Auto-infection system for the sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) with entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* using a modified Sex pheromone trap in the field. **Applied Entomology and Zoology**, Tokio, v. 34, n. 4, p. 501-505, 1999.