

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

HULLY MONAÍSY ALENCAR LIMA

Criação de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) em dietas artificiais e controle utilizando fungos entomopatogênicos

Rio Largo

2014

HULLY MONAÍSY ALENCAR LIMA

Criação de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) em dietas artificiais e controle utilizando fungos entomopatogênicos

Defesa da Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Proteção de Plantas.

Orientador: Prof. Dr. Ivanildo Soares de Lima

Coorientadores: Prof^a Dr^a Adriana Guimarães Duarte

Dr. Aldomario Santo Negrisoni Junior

Rio Largo

2014

Folha de Aprovação

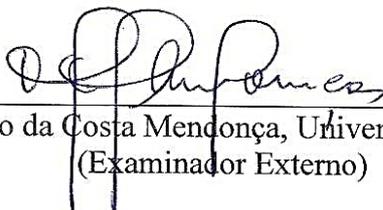
HULLY MONAÍSY ALENCAR LIMA

Criação de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) em dietas artificiais e controle utilizando fungos entomopatogênicos / Tese de doutorado em Proteção de Plantas, da Universidade Federal de Alagoas, na forma normalizada e de uso obrigatório.

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 19 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. Ivanildo Soares de Lima, Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Banca examinadora:



Prof. Dr. Marcelo da Costa Mendonça, Universidade Tiradentes/SE
(Examinador Externo)

Dr^a Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrisoli, Universidade Federal de Alagoas
(Examinador Externo)

Prof^a Dr^a Roseane Cristina Prêdes Trindade, Universidade Federal de Alagoas
(Examinador Interno)

Dedico aos meus pais, **Eronildes Gusmão Lima** (*in memoriam*) e **Cristina Lúcia Lins de Alencar**, e ao meu irmão, **Haddallas Henrique Alencar Lima**, pelo incentivo aos estudos, dedicação, carinho, credibilidade, estímulo e por terem dado exemplo e base sólida para vencer

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, proteção e por iluminar o meu caminho ao longo desta jornada;

Ao Prof. Dr. Ivanildo Soares de Lima, pelos ensinamentos, oportunidade e apoio para realização deste trabalho;

Aos coorientadores Prof^ª Dr^ª Adriana Guimarães Duarte e Dr. Aldomario Santo Negrison Junior, pela confiança, ensinamentos e importante colaboração na condução e desenvolvimento deste trabalho;

À Prof^ª Dr^ª Edna Peixoto da Rocha Amorim, pela colaboração na execução dos trabalhos e contribuição ao realizar as correções;

Aos Profs. Drs. Roseane Cristina Prêdes Trindade e Marcelo Menezes Costa Mendonça, e às Drs^ª Carla Ruth de Carvalho Barbosa Negrison e Alice Maria Nascimento de Araújo, pela contribuição ao realizar as correções e sugestões;

Aos Profs. Drs. Iraildes Pereira Assunção e Gaus Silvestre de Andrade Lima pelo apoio, conselhos e amizade;

Ao Ítalo William Bezerra França, da empresa Fitoagro Controle Biológico, pela concessão de um dos isolados fúngicos utilizados no trabalho;

À Embrapa Tabuleiros Costeiros pela concessão de alguns isolados fúngicos utilizados no trabalho;

Ao Maciel, funcionário da Secretaria de Agricultura de Feliz Deserto-AL, pelo apoio nas coletas dos insetos;

À Mariana de Macedo Costa e ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo pela colaboração na etapa do trabalho realizada na Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo para realização do curso;

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Proteção de Plantas do Centro de Ciências Agrárias, pelos ensinamentos;

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, Geraldo de Lima, Marcos Antonio Lopes e Michele Cristina pela ótima convivência;

Aos amigos Vanessa de Melo Rodrigues, Maria Quiteria Cardoso dos Santos e Anderson Rodrigues Sabino pela amizade e grande apoio dado ao trabalho;

Aos que fazem parte do Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos, em especial aos amigos Lud'milla Monique Dorvillé, Daniel Silva Torres, Rui Fernando da

Silva, Fábio Francisco da Silva e Luanda Emely, por todo apoio, amizade e ótima convivência;

Aos colegas e amigos da pós-graduação, Maria Erika Francisca Sales, Juliana Ferreira de Lima, Ellen Carine Neves Valente, Paulo Nogueira de Barros, Núbia Lima dos Santos, Joseani Castro da Silva, Jaqueline Figueiredo de Oliveira, Deyse Ferreira Rocha, Danilo César Oliveira, Wellington Costa da Silva, Jorge Portella, Izael Oliveira Silva, Nelson Augusto do Nascimento Junior, Débora Teresa Ferreira, Márcia Daniela dos Santos, Clemens Rocha Fortes, Maria Lausanne Damasceno, Jakeline Maria dos Santos, Djison Silvestre dos Santos, Emerson dos Santos Ferreira e Andrezo Adenilton Santos, pelo excelente convívio durante a realização do curso.

RESUMO

Dentre os insetos-praga que causam danos econômicos a cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), a broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) destaca-se por ocasionar danos durante as diferentes fases de desenvolvimento da planta. O presente estudo teve como objetivos: estudar os parâmetros biológicos qualitativos e quantitativos de *R. palmarum* em duas dietas artificiais; e verificar a sua susceptibilidade a fungos entomopatogênicos. Na fase de ovo, foi determinado o período de incubação (dias) e a fertilidade (%). Para a fase larval foi calculada a viabilidade total e a viabilidade por ínstar (%), duração dos ínstars larvais e a duração total do período larval (dias), a largura da cápsula cefálica (mm) e o peso (g) das larvas nas duas dietas (A e B). Determinou-se a duração das fases de pré-pupa e pupa (dias), o peso (g), viabilidade (%) e a ocorrência de deformações (%) nas pupas. Após a emergência dos adultos de *R. palmarum*, foi calculada a razão sexual e observada a porcentagem de adultos defeituosos, o peso (g) e comprimento (mm) dos machos e fêmeas das duas dietas. Após a formação dos casais, foram determinados os períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição (dias), fecundidade total e diária, longevidade dos machos e das fêmeas (dias), e duração do ciclo biológico (dias). Foi calculada a absorvância das amostras dos adultos de *R. palmarum* provenientes das duas dietas artificiais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e todas as variáveis das duas dietas artificiais foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de significância. Em um segundo experimento, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹) dos isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, do isolado T9 de *Trichoderma harzianum* Rifai e do produto comercial Boveril[®] sobre adultos de *R. palmarum*. Os dados obtidos de mortalidade confirmada foram submetidos à análise da variância (ANOVA), utilizando o Proc ANOVA do SAS, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para determinar a porcentagem de sobrevivência, os dados de mortalidade confirmada foram submetidos ao teste de Log-Rank, através do método Kaplan-Meier. Posteriormente, os valores da CL₅₀ e TL₅₀ foram estimados submetendo os dados de mortalidade confirmada à análise de Probit. A dieta A proporcionou uma maior viabilidade de larvas e pupas de *R. palmarum*. A porcentagem de pupas deformadas na dieta B foi maior em relação à dieta A. O período de oviposição das fêmeas provenientes da dieta A foi de 32,4 dias. Em relação ao teor de lipídios de *R. palmarum*, os machos adultos da dieta B, apresentaram maiores médias de absorvância, enquanto as fêmeas da dieta B apresentaram valores menores. O produto comercial Boveril[®] e os isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 provocaram a mortalidade confirmada de 40, 36, 64 e 52% dos adultos de *R. palmarum*, respectivamente, para a concentração 10^9 conídios.mL⁻¹, não diferindo da concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, onde o isolado CPATC 032 ocasionou mortalidade de 52% dos insetos, que por sua vez não diferiu do isolado CPATC 057, o qual apresentou 44% de mortalidade confirmada dos adultos. O isolado CPATC 032 apresentou maior virulência e menor CL₅₀, estimando-a em $1,11 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹; enquanto o TL₅₀ para as concentrações 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ foi de 17,61 dias e 17,25 dias, respectivamente.

Palavras-chave: *Cocos nucifera*. Broca-do-olho-do-coqueiro. Biologia. Metabolismo de lipídios. Controle biológico.

CREATION OF *Rhynchophorus palmarum* (LINNAEUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) IN ARTIFICIAL DIETS AND CONTROL USING FUNGI ENTOMOPATHOGENIC

ABSTRACT

Among the insect-pests that cause economic damage to the culture of coconut (*Cocos nucifera* L.), the giant palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) stands out for damage in different stages of development of the plant. This study aimed to: study the qualitative and quantitative biological parameters of *R. palmarum* in two artificial diets; and verify their susceptibility to entomopathogenic fungi. At the egg stage, it was determined the incubation period (days) and fertility (%). For the larval stage was calculated total viability and the viability for instar (%), duration of larval instars and the total duration of the larval period (days), the width of the head capsule (mm) and weight (g) of the larvae in two diets (A and B). Was determined the duration of the phases of pre-pupae and pupae (day), weight (g), viability (%) and the occurrence of deformation (%) in the pupa. After the emergence of adult *R. palmarum*, we calculated the sex ratio and observed the percentage of defective adults (%), weight (g) and length (mm) of males and females of two diets. After the formation of the couples were certain periods of pre-oviposition, oviposition and post-oviposition (days), total and daily fertility, longevity of males and females (days), and duration of the cycle (days). The absorbance of samples was calculated from adult *R. palmarum* from the artificial diets. The experimental design was completely randomized and all variables of the two artificial diets were submitted to analysis of variance (ANOVA) and means compared by t-test at 5% significance level. In a second experiment, the effect of different concentrations (10^7 , 10^8 and 10^9 conidia.mL⁻¹) of isolates IBCB 66, CPATC 032 and CPATC 057 of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, isolated T9 *Trichoderma harzianum* Rifai and commercial product Boveril® on adult *R. palmarum*. The data of confirmed mortality were submitted to analysis of variance (ANOVA) using the Proc ANOVA of SAS, and the means compared by Tukey test at 5% probability. To determine percentage survival, confirmed mortality data were subjected to Log-Rank test using the Kaplan-Meyer method. Subsequently the values of LC₅₀ and LT₅₀ were estimated submitting mortality confirmed the Probit analysis. The diet A promoted a more viable larvae and pupae of *R. palmarum*. The percentage of deformed pupae in the diet B was higher in relation to diet A. The period oviposition of females from the diet A was 32.4 days. Regarding the lipid content of *R. palmarum* the adult male diet B, have the highest mean absorbance, while females diet B showed lower values. The commercial product Boveril® and isolated IBCB 66, CPATC 032 and CPATC 057 caused the confirmed mortality of 40, 36, 64 and 52% of *R. palmarum* adults, respectively, for the concentration 10^9 conidia.mL⁻¹ did not differ concentration of 10^8 conidia.mL⁻¹, where the isolated CPATC 032 caused mortality of 52% of the insects, which in turn did not differ isolated CPATC 057, which showed 44% confirmed mortality of adults. The isolated CPATC 032 showed higher virulence and lower LC₅₀, estimating it in $1,11 \times 10^9$ conidia.mL⁻¹; while the LT₅₀ in concentrations 10^8 and 10^9 conídios.mL⁻¹ was 17.61 days and 17.25 days, respectively.

Keyword: *Cocos nucifera* L. Giant palm weevil. Biology. Metabolism of lipids. Biological control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Dimorfismo sexual nos adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . Presença de pelos no rosto do macho (A) e ausência dos pelos no rosto das fêmeas (B).....	19
Figura 2 -	Processo de infecção de um fungo entomopatogênico.....	26
Figura 3 -	Ovo de <i>Rhynchophorus palmarum</i> coletado do tolete de cana-de-açúcar (A); e ovo individualizado na placa de Petri forrada com papel filtro umedecido com água destilada (B).....	47
Figura 4 -	Mudança do substrato alimentar de <i>Rhynchophorus palmarum</i> a partir do 10º ínstar: (A) Larva se alimentando no interior da cana-de-açúcar; (B) Larva habitando o interior do colmo da cana-de-açúcar juntamente com a fibra de coco; e (C) Formação do casulo.....	48
Figura 5 -	Fases de pré-pupa (A), pupas (B e C) e início da fase adulta (D) de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . (Temp. $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$).....	49
Figura 6 -	Etapas para a quantificação do teor de lipídios de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> : A – inseto dissecado; B – amostra macerada para homogeneização; C - amostras prontas para evaporação do solvente; D - tubos de ensaio em “banho-maria”; E – amostras contendo a solução estoque; e F – amostras colocadas em microplacas para medir a absorbância.....	52
Figura 7 -	Ovos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . (Temp. $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).....	53
Figura 8 -	Média \pm EP da porcentagem de larvas de <i>Rhynchophorus palmarum</i> que passaram pelo 11º, 12º e 13º ínstar, criadas nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).....	55
Figura 9 -	Desenvolvimento larval de <i>Rhynchophorus palmarum</i> : A (1º ínstar); B (2º ínstar); C (3º ínstar); D (4º ínstar); E (5º ínstar); F (6º ínstar); G (7º ínstar); H (8º ínstar); I (9º ínstar); J (10º ínstar); K (11º ínstar); L (12º ínstar) e M (13º ínstar). (Temp. $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).....	56
Figura 10 -	Fase de pré-pupa de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . (Temp. $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).....	61
Figura 11 -	Alterações na coloração da pupa de <i>Rhynchophorus palmarum</i> durante o seu desenvolvimento. (Temp. $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h)..	62
Figura 12 -	Adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> com deformações nas asas (A e B) e fêmea com o ovipositor exposto (C). (Temp. $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).....	64

Figura 13 - Média da absorbância \pm EP das amostras dos adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> provenientes das dietas artificiais (A e B) em comprimento de onda de 540 nm.....	66
Figura 14 - Armadilhas instaladas para coleta de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> (A e B); e insetos capturados dentro da armadilha (C).....	77
Figura 15 - Imersão dos colmos de cana-de-açúcar na suspensão dos fungos entomopatogênicos: IBCB 66 (A), CPATC 032 (B), CPATC 057 (C), Boveril [®] (D) e T9 (E).....	80
Figura 16 - Adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> em contato com os colmos de cana-de-açúcar tratados pelos fungos entomopatogênicos.....	80
Figura 17 - Assepsia dos insetos com Hipoclorito de Sódio (2%) (A), água destilada (B) e, posteriormente, colocados em BOD (C).....	81
Figura 18 - Evolução da infecção de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> pelos isolados do fungo <i>Beauveria bassiana</i> e pelo produto comercial Boveril [®] (A) e <i>Trichoderma harzianum</i> (B). (Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas artificiais para criação de <i>Rhynchophorus palmarum</i> em laboratório. Dieta A: adaptada por Negrisola Junior et al. (2011), modificada de Sánchez et al. (1993); e dieta B: modificada de Negrisola Junior et al. (2011).....	45
Tabela 2 -	Composição da dieta líquida para adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> desenvolvida por Negrisola Junior et al. (2011).....	46
Tabela 3 -	Média ± EP ¹ do período de incubação (dias) e da fertilidade dos ovos (%) de <i>Rhynchophorus palmarum</i> criados nas dietas A e B. (Temp. 27 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 h).....	54
Tabela 4 -	Média ± EP ¹ da viabilidade larval total e por ínstar de <i>Rhynchophorus palmarum</i> criados nas dietas A e B. (Temp. 27 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 h).....	55
Tabela 5 -	Média ± EP ¹ da duração da fase larval e dos ínstars (dias) de <i>Rhynchophorus palmarum</i> criadas nas dietas A e B. (Temp. 27 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 h).....	57
Tabela 6 -	Média ± EP ¹ da largura da cápsula cefálica (mm) dos diferentes ínstars de <i>Rhynchophorus palmarum</i> criados nas dietas A e B. (Temp. 27 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 h).....	59
Tabela 7 -	Média ± EP ¹ do peso (g) dos diferentes ínstars larvais de <i>Rhynchophorus palmarum</i> criados nas dietas A e B. (Temp. 27 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 h).....	60
Tabela 8 -	Média ± EP ¹ da duração das fases de pré-pupa e pupa (dias), da viabilidade e deformações (%), e do peso (g) das pupas de <i>Rhynchophorus palmarum</i> criadas nas dietas A e B. (Temp. 27 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 h ²).....	61
Tabela 9 -	Parâmetros biológicos ± EP ¹ de <i>Rhynchophorus palmarum</i> criados nas dietas A e B. (Temp. 27 ± 2°C, UR 70 ± 10% e fotofase de 12 h).....	64
Tabela 10 -	Procedência dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> e do produto comercial Boveril [®] utilizados nos experimentos com <i>Rhynchophorus palmarum</i>	78
Tabela 11 -	Média ± EP ¹ da viabilidade (%) dos conídios dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> e do produto comercial Boveril [®]	83
Tabela 12 -	Média ± EP ¹ da mortalidade confirmada (%) de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> alimentados Mcom cana-de-açúcar tratada com fungos entomopatogênicos nas concentrações de 10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹ conídios.mL ⁻¹ . (Temp. 26 ± 1°C, UR 60 ± 10% e fotofase de 12 h).....	85

Tabela 13 - Média \pm EP ¹ da sobrevivência (dias) de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> alimentados com cana-de-açúcar tratada com fungos entomopatogênicos nas concentrações de 10 ⁷ , 10 ⁸ e 10 ⁹ conídios.mL ⁻¹ . (Temp. 26 \pm 1°C, UR 60 \pm 10% e fotofase de 12 h).....	88
Tabela 14 - Estimativa da Concentração Letal (CL ₅₀) para os fungos entomopatogênicos sobre adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . (Temp. 26 \pm 1°C, UR 60 \pm 10% e fotofase de 12 h).....	89
Tabela 15 - Estimativa do Tempo Letal (TL ₅₀) para os fungos entomopatogênicos na concentração 10 ⁸ conídios.mL ⁻¹ sobre adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> (Temp. 26 \pm 1°C, UR 60 \pm 10% e fotofase de 12 h).....	90
Tabela 16 - Estimativa do Tempo Letal (TL ₅₀) para os fungos entomopatogênicos na concentração 10 ⁹ conídios.mL ⁻¹ sobre adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> . (Temp. 26 \pm 1°C, UR 60 \pm 10% e fotofase de 12 h).....	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 A cultura do coqueiro	17
2.1.1 Origem e importância econômica	17
2.2 Aspectos gerais sobre <i>Rhynchophorus palmarum</i>	18
2.2.1 Plantas hospedeiras	18
2.2.2 Distribuição geográfica	19
2.2.3 Descrição e biologia	19
2.2.4 Hábitos e danos	20
2.2.5 Métodos de controle	21
2.3 Aspectos gerais sobre controle biológico com entomopatógenos	23
2.4 Aspectos gerais sobre nutrição de insetos e dietas artificiais	27
2.4.1 Necessidades nutricionais dos insetos	27
2.4.2 Criação de insetos em dietas artificiais	28
2.4.3 Composição das dietas artificiais	30
REFERÊNCIAS	33
3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>Rhynchophorus palmarum</i> (LINNAEUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM DIETAS ARTIFICIAIS	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.2.1 Local e instalações	45
3.2.2 Preparo das dietas	45
3.2.3 Criação de <i>Rhynchophorus palmarum</i> em dietas artificiais	47
3.2.4 Teor de lipídios dos adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	50
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.3.1 Caracterização, período de incubação e fertilidade dos ovos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	53
3.3.2 Caracterização, duração e viabilidade da fase larval de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	54
3.3.3 Caracterização, duração e viabilidade das fases de pré-pupa e pupa de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	61
3.3.4 Parâmetros biológicos da fase adulta de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	63
3.3.5 Determinação do teor de lipídios em <i>Rhynchophorus palmarum</i>	66
3.4 CONCLUSÕES	68

REFERÊNCIAS	69
4 SUSCEPTIBILIDADE DE <i>Rhynchophorus palmarum</i> (LINNAEUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	73
RESUMO	73
ABSTRACT	74
4.1 INTRODUÇÃO	75
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	77
4.2.1 Local e instalações	77
4.2.2 Coleta de adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	77
4.2.3 Origem dos fungos entomopatogênicos	78
4.2.4 Teste de viabilidade dos fungos entomopatogênicos	78
4.2.5 Preparação das suspensões de esporos dos fungos entomopatogênicos	79
4.2.6 Bioensaios de inoculação dos fungos	80
4.2.7 Análise estatística.....	81
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.3.1 Viabilidade dos fungos entomopatogênicos	83
4.3.2 Patogenicidade dos isolados de <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> , e do produto comercial Boveril [®] sobre adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	83
4.3.3 Análise de sobrevivência dos adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i> tratados com fungos entomopatogênicos.....	87
4.3.4 Determinação da Concentração Letal (CL ₅₀) para adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	88
4.3.5 Determinação do Tempo Letal (TL ₅₀) para adultos de <i>Rhynchophorus palmarum</i>	90
4.4 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96

1 INTRODUÇÃO GERAL

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma cultura tropical pertencente à família Arecaceae, sendo cultivado em aproximadamente 12,14 milhões de hectares distribuídos em praticamente todos os continentes (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011; FAO, 2013).

O coqueiro é uma rica fonte de alimento para diversas espécies de insetos e ácaros. Esses organismos, uma vez na planta, são hospedeiros específicos das folhas, das flores, dos frutos, do estipe ou das raízes, causando atraso no desenvolvimento, perda ou atraso na produção e morte da planta (FONTES; FERREIRA; SIQUEIRA, 2002).

A coleobroca *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) é de grande importância para a cultura do coqueiro, sendo que os danos podem ser ocasionados pelo inseto tanto na fase larval quanto na fase adulta, podendo provocar a morte da planta (AMBROGI et al., 2009).

Dada a importância econômica do *R. palmarum* para a cultura do coqueiro, surge a necessidade da adoção de estratégias de controle que sejam mais eficientes e que mantenham a população da praga abaixo do Nível de Dano Econômico (NDE). Atualmente, a demanda dos consumidores por produtos vegetais com qualidade estimula a adoção de métodos ecologicamente seguros de controle de pragas, minimizando o uso de agrotóxicos, visando aumentar a preservação do meio ambiente, da saúde humana e dos animais.

Os insetos adultos de *R. palmarum*, estágio alvo de controle, não permanecem nas plantas, apenas alimentam-se e ovipositam, e suas larvas completam o ciclo no interior do estipe do coqueiro. Dessa maneira, o controle biológico desse inseto-praga através da aplicação de fungos entomopatogênicos diretamente sobre os insetos torna-se inviável. Sendo assim, uma estratégia que pode ser eficiente no controle de *R. palmarum* é inocular os fungos entomopatogênicos em iscas atrativas e torná-las disponíveis aos insetos por meio de armadilhas de autoinoculação, onde o inseto pode entrar e sair livremente das armadilhas, causando a mortalidade direta dos insetos dentro das armadilhas ou disseminando a doença no campo.

Para que as medidas de controle sejam aplicadas, é necessário que se conheça a cultura estudada e as características biológicas das pragas, mantendo as criações de insetos em condições de laboratório (KOGAN, 1998).

Na criação de insetos, a elaboração de dietas artificiais é de fundamental importância, pois permite a manutenção da população de maneira contínua, reduz a mão-de-obra e o risco de contaminação das colônias com entomopatógenos, comumente encontrados na dieta

natural. As técnicas de criação de insetos em laboratório se desenvolveram possibilitando novas pesquisas capazes de fornecer subsídios para o controle eficiente do inseto no campo (KOGAN, 1980).

O estudo da biologia e das exigências nutricionais dos insetos é de grande importância, uma vez que a determinação das características biológicas do inseto servirá de base para a adequação de táticas de controle populacional do inseto na cultura estudada. Nesse contexto, a nutrição afeta diretamente a biologia, a distribuição e a abundância dos insetos (PANIZZI; PARRA, 2009).

A nutrição de insetos adquire importância em razão da necessidade crescente de sua produção massal para aprimorar estudos relacionados à praga. Assim, o conhecimento da dieta adequada da fase larval e dos adultos da espécie que se está pesquisando é fundamental para manutenção de seu nível populacional constante em laboratório (FONSECA et al., 2005).

Desse modo, este trabalho teve como objetivos estudar os parâmetros biológicos qualitativos e quantitativos de *R. palmarum* em duas dietas artificiais; e verificar a sua susceptibilidade a isolados de fungos entomopatogênicos e ao produto comercial Boveril®.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do coqueiro

2.1.1 Origem e importância econômica

O coqueiro ou coco-da-baía é uma palmeira perene originária do Sudeste Asiático, expandida naturalmente e de ocorrência em praticamente todos os continentes (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011). No Brasil, o coqueiro foi introduzido pelos portugueses em 1553 no Estado da Bahia, com material proveniente da Ilha de Cabo Verde, localizada no continente Africano (SIQUEIRA; ARAGÃO; TUPINAMBÁ, 2002). A partir da Bahia, o coqueiro disseminou-se pelo litoral nordestino, principalmente por ser uma frutífera típica de clima tropical, onde encontrou condições favoráveis para o cultivo e, posteriormente, acabou adaptando-se em outras regiões do país (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2011).

A Indonésia é a maior produtora mundial de coco, seguida por Filipinas e Índia, com uma produção anual aproximada de 18, 15 e 10 milhões de toneladas, respectivamente. Entretanto, em área colhida, a Filipinas destaca-se com uma maior área cultivada (3,5 milhões de hectares) (FAO, 2013).

O Brasil, quarto maior produtor mundial de coco, ocupa uma área em torno de 257 mil hectares e uma produção anual de cerca de 1,8 milhões de frutos (IBGE, 2014), equivalente a aproximadamente 2,8 milhões de toneladas (FAO, 2013). O Estado da Bahia destaca-se com uma produção de 552.836 frutos, sendo o maior produtor do país. Em seguida, destacam-se os Estados de Sergipe com 239.211 frutos e Pará com 214.453 frutos. O Estado de Alagoas também um importante produtor, ocupando a nona posição no ranking nacional, com uma produção anual de 51.507 frutos (IBGE, 2014).

Em virtude da sua dispersão e adaptabilidade, seu cultivo e utilização se dão de maneira expressiva em todo o mundo, onde seus frutos podem ser consumidos *in natura* ou industrializados na forma de mais de 100 produtos e subprodutos. Raiz, estipe, inflorescência, folhas e palmito geram diversos subprodutos ou derivados de interesse econômico (COSTA et al., 2005). O principal produto do coqueiro é o seu fruto, do qual se extraem o óleo, a água e a polpa para o consumo humano, sendo que a fibra também apresenta valor comercial cada vez maior e é utilizada para a confecção diversos produtos artesanais (HOWARD, 2001; MAGALHÃES; SILVA NEVES, 2011).

Segundo Martins; Jesus Júnior (2011), a intensificação das áreas de cultivo e de produção do coqueiro é percebida em várias partes do mundo. No Brasil, o avanço da cultura ocorre não só pela evolução da produção, que condicionam ao país lugar de destaque entre os maiores produtores mundiais, mas também pelo aumento da área cultivada em regiões não tradicionais de cultivo.

A região Nordeste caracteriza-se por ter a maior área plantada de coco da variedade gigante destinado à produção de alimentos, destacando-se, também, por ser uma região extrativista, que não realiza os tratos culturais necessários para o bom desenvolvimento da cultura, culminando com a disseminação de pragas e doenças e levando a uma elevada queda na produtividade (SARRO, 2002; FONTES; WANDERLEY, 2006).

2.2 Aspectos gerais sobre *Rhynchophorus palmarum*

Dentre os problemas que limitam a produção do coco, os insetos-praga apresentam uma relevante importância para a cultura, causando danos durante as diferentes fases de desenvolvimento da planta. Dentre eles, destaca-se o bicudo-das-palmáceas ou a broca-do-olho-do-coqueiro *R. palmarum* (GALLO et al., 2002).

2.2.1 Plantas hospedeiras

Além do coqueiro, o *R. palmarum* pode ainda utilizar como planta hospedeira ou fonte de alimento, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), a banana (*Musa* spp. L.) o dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), o mamão (*Carica papaya* L.), o abacaxi (*Ananas comosus* L.), dentre outras, levando a perdas e danos consideráveis às respectivas plantações (NAVARRO et al., 2002). Hagley (1965); Wattanapongsiri (1966) observaram larvas do gênero *Rhynchophorus* alimentando-se de uma grande variedade de plantas das famílias Arecaceae, Poaceae, Caricaceae, Bromeliaceae e Musaceae.

Relatos indicam a ocorrência do gênero *Rhynchophorus* em várias palmeiras, distribuídas por quase toda a região tropical do planeta. As espécies mais comuns em coqueiro são: *R. palmarum* e *R. cruentatus* (Fabricius, 1775), no continente americano; *R. phoenicis* (Fabricius, 1801), no continente africano; *R. ferrugineus* (Olivier, 1790) e *R. vulneratus* (Panzer, 1798), no Sudeste da Ásia; *R. ferrugineus*, no Oriente Médio; e *R. bilineatus* (Montrouzier, 1857), nas Ilhas do Pacífico (Oceania) (FERREIRA, 2002).

2.2.2 Distribuição geográfica

Trata-se de uma praga que está distribuída em diversos países, destacando-se: Brasil, México, Caribe, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Porto Rico, Trinidad e Tobago, Belize, Dominica, Grenada, Guadalupe, Martinique, São Vicente, Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (OEPP, 2005).

No Brasil, a broca-do-olho-do-coqueiro tem sido constatada nos Estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio Grande do Norte, Alagoas, Sergipe (FERREIRA et al., 1998) e Mato Grosso do Sul (SÁNCHEZ-SOTO; NAKANO, 2002).

2.2.3 Descrição e biologia

O adulto de *R. palmarum* é um besouro de cor preta de 45 a 60 mm de comprimento, de rostro bem desenvolvido com 10 a 12 mm de comprimento e recurvado. A espécie apresenta dimorfismo sexual localizado no rostro, sendo mais comprido, delgado e curvo na fêmea do que no macho. O macho pode ter abundantes pelos rígidos na parte dorsal do rostro, exceto em indivíduos de pequeno tamanho (Figura 1) (COSTA-CARVALHO, 2011).

Figura 1 - Dimorfismo sexual nos adultos de *Rhynchophorus palmarum*. Presença de pelos no rostro do macho (A) e ausência dos pelos no rostro das fêmeas (B).



Foto: Autora (2013).

Esse inseto apresenta metamorfose completa (holometabólico), que compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto. O primeiro par de asas, do tipo élitros, é curto e não recobre a extremidade do abdome, e têm oito sulcos longitudinais. O segundo par de asas, do tipo membranoso, é fino e flexível, com as nervuras bem distintas. As fêmeas de *R. palmarum*

colocam seus ovos na parte tenra da planta, individualmente e aleatoriamente. Uma fêmea coloca de 5 a 6 ovos por dia, totalizando 250 ovos durante sua vida. Após 2 a 3 dias, eclodem as larvas, que são ápodas, do tipo curculioniforme, coloração branco-creme, com a cabeça marrom-escura e, quando completamente desenvolvida, atinge cerca de 70 mm de comprimento. As larvas apresentam mandíbula forte e são canibais. A pupa é do tipo exarada e de coloração amarelada e se abriga dentro de um casulo de fibras da própria planta hospedeira, podendo medir de 70 a 90 mm de comprimento (GALLO et al., 2002).

Ao estabelecer uma criação de *R. palmarum* em laboratório, sob a temperatura de 20°C a 35°C e umidade relativa de 62 a 92%, utilizando o estipe do coqueiro como fonte de alimento, Hagley (1965); Sánchez et al. (1993), verificaram que uma fêmea pode colocar, em média, 245 ovos durante sua vida, ocorrendo a eclosão das larvas três dias após a postura. As larvas podem passar por seis a 10 ínstaes ao longo de um período de 52 dias. Após esse período, as larvas fazem um casulo da fibra do coco, onde vão permanecer durante a fase de pré-pupa (4 a 17 dias) e a fase de pupa (8 a 23 dias). Após a emergência, os adultos ainda permanecem dentro do casulo por aproximadamente sete dias. Os machos e as fêmeas podem viver, em média, 44 e 40 dias, respectivamente. Por sua vez, Restrepo; Rivera; Raigosa (1982), relataram que a duração do ciclo de biológico de *R. palmarum* pode variar dependendo da fonte de alimento.

2.2.4 Hábitos e danos

A broca-do-olho-do-coqueiro tem hábito diurno, principalmente nas horas com temperaturas mais amenas, sendo capaz de se deslocar 1,6 km por dia (HAGLEY, 1965). Esse inseto penetra pela gema apical das palmáceas e entre as folhas em formação, danificando-as e, conseqüentemente, destruindo-as. O ataque à gema apical ou os ferimentos causados durante a colheita resultam em fermentação da seiva da planta, cujo odor atrai outros besouros da mesma espécie, onde irão efetuar as posturas nas cicatrizes recém-abertas, reiniciando todo o ciclo de vida do inseto (GALLO et al., 2002). Segundo Griffith (1968), 30 larvas são suficientes para causar a morte de uma planta adulta. Em plantas jovens, é possível que um número menor de larvas provoque o mesmo efeito (SÁNCHEZ; CERDA, 1993).

Esse inseto é o principal vetor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb, 1919) Baujard, 1989 (Nematoda: Aphelenchoididae), agente causal da doença conhecida como “anel-vermelho”, que por sua vez é letal para o coqueiro e outras palmeiras (DUARTE et al., 2008). Os sintomas podem variar conforme as condições ambientais, idade e variedade

das plantas afetadas. No campo, a doença surge em plantas adultas (5 a 15 anos). Os sintomas da doença começam na ponta das folhas avançando em direção à ráquis. As folhas doentes tornam-se necrosadas e quebram-se na base da ráquis. Em fase avançada da doença, a copa do coqueiro fica com um aspecto amarelo-ouro, com exceção de um tufo central de folhas verdes que se dobram, secam e a planta morre. Após o corte transversal do estipe do coqueiro, observa-se um anel-vermelho (2 a 4 cm de largura). Esse anel é observado na parte mais alta ou mais baixa do estipe, dependendo do local do início da infecção. Quando a infecção ocorre pelas raízes, o anel-vermelho se desenvolve de baixo para cima, mas quando o inseto-vetor faz a transmissão do nematoide de uma planta doente para outra sadia, o anel vermelho é observado nas partes mais altas do estipe (CASTRO; LIMA; SANTANA, 2009).

A porcentagem de insetos de *R. palmarum* portadores do nematoide varia de uma região para outra, inclusive entre lotes de uma mesma plantação (SÁNCHEZ; CERDA, 1993). O inseto pode adquirir o nematoide na fase adulta quando em contato com plantas contaminadas ou durante seu período larval, enquanto as larvas se desenvolvem nos tecidos contaminados. A transmissão e a disseminação do nematoide também podem ocorrer através das ferramentas utilizadas na colheita e tratos culturais, solo infestado, raízes, água de irrigação e matéria orgânica infestada (WARWICK, 2005).

2.2.5 Métodos de controle

- Controle mecânico

Para reduzir a população de *R. palmarum* e, conseqüentemente, diminuir os danos e injúrias ocasionados pelo inseto, o controle pode ser realizado manualmente através da atração dos insetos pelos odores das plantas hospedeiras, que após o corte fermentam dentro do plantio de coco (FERREIRA, 2007/2008).

- Controle químico

Ferreira (1987) indicou a instalação de iscas atrativas no coqueiral contendo pedaços do estipe do coqueiro ou de palmeiras nativas pulverizadas com inseticida e cobertas com folhas secas de coqueiro para atrair e matar os indivíduos adultos.

O controle químico de *R. palmarum*, por meio da pulverização de produtos, apresenta uma baixa eficiência, tendo em vista o comportamento dos insetos adultos, pois estes não permanecem nas plantas, apenas alimentam-se e ovipositam, e suas larvas completam o ciclo

no interior dos tecidos vegetais. Dependendo da variedade, o coqueiro apresenta um porte elevado, além de uma filotaxia que dificulta a penetração de produtos (MENDONÇA, 2007).

- Controle comportamental

O estudo do comportamento dos insetos proporcionou o desenvolvimento de novos métodos que estão sendo adotados em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). A aplicabilidade de semioquímicos, substâncias químicas envolvidas na comunicação entre os seres vivos, tem contribuído para a redução dos danos provocados em várias espécies de brocas pertencentes à família curculionidae, devido à eficiência da captura massal por meio destas substâncias, onde os resultados alcançados, nestes casos, apresentam-se mais eficientes que a alternativa do controle químico (FERREIRA, 2007/2008).

Feromônios de agregação em coleópteros, geralmente, são produzidos pelos insetos machos e, usualmente, atraem ambos os sexos (NAVARRO et al., 2002; FERREIRA, 2007/2008). A detecção dos insetos adultos por meio de armadilhas contendo feromônio de agregação e a captura massal são ferramentas importantes para prevenir os danos provocados pelas brocas e tornar o seu controle mais econômico, efetivo e seguro sob o ponto de vista ambiental, proporcionando a racionalização de agrotóxicos no meio ambiente e preservando os inimigos naturais (MOREIRA, 2005).

O feromônio de agregação 6-methyl-2(E)-hepten-4-ol, denominado rincoforol, produzido pelos machos de *R. palmarum*, é utilizado no controle dessa praga e elimina o uso de inseticidas, trazendo para o agricultor considerável economia (ROCHAT et al., 1991). Porém, Jaffé et al. (1993) demonstraram que o feromônio sozinho exerce pouca atratividade, pois, quando o mesmo é utilizado juntamente com pedaços de tecidos da planta, há aumento significativo no número de insetos capturados, o que sugere uma interação entre os componentes químicos da planta e o feromônio produzido pelo inseto. De acordo com Tiglia et al. (1998), o uso da cana-de-açúcar, conjuntamente com o feromônio, aumenta a eficiência das armadilhas na captura do *R. palmarum*, podendo quadruplicar o índice de coleta.

- Controle biológico

Existem na natureza agentes bióticos com elevado potencial para provocar mudanças na população de insetos, a exemplo de vírus, fungos, bactérias e nematoides, cuja utilização em larga escala pode contribuir para manter a população da praga abaixo do NDE (FERREIRA, 2002; CARVALHO; BARCELLOS, 2012). Dentre esses agentes biológicos de

controle de insetos, os fungos, pertencentes à cerca de 90 gêneros e 700 espécies, causam cerca de 80% das enfermidades (ALVES, 1998a).

A primeira classificação de um entomopatôgeno foi feita por Réaumur 1726, identificando um fungo do gênero *Cordyceps* (Fr.) Link atacando um lepidóptero. O relato pioneiro comprovando a ação entomopatogênica de um fungo foi feita em 1835, por Agostino Bassi, o qual observou que o fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. era o causador da doença denominada “*muscardine branca*”, muito importante para o bicho-da-seda *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae). Em 1865, Pasteur determinou como agente causal da doença do bicho-da-seda o protozoário *Nosema bombycis* Nägeli 1857. O primeiro trabalho sobre o controle de pragas com um fungo entomopatogênico foi realizado pelo russo Metchnikoff em 1878-79, o qual utilizou *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin para o controle de larvas do besouro *Anisoplia austriaca* (Herbst, 1783) (Coleoptera: Scarabaeidae) (ALVES, 1998b).

2.3 Aspectos gerais sobre controle biológico com entomopatôgenos

A maioria dos gêneros de fungos entomopatogênicos ocorre no Brasil, sendo que mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1998a). Os fungos também foram os primeiros patógenos de insetos a serem relatados e vêm sendo estudados há vários anos no país. Os gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* são os mais estudados e utilizados devido ao amplo espectro de hospedeiros e facilidade de produção em laboratório (ALMEIDA; MACHADO, 2006).

O controle biológico de pragas através da utilização de fungos entomopatogênicos é uma opção que apresenta potencial de utilização sobre diversas espécies. Existem importantes projetos de controle de pragas no Brasil envolvendo esses entomopatôgenos, como por exemplo: *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), *Mahanarva posticata* (Stål, 1855) (Hemiptera: Cercopidae), *M. fimbriolata* (Stål, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), *Zulia entrerriana* (Berg, 1879) (Hemiptera: Cercopidae), *R. palmarum*, *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae), *Schistocerca pallens* (Thunberg, 1815) (Orthoptera: Acrididae), *Stiphra robusta* (Mello-Leitão, 1939) (Orthoptera: proscopiidae), *Rhammatocerus schistocercoides* (Rehn, 1906) (Orthoptera: Acrididae), *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae), *Metamasius hemipterus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae), *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) (NEVES; HIROSE, 2005; ALVES et al., 2008).

O fungo *B. bassiana*, de ampla distribuição geográfica, pode ser facilmente produzido a um custo relativamente baixo, além de minimizar o impacto provocado pelos inseticidas convencionais. Considerando a variabilidade genética existente na espécie *B. bassiana* e suas implicações na virulência e adaptação às condições climáticas, a seleção de cepas é fundamental em estudos de controle biológico de pragas com entomopatógenos (FANCELLI et al., 2004). Esse fungo é utilizado em escala comercial na produção de inseticidas biológicos em países como Estados Unidos e México (FARIA; MAGALHÃES, 2001; DALZOTO; UHRY, 2009). No mundo, são encontrados diversos produtos comerciais para controle biológico contendo *B. bassiana* como ingrediente ativo (BUTT; WALDEN, 2000).

O fungo *B. bassiana* pertence à classe de fungos entomopatogênicos Deuteromicetos (fungos imperfeitos), apresentando um modo de crescimento dimórfico. Na ausência de insetos hospedeiros, passa por um ciclo vegetativo assexuado que inclui germinação, crescimento filamentosos e formação de conídios. Quando na presença do hospedeiro, passa para o ciclo patogênico (RIBA; SILVY, 1989; BOVI, 2012). A maioria dos fungos penetram nos insetos, principalmente, por contato e ingestão (LEITE et al., 2003; LOUREIRO et al., 2005).

Fungos do gênero *Trichoderma* Persoon, pertencentes à classe dos Deuteromicetos, são bastante utilizados no controle de doenças de plantas. Compreendem fungos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente, presentes com mais frequência em solos de regiões de clima temperado e tropical (MACHADO et al., 2012; DIAS; BERBARA; FERNANDES, 2013).

Segundo Saito et al. (2009); Menezes et al. (2010), *Trichoderma* spp. é um microrganismo que apresenta uma importante função ecológica, pois participa da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais, contribuindo com a disponibilização de nutrientes para as plantas. Também é considerado um biofungicida natural, que reduz em até 100% as chances de qualquer fungo atingir a cultura. O *Trichoderma* spp. é um fungo de crescimento rápido, daí a grande vantagem de utilização como agente de biocontrole em larga escala. De acordo com Santos (2010), além da capacidade adaptativa elevada, apresentam também grande potencial de dispersão.

Os fungos do gênero *Trichoderma* consomem outros fungos, matéria orgânica, insetos e alguns nutrientes que são secretados pelas raízes. O principal mecanismo de ação desse fungo é o micoparasitismo. O *Trichoderma* envolve o fungo a ser atacado, penetrando nas células e causando danos, como: alterações da parede celular, retração da parede da membrana plasmática e desordem no citoplasma. Quando o fungo é aplicado ao solo, é

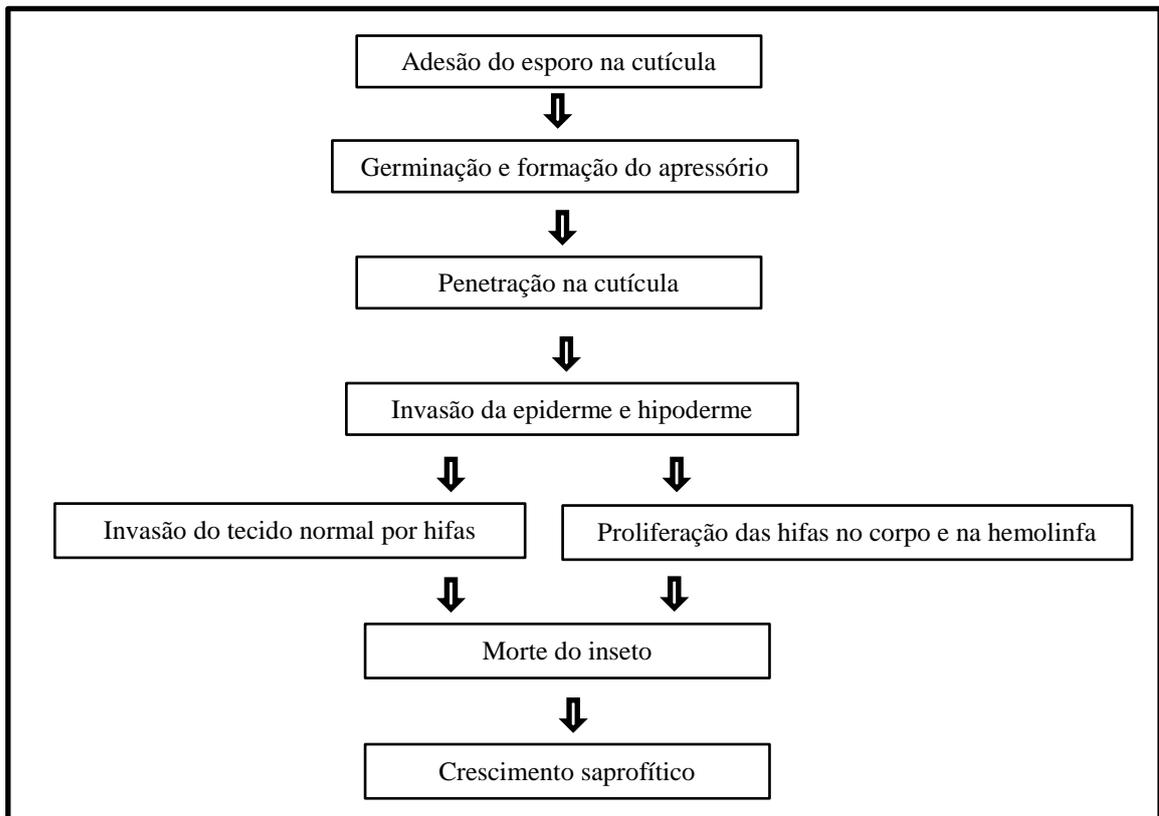
alimentado pelos exsudatos das raízes, entrando em simbiose com as mesmas, as quais são protegidas pelo fungo. A espécie *T. harzianum* Rifai atua como uma barreira que impede a entrada de patógenos à raiz, podendo, também, ser entomopatogênico. Geralmente, seu modo de entrada é por penetração na cutícula do inseto por uma combinação de degradação enzimática, principalmente pelas enzimas protease e quitinase, e pressão mecânica pela produção do haustório (SHAKERI; FOSTER, 2007).

De acordo com Alves (1998b), a utilização de patógenos para o controle de insetos apresenta várias vantagens, tais como: especificidade e seletividade, preservando os inimigos naturais; além da mortalidade direta dos insetos, podem afetar as gerações seguintes, diminuindo a oviposição, viabilidade dos ovos e aumentando a susceptibilidade dos insetos a outros métodos de controle biológico; controle mais duradouro; podem ser empregados juntamente com inseticidas menos agressivos ao meio ambiente; os insetos dificilmente se tornam resistentes aos patógenos devido às aplicações corretas nas culturas; podem se multiplicar e se dispersar no ambiente afetando insetos não atingidos diretamente pela aplicação; não poluem o ambiente e não são tóxicos ao homem e animais; entre outras. Entretanto, como desvantagens, têm uma ação mais lenta; necessitam de condições ambientais favoráveis para serem eficientes; a especificidade de alguns patógenos pode ser considerada uma desvantagem; cuidados no armazenamento, de modo que mantenha a viabilidade e patogenicidade do fungo; e risco de contaminação do material biológico.

O modo de ação dos fungos entomopatogênicos inicia-se com a adesão ao tegumento e a germinação dos conídios sobre o inseto. Logo após, dá-se início a penetração, a partir da combinação de pressão e degradação enzimática, atravessando a cutícula do inseto. Posteriormente, ocorre a multiplicação do fungo na hemolinfa e a produção de toxinas. A seguir ocorre a morte do inseto e o fungo coloniza todo o interior do hospedeiro. Posteriormente, o micélio migra para o exterior do corpo do inseto, passando através do tegumento, esporula sobre a superfície do inseto e, finalmente os propágulos são disseminados no ambiente (MOUATCHO, 2010) (Figura 2).

Pesquisas têm demonstrado que *B. bassiana* é capaz de infectar insetos em diferentes estágios de desenvolvimento, causando elevados índices de mortalidade, podendo chegar a 100% em condições de laboratório (ALVES, 1998a; ROHDE et al., 2006; RONDELLI et al., 2012).

Figura 2 - Processo de infecção de um fungo entomopatogênico.



Fonte: Clarkson; Charnley (1996).

Estudando isolados de *B. bassiana*, Figuêiredo et al. (2002), demonstraram patogenicidade para a fase larval da broca-gigante *Telchin licus licus* (Drury, 1770) (Lepidoptera: Castniidae).

Alves et al. (2008) relataram que a broca-comum *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) é susceptível ao fungo *B. bassiana*, o qual ocorre naturalmente infectando cerca de 10% das lagartas, nas condições da região Nordeste do Brasil.

Almeida et al. (2009) avaliaram isolados de *B. bassiana* sobre adultos do moleque-da-bananeira *C. sordidus* e constataram que os isolados IBCB 74, IBCB 87 e IBCB 146, apresentam potencial para o controle microbiano dessa praga. Do mesmo modo, Correa-Cuadros; Rodríguez-Bocanegra; Sáenz-Aponte (2014) observaram a susceptibilidade de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) a vários isolados do fungo *B. bassiana* em laboratório.

Martins; Maruyama; Marugana (2007), selecionando isolados de *B. bassiana*, constataram que esse fungo é patogênico para *Alabama argillacea* (Hübner, 1823) (Lepidoptera: Noctuidae).

A alta capacidade de disseminação dos propágulos dos entomopatógenos é uma característica favorável à ocorrência de doenças nas populações de insetos, denominada epizootia. O desenvolvimento de epizootias está relacionado com a dinâmica da população de insetos, o número de conídios fúngicos e sua viabilidade, a eficiência de infecção e desenvolvimento do microrganismo (MEYLING; EILENBERG, 2007). A capacidade de sobrevivência dos propágulos no ambiente é variável nos diferentes grupos e até mesmo entre as raças, permanecendo no ambiente através de insetos mortos (FANCELLI et al., 2004). Os fungos entomopatogênicos ocorrem naturalmente no ambiente, sendo a temperatura ideal entre 20°C e 30°C, e necessitam de alta umidade para os esporos germinarem e penetrarem através da cutícula do inseto. A sobrevivência dos esporos pode ser reduzida em condições de campo após exposição a radiações solares (TANG; HOU, 2001).

A tomada de decisão da melhor estratégia de controle baseia-se na integração entre as táticas existentes. Estas podem ser adotadas para potencializar a ocorrência natural, introduzir e conservar o inóculo dos patógenos em uma determinada área ou mesmo promover um efeito sinérgico (ROSSI-ZALAF et al., 2008). Uma estratégia utilizada no controle de pragas, especialmente de coleópteros, é a associação de fungos entomopatogênicos com atrativos alimentares (iscas atrativas) juntamente com o uso de feromônios. Os insetos contaminados têm grande capacidade de voo, e podem contribuir para a disseminação da doença no campo. Esse método é bastante utilizado para o controle de *R. palmarum*, *M. hemipterus* e *C. sordidus* (BORGES; SOUZA, 2004; ALVES et al., 2008), porém é necessário o aperfeiçoamento desse método, através da seleção de isolados fúngicos mais virulentos, para garantir maior eficiência no MIP.

2.4 Aspectos gerais sobre nutrição de insetos e dietas artificiais

2.4.1 Necessidades nutricionais dos insetos

A nutrição de insetos adquire importância em virtude da necessidade crescente de sua produção massal visando à resolução de problemas relacionados à entomologia básica e aplicada (FONSECA et al., 2005).

A maioria dos insetos tem exigências nutricionais qualitativas semelhantes, uma vez que a composição química dos tecidos e processos metabólicos básicos são geralmente similares. Porém, grandes variações nestas exigências podem ocorrer e elas refletem diferenças no metabolismo, ou são resultantes de reservas acumuladas num estágio anterior de

desenvolvimento, ou da capacidade do inseto associar-se a microrganismos para sintetizar certos nutrientes (PARRA, 2009). Segundo Panizzi; Parra (2009), os seres vivos, geralmente, são um reflexo daquilo que consomem e, no caso dos insetos, muitos aspectos da sua biologia estão inseridos dentro de um contexto nutricional.

Hagen (1976) discute o papel da nutrição no manejo de insetos e salienta que aspectos vitais como crescimento, metamorfose, reprodução, localização e seleção do hospedeiro, bem como defesa, são influenciados por fatores nutricionais.

Os insetos têm como exigências nutricionais básicas: aminoácidos, vitaminas e sais minerais (nutrientes essenciais) e carboidratos, lipídios e esteróis (nutrientes não-essenciais). Uma dieta artificial corretamente formulada possui propriedades físicas e produtos químicos que estimulam e mantêm a alimentação, com nutrientes (essenciais e não-essenciais) em proporções balanceadas para produzir ótimo crescimento e desenvolvimento, e deve ser livre de microrganismos contaminantes (PARRA; PANIZZI; HADDAD, 2009).

2.4.2 Criação de insetos em dietas artificiais

De acordo com Parra et al. (2002), existem três formas de se obter insetos: 1) coletando populações no campo; 2) mantendo, em laboratório, populações em hospedeiros naturais; e 3) mantendo, em laboratório, populações em dietas artificiais.

Uma dieta artificial adequada é aquela que: propicia alta viabilidade larval; produz insetos com duração da fase larval igual à da natureza; origina adultos com alta capacidade reprodutiva; é indicada para mais de uma espécie de insetos; contenha na sua composição ingrediente de baixo custo e facilmente adquiridos; apresente uma viabilidade total superior a 75%; e mantenha a qualidade do inseto ao longo das gerações (PARRA, 2009). A viabilização da criação com dieta artificial de baixo custo, que possa suprir as necessidades fisiológicas dos insetos, permitirá uma técnica com melhor relação custo-benefício (PASINI; PARRA; LOPES, 2007).

Bueno (2000); Trivellato (2010) enfatizam que um dos problemas frequentemente encontrados em criações de insetos é a ocorrência de patógenos ou contaminantes microbianos, levando a uma alta mortalidade, desenvolvimento prolongado, adultos de tamanho pequenos, amplas flutuações na qualidade dos insetos e efeitos patológicos diretos. O contaminante microbiano mais comumente encontrado em criações de insetos são os fungos, seguidos por bactérias, vírus, protozoários e nematoides. Os insetos coletados no

campo para iniciar uma colônia no laboratório e os ingredientes da dieta são as principais fontes de contaminantes microbianos.

A criação de insetos em laboratório tem se mostrado importante para diferentes finalidades, tais como: estudos de resistência de plantas a insetos; bioensaios com inseticidas; produção de inimigos naturais; estudos de biologia e de exigências nutricionais; produção de insetos estéreis; testes com feromônio e outros semioquímicos; entre outros (PARRA, 1999).

Parra (1998) distingue três categorias de criações de insetos em laboratório: 1) criação em pequena escala para pesquisas básicas ou para objetivos genéricos; 2) criação de médio porte; e 3) criação massal, geralmente envolvendo operações semelhantes a uma fábrica, servindo de suporte a programas de controle de pragas.

Embora seja possível manter os insetos em alimento natural, é exigida elevada mão-de-obra para manipulação das espécies vegetais utilizadas na alimentação dos insetos. Uma alternativa é a utilização de dietas artificiais, que além de proporcionar a manutenção contínua dos insetos em laboratório, permitem diminuir a mão-de-obra nas criações (SINGH, 1983). Entretanto, é necessário o constante aperfeiçoamento das técnicas de criação, especialmente das dietas artificiais, visando manter a qualidade biológica dos insetos ao longo das gerações, uma vez que a quantidade e a qualidade do alimento afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, o peso do corpo, a sobrevivência, influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição de adultos (PANIZZI; PARRA, 2009).

Embora algumas dietas artificiais sejam satisfatórias para o crescimento do inseto, nas mesmas podem faltar fagoestimulantes físicos ou químicos (compostos que liberam o comportamento de alimentação e induzem os insetos a se alimentar, podendo não ser os mesmos em cada estágio de desenvolvimento do inseto), ou mesmo características físicas ou biológicas que permitam o ótimo desenvolvimento do inseto, pois mesmo oferecendo ao inseto uma dieta considerada adequada, o mesmo poderá não se desenvolver normalmente (PARRA, 2009).

Waldbauer; Friedman (1991) salientam que é necessário que um certo limite energético seja atingido para que esses processos ocorram normalmente, pois formas jovens alimentadas de forma inadequada, formarão pupas e adultos de má qualidade, geralmente sem condições de competir no meio ambiente.

2.4.3 Composição das dietas artificiais

Segundo Cohen (2004); Parra (2009), as exigências nutricionais dos insetos são determinadas em estudos com dietas artificiais, e a função de alguns nutrientes serão definidas a seguir:

- Aminoácidos

São exigidos para produção de proteínas estruturais e enzimas. Estão normalmente presentes na dieta como proteínas, pois estas são formadas por ligações de aminoácidos (ligações peptídicas). Proteínas ou aminoácidos são sempre essenciais à dieta de insetos em desenvolvimento e são exigidos em altas concentrações para um crescimento ótimo.

Para o crescimento e desenvolvimento, os insetos necessitam, no mínimo, dos 10 aminoácidos essenciais (arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina), sendo os demais sintetizados a partir deles. Os 10 aminoácidos essenciais são também exigidos por insetos adultos para a produção de ovos. No entanto, várias espécies podem obtê-los da alimentação larval e os adultos não precisam ingeri-los.

- Vitaminas

São substâncias orgânicas exigidas em pequenas quantidades que atuam nos processos metabólicos, fornecendo componentes estruturais das enzimas. As vitaminas hidrossolúveis (vitaminas do complexo B) são essenciais para a maioria dos insetos. Assim, tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, piridoxina e ácido pantotênico são essenciais para diversos insetos, enquanto biotina e ácido fólico são essenciais somente para um número menor de insetos.

A colina, apesar de apresentar função diferente em relação às vitaminas do complexo B, é exigida em doses mais elevadas que as vitaminas típicas e é essencial a todos os insetos.

- Sais minerais

São importantes para o balanceamento iônico e a permeabilidade da membrana dos insetos, muitas vezes, atuando como ativadores enzimáticos. Sabe-se que os insetos necessitam para crescimento e desenvolvimento de quantidades elevadas de potássio, fosfato e magnésio, e quantias menores de cálcio, sódio e cloro. Entretanto, é difícil determinar as quantidades que os insetos necessitam destes últimos sais, pois, como as exigências são

pequenas, muitas vezes elas são fornecidas por meio de impurezas de outros componentes da dieta.

- Carboidratos

São a principal fonte de energia dos insetos. Podem ser convertidos em gorduras para armazenamento e contribuir para a produção de aminoácidos. Sendo assim, os carboidratos, as gorduras e proteínas são envolvidos em ciclos de reações produtoras de energia. Geralmente, os insetos exigem elevadas quantidades de carboidratos em suas dietas.

- Esteróis

São essenciais para quase todos os insetos e tem como funções: promover a ovogênese e o crescimento larval, ser responsável pela esclerotização da cutícula, desempenhar papel metabólico e anti-infeccioso, e ser precursor de hormônios esteroides.

- Ácidos nucleicos

Esses ácidos ou os seus componentes (nucleotídeos, nucleosídeos e bases) formam outra categoria de fatores de crescimento solúveis em água e que são necessários para construção do ácido ribonucleico (RNA) e do ácido desoxirribonucleico (DNA). O desenvolvimento larval de alguns insetos em dietas sem ácido nucleico ocorre de maneira muito lenta. Porém, se for adicionado RNA (ou adenina) à dieta, o seu desenvolvimento se dará mais rapidamente (PARRA, 2009).

- Água

Os insetos exigem água e a maioria dos insetos terrestres contêm pelo menos 70% de água. Muitos insetos exigem altas umidades no alimento; a água dilui os nutrientes e faz com que eles sejam mais consumidos.

- Lipídios

As gorduras são a principal forma na qual a energia é armazenada. Os insetos utilizam lipídios e podem sintetizá-los a partir de proteínas e carboidratos. São ésteres de um ou mais ácidos graxos e glicerol, os quais são formados a partir de uma hidrólise enzimática no trato digestivo dos insetos.

Constituem estruturas celulares, atuam como hormônios e formam importantes reservas energéticas que são fundamentais em algumas situações de grande demanda metabólica, tais como o voo e a produção de ovos (ARRESE et al., 2001).

REFERÊNCIAS

- Almeida, J.E.M.; Machado, L.A. Controle biológico de insetos e ácaros. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n.15, 2006, 85p.
- Almeida, A.M.B. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, p.489-493, 2009.
- Alves, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998a. n.4. p.289-382.
- Alves, S.B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998b. n.4. p.21-38.
- Alves, S.B. et al. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B.; Lopes, R.B. (Eds.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. v.14. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.69-110.
- Ambrogi, B.G. et al. Feromônios de agregação em curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2151-2158, 2009.
- Arrese, E.L. et al. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.7-17, 2001.
- Borges, A.L.; Souza, L.S. **O Cultivo da bananeira**. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 279p.
- Bovi, E.C.V. **Caracterização patogênica e molecular de isolados de *Beauveria* sp. e *Metarhizium* sp de diferentes regiões do Brasil para o controle de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae)**. 2012. 166f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Industrial), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 2012.
- Bueno, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Lavras, MG: UFLA, 2000. 206p.
- Butt, T.M.; Walden, S. Fungal biological control agents. **Pesticide Outlook**, v.11, p.186-191, 2000.

Carvalho, N.L.; Barcellos, A.L. Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.5, n.5, p.749-766, 2012.

Castro, J.M.C.; Lima, C.R.F.; Santana, M.L.M.P. Nematóide do anel vermelho do coqueiro e medidas de manejo. **Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido**, Petrolina, PE, dezembro, 2009. n.88.

Clarkson, J.M.; Charnley, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v.4, p.197-203, 1996.

Cohen, A.C. **Insect Diets: Science and Technology**. CRC Press: Boca Raton, 2004, 330p.

Correa-Cuadros, J.P.; Rodríguez-Bocanegra, M.X.; Sáenz-Aponte, A. Susceptibility of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae; Linnaeus 1758) to *Beauveria bassiana* Bb9205, *Metarhizium anisopliae* Ma9236 and *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100. **Universitas Scientiarum**, v.9, n.3, p.277-285, 2014.

Costa, R.S.C. et al. Cultivo do Coqueiro em Rondônia. **Sistemas de Produção - EMBRAPA**, Rondônia, dezembro, 2005. n.6.

Costa-Carvalho, R.R. **Epidemiologia da resinose do coqueiro e sensibilidade de *Thielaviopsis paradoxa* a óleos essenciais**. 2011. 82f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, MG, 2011.

Dalzoto, P.R.; Uhry, K.F. Controle biológico de pragas no Brasil por meio de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Biológico**, v.71, n.1, p.37-41, 2009.

Dias, P.P.; Berbara, R.L.L.; Fernandes, M.C.A. Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.4, p.258-262, 2013.

Duarte, A.G. et al. Disposição do nematóide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, em coqueiros portadores da doença anel-vermelho. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.3, p.622-627, 2008.

Fancelli, M. et al. Controle biológico de *Cosmopolites sordidus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae) pelo fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Comunicado Técnico - EMBRAPA**, Cruz das Almas, BA, julho, 2004. n.102.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAOSTAT. 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>> Acesso em: 04/01/2014.

Faria, M.R.; Magalhães, B.P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil: situação atual e perspectivas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.22, p.18-21, 2001.

Ferreira, J.M.S. Proteção fitossanitária do coqueiral III. Controle de pragas no campo. **Circular Técnica - EMBRAPA**, Aracaju, SE, novembro, 1987. n.7, 23p.

Ferreira, J.M.S. Controle biológico do agente transmissor do nematoide causador do anel-vermelho-do-coqueiro. **Circular Técnica – EMBRAPA**, Aracaju, SE, Outubro, 2002. n.31.

Ferreira, J.M.S. Manejo integrado de pragas do coqueiro. **Ciência Agrícola**, v.8, n.1, p.21-29, 2007/2008.

Ferreira, J.M.S. et al. Pragas do coqueiro. In: Sobrinho, R.B.; Cardoso, J.E.; Freire, F.C.O. (Eds.). **Pragas de fruteiras tropicais de importância agroindustrial**. Brasília: EMBRAPA, 1998. p.81-118.

Figuêiredo, M.F.S. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a broca gigante da cana-de-açúcar *Castnia licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae). **Neotropical Entomology**, v.31, p.397-403, 2002.

Fonseca, F.L. et al. A. Efeito de dietas artificiais para a alimentação de adultos de *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae), em laboratório. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1229-1233, 2005.

Fontes, H.R.; Ferreira, J.M.S.; Siqueira, L.A. Sistema de produção para a cultura do coqueiro. **Sistemas de Produção – EMBRAPA**, Aracaju, SE. Dezembro, 2002. n.1, 65p.

Fontes, H.R.; Wanderley, M. Situação atual e perspectivas para a cultura do coqueiro no Brasil. **Documentos – EMBRAPA**, Aracaju, SE, novembro, 2006. n.94.

Gallo, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v.10, 2002, 920p.

Griffith, R. The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. **Journal of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago**, v.68, p.342-356, 1968.

Hagen, K. S. Role of nutrition in insect management. **Proceedings Tallahassee Timbers Conference on Ecological Animal Control Habitat Management**, n.6, p.221-261, 1976.

Hagley, E.A.C. On the life history and habitats of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.). **Annals of the Entomological Society of America**, v.58, p.22-28, 1965.

Howard, F.W. The animal class Insecta and the plant family Palmae. In: Howard, F.W. et al. al. (Eds.). **Insects on palms**. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p.1-32.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Levantamento sistemático da produção agrícola: safra 2014. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=1618&z=t&o=1&i=P>> Acesso em: 28/01/2015.

Jaffé, K. et al. Chemical ecology of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): attraction to host plants and to a male-produced aggregation pheromone. **Journal of Chemical Ecology**, v.19, p.1703-1720, 1993.

Kogan, M. Criação de insetos: bases nutricionais e aplicação em programas de manejo de pragas. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 6., 1980, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1980. p.45-75.

Kogan, M. Integrated pest management: historical perspective and contemporary development. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.243-270, 1998.

Leite, L.G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S.P., 2003. 92p.

Loureiro, E.S. et al. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra a cigarrinha da raiz da cana-da-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Stål) (Hemiptera: Cercopidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v.34, p.791-798, 2005.

Machado, D.F.M. et al. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, p.274-288, 2012.

Magalhães, V.H.P.; Silva Neves, M.A.F. Utilização do pericarpo de coco verde (*Cocos nucifera* L. - Arecaceae) para a remoção de resíduos de íons cromo (VI) em soluções aquosas. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.3, n.1/2, p.10-16, 2011.

Martins, G.L.M.; Maruyama, L.C.T.; Marugana, W.I. Agentes microbianos no controle de *Alabama argilacea* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, p.23-27, 2007.

Martins, C.R.; Jesus Junior, L.A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional - Panorama 2010. **Documentos** - Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, junho, 2011. n.164.

Mendonça, M.C. **Contribuição ao controle biológico de *Rhynchophorus palmarum*** - atividade de voo, eficiência de autoinoculação e caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana*. 2007. 97f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

Menezes, J.P. et al. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, v.17, n.1, p.38-50, 2010.

Meyling, N.V.; Eilenberg, J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. **Biological Control**, v.43, p.145-155, 2007.

Moreira, M.A.B. **Identificação, dinâmica da produção e potencial de uso do feromônio de agregação de *Pseudopiazurus obesus* (Boheman, 1838) (Coleoptera: Curculionidae)**. 2005. 120f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

Mouatcho, J.C. **The use of entomopathogenic fungi against *Anopheles funestus* Giles (Diptera: Culicidae)**. 2010. 162f. Tese (Doutorado em Filosofia), University of the Witwatersrand, Johannesburg, 2010.

Navarro, D.M.A.F. et al. Aspectos práticos relacionados ao uso do rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro: análise de sua eficiência em campo. **Química Nova**, v.25, n.1, p.32-36, 2002.

Neves, P.M.O.J.; Hirose, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology**, v.34, p.77-82, 2005.

OEPP. Organization Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. *Rhynchophorus palmarum*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. OEPP/EPPO, **Bulletin OEPP/EPPO**, v.35, p.468-471, 2005.

Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. Introdução à bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos** – base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, Brasília, 2009, p.21-36.

Parra, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. n. 4. p.1015-1038.

Parra, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1999. 134p.

Parra, J.R.P. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos** – base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, 2009, p.91-174.

Parra, J.R. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Malone, 2002. 603p.

Parra, J.R.P.; Panizzi, A.R.; Haddad, M.L. Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos. In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos** – base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, 2009, p.37-90.

Pasini, A.; Parra, J.R.P.; Lopes, J.M. Dieta artificial para criação de *Doru luteipes* (Scudder) (Dermaptera: Forficulidae), predador da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.36, n.2, p.308-311, 2007.

Restrepo, L.G.; Rivera, F.; Raigosa, J. Ciclo de vida, hábitos y morfometría de *Metamasius hemipterus* Oliver. y *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) en caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.). **Acta Agronómica**, v.32, p.33-44, 1982.

Riba, G.; Silvy, C. **Combattre les ravageurs des cultures**. Enjeux et perspectives. Paris: INRA, 1989. 230p.

Rochat, D. et al. Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): collection, identification, electrophysiological activity, and laboratory bioassay. **Journal of Chemical Ecology**, v.17, n.11, 1991.

Rohde, C. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, v.35, p.231-240, 2006.

Rondelli, V.M. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* potenciais para o controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.3, p.391-396, 2012.

Rossi-Zalaf, L.S. et al. Interação de microrganismos com outros agente de controle de pragas e doenças. In: Alves, S.B.; Lopes, R.B. (Eds.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p.279-302.

Saito, L.R. et al. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n.3, p.203-208, 2009.

Sánchez, P.A.; Cerda, H. El complejo *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) - *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Tylenchida: Aphelenchoididae), en palmeras. **Boletín de Entomología Venezolana**, v.8, p.1-18, 1993.

Sánchez, P.A. et al. Biology and behaviour of *Rhynchophorus palmarum*. **Boletín de Entomología Venezolana**, v.8, p.83-93, 1993.

Sánchez-Soto, S.; Nakano, O. Registro de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) no Estado de Mato Grosso do Sul. **Neotropical Entomology**, v.31, n.4, p.659-660, 2002.

Santos, P.R. **Identificação de isolados de *Trichoderma* spp. Utilizando marcadores do tipo RAPD e DNA Barcode**. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

Sarro, F.B. **Biologia da broca do pedúnculo floral do coqueiro *Homalinotus coriaceus* (Gyllenhal, 1836) (Coleoptera: Curculionidae) em três dietas**. 2002. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2002.

Shakeri, J.; Foster, H.A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.961-968, 2007.

Singh, P. A general purpose laboratory diet mixture for rearing insects. **Insect Science**, v.4, p.357-362, 1983.

Siqueira, L.A.; Aragão, W.M; Tupinambá, E.A. A introdução do coqueiro no Brasil. Importância histórica e agrônômica. **Documentos** - EMBRAPA, Aracaju, SE, novembro, 2002. n.47.

Tang, L.C.; Hou, R.F. Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v.125, p.243-248, 2001.

Tiglia, E.A. et al. Eficiência de armadilhas com feromônio de agregação e cana-de-açúcar na captura de *Rhynchophorus palmarum* (L.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.27, n.2, p.177-183, 1998.

Trivellato, G.F. **Aspectos biológico e suas implicações na qualidade da produção massal de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Waldbauer, G.P.; Friedman, S. Self-selection of optimal diets by insects. **Annual Review of Entomology**, v.36, p.43-63, 1991.

Warwick, D.R.N. Principais Características do anel-vermelho e murcha-de-fitomonas. **Comunicado Técnico** - EMBRAPA, Aracaju, SE, julho, 2005. n.38.

Wattanapongsiri, A. A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). **Department of Agricultural Science Bulletin**, v.1, p.1-328, 1966.

3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Rhynchophorus palmarum* (LINNAEUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM DIETAS ARTIFICIAIS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de duas dietas artificiais sobre os aspectos biológicos qualitativos e quantitativos de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae). Na fase de ovo, foi determinado o período de incubação (dias) e a fertilidade (%). Para a fase larval foi calculada a viabilidade total e a viabilidade por instar (%), duração dos ínstaros larvais e a duração total do período larval (dias), a largura da cápsula cefálica (mm) e o peso (g) das larvas nas duas dietas (A e B). Pôde-se determinar também a duração das fases de pré-pupa e pupa (dias), bem como o peso (g), viabilidade (%) e a ocorrência de deformações (%) nas pupas. Após a emergência dos adultos de *R. palmarum*, foi realizada a sexagem e observada a razão sexual, a presença de adultos defeituosos (%), o peso (g) e comprimento (mm) dos machos e fêmeas das duas dietas artificiais. Após a formação dos casais, foram determinados os períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição (dias), fecundidade total e diária, longevidade dos machos e das fêmeas (dias), e duração do ciclo biológico (dias). Foi calculada a absorvância das amostras dos adultos de *R. palmarum* provenientes das duas dietas artificiais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e todas as variáveis das duas dietas artificiais foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de significância. A dieta A proporcionou uma maior viabilidade de larvas e pupas de *R. palmarum*. Para as dietas A e B, as larvas se desenvolveram em 142 dias e em 125 dias, respectivamente, apresentando entre 11 e 13 ínstaros, não diferindo entre si. A porcentagem de pupas deformadas na dieta B foi maior em relação à dieta A. As fêmeas da dieta A se caracterizaram por apresentarem maior peso e comprimento, quando comparadas às fêmeas da dieta B. O período de oviposição das fêmeas provenientes da dieta A foi de 32,4 dias, diferindo estatisticamente das fêmeas da dieta B com 23,5 dias. O ciclo biológico (ovo a ovo) na dieta A foi de 213,5 dias e na dieta B 194,3 dias, porém não diferiram entre si. Em relação ao teor de lipídios de *R. palmarum*, os machos adultos da dieta B apresentaram maiores médias de absorvância, enquanto as fêmeas da dieta B apresentaram valores menores.

Palavras-chave: Insecta. Broca-do-olho-do-coqueiro. Biologia. Metabolismo de lipídios.

BIOLOGICAL ASPECTS OF *Rhynchophorus palmarum* (LINNAEUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) IN ARTIFICIAL DIETS

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the influence of two artificial diets on the qualitative and quantitative biological aspects of *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae). At the egg stage, it was determined the incubation period (days) and fertility (%). For the larval stage was calculated total viability and the viability for instar (%), duration of larval instars and the total duration of the larval period (days), the width of the head capsule (mm) and weight (g) of the larvae in two diets (A and B). One can also determine the duration of the phases of pre-pupae and pupae (day), weight (g), viability (%) and the occurrence of deformation (%) in the pupa. After the emergence of adult *R. palmarum*, sexing was performed and observed sex ratio, the presence of defective adults (%), weight (g) and length (mm) of males and females of two artificial diets. After the formation of the couples were certain periods of pre-oviposition, oviposition and post-oviposition (days), total and daily fertility, longevity of males and females (days), and duration of the cycle (days). The absorbance of samples was calculated from adult *R. palmarum* from the two artificial diets. The experimental design was completely randomized and all variables of the two artificial diets were submitted to analysis of variance (ANOVA) and means compared by t-test at 5% significance level. The diet A promoted a more viable larvae and pupae of *R. palmarum*. For diets A and B, the larvae developed in 142 days and 125 days, respectively, between 11 and 13 instars, with no difference between them. The percentage of deformed pupae in the diet B was higher in relation to diet A. The females of diet A were characterized by had higher weight and length when compared to diet B. The period oviposition of females from the diet A was 32.4 days differing significantly from the female of diet B with 23.5 days. The life cycle (egg to egg) in the diet A was 213.5 days and 194.3 days in the diet B, with no difference between them. Regarding the lipid content of *R. palmarum*, the adult male diet B have the highest mean absorbance, while females diet B showed lower values.

Keywords: Insect. Giant palm weevil. Biology. Metabolism of lipids.

3.1 INTRODUÇÃO

Dentre os problemas que causam prejuízos a cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), a coleobroca *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae), popularmente conhecida como broca-do-olho-do-coqueiro, é uma das mais importantes pragas (ALDANA DE LA TORRE; ALDANA DE LA TORRE; MOYA, 2011).

Esse inseto é responsável por causar danos diretos, decorrentes da alimentação das larvas, e danos indiretos ocasionados, principalmente, pelos insetos adultos. A atividade das larvas da broca-do-olho-do-coqueiro é intensa durante a fase produtiva da planta. As larvas atacam o broto apical (palmito) e permanecem no interior das inúmeras galerias que constroem no estipe, ocasionando a morte da planta (CYSNE et al., 2013)

No estágio adulto, o macho libera uma substância que atrai ambos os sexos, geralmente para a fonte de alimento. Uma vez que os insetos se encontram no mesmo ambiente, ocorre também a cópula. As fêmeas fazem posturas em ferimentos recém-abertos na planta, reiniciando todo o ciclo de vida de *R. palmarum* (FERREIRA, 2007/2008). Além dos prejuízos decorrentes da alimentação, este inseto é o principal transmissor do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb), agente causal da doença conhecida como “anel-vermelho”, que por sua vez é letal para o coqueiro e outras palmeiras, podendo ser detectada pelo amarelecimento das folhas mais novas (MAGALHÃES; MORAES NETO; MIGUENS, 2008; AMBROGI et al., 2009; MOURA et al., 2013).

Apesar da elevada importância econômica de *R. palmarum*, estudos relacionados sobre sua biologia, comportamento e controle merecem um aperfeiçoamento. De modo a contribuir para o manejo adequado de uma praga, a criação de insetos em laboratório é indispensável, sendo necessário o conhecimento de uma técnica de criação que permita manter e multiplicar insetos comparáveis aos da natureza. A observação dos parâmetros biológicos é importante para avaliar a qualidade dos insetos criados em condições de laboratório, ou seja, é de extrema importância conhecer a preferência e os hábitos alimentares, assim como as necessidades nutricionais e suas consequências no desenvolvimento dos insetos.

Segundo Panizzi; Parra (2009), os seres vivos, geralmente, são um reflexo daquilo que consomem e no caso dos insetos, muitos aspectos da sua biologia, estão inseridos dentro de um contexto nutricional. Desse modo, para se estabelecer uma criação massal de insetos em laboratório, é imprescindível a utilização de dietas artificiais adequadas, pois, estas possibilitam a manutenção contínua de populações de insetos.

Conforme Leppla; Ashley (1989), os parâmetros biológicos mais empregados para determinar a qualidade de uma dieta são: a viabilidade das fases imaturas, as deformações morfológicas, a razão sexual, a fertilidade, a fecundidade e a longevidade dos insetos.

De acordo com Parra; Panizzi; Haddad (2009), os insetos têm como exigências nutricionais básicas: aminoácidos, vitaminas e sais minerais (nutrientes essenciais) e carboidratos, lipídios e esteróis (nutrientes não-essenciais), os quais devem ser adequadamente balanceados, principalmente na relação proteínas:carboidratos.

Segundo Santana et al. (2014), a gordura dos insetos é normalmente sintetizada a partir de carboidratos presentes na dieta e, geralmente, armazenada na forma de triglicérides. Dessa forma, torna-se relevante investigar alguns aspectos do acúmulo de reservas energéticas por insetos visando determinar a qualidade da dieta, à produção em larga escala e a viabilidade para o desenvolvimento de bioensaios em laboratório.

Na literatura há uma deficiência acerca da absorção de lipídios por adultos de *R. palmarum*. Essas informações seriam de grande interesse para o entendimento básico da biologia desse inseto, visto que, conforme Ziegler; Van Antwerpen (2006), os lipídios são a principal fonte de energia para o desenvolvimento dos ovos dos insetos. Nas fases que procedem à incubação, os teores de lipídios aumentam, principalmente durante os estágios larvais devido ao aumento na absorção dos nutrientes, podendo diminuir durante o período de pré-pupa (LAUGHLIN, 1956; BABCOCK; RUTSCHKY, 1961).

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivos avaliar a influência de duas dietas artificiais sobre os aspectos biológicos qualitativos e quantitativos de *R. palmarum*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e instalações

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Ecologia e Comportamento de Insetos (LECOM) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e desenvolvidos sob condições ambientais à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

3.2.2 Preparo das dietas

- Fase larval

As larvas foram criadas em dois tipos de dietas artificiais, conforme a Tabela 1. A dieta A foi adaptada por Negrisola Junior et al. (2011), modificada de Sánchez et al. (1993). A dieta B foi uma alteração da dieta adaptada por Negrisola Junior et al. (2011).

Tabela 1 - Composição das dietas artificiais para criação de *Rhynchophorus palmarum* em laboratório. Dieta A: adaptada por Negrisola Junior et al. (2011), modificada de Sánchez et al. (1993); e dieta B: modificada de Negrisola Junior et al. (2011).

Ingredientes	Dieta A	Dieta B (modificada)
Ácido propiônico ¹	0,75 mL	0,75 mL
Açúcar refinado	11 g	11 g
Ágar-ágar ¹	20 g	20 g
Água destilada	200 mL	200 mL
Aveia em flocos	34 g	-
Gérmen de trigo	-	34 g
Farinha de milho fina (fubá)	65 g	65 g
Fibra de cana-de-açúcar	52 g	52 g
Óleo de coco	45 gotas ou 2,0 mL	45 gotas ou 2,0 mL
Solução vitamínica ^{1,2}	20 mL	-

¹Ingredientes adicionados aos demais após a dieta esfriar;

²Componentes da solução vitamínica: ácido fólico 0,25 mg, biotina 0,02 mg, inositol 20,0 mg, niacinamida 1,0 mg, pantotenato de cálcio 1,0 mg, piridoxina 0,25 mg, riboflavina 0,5 mg, tiamina 0,25 mg e vitamina B12 0,002 mg. Todos os componentes podem ser facilmente encontrados no mercado nacional sendo que a vitamina B12 é comercializada na forma líquida e os demais componentes na forma sólida. Para obtenção da solução, todos os componentes foram misturados em 1,0 L de água destilada e armazenados sob refrigeração.

Inicialmente, para o preparo das dietas para as larvas, 52 g de um tolete de cana-de-açúcar, descascado, foi pesado em balança analítica. A fibra da cana-de-açúcar foi obtida batendo-se o tolete, sem a casca, no liquidificador com 100 mL de água destilada, a qual foi colocada em uma panela, juntamente com os demais ingredientes (Tabela 1), com exceção do ágar (que foi dissolvido em 100 mL de água destilada em fogo brando, em torno de 96°C), da solução vitamínica e do ácido propiônico. A mistura foi levada ao fogo até a obtenção do ponto de massa homogênea, quando foi acrescentado o ágar previamente dissolvido, até total homogeneização. Quando a dieta estava morna (em torno de 45°C), acrescentou-se a solução vitamínica e o ácido propiônico, e após o esfriamento, quando adquiriu uma consistência pastosa, foi colocada em um recipiente com tampa e mantida em geladeira (12°C) por, no máximo, uma semana.

- Fase adulta

Os adultos foram alimentados com pequenos toletes de cana-de-açúcar tratados com a dieta líquida, desenvolvida por Negrisoli Junior et al. (2011) (Tabela 2). A dieta foi preparada a frio misturando-se os ingredientes constantes da Tabela 2 e foi armazenada por alguns dias em geladeira, para uso posterior. No entanto, como não levou conservantes, o tempo de armazenamento foi de, no máximo, cinco dias.

Tabela 2 - Composição da dieta líquida para adultos de *Rhynchophorus palmarum* desenvolvida por Negrisoli Junior et al. (2011).

Ingredientes	Quantidade
Água destilada	1 L
Levedo de cerveja	30 g
Melaço de cana-de-açúcar	10 mL
Solução vitamínica ¹	10 mL

¹Componentes da solução vitamínica: ácido fólico 0,25 mg, biotina 0,02 mg, inositol 20,0 mg, niacinamida 1,0 mg, pantotenato de cálcio 1,0 mg, piridoxina 0,25 mg, riboflavina 0,5 mg, tiamina 0,25 mg e vitamina B12 0,002 mg. Todos os componentes podem ser facilmente encontrados no mercado nacional sendo que a vitamina B12 é comercializada na forma líquida e os demais componentes na forma sólida. Para obtenção da solução, todos os componentes foram misturados em 1,0 L de água destilada e armazenados sob refrigeração.

3.2.3 Criação de *Rhynchophorus palmarum* em dietas artificiais

Insetos adultos provenientes de plantio comercial de coqueiros da variedade gigante do município de Feliz Deserto, localizado no litoral Sul do Estado de Alagoas a 10°17'31'' de latitude Sul e 36°18'21'' de longitude Oeste, coletados através de armadilhas tipo “milkan”, com capacidade de 5 L, contendo seções de colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) medindo cerca de 10 cm de comprimento, juntamente com o feromônio Rincoforol[®], foram levados ao LECOM.

Os insetos coletados foram mantidos em gaiolas de madeira, medindo (30 cm de comprimento x 30 cm de largura x 30 cm de altura), contendo toletes de cana-de-açúcar previamente lavados com água corrente, secos em temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) e cortados longitudinalmente, os quais serviam como substrato alimentar e local de oviposição. Diariamente, esses toletes foram substituídos para que fosse realizada a coleta dos ovos depositados dentro do substrato alimentar, com o auxílio de uma faca.

Após a coleta, os ovos foram transferidos, individualmente, para placas de Petri (3 cm de diâmetro x 1 cm de altura) forradas com papel filtro umedecido com água destilada para evitar sua desidratação (Figura 3), realizando-se, a partir desse momento, a criação em laboratório.

Figura 3 - Ovo de *Rhynchophorus palmarum* coletado do tolete de cana-de-açúcar (A); e ovo individualizado na placa de Petri forrada com papel filtro umedecido com água destilada (B).

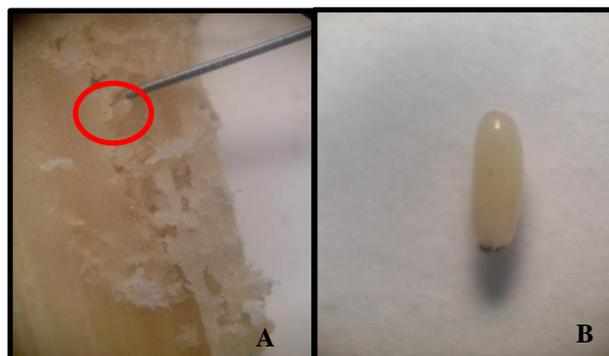


Foto: Autora (2013).

As larvas recém-eclodidas foram retiradas da placa de Petri, com auxílio de um pincel nº 000, e individualizadas em recipientes plásticos com capacidade de 100 mL devidamente tampados e contendo, aproximadamente, 1 g da dieta artificial. Para essa fase, foram individualizadas 150 larvas para cada tipo de dieta.

As dietas foram trocadas a cada dois dias para evitar contaminação. Conforme as larvas aumentavam de tamanho, a quantidade de dieta oferecida também aumentava (3 g de dieta artificial), sendo transferidas para recipientes plásticos com capacidade de 500 mL, onde as larvas permaneceram até o final do seu desenvolvimento.

A partir do 5º ínstar, dois dias após a troca da cápsula cefálica, 30 larvas alimentadas com as diferentes dietas (A e B) foram pesadas até o final desse estágio.

Nas duas dietas, a medição da cápsula cefálica de 30 larvas foi realizada durante todos os ínstars com o auxílio de um paquímetro digital.

A partir do 10º ínstar, o substrato alimentar foi modificado. As larvas passaram a se alimentar de pequenos toletes de cana-de-açúcar, permanecendo nos recipientes plásticos, com capacidade de 500 mL, juntamente com fibra de coco para auxiliar as larvas na formação do casulo para posterior pupação (Figura 4).

Os parâmetros biológicos avaliados na fase larval foram: peso das larvas (g), largura da cápsula cefálica (mm), duração dos ínstars larvais e duração total do período larval (dias), viabilidade por ínstar e viabilidade total (%).

Figura 4 - Mudança do substrato alimentar de *Rhynchophorus palmarum* a partir do 10º ínstar: (A) Larva se alimentando no interior da cana-de-açúcar; (B) Larva habitando o interior do colmo da cana-de-açúcar juntamente com a fibra de coco; e (C) Formação do casulo.



Foto: Autora (2013).

Assim que constatado o início da fase de pré-pupa, o inseto foi retirado do recipiente de alimentação e colocado em recipiente plástico, com capacidade de 100 mL, forrado com papel filtro umedecido com água destilada. Os recipientes foram cobertos com papel alumínio para simular um ambiente escuro no qual as pupas ficam protegidas dentro do casulo. As pupas de *R. palmarum* foram examinadas diariamente para que seu desenvolvimento fosse acompanhado, observando-se os períodos de pré-pupa e de pupa e a emergência do adulto (Figura 5).

Para a determinação do peso médio na fase de pupa (g), foram pesadas, individualmente, 30 pupas originárias de cada dieta 48 horas após a transformação, utilizando-se uma balança analítica.

Foi avaliada a porcentagem de pupas deformadas por ocasião do efeito das dietas. A viabilidade das pupas (%) foi determinada com base na diferença entre a quantidade de pupas obtidas e a quantidade de adultos que emergiram.

Figura 5 - Fases de pré-pupa (A), pupas (B e C) e início da fase adulta (D) de *Rhynchophorus palmarum*. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$).

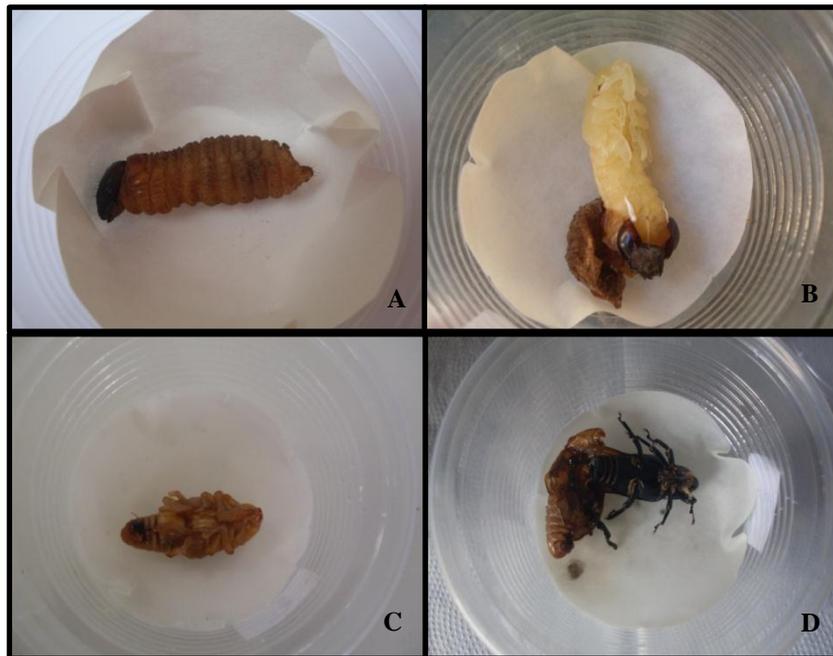


Foto: Autora (2013).

Somente na fase adulta foi realizada a sexagem para obtenção da razão sexual da espécie. O dimorfismo sexual foi determinado através da observação direta ou em microscópio estereoscópico (no caso de indivíduos de tamanho pequeno) da presença de pelos no rosto dos indivíduos machos, e da ausência dos pelos no rosto das fêmeas. A razão sexual foi calculada pela divisão do número de fêmeas pelo total de indivíduos (machos + fêmeas) (SILVEIRA-NETO et al., 1976). Ainda nessa fase, foi observada porcentagem de insetos deformados.

Os insetos adultos provenientes das duas dietas artificiais (A e B), 72 horas após a sua emergência, foram pesados (g) e mensurados (mm), individualmente. Para isso, foram selecionados 15 insetos machos e 15 fêmeas de cada tratamento, pesados em balança analítica e mensurados com paquímetro digital.

Após a realização da sexagem, 10 casais de insetos originários de cada dieta foram individualizados em recipientes plásticos com capacidade de 500 mL. Nessa fase foram observadas as seguintes variáveis: períodos de pré-oviposição, oviposição e pós-oviposição (dias), fecundidade diária e total, e longevidade das fêmeas e dos machos (dias).

Após a formação dos casais e do período de oviposição, 500 ovos postos por fêmeas provenientes de cada dieta artificial foram observados diariamente para verificar a duração do ciclo biológico (ovo a ovo) (dias), o período médio de incubação (dias) e a fertilidade (%), sendo esta última determinada pelo percentual de eclosão das larvas.

Por se tratar de um inseto que oviposita no interior do substrato alimentar, os toletes de cana-de-açúcar foram abertos diariamente, com o auxílio de uma faca, para a coleta dos ovos e, em seguida, substituídos por outros toletes.

Todos os parâmetros biológicos observados nas fases de ovo, larva, pupa e adulto dos insetos alimentados nas duas dietas artificiais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de significância por meio do programa estatístico Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2014).

3.2.4 Teor de lipídios dos adultos de *Rhynchophorus palmarum*

Após completar o ciclo de vida, oito insetos adultos mortos (machos e fêmeas) provenientes de cada dieta artificial foram analisados para verificar diferenças no acúmulo de lipídios.

Na avaliação do teor de lipídios, os adultos foram dissecados e os corpos gordurosos retirados para análise (Figura 6A). Os tecidos foram homogeneizados em solução tampão contendo acetato de sódio 10 mM, pH 4,8.

A extração de lipídios em solução foi determinada pelo método de Bligh-Dyer (1959), o qual utiliza a mistura de três solventes, clorofórmio-metanol-água. Para isso, 1 mL da amostra foi macerado com clorofórmio (CHCl_3) e metanol (MeOH) na proporção 1:2 (1,25 mL:2,5 mL) (Figura 6B), postos em tubos de ensaio e agitados em vórtex, a fim de homogeneizar a amostra, e colocados na ultrassom, durante dois minutos, para solubilizar o lipídio no solvente. Em seguida, foi acrescentado 1,25 mL de CHCl_3 no tubo de ensaio, agitados em vórtex e em seguida na ultrassom. Posteriormente, foi adicionado 1,25 mL de água destilada à amostra, sendo agitada em vórtex.

Os pesos das amostras foram padronizados acrescentando-se AD e colocadas para centrifugar a 1000 rpm durante cinco minutos à temperatura ambiente (25°C) para gerar um

sistema de duas fases (aquosa superior e inferior orgânico), e logo após recuperando aproximadamente 90% da fase orgânica com o auxílio da pipeta de Pasteur. Posteriormente, as amostras permaneceram na câmara de fluxo durante 48 horas para evaporar o solvente (Figura 6C).

O ensaio com vanilina foi utilizado para medida de lipídios no corpo gorduroso (WILLIAMS et al., 2011). A solução estoque foi constituída de 170 μL de ácido fosfórico e 830 μL de vanilina, objetivando dar cor às amostras.

Para a quantificação dos lipídios totais, aos tubos com os tecidos homogeneizados (amostras secas), foi adicionado 100 μL de ácido sulfúrico e, em seguida, colocados em “banho-maria” à 90°C por 20 min (Figura 6D). Logo após, as amostras foram resfriadas até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 50 μL da solução estoque em cada amostra e colocadas em microplaca para medir a absorbância em 540 nm (Figuras 6E e 6F).

A absorbância foi medida pelo equipamento Flexstation 3, através do programa SoftMax Pro, seguindo o protocolo Endpont. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias da absorbância dos insetos submetidos às dietas A e B comparadas pelo teste t ao nível de 5% de significância por meio do programa estatístico Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2014).

Figura 6 - Etapas para a quantificação do teor de lipídios de adultos de *Rhynchophorus palmarum*: A – inseto dissecado; B – amostra macerada para homogeneização; C - amostras prontas para evaporação do solvente; D - tubos de ensaio em “banho-maria”; E – amostras contendo a solução estoque; e F – amostras colocadas em microplacas para medir a absorbância.

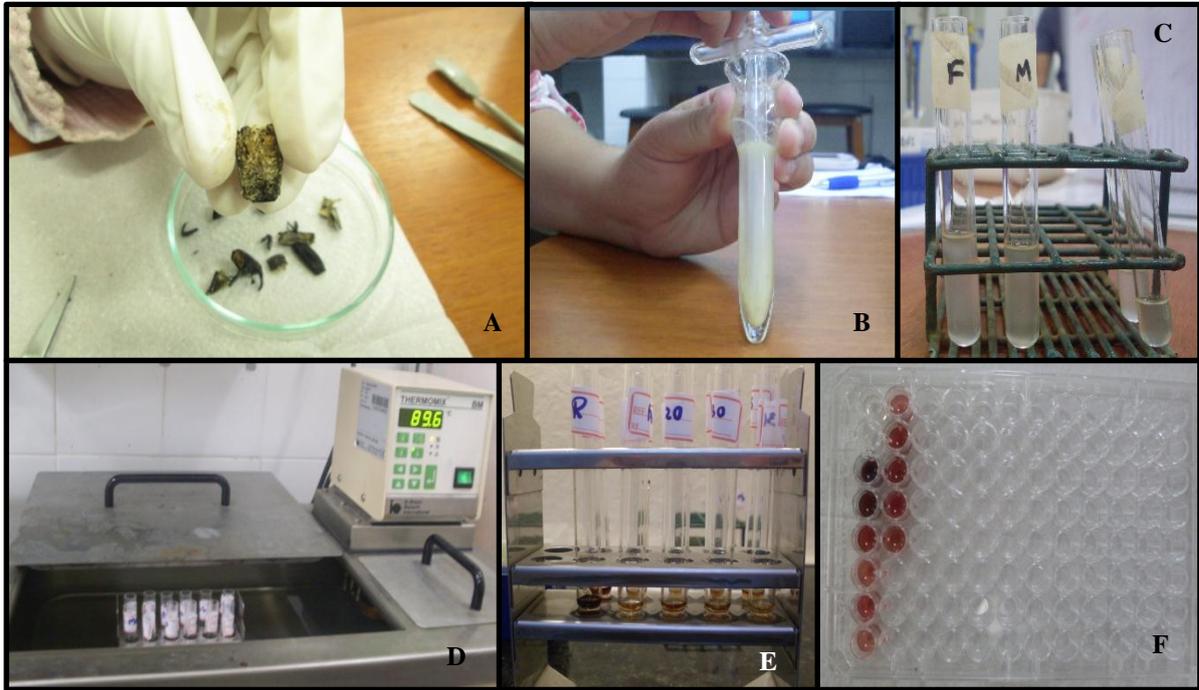


Foto: Autora (2014).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização, período de incubação e fertilidade dos ovos de *Rhynchophorus palmarum*

Os ovos de *R. palmarum* apresentam formato oblongo, coloração amarelo-claro leitosa, com córion transparente e liso (Figura 7).

Figura 7 - Ovos de *Rhynchophorus palmarum*. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).



Foto: Autora (2014).

Após a formação dos casais obtidos das duas dietas artificiais foi observado um período médio de incubação entre 2,4 e 2,6 dias (Tabela 3). Essas médias corroboram com observações de Prabhu; Patil (2009) em *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) (Olivier, 1790), criados em cana-de-açúcar, com duração média de 2,5 dias.

A fertilidade média dos ovos postos pelas fêmeas da dieta A foi de 87%, e da dieta B foi de 89,4% (Tabela 3). Esses valores são inferiores aos encontrados por Restrepo; Rivera; Raigosa (1982) que, ao estudar os aspectos biológicos de *R. palmarum* em cana-de-açúcar, constataram uma fertilidade média de 94%; sendo assim, a cana-de-açúcar supriu mais a necessidade dos insetos para produção dos ovos.

A fertilidade média dos ovos encontrada na dieta A apresenta valor semelhante aos observados em outros curculionídeos criados em dietas artificiais, como por exemplo, em *Trichobaris trinotata* (Say, 1831) (Coleoptera: Curculionidae), constatado por Cuda; Burke

(1986); e *Homalinotus coriaceus* (Gyllenhal, 1836) (Coleoptera: Curculionidae), verificado por Sarro (2002), ambos com uma média de 87%.

Tabela 3 - Média \pm EP¹ do período de incubação (dias) e da fertilidade dos ovos (%) de *Rhynchophorus palmarum* criados nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

Parâmetros biológicos	-----Tratamentos-----		
	Dieta A	Dieta B	CV (%)
Período de incubação (dias)	4,30 \pm 0,15 a	4,20 \pm 0,13 a	10,67
Fertilidade dos ovos (%)	87,00 \pm 2,67 a	89,40 \pm 1,79 a	8,15

¹Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

3.3.2 Caracterização, duração e viabilidade da fase larval de *Rhynchophorus palmarum*

A viabilidade total das larvas da dieta A foi de 100%, enquanto que na dieta B foi de 56% (Tabela 4). Dessa forma, a dieta A mostrou-se mais apropriada para a fase larval de *R. palmarum*, visto que, de acordo com Bavaresco et al. (2004); Parra (2009), uma dieta artificial é considerada adequada quando apresenta um mínimo de 75% de viabilidade.

A viabilidade por ínstar da dieta A foi de 100% em todos os ínstars. Na dieta B, a viabilidade manteve-se em 100% do 1º ao 8º ínstar; 80% das larvas que passaram pelo 9º ínstar foram viáveis; das larvas que passaram para o 10º ínstar, 60% foram viáveis; e das larvas que passaram do 11º ao 13º ínstar, 56% foram viáveis (Tabela 4). O elevado índice de mortalidade das larvas da dieta B pode ser justificado pelo fato de que essa dieta não supriu as necessidades nutricionais das larvas a partir dos 9º ínstar, não proporcionando um bom desenvolvimento das mesmas.

O número de ínstars de *R. palmarum* variou entre 11 e 13 nas duas dietas artificiais, corroborando com os valores relatados por Restrepo; Rivera; Raigosa (1982) ao criar larvas de *R. palmarum* em cana-de-açúcar. Na dieta A, 64% das larvas passaram por 11 ínstars, 24% por 12 ínstars e 12% por 13 ínstars. Já na dieta B, 50% das larvas passaram por 11 ínstars, 4% por 12 ínstars e apenas 2% por 13 ínstars (Figura 8).

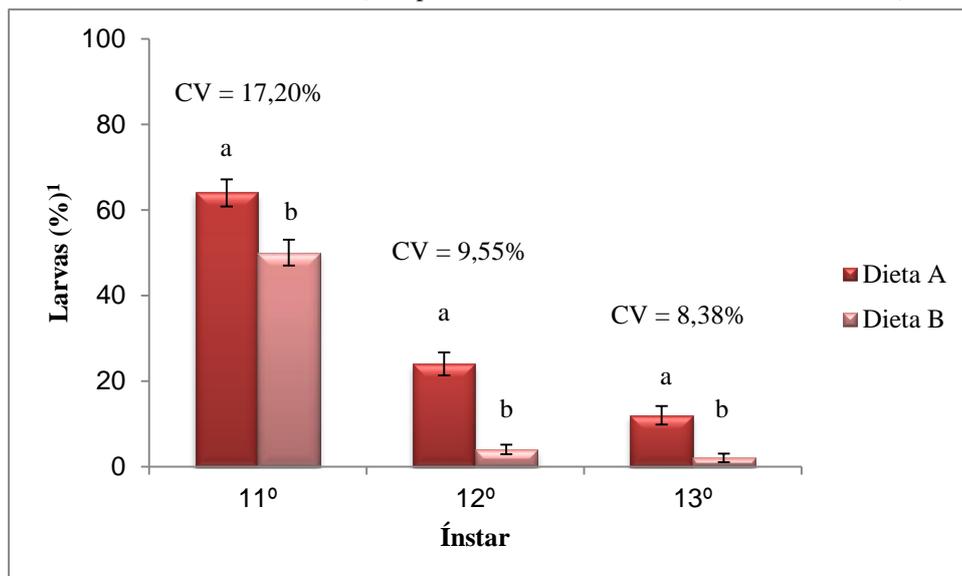
Tabela 4 - Média \pm EP¹ da viabilidade larval total e por ínstar de *Rhynchophorus palmarum* criados nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

Parâmetros biológicos	-----Tratamentos-----		CV (%)
	Dieta A	Dieta B	
Viabilidade larval total (%)	100,00 \pm 0,00 a	56,00 \pm 3,33 b	9,53
Viabilidade por ínstar (%)			
1º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
2º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
3º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
4º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
5º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
6º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
7º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
8º	100,00 \pm 0,00 a	100,00 \pm 0,00 a	0,00
9º	100,00 \pm 0,00 a	80,00 \pm 2,81 b	6,98
10º	100,00 \pm 0,00 a	60,00 \pm 1,72 b	4,81
11º	100,00 \pm 0,00 a	56,00 \pm 3,33 b	9,54
12º	100,00 \pm 0,00 a	56,00 \pm 3,33 b	9,54
13º	100,00 \pm 0,00 a	56,00 \pm 3,33 b	9,54

¹Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

Figura 8 - Média \pm EP da porcentagem de larvas de *Rhynchophorus palmarum* que passaram pelo 11º, 12º e 13º ínstar, criadas nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).



¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas agrupadas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

Na criação de *R. palmarum*, em ambas dietas artificiais, foi possível verificar que durante os 13 ínstaros houve um crescimento notável das larvas, atingindo, aproximadamente, 5,5 cm de comprimento (Figura 9). Conforme Panizzi; Parra (2009), é durante a fase larval que os insetos tendem a escolher um alimento apropriado para consumi-lo em proporções balanceadas a fim de utilizá-lo adequadamente para proporcionar um ótimo crescimento e desenvolvimento, originando um adulto que seja reprodutivamente competitivo.

Figura 9 - Desenvolvimento larval de *Rhynchophorus palmarum*: A (1° ínstar); B (2° ínstar); C (3° ínstar); D (4° ínstar); E (5° ínstar); F (6° ínstar); G (7° ínstar); H (8° ínstar); I (9° ínstar); J (10° ínstar); K (11° ínstar); L (12° ínstar) e M (13° ínstar). (Temp. $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

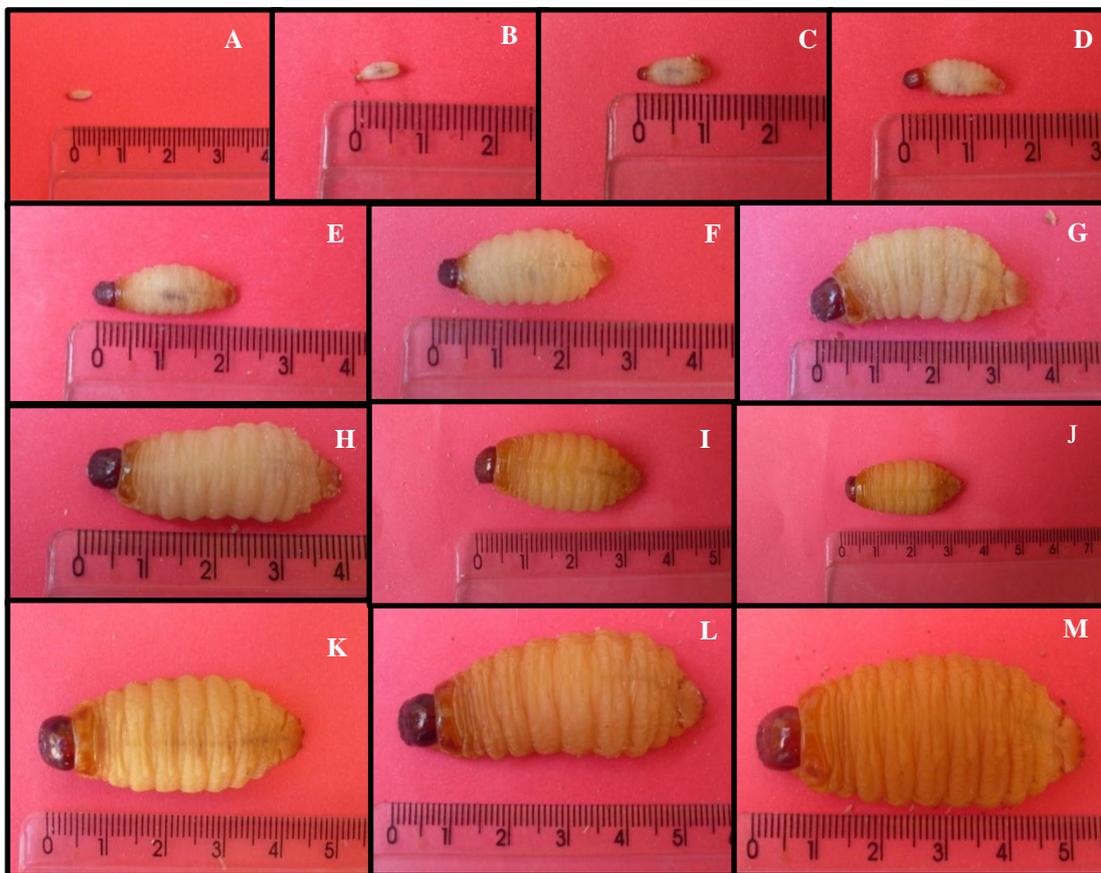


Foto: Autora (2013).

Não houve diferença estatística na duração média total do período larval de *R. palmarum*, que foi de 142,8 dias para a dieta A e de 125,4 dias para a dieta B (Tabela 5), sendo esses valores superiores aos encontrados por diversos autores. Hagley (1965) observou que as larvas de *R. palmarum* tiveram uma duração de 52 dias, quando criadas no estipe do coqueiro. Por outro lado, de acordo com Restrepo, Rivera e Raigosa (1982), as larvas criadas em cana-de-açúcar duraram 120 dias; e conforme Zagatti et al. (1993), 83 dias. Prabhu; Patil (2009) verificaram que o período médio larval de *R. ferrugineus* criadas com cana-de-açúcar

foi de 55,69 dias; enquanto Martín; Cabello (2006) constataram uma duração média de 95,33 dias quando as larvas foram criadas em dieta artificial.

Tabela 5 - Média \pm EP¹ da duração da fase larval e dos ínstaes (dias) de *Rhynchophorus palmarum* criadas nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

Parâmetros biológicos	-----Tratamentos-----		
	Dieta A	Dieta B	CV (%)
Duração da fase larval (dias)	142,80 \pm 2,51 a	125,40 \pm 10,40 a	17,83
Duração dos ínstaes larvais (dias)			
1°	4,80 \pm 0,33 a	4,80 \pm 0,33 a	21,52
2°	4,20 \pm 0,39 a	3,40 \pm 0,45 a	35,09
3°	3,80 \pm 0,25 a	3,20 \pm 0,49 a	35,12
4°	4,80 \pm 0,25 a	4,40 \pm 0,64 a	33,99
5°	5,60 \pm 0,16 a	5,80 \pm 1,04 a	41,35
6°	7,20 \pm 0,13 a	8,60 \pm 0,98 a	27,99
7°	10,80 \pm 0,57 a	12,20 \pm 0,95 a	21,61
8°	13,60 \pm 0,58 a	15,40 \pm 1,28 a	21,61
9°	14,80 \pm 1,06 a	14,60 \pm 1,36 a	26,25
10°	20,00 \pm 1,38 a	18,00 \pm 1,05 a	20,46
11°	14,20 \pm 1,48 a	17,20 \pm 0,74 a	23,60
12°	21,00 \pm 2,07 b	36,00 \pm 1,00 a	18,01
13°	18,00 \pm 1,41 b	48,00 \pm 2,00 a	16,60

¹Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

De acordo com Parra (2009), as propriedades físicas da dieta, como dureza, textura, homogeneização e conteúdo de água podem ter papel importante para o inseto. Pode-se conseguir modificação física da dieta adicionando-se celulose, a qual não é digerida pelos insetos. Ela funciona como um estímulo para o inseto, fazendo com que seja ingerida maior quantidade de alimento. Ainda de acordo com o mesmo autor, muitos insetos apresentam alimentação e crescimento melhorados ao adicionar celulose às suas dietas. Dessa forma, a

função da celulose é alterar a textura da dieta, facilitando a passagem do alimento para o tato digestivo.

Observando-se a duração de cada ínstar larval, das duas dietas artificiais, foi possível constatar que, apesar das larvas da dieta B serem mais desenvolvidas, estas não diferiram da dieta A em relação à duração dos 11 primeiros ínstaes larvais. Ocorreu diferença estatística entre a duração dos ínstaes larvais de *R. palmarum*, criadas nas duas dietas, apenas no 12º e 13º ínstar. Também foi possível perceber que as larvas da dieta B que passaram por 12 e 13 ínstaes se desenvolveram mais lentamente nesses períodos (Tabela 5).

O desenvolvimento larval de alguns insetos em dietas sem ácido nucleico ocorre de maneira muito lenta. Porém, se for adicionado RNA (ou adenina) à dieta, o seu desenvolvimento se dará mais rapidamente (PARRA, 2009).

A cada mudança de ínstar larval de *R. palmarum*, a largura das cápsulas cefálicas foram medidas e pode-se observar que as cápsulas cefálicas das larvas criadas na dieta B apresentaram maior desenvolvimento do que as das larvas da dieta A, diferindo significativamente na maioria dos ínstaes. Somente no 12º ínstar houve um acréscimo no tamanho das cápsulas cefálicas das larvas da dieta A, diferindo, assim, da dieta B. Não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação à largura da cápsula cefálica apenas no 3º, 11º e 13º ínstar (Tabela 6).

As larvas foram pesadas do 5º até o 13º ínstar e foi observado que as larvas da dieta B se desenvolveram mais rapidamente, obtendo pesos superiores em todos os ínstaes e diferindo estatisticamente das médias observadas nas larvas criadas na dieta A (Tabela 7).

Segundo Parra; Haddad (1989), durante um estágio de desenvolvimento o peso aumenta constantemente e, então, decresce rapidamente no período de ecdise devido à perda de água e da cutícula, ocorrendo, após a ecdise, um aumento rápido de peso em relação ao nível anterior.

Tabela 6 - Média \pm EP¹ da largura da cápsula cefálica (mm) dos diferentes ínstaes de *Rhynchophorus palmarum* criados nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

Ínstaes	-----Largura da cápsula cefálica (mm)-----		
	Dieta A	Dieta B	CV (%)
1°	0,86 \pm 0,01 b	1,01 \pm 0,01 a	5,19
2°	1,13 \pm 0,01 b	1,26 \pm 0,01 a	6,79
3°	1,50 \pm 0,02 a	1,64 \pm 0,02 a	9,92
4°	1,80 \pm 0,01 b	2,04 \pm 0,02 a	8,49
5°	2,19 \pm 0,02 b	2,54 \pm 0,03 a	9,67
6°	2,63 \pm 0,02 b	3,22 \pm 0,02 a	5,30
7°	2,98 \pm 0,02 b	3,69 \pm 0,01 a	3,95
8°	3,72 \pm 0,02 b	4,54 \pm 0,03 a	5,08
9°	4,62 \pm 0,02 b	5,27 \pm 0,02 a	2,71
10°	5,60 \pm 0,03 b	6,56 \pm 0,04 a	4,55
11°	7,09 \pm 0,04 a	7,28 \pm 0,02 a	3,72
12°	8,53 \pm 0,07 a	8,37 \pm 0,02 b	1,55
13°	9,23 \pm 0,03 a	9,11 \pm 0,01 a	1,55

¹Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

Tabela 7 - Média \pm EP¹ do peso (g) dos diferentes ínstaras larvais de *Rhynchophorus palmarum* criados nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

-----Peso larval por ínstar (g)-----									
Tratamentos	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°
Dieta A	0,100 \pm 0,004 b	0,185 \pm 0,003 b	0,290 \pm 0,004 b	0,570 \pm 0,019 b	1,284 \pm 0,035 b	2,231 \pm 0,070 b	3,463 \pm 0,092 b	6,322 \pm 0,135 b	7,414 \pm 0,098 b
Dieta B	0,235 \pm 0,010 a	0,584 \pm 0,035 a	1,370 \pm 0,092 a	2,181 \pm 0,090 a	3,354 \pm 0,131 a	4,828 \pm 0,137 a	6,301 \pm 0,154 a	7,595 \pm 0,033 a	8,254 \pm 0,048 a
CV (%)	14,71	20,25	24,89	15,00	13,01	9,75	8,23	4,47	3,12

¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

3.3.3 Caracterização, duração e viabilidade das fases de pré-pupa e pupa de *Rhynchophorus palmarum*

A fase de pré-pupa teve início quando a larva parava de se alimentar e apresentava movimentos bruscos quando tocada (Figura 10). As larvas permaneciam nessa fase por 4,3 dias na dieta A e por 4,2 dias na dieta B, não ocorrendo diferença significativa (Tabela 8). Períodos próximos verificados na duração da fase de pré-pupa foram encontrados por Sarro (2002) ao utilizar dietas artificiais na criação de *H. coriaceus* e constatar duração de 4,89 a 6,87 dias. Prabhu; Patil (2009) verificaram que a duração média do período de pré-pupa de *R. ferrugineus*, criadas com cana-de-açúcar, foi de 7,4 dias.

Figura 10 - Fase de pré-pupa de *Rhynchophorus palmarum*. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).



Foto: Autora (2013).

Tabela 8 - Média \pm EP¹ da duração das fases de pré-pupa e pupa (dias), da viabilidade e deformações (%), e do peso (g) das pupas de *Rhynchophorus palmarum* criadas nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h²).

Parâmetros biológicos	-----Tratamentos-----		
	Dieta A	Dieta B	CV (%)
Duração da fase de pré-pupa (dias)	4,3 \pm 0,15 a	4,2 \pm 0,13 a	10,67
Duração da fase de pupa (dias)	11,90 \pm 0,23 a	12,00 \pm 0,30 a	7,08
Viabilidade das pupas (%)	74,00 \pm 3,36 a	40,03 \pm 2,00 b	15,36
Deformações das pupas (%)	7,34 \pm 0,67 b	22,11 \pm 2,51 a	39,51
Peso das pupas (g)	2,56 \pm 0,09 a	2,36 \pm 0,07 a	14,77

¹Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

²Exceto para a fase de pré-pupa.

Fonte: Autora (2014).

A pupa de *R. palmarum* se apresenta de coloração branco-amarelada, a qual escurece conforme se aproxima o período de emergência do adulto (Figura 11), permanecendo nessa fase durante 11,9 dias na dieta A e 12,0 dias na dieta B, não ocorrendo diferença significativa (Tabela 8). Esses resultados são bem inferiores aos encontrados por Restrepo; Rivera; Raigosa (1982); Zagatti et al. (1993) ao criar *R. palmarum* em cana-de-açúcar, observando duração do período pupal de 28 e 30 dias, respectivamente. Martín; Cabello (2006) também observaram valores superiores na duração do período de pupa de *R. ferrugineus* criados em dieta artificial, com uma média de 27,83 dias. Segundo Auad (2003), menor duração do estágio pupal é importante por fornecer adultos em menos tempo e aumentar a densidade populacional dos insetos em laboratório.

Figura 11 - Alterações na coloração da pupa de *Rhynchophorus palmarum* durante o seu desenvolvimento. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).



Foto: Autora (2013).

A viabilidade das pupas foi de 74% para a dieta A e de 40,26% para a dieta B, diferindo significativamente entre si (Tabela 8). Houve uma elevada taxa de mortalidade das pupas da dieta B, possivelmente devido à carência de algum nutriente fundamental para o seu desenvolvimento que estava presente apenas na dieta A. Conforme Michaud (2005), um balanço nutricional inadequado nas dietas artificiais pode estar associado a um nutriente que torna limitado o desenvolvimento dos estágios finais dos insetos.

A porcentagem de pupas deformadas verificadas na dieta A foi de 7,34%, diferindo estatisticamente da dieta B com média igual a 22,11% (Tabela 8).

As pupas que, na fase larval se alimentaram das diferentes dietas, foram pesadas, porém não se constataram diferenças estatísticas entre as médias de 2,56 g para a dieta A e de 2,36 g para a dieta B (Tabela 8). Esses resultados indicam que não há problemas com preferência alimentar ou resistência do tipo antibiose, pois de acordo com Santos; Meneguim; Neves (2005), o menor peso da pupa indicaria a não preferência alimentar ou ainda, resistência do tipo antibiose.

3.3.4 Parâmetros biológicos da fase adulta de *Rhynchophorus palmarum*

Após a emergência dos adultos de *R. palmarum*, pôde-se determinar a porcentagem de insetos deformados, sendo constatado 5,13% para a dieta A e 2,50% para a dieta B (Tabela 9). Esses insetos apresentaram deformações nas asas e/ou a fêmea tornou-se defeituosa por apresentar o ovipositor exposto (Figura 12). De acordo com Parra (2009), os insetos utilizam lipídios e podem sintetizá-los a partir de proteínas e carboidratos presentes nas dietas artificiais. Entretanto, alguns ácidos graxos não são sintetizados pelos insetos, como os ácidos linoléico e linonênico. O ácido linonênico está relacionado à formação de fosfatídeos lipídicos e, quando ausente, pode afetar a ecdise, a formação das asas e a emergência de alguns insetos.

O peso dos adultos foi outro parâmetro estudado para avaliação das diferenças que pudessem ocorrer devido aos diferentes tipos de alimentação empregados na criação das larvas. Assim, para os insetos alimentados com as dietas A e B, observou-se que o peso dos machos adultos não apresentou diferença significativa entre as dietas. As fêmeas adultas da dieta B apresentaram uma média de 1,00 g, diferindo estatisticamente das fêmeas da dieta A, com 1,31 g (Tabela 9).

Os machos adultos das dietas artificiais A e B apresentaram 34,88 e 33,03 mm de comprimento, respectivamente, não diferindo entre si. As fêmeas da dieta B mediram 31,31 mm de comprimento, apresentando, assim, diferenças estatísticas em relação aos insetos da dieta A, com 34,82 mm (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros biológicos \pm EP¹ de *Rhynchophorus palmarum* criados nas dietas A e B. (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

Parâmetros biológicos	-----Tratamentos-----		
	Dieta A	Dieta B	CV (%)
Deformações dos adultos (%)	5,13 \pm 1,82 a	2,50 \pm 2,50 a	11,58
Peso dos machos (g)	1,13 \pm 0,05 a	1,14 \pm 0,05 a	13,66
Peso das fêmeas (g)	1,31 \pm 0,10 a	1,00 \pm 0,01 b	20,32
Comprimento dos machos (mm)	34,88 \pm 0,78 a	33,03 \pm 0,51 a	6,15
Comprimento das fêmeas (mm)	34,82 \pm 0,66 a	31,31 \pm 0,33 b	4,95
Longevidade dos machos (dias)	48,40 \pm 6,12 a	49,00 \pm 5,07 a	36,51
Longevidade das fêmeas (dias)	44,60 \pm 5,34 a	37,50 \pm 6,10 a	44,16
Período de pré-oviposição (dias)	14,90 \pm 0,62 a	13,90 \pm 0,38 a	11,32
Período de oviposição (dias)	32,40 \pm 1,18 a	23,50 \pm 2,48 b	22,01
Período de pós-oviposição (dias)	10,20 \pm 1,09 a	13,40 \pm 1,13 a	29,76
Fecundidade total	213,70 \pm 27,92 a	182,40 \pm 25,37 a	42,59
Fecundidade diária	7,18 \pm 0,85 a	7,95 \pm 1,23 a	44,22
Razão sexual	0,65 \pm 0,02 a	0,68 \pm 0,05a	16,81
Duração do ciclo biológico (dias)	213,50 \pm 10,88 a	194,30 \pm 8,52 a	15,16

¹Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

Figura 12 - Adultos de *Rhynchophorus palmarum* com deformações nas asas (A e B) e fêmea com o ovipositor exposto (C). (Temp. $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).



Foto: Autora (2013).

A longevidade das fêmeas foi de 44,6 dias para a dieta A e de 37,5 dias para a dieta B, enquanto os machos viveram em média 48,4 e 49 dias, nas dietas A e B, respectivamente, não apresentando diferenças significativas (Tabela 9). Corroborando com os resultados encontrados nesse estudo, Kaakeh (2005), criando *R. ferrugineus* em dieta artificial a base de aveia, observou que a longevidade média dos machos foi de 49,2 dias e das fêmeas de 44,7 dias. Em contrapartida, esses valores foram inferiores aos encontrados por Prabhu; Patil

(2009) em *R. ferrugineus* criados em cana-de-açúcar, os quais obtiveram a longevidade média dos machos de 70,6 dias e das fêmeas de 68,7 dias.

Do momento da formação dos casais até a morte das fêmeas foi possível observar que o período de pré-oviposição foi de 14,9 dias para a dieta A e 13,9 dias para a dieta B. O período de oviposição foi mais curto para as fêmeas da dieta B, durando 23,5 dias e diferindo estatisticamente da dieta A, com 32,4 dias. O período de pós-oviposição não diferiu estatisticamente entre as dietas durando em média 10,2 dias na dieta A e 13,4 dias na dieta B (Tabela 9).

Durante todo o seu ciclo, as fêmeas colocaram, aproximadamente, 213 ovos na dieta A e 182 ovos na dieta B, colocando em média 7,18 e 7,95 ovos/fêmea/dia, respectivamente. A razão sexual foi de 0,65 e 0,68 para as dietas A e B, respectivamente (Tabela 9). Kaakeh (2005), criando *R. ferrugineus* em cana-de-açúcar, palmito e em dieta a base de aveia, verificou que as fêmeas colocaram de 135 a 185 ovos durante todo o seu ciclo, colocando em média 1,65 a 3,0 ovos/fêmea/dia, apresentando resultados bem inferiores aos encontrados nessa pesquisa.

Santos; Meneguim; Neves (2005) relatam que alguns parâmetros reprodutivos, como a produção de ovos, podem ser influenciados por diferenças físicas ou químicas do alimento ou pela quantidade ingerida na fase larval.

Sabendo-se que os nutrientes podem ser armazenados em grandes quantidades nos corpos gordurosos das larvas e adultos, e que para se obter longevidade e fecundidade ótimas, as fêmeas adultas requerem sais variados, lipídios e vitaminas em adição a aminoácidos ou proteínas (PARRA, 2009), possivelmente, as necessidades nutricionais das fêmeas adultas da dieta A foram supridas devido a presença da solução vitamínica e do maior teor de carboidratos e proteínas presentes nos ingredientes dessa dieta para a fase larval.

A duração do ciclo biológico de *R. palmarum* (ovo a ovo) foi de, aproximadamente, 213 dias na dieta A e de 194 dias na dieta B (Tabela 9), não diferindo estatisticamente entre si. Em estudos realizados por Sánchez et al. (1993), em cana-de-açúcar, a duração do ciclo biológico de *R. palmarum* foi de 231 dias.

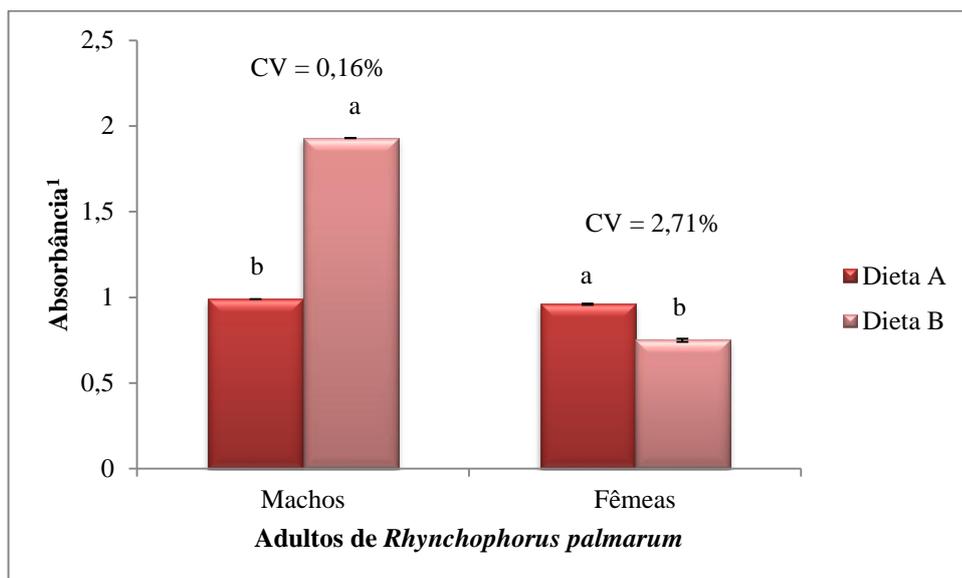
Nava; Parra (2005) afirmam que quando se comparam dietas, aquela que proporciona menor duração do ciclo é considerada a melhor para o desenvolvimento biológico dos indivíduos em estudo, já que, os alimentos mais adequados propiciam, normalmente, menor duração das fases de desenvolvimento e maior sobrevivência.

3.3.5 Determinação do teor de lipídios em *Rhynchophorus palmarum*

As dietas artificiais utilizadas foram capazes de suprir as necessidades fisiológicas dos adultos de *R. palmarum*. Foi possível observar que os machos adultos de *R. palmarum* provenientes da dieta B apresentaram maiores médias de absorbância, diferindo estatisticamente dos machos da dieta A. Em relação as fêmeas adultas de *R. palmarum*, os insetos originários da dieta A, apresentaram maiores médias de absorbância quando comparados aos insetos da dieta B, ocorrendo diferenças estatísticas entre si (Figura 13).

Do ponto de vista nutricional, para inúmeras espécies, os lipídios são mais importantes para as formas jovens do que para os insetos adultos (DADD, 1985), sendo possível sintetizá-los a partir de proteínas e carboidratos presentes nas dietas artificiais (PANIZZI; PARRA, 2009).

Figura 13 - Média da absorbância \pm EP das amostras dos adultos de *Rhynchophorus palmarum* provenientes das dietas artificiais (A e B) em comprimento de onda de 540 nm.



¹Médias seguidas pela mesma letra nas colunas agrupadas não diferem estatisticamente entre si pelo teste t ao nível de 5% de significância.

Fonte: Autora (2014).

O corpo gorduroso dos insetos desempenha um importante papel na síntese de proteínas e armazenamento de lipídios (PONTES et al., 2008), sendo o triglicerídeo o principal componente lipídico que, por sua vez, na maioria dos insetos, compreende mais de 90% da gordura corporal. Esses depósitos de lipídios são derivados dos lipídios da dieta que são absorvidos e transportados para o corpo gorduroso dos insetos (BEENAKKERS; VAN DER HORST; VAN MARREWIJK, 1985).

Segundo Santana et al. (2014), larvas de *R. palmarum* submetidas à dieta artificial apresentaram maiores teores de lipídios quando comparadas às larvas alimentadas com o mesocarpo de coco.

De acordo com Beenackers; Van Der Horst; Van Marrewijk (1985), as fêmeas dos insetos contêm mais lipídios que os machos, sendo essa reserva lipídica responsável pela produção de ovos; no entanto, o inverso também pode ocorrer, como constatado no presente estudo. Ainda segundo esses autores, a quantidade de lipídios nos insetos varia consideravelmente e é influenciada por vários fatores, dentre eles, estágio de desenvolvimento, estado nutricional, sexo, temperatura, diapausa e voo.

Conforme Hahn; Denlinger (2007); Mirth; Riddiford (2007), o nível de nutrientes armazenados é de grande importância, principalmente no ciclo de vida dos insetos holometabólicos, pois as reservas energéticas acumuladas, além de serem utilizadas nos processos de metamorfose, irão promover a reserva de nutrientes para o inseto adulto. Segundo Ziegler; Van Antwerpen (2006), as reservas energéticas armazenadas também interferem no desenvolvimento do ovo e em períodos prolongados de voo.

3.4 CONCLUSÕES

- ✓ É possível e viável criar a broca-do-olho-do-coqueiro *R. palmarum* em condições de laboratório;
- ✓ Levando em consideração a viabilidade das fases de larva e pupa, a dieta A é a mais adequada para a criação de *R. palmarum* em laboratório;
- ✓ As larvas de *R. palmarum*, nas duas dietas artificiais, se desenvolvem entre 11 e 13 ínstars;
- ✓ O período de oviposição das fêmeas provenientes da dieta A é de 32,4 dias;
- ✓ O ciclo biológico de *R. palmarum*, criados em laboratório com dietas artificiais, é de aproximadamente sete meses;
- ✓ Em relação ao teor de lipídios, os machos adultos de *R. palmarum* da dieta B e as fêmeas adultas da dieta A apresentam maiores médias de absorbância.

REFERÊNCIAS

- Aldana de la Torre, R.C.; Aldana de la Torre, J.A.; Moya, O.M. **Manejo del picudo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae)**. Bogotá: Línea Agrícola, 2011. 49p.
- Ambrogi, B.G. et al. Feromônios de agregação em curculionidae (Insecta: Coleoptera) e sua implicação taxonômica. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2151-2158, 2009.
- Auad, A.M. Aspectos biológicos dos estágios imaturos de *Pseudodorus clavatus* (Fabricius) (Diptera: Syrphidae) alimentados com *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) em diferentes temperaturas. **Neotropical Entomology**, v.32, n.3, p.475-480, 2003.
- Babcock, K.L.; Rutschky, C.W. Lipids in insect eggs. A review with new evidence for the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. **Annals of the Entomological Society of America**, v.54, n.2, p.156-164, 1961.
- Bavaresco, A. et al. Adequação de uma dieta artificial para a criação de *Spodoptera cosmioides* (walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, v.33, n.2, p.155-161, 2004.
- Beenackers, A.M.T.; Van Der Horst, D.J.; Van Marrewijk, W.J.A. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. **Progress in Lipid Research**, v.24, p.19-67, 1985.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- Cuda, J.P.; Burke, H.R. Reproduction and development of the Potato Stalk Borer, (Coleoptera: Curculionidae) with notes on field biology. **Journal of Economic Entomology**, v.79, n.6, p.1549-54, 1986.
- Cysne, A.Q. et al. Manejo de *Rhynchophorus palmarum* em campo de produção de sementes de palma de óleo. **Documentos** – EMBRAPA, Manaus, AM, Novembro, 2013. n.107.
- Dadd, R.H. Nutrition: Organisms. In. Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. (Eds.). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. Pergamon Press, 1985, v.4, p.313-390.

Ferreira, J.M.S. Manejo integrado de pragas do coqueiro. **Ciência Agrícola**, v.8, n.1, p.21-29, 2007/2008.

Hagley, E.A.C. On the life history and habitats of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.). **Annals of the Entomological Society of America**, v.58, p.22-28, 1965.

Hahn, D.A.; Denlinger, D.L. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. **Journal Insect Physiology**, v.53, n.8, p.760-773, 2007.

Kaakeh, W. Longevity, fecundity, and fertility of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae) on natural and artificial diets. **Emirates Journal of Agricultural Sciences**, v.17, n.1, p.23-33, 2005.

Laughlin, R. Storage and utilization of reserves by the garden chafer, *Phyllopertha horticola* L. **The Journal of Experimental Biology**, v.33, p.566-575, 1956.

Leppla, N.C.; Ashley, T.R. Quality control in insect mass production: a review and model. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v.35, n.4, p.33-44, 1989.

Magalhães, J.A.S.; Moraes Neto, A.H.A.; Miguens, F.C. Nematodes of *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae), vector of the Red Ring disease in coconut plantations from the north of the Rio de Janeiro State. **Parasitology Research**, v.102, n.6, p.1281-1287, 2008.

Martín, M.M.; Cabello, T. Manejo de la cria del picudo rojo de la palmera, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera, Dryophthridae), em dieta artificial y efectos em su biometria y biologia. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v.32, p.631-641, 2006.

Michaud, J.P. On the assessment of prey suitability in aphidophagous Coccinellidae. **European Journal of Entomology**, v.102, p.385-390, 2005.

Mirth, C.K.; Riddiford, L.M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. **BioEssays**, v.29, n.4, p.344-55, 2007.

Moura, J.I.L. et al. Preferência do bicudo-das-palmeiras por dendezeiro, caiaué e por seu híbrido interespecífico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.4, p.454-456, 2013.

Nava, D.E.; Parra, J.R.P. Biologia de *Stenoma cantenifer* Walsingham (Lepidoptera: Elachistidae) em dieta natural e artificial e estabelecimento de um sistema de criação. **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.751-759, 2005.

Negrison Junior, A.S. et al. Criação em laboratório da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) visando pesquisas para o controle das suas larvas. **Comunicado Técnico** – EMBRAPA, Aracaju, SE, dezembro, 2011. n.116.

Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. Introdução à bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos** – base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, 2009, p.21-36.

Parra, J.R.P.; Haddad, M.L. **Determinação do número de instares de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1989, 49p.

Parra, J.R.P. A evolução das dietas artificiais e suas interações em ciência e tecnologia. In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos** – base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, 2009, p.91-174.

Parra, J.R.P.; Panizzi, A.R.; Haddad, M.L. Índices nutricionais para medir consumo e utilização de alimentos por insetos. In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (Eds.). **Bioecologia e nutrição de insetos** – base para o manejo integrado de pragas. Brasília: Embrapa, 2009, p.37-90.

Pontes, E.G. et al. Dynamics of lipid accumulation by the fat body of *Rhodnius prolixus*: The involvement of lipophorin binding sites. **Journal of Insect Physiology**, v.54, p.790-797, 2008.

Prabhu, S.T.; Patil, R.S. Studies on the biological aspects of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v.22, p.732-733, 2009.

Restrepo, L.G.; Rivera, F.; Raigosa, J. Ciclo de vida, hábitos y morfometría de *Metamasius hemipterus* Oliver. y *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) en caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L.). **Acta Agronómica**, v.32, p.33-44, 1982.

Sánchez, P.A. et al. Biology and behaviour of *Rhynchophorus palmarum*. **Boletín de Entomología Venezolana**, v.8, p.83-93, 1993.

Santana, C.C. et al. Avaliação do desenvolvimento e reservas energéticas de larvas de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) em diferentes dietas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.9, n.2, p.205-209, 2014.

Santos, K.B.; Meneguim, A.M.; Neves, P.M.O.J. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology**, v.34, n.6, p.903-910, 2005.

Sarro, F.B. **Biologia da broca do pedúnculo floral do coqueiro *Homalinotus coriaceus* (Gyllenhal, 1836) (Coleoptera: Curculionidae) em três dietas**. 2002. 70f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2002.

Silva, F.A.S.; Azevedo, C.A.V.A. Assistat. **Assistência estatística**. Versão 7.7 beta, 2014.

Silveira-Neto, S. et al. **Manual de ecologia dos insetos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1976. 419p.

Williams, C.M. et al. Triacylglyceride measurements in small quantities of homogenised insect tissue: comparison and caveats. **Journal of Insect Physiology**, v.57, n.12, p.1602-1613, 2011.

Zagatti, P. et al. Continuous rearing of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* in the laboratory. **Oleagineux**, v.48, n.5, p.213-217, 1993.

Ziegler, R.; Van Antwerpen, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, n.4, p.264-272, 2006.

4 SUSCEPTIBILIDADE DE *Rhynchophorus palmarum* (LINNAEUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) A FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações dos isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, do isolado T9 de *Trichoderma harzianum* Rifai e do produto comercial Boveril[®] sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (5x3) + testemunha, composto por cinco tratamentos (isolados IBCB 66, CPATC 032, CPATC 057 e T9, e pelo produto comercial Boveril[®]) e três concentrações de cada fungo (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹). Seções de colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) foram submersos nas suspensões padronizadas dos fungos por um período de 30 minutos. Os adultos de *R. palmarum* foram colocados em recipientes plásticos contendo os colmos de cana-de-açúcar, previamente tratados pelo fungo, onde permaneceram em contato com o inóculo durante três horas. Os tratamentos foram constituídos por cinco repetições compostas por cinco insetos cada, totalizando 25 insetos/tratamento, mais 25 insetos utilizados na testemunha. Os dados obtidos de mortalidade confirmada foram submetidos à análise da variância (ANOVA), utilizando o Proc ANOVA do SAS, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para determinar a porcentagem de sobrevivência, os dados de mortalidade confirmada foram submetidos ao teste de Log-Rank, através do método Kaplan-Meier. Posteriormente os valores da CL₅₀ e TL₅₀ foram estimados submetendo os dados de mortalidade confirmada à análise de Probit. O produto comercial Boveril[®] e os isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 causaram a mortalidade confirmada de 40, 36, 64 e 52% dos adultos de *R. palmarum*, respectivamente, para a concentração 10^9 conídios.mL⁻¹, não diferindo da concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, onde o isolado CPATC 032 ocasionou mortalidade de 52% dos insetos, que por sua vez não diferiu do isolado CPATC 057, o qual apresentou 44% de mortalidade confirmada dos adultos. Em relação à sobrevivência média de *R. palmarum*, na concentração 10^7 conídios.mL⁻¹, foi possível verificar que houve diferença significativa entre o isolado CPATC 032 (12,25 dias) e o isolado T9, o produto Boveril[®] e a testemunha, com médias entre 14 e 19 dias. Na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, para o isolado CPATC 032, os insetos apresentaram sobrevivência de aproximadamente 11 dias, não diferindo do produto Boveril[®], com sobrevivência aproximada de 13 dias. Na concentração 10^9 conídios.mL⁻¹, a sobrevivência média para o produto Boveril[®] e os isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 foi de 12 a 15 dias, não diferindo entre si. O isolado CPATC 032 apresentou maior virulência e menor CL₅₀, estimando-a em $1,11 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹; enquanto o TL₅₀ para as concentrações 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ foi de 17,61 dias e 17,25 dias, respectivamente.

Palavras-chave: *Cocos nucifera*. Broca-do-olho-do-coqueiro. *Beauveria bassiana*. *Trichoderma harzianum*.

SUSCEPTIBILITY OF *Rhynchophorus palmarum* (LINNAEUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of different concentrations of isolated IBCB 66, CPATC 032 and CPATC 057 of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, isolated T9 of *Trichoderma harzianum* Rifai and commercial product Boveril[®] on adult *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae). The experimental design was completely randomized in a factorial design (5x3) + control, composed of five treatments (isolated IBCB 66, CPATC 032, CPATC 057 and T9, and the commercial product Boveril[®]) and three concentrations of each fungus (10^7 , 10^8 and 10^9 conidia.mL⁻¹). Sections of stems of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) were submerged in the standard suspension of the fungi for a period of 30 minutes. Adults of *R. palmarum* were placed in plastic containers containing the stems of cane sugar, previously treated by the fungus, which remained in contact with the inoculum for three hours. The treatments consisted of five replication of five insects each, totaling 25 insects/treatment, over 25 insects used in the control. The data of confirmed mortality were submitted to analysis of variance (ANOVA) using the Proc ANOVA of SAS, and the means compared by Tukey test at 5% probability. To determine percentage survival, confirmed mortality data were subjected to Log-Rank test using the Kaplan-Meyer method. Subsequently the values of LC₅₀ and LT₅₀ were estimated submitting mortality confirmed the Probit analysis. The commercial product Boveril[®] and isolated IBCB 66, CPATC 032 and CPATC 057 caused the confirmed mortality of 40, 36, 64 and 52% of *R. palmarum* adults, respectively, for the concentration 10^9 conidia.mL⁻¹ did not differ concentration of 10^8 conidia.mL⁻¹, where the isolated CPATC 032 caused mortality of 52% of the insects, which in turn did not differ isolated CPATC 057, which showed 44% confirmed mortality of adults. From the average survival of *R. palmarum*, concentration 10^7 conidia.mL⁻¹, we found a significant difference between the isolated CPATC 032 (12.25 days) and the isolated T9, the product Boveril[®] and the control, with average between 14 and 19 days. The concentration 10^8 conidia.mL⁻¹, for the isolated CPATC 032, the insects had survival of approximately 11 days, did not differ from product Boveril[®], with approximate survival of 13 days. In the concentration 10^9 conidia.mL⁻¹, the median survival for the product Boveril[®] and isolated IBCB 66, CPATC 032 and CPATC 057 was 12 to 15 days, with no difference between them. The isolated CPATC 032 showed higher virulence and lower LC₅₀, estimating it in $1,11 \times 10^9$ conidia.mL⁻¹; while the LT₅₀ in concentrations 10^8 and 10^9 conidios.mL⁻¹ was 17.61 days and 17.25 days, respectively.

Keywords: *Cocos nucifera*. Giant palm weevil. *Beauveria bassiana*. *Trichoderma harzianum*.

4.1 INTRODUÇÃO

A coleobroca *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Curculionidae) é uma praga-chave da cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), responsável por causar danos diretos, decorrentes da alimentação das larvas, e danos indiretos ocasionados, principalmente, pelos insetos adultos, sendo os principais vetores do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb, 1919) Baujard, 1989 (Nematoda: Aphelenchoididae), que por sua vez pode provocar a morte da planta (OEPP, 2005).

O controle de *R. palmarum* sempre se baseou nos hábitos comportamentais do inseto e na utilização de práticas culturais. No entanto, existem na natureza agentes bióticos com elevado potencial para provocar mudanças na população dessa espécie, a exemplo de vírus, fungos, bactérias e nematoides, cuja utilização em larga escala pode contribuir para manter a população da praga abaixo do Nível de Dano Econômico (NDE) (FERREIRA, 2002). Dentre esses agentes biológicos de controle de insetos-praga, os fungos causam cerca de 80% das enfermidades (ALVES, 1998).

Os fungos apresentam grande capacidade de controle de insetos-praga devido ao seu modo de ação, que consiste na adesão dos conídios no tegumento dos insetos, podendo também penetrar por ingestão; e pela dispersão horizontal, com o seu transporte feito por diversos agentes a grandes distâncias, aumentando a sua capacidade de disseminação no ambiente e podendo atingir vários insetos-pragas (ALVES, 1998). Além disso, pode apresentar um amplo espectro de hospedeiros, sendo possível o seu cultivo em laboratório (LEITE et al., 2003).

Sabendo-se que os insetos adultos de *R. palmarum* não permanecem nas plantas, apenas alimentam-se e ovipositam, e suas larvas completam o ciclo no interior do estipe do coqueiro, a aplicação de fungos entomopatogênicos diretamente sobre os insetos torna-se ineficiente. Desse modo, uma alternativa viável em campo é inocular os fungos em atrativos alimentares e torná-los disponíveis aos insetos por meio de armadilhas de autoinoculação, onde o inseto pode entrar e sair livremente das armadilhas, causando a mortalidade direta dos insetos dentro das armadilhas ou disseminando a doença no campo.

Entre os fungos entomopatogênicos mais conhecidos e estudados estão os dos gêneros *Entomophthora* Fresenius, *Verticillium* Viègas, *Hirsutella* Fischer, *Cordyceps* Fries, *Aschersonia* Webber, *Metarhizium* Sorokin, *Beauveria* Vuillemin e *Nomuraea* Moubanc (CARNEIRO et al., 2004).

De acordo com Lazzarini (2005), *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin tem um ciclo biológico que permite sua caracterização como um parasita facultativo. Seus conídios podem penetrar em qualquer parte da cutícula do inseto. Após atravessar a cutícula, formam-se tubos germinativos e hifas que atravessam o tegumento. Na hemolinfa do inseto, o fungo se multiplica e logo há uma massa hifal considerável. O inseto morre e, com o esgotamento dos nutrientes, se houverem condições favoráveis, o fungo germina, exteriorizando suas hifas, formando uma massa branca na superfície do inseto morto.

O gênero *Trichoderma* Persoon reúne espécies que se encontram entre os fungos de solo mais comumente encontrados. Além de uma capacidade adaptativa elevada, apresentam também grande potencial de dispersão (SANTOS, 2010). A utilização dos fungos do gênero *Trichoderma* para o controle biológico de pragas e doenças baseia-se na degradação de enzimas hidrolíticas. Em geral, diferentes estirpes de *Trichoderma* spp. exibem diferentes níveis de expressão dessas enzimas hidrolíticas, o que leva a diferenças de desempenho quando utilizados como agentes de controle biológico (GONZÁLEZ et al., 2012). De acordo com Shakeri; Foster (2007), quitinase e proteases são duas destas enzimas responsáveis pela degradação da parede celular dos fungos fitopatogênicos e da cutícula dos insetos e nematoides, que é composta principalmente de quitina.

Conforme foi observado por Lamovšek; Urek; Trdan (2013), a quitina também está presente na cutícula dos ovos de nematoides, cuja viabilidade diminui severamente quando tratados com espécies de *Trichoderma* spp.

Considerando que existe uma grande variabilidade genética nas espécies de fungos, a seleção de isolados é fundamental em estudos de controle biológico de pragas com entomopatógenos, a fim de estabelecer uma ferramenta natural e uma alternativa ecológica e viável para superar os problemas ocasionados pelos insetos-praga. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações dos isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 de *B. bassiana*, do isolado T9 de *Trichoderma harzianum* Rifai e do produto comercial Boveril[®] sobre adultos de *R. palmarum*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local e instalações

Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Entomologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) da Unidade de Execução de Pesquisa (UEP) Rio Largo, localizada na Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (U.A. CECA), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), a temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

4.2.2 Coleta de adultos de *Rhynchophorus palmarum*

Os insetos foram coletados em pomares de coco localizados no município de Coqueiro Seco, situado na Zona da Mata do Estado de Alagoas a $09^\circ38'16''$ de latitude Sul e $35^\circ48'10''$ de longitude Oeste. Para captura dos insetos adultos, utilizaram-se 10 armadilhas do tipo “milkan”, com capacidade de 5 L, em cujas tampas foram feitos furos e instalados funis para facilitar a entrada e evitar a saída dos insetos. Dentro dos baldes foram colocadas seções de colmos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (atrativo alimentar) mais uma cápsula do feromônio comercial (Rincoforol[®]). As armadilhas foram instaladas na periferia do pomar e os insetos adultos foram coletados quinzenalmente, quando também eram substituídos o atrativo alimentar e as cápsulas do feromônio, quando necessário (Figura 14).

Figura 14 - Armadilhas instaladas para coleta de adultos de *Rhynchophorus palmarum* (A e B); e insetos capturados dentro da armadilha (C).

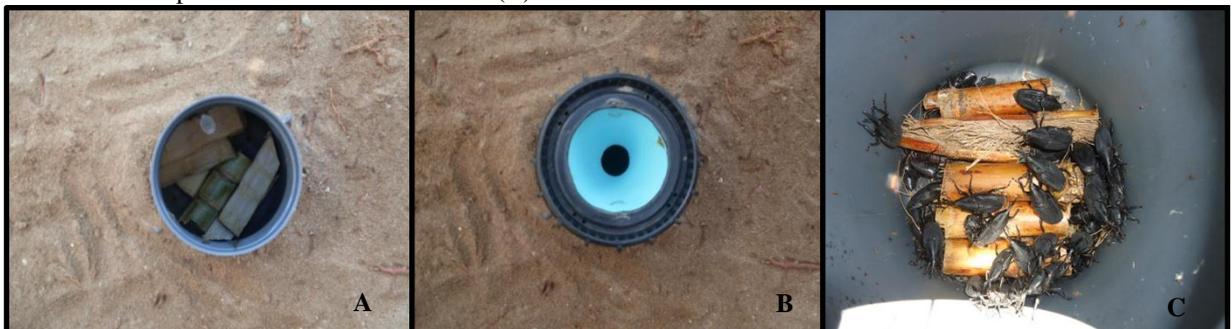


Foto: Autora (2013).

4.2.3 Origem dos fungos entomopatogênicos

Os isolados de *B. bassiana* e *T. harzianum* utilizados no estudo foram originários de diferentes hospedeiros e localidades. Utilizou-se o produto comercial Boveril[®], à base do fungo *B. bassiana*, e quatro isolados de fungos, sendo três de *B. bassiana* e um de *T. harzianum* (Tabela 10).

Tabela 10 - Procedência dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* e do produto comercial Boveril[®] utilizados nos experimentos com *Rhynchophorus palmarum*.

Fungos	Isolados	Hospedeiro	Localidade
<i>B. bassiana</i>	IBCB 66	<i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae)	São José do Rio Pardo-SP
	CPATC 032	<i>R. palmarum</i>	Aracaju-SE
	CPATC 057	<i>Homalinotus coriaceus</i> (Gyllenhal, 1836) (Coleoptera: Curculionidae)	Aracaju-SE
	Boveril ^{®1}	<i>Solenopsis</i> sp. (Westwood, 1840) (Hymenoptera: Formicidae)	Piracicaba-SP
<i>T. harzianum</i>	T9	Solo	Jaguariúna-SP

¹Produto comercial Boveril[®] PM PL63/Koppert Biological Systems, à base do fungo *Beauveria bassiana*.

4.2.4 Teste de viabilidade dos fungos entomopatogênicos

A viabilidade dos conídios de todos os isolados e do produto comercial foi determinada pelo método da germinação, inoculando-se 0,1 mL de suspensão de cada isolado em duas placas de Petri contendo ágar-ágar e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalsky. Foi determinada a concentração inicial do inóculo na suspensão de cada fungo, encontrando-se os seguintes valores: IBCB 66 ($1,21 \times 10^9$ conídios.0,1mL⁻¹), CPATC 032 ($5,35 \times 10^8$ conídios.0,1mL⁻¹), CPATC 057 ($4,30 \times 10^8$ conídios.0,1mL⁻¹), T9 ($9,7 \times 10^8$ conídios.0,1mL⁻¹) e Boveril[®] ($1,98 \times 10^8$ conídios.0,1mL⁻¹).

Em seguida, as placas de Petri foram mantidas em câmaras tipo BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h e as leituras realizadas em microscópio óptico de luz para encontrar a viabilidade dos conídios, que foi determinada através da contagem direta nas placas de Petri dos conídios germinados e não germinados (ALVES; MORAES, 1998), sendo que, para isto, as placas de

Petri foram divididas em quatro quadrantes, sobre os quais foram colocadas lamínulas para leitura em microscópio.

4.2.5 Preparação das suspensões de esporos dos fungos entomopatogênicos

Para obtenção dos isolados IBCB 66 e T9, os fungos foram produzidos em meio de cultura semi-sólido de arroz, submetendo-os a diluições com Água Destilada Esterilizada (ADE). Para obter a suspensão padrão do isolado IBCB 66 foram adicionados 200 g de arroz em 300 mL de ADE; e para o isolado T9 diluiu-se 100 g de arroz em 200 mL de ADE. A partir dessas suspensões, coadas em gaze esterilizada, foram realizadas diluições sucessivas para permitir a contagem direta dos esporos em microscópio óptico de luz, utilizando-se a câmara de Neubauer. Depois de determinada a concentração de esporos da suspensão-padrão para IBCB 66 e T9, equivalente a $1,21 \times 10^{10}$ e $9,7 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ de suspensão, respectivamente, foram realizadas novas diluições em ADE mais espalhante adesivo Will Fix[®] (0,1%) visando padronizar as concentrações empregadas no experimento (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ de suspensão).

Para preparar a suspensão do produto comercial Boveril[®] misturou-se 150 g do produto (pó) em 300 mL de ADE. As suspensões foram coadas em gaze esterilizada e quantificadas em câmara de Neubauer após diluições sucessivas. Depois de determinada a concentração de esporos da suspensão-padrão do produto Boveril[®] equivalente a $1,98 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ de suspensão, foram realizadas novas diluições em ADE mais Will Fix[®] (0,1%) visando padronizar as concentrações empregadas no experimento (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ de suspensão).

Os isolados CPATC 032 e CPATC 057 foram obtidos a partir dos conídios dos isolados cultivados em placas de Petri contendo meio BDA da Micoteca da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Discos de micélio retirados dos isolados CPATC 032 e CPATC 057 foram repicados no centro de 20 placas de Petri contendo meio BDA e mantidas a 25°C por 10 dias. Após esse período, foram preparadas suspensões fúngicas mediante adição de 10 mL de ADE em cada placa de Petri. As suspensões foram coadas em gaze esterilizada e quantificadas em câmara de Neubauer após diluições sucessivas. Depois de determinada a concentração de esporos da suspensão-padrão para CPATC 032 e CPATC 057 de $5,35 \times 10^9$ e $4,3 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ de suspensão, respectivamente, foram realizadas novas diluições em ADE mais Will Fix[®] (0,1%), visando padronizar as concentrações empregadas no experimento (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ de suspensão).

4.2.6 Bioensaios de inoculação dos fungos

Seções de quatro colmos de cana-de-açúcar, medindo cerca de 10 cm de comprimento, foram cortados e abertos longitudinalmente. Os colmos foram submersos nas suspensões padronizadas de esporos dos isolados IBCB 66, CPATC 032, CPATC 057 e T9, e do produto comercial Boveril[®] nas concentrações 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹ de suspensão + espalhante adesivo Will Fix[®] (0,1%), por um período de 30 minutos, conforme Mendonça (2007) (Figura 15). No tratamento testemunha, os colmos foram imersos somente em água destilada + espalhante adesivo Will Fix[®] (0,1%), durante o mesmo período dos demais tratamentos. Os adultos de *R. palmarum* foram separados em grupo de 25 insetos e transferidos para baldes (5 L) lacrados e com as tampas perfuradas contendo os colmos de cana-de-açúcar previamente tratados pelo fungo, onde permaneceram em contato com o inóculo durante três horas (Figura 16), de acordo com metodologia descrita por Mendonça (2007). Para isso, foram utilizados nos testes de inoculação insetos (ambos os sexos) aparentemente sadios e de tamanho uniforme.

Figura 15 - Imersão dos colmos de cana-de-açúcar na suspensão dos fungos entomopatogênicos: IBCB 66 (A), CPATC 032 (B), CPATC 057 (C), Boveril[®] (D) e T9 (E).



Foto: Autora (2014).

Figura 16 - Adultos de *Rhynchophorus palmarum* em contato com os colmos de cana-de-açúcar tratados pelos fungos entomopatogênicos.



Foto: Autora (2013).

Após o período de inoculação com os fungos, seções do colmo da cana-de-açúcar foram oferecidos aos insetos como substrato de alimentação. Os insetos foram individualizados em recipientes plásticos (500 mL), sendo o alimento substituído a cada três dias. As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente por um período de 20 dias, tempo suficiente para os fungos estudados completarem o seu ciclo de vida na presença de um hospedeiro.

Os insetos mortos foram lavados com Hipoclorito de Sódio (2%) e, posteriormente, com água destilada, visando limpar a superfície dos mesmos, sendo, em seguida, individualizados em recipientes plásticos (100 mL) contendo algodão esterilizado e umedecido com ADE e mantidos em estufa incubadora tipo BOD (T. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h), visando confirmar a mortalidade por meio da esporulação dos fungos (Figura 17).

Figura 17 - Assepsia dos insetos com Hipoclorito de Sódio (2%) (A), água destilada (B) e, posteriormente, colocados em BOD (C).



Foto: Autora (2013).

4.2.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (5x3) + testemunha, composto por cinco tratamentos (isolados IBCB 66, CPATC 032, CPATC 057 e T9, e pelo produto comercial Boveril[®]) e três concentrações de cada fungo (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹). Os tratamentos foram constituídos por cinco repetições compostas por cinco insetos cada, totalizando 25 insetos/concentração de fungo, mais 25 insetos utilizados na testemunha.

Os dados de mortalidade confirmada (porcentagem dos insetos nos quais ocorreu esporulação do fungo), transformados em arco seno $\sqrt{(x/100)}$, e os dados de viabilidade dos conídios dos isolados de *B. bassiana* e *T. harzianum*, e do produto Boveril[®] foram submetidos

à análise da variância (ANOVA), utilizando o Proc ANOVA do SAS versão 9.0, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (SAS INSTITUTE, 2002).

Mediante os dados de mortalidade confirmada dos adultos de *R. palmarum*, determinou-se a porcentagem de sobrevivência média, sendo os dados submetidos ao teste de Log-Rank, através do método Kaplan-Meyer por pares de isolado, usando o Proc Lifetest. Na determinação da Concentração Letal (CL_{50}) e do Tempo Letal (TL_{50}) dos isolados IBCB 66, CPATC 032, CPATC 057 e T9, e do produto Boveril[®], os dados de mortalidade confirmada de adultos de *R. palmarum* foram submetidos a análise de Probit. Para todas as análises utilizou-se o programa estatístico SAS versão 9.0 (SAS INSTITUTE, 2002).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Viabilidade dos fungos entomopatogênicos

A viabilidade dos conídios dos isolados IBCB 66, CPATC 032, CPATC 057 e T9, e do produto comercial Boveril[®] mostraram-se adequadas, sendo que os isolados CPATC 057 e IBCB 66 apresentaram, respectivamente, maior e menor porcentagem de viabilidade, não diferindo dos demais tratamentos (Tabela 11). Alves; Faria (2010) considera que seja de qualidade satisfatória uma viabilidade acima de 80% nos produtos comerciais à base de esporos puros.

Tabela 11 - Média \pm EP¹ da viabilidade (%) dos conídios dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* e do produto comercial Boveril[®].

Tratamentos	Viabilidade (%)
IBCB 66	97,00 \pm 0,82 b
CPATC 032	98,00 \pm 0,82 ab
CPATC 057	99,25 \pm 0,96 a
Boveril^{®2}	98,75 \pm 1,26 ab
T9	98,25 \pm 0,96 ab
CV (%)	0,99

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

²Produto comercial Boveril[®] PM PL63/Koppert Biological Systems, à base do fungo *Beauveria bassiana*.
Fonte: Autora (2014).

4.3.2 Patogenicidade dos isolados de *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum*, e do produto comercial Boveril[®] sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum*

Após a morte dos insetos pela ação dos isolados dos fungos *B. bassiana* e *T. harzianum*, e do produto Boveril[®], as hifas começaram a emergir, iniciando-se, associada ao crescimento micelial, a esporulação do fungo, recobrindo o corpo do inseto (Figura 18).

Figura 18 - Evolução da infecção de adultos de *Rhynchophorus palmarum* pelos isolados do fungo *Beauveria bassiana* e pelo produto comercial Boveril® (A) e *Trichoderma harzianum* (B). (Temp. $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h).



Apenas 8% dos insetos da testemunha utilizada no experimento apresentaram esporulação de fungo, sendo esse fato ocasionado pela ocorrência natural do fungo *B. bassiana* em campo. Todos os isolados, nas três concentrações testadas (10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹), mostraram-se patogênicos aos adultos de *R. palmarum* (Tabela 12).

Apesar de o isolado T9 de *T. harzianum* ter sido patogênico aos adultos de *R. palmarum*, penetrando na sua cutícula, que é composta principalmente de quitina (SHAKERI; FOSTER, 2007), as concentrações utilizadas do fungo não influenciaram na porcentagem de mortalidade dos mesmos (Tabela 12).

O produto comercial Boveril® e os isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 provocaram a mortalidade confirmada de 40, 36, 64 e 52% dos adultos de *R. palmarum*, respectivamente, quando alimentados com seções do colmo de cana-de-açúcar tratadas com a concentração 10^9 conídios.mL⁻¹, observando-se diferenças significativas somente em relação a mortalidade confirmada ocasionada na testemunha e na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹ (Tabela 12).

Tabela 12 – Média \pm EP¹ da mortalidade confirmada (%) de adultos de *Rhynchophorus palmarum* alimentados com cana-de-açúcar tratada com fungos entomopatogênicos nas concentrações de 10⁷, 10⁸ e 10⁹ conídios.mL⁻¹. (Temp. 26 \pm 1°C, UR 60 \pm 10% e fotofase de 12 h).

Tratamentos	-----Concentração (conídios.mL ⁻¹)-----			
	0	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
IBCB 66	8,00 \pm 4,29 aB	4,00 \pm 2,86 aB	16,00 \pm 5,72 bcAB	36,00 \pm 6,44 abA
CPATC 032	8,00 \pm 4,29 aC	32,00 \pm 5,72 aBC	52,00 \pm 7,87 aAB	64,00 \pm 6,44 aA
CPATC 057	8,00 \pm 4,29 aC	24,00 \pm 5,72 aBC	44,00 \pm 9,30 abAB	52,00 \pm 5,72 aA
Boveril^{®2}	8,00 \pm 4,29 aB	8,00 \pm 4,29 aB	20,00 \pm 3,57 bcAB	40,00 \pm 7,15 abA
T9	8,00 \pm 4,29 aA	4,00 \pm 2,86 aA	8,00 \pm 4,29 cA	12,00 \pm 6,44 bA

¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV = 23,49%.

²Produto comercial Boveril[®] PM PL63/Koppert Biological Systems, à base do fungo *Beauveria bassiana*.
Fonte: Autora (2014).

A eficiência das concentrações fúngicas utilizadas no controle de insetos-praga está relacionada com a variabilidade que existe entre os isolados de *B. bassiana*. Sheeba et al. (2001), ao avaliar o gorgulho-do-arroz *Sitophilus oryzae* (L., 1763) (Coleoptera: Curculionidae) durante 20 dias após serem tratados com o isolado MTCC 2028 de *B. bassiana* nas concentrações 3,2x10⁵, 2,5x10⁶ e 3,9x10⁷ conídios.mL⁻¹, constataram mortalidade média confirmada de 28, 48,4 e 75,8%, respectivamente.

Pedrini et al. (2010) estudaram a eficiência do isolado GHA de *B. bassiana*, em quatro concentrações, sobre adultos de *Tribolium castaneum* (Herbst., 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Coleoptera: Tenebrionidae), imersos na suspensão fúngica por 6 segundos e avaliados durante 14 dias após serem tratados, e observaram mortalidade confirmada de 0, 0, 0 e 4% para *T. castaneum* e 0, 6,7, 12,5 e 10,6% para *U. dermestoides* nas concentrações 10⁶, 10⁷, 10⁸ e 10⁹ conídios.mL⁻¹, respectivamente.

Na concentração 10⁷ conídios.mL⁻¹, a porcentagem de mortalidade confirmada do Boveril[®] e dos isolados T9, IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 foi de 8, 4, 4, 32 e 24%, respectivamente, não diferindo entre si (Tabela 12). Enquanto isso, Pires et al. (2010) constataram mortalidade confirmada de 13% de lagartas de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917)

(Lepidoptera: Gelechiidae) ao alimentá-las com folíolos de tomateiro pulverizados com a suspensão do isolado CPATC 057 na concentração de 10^7 conídios.mL⁻¹.

Rondelli et al. (2012) constataram que o produto comercial Boveril[®], na concentração 10^7 conídios.mL⁻¹, foi responsável pela mortalidade confirmada de 86,4% de lagartas da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), apresentando, dessa maneira, resultados bem superiores aos encontrados no presente estudo. Provavelmente, essa elevada diferença na porcentagem da mortalidade ocorreu devido à forte esclerose do exoesqueleto e dos élitros dos insetos pertencentes à ordem Coleoptera (COSTA LIMA, 1952), dificultando a penetração do fungo, o que não ocorre na ordem Lepidoptera.

Para a concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, o isolado CPATC 032 ocasionou mortalidade de 52% dos insetos, porém não diferiu significativamente do isolado CPATC 057, o qual apresentou 44% de mortalidade confirmada dos adultos de *R. palmarum*. A mortalidade confirmada causada pelo produto Boveril[®] e pelos isolados T9 e IBCB 66 foi de 20, 8 e 16%, respectivamente, não diferindo entre si (Tabela 12). Em contrapartida, Giometti et al. (2010) encontraram mortalidade confirmada de 70% ao tratar os adultos do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) com o isolado IBCB 66 na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹. Possivelmente, essa diferença pode estar associada ao método de aplicação do fungo diretamente no inseto, garantindo um maior índice de mortalidade.

Diferenças encontradas nos índices de mortalidade confirmada podem estar relacionadas à virulência dos isolados de *B. bassiana* ou ainda pelo modo de aplicação do fungo. Lo Verde et al. (2015), ao tratar adultos de *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae) com o isolado L1 de *B. bassiana* durante 30 segundos na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, verificaram 20% de mortalidade confirmada. Por outro lado, Nussenbaum; Lecuona (2012) verificaram que os isolados de *B. bassiana* Bb 23, Bb 286, Bb 301 e Bb 302 ocasionaram mortalidade de 90-92% sobre os adultos de *A. grandis*, quando tratados por 15 segundos com a concentração 5×10^5 conídios.mL⁻¹.

Na concentração 10^9 conídios.mL⁻¹, o produto Boveril[®] e os isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 ocasionaram mortalidade de 40, 36, 64 e 52% dos insetos, respectivamente, não ocorrendo diferenças significativas entre esses isolados. O isolado T9 de *T. harzianum* ocasionou a mortalidade de apenas 12% dos insetos (Tabela 12).

Embora o isolado CPATC 032 não tenha diferido estatisticamente dos demais tratamentos, exceto do isolado T9, é provável que a maior porcentagem de mortalidade de *R.*

palmarum ocasionada por esse tratamento esteja relacionada ao fato de ser um fungo isolado do próprio inseto em estudo, proporcionando uma maior virulência.

Ainda em relação ao isolado CPATC 032, valor próximo foi encontrado por Mendonça (2007), que, ao estudar a eficiência desse isolado sobre adultos de *R. palmarum*, alimentados com colmos de cana-de-açúcar previamente tratados pelo fungo na concentração 10^9 conídios.mL⁻¹, durante 3 horas, constatou 61,4% de mortalidade dos insetos.

Resultados próximos, porém, mantendo os insetos em contato direto com a suspensão fúngica, foram encontrados por Almeida et al. (2009), os quais verificaram que o isolado IBCB 66 de *B. bassiana* na concentração $1,12 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ causou mortalidade confirmada de 40% dos adultos do moleque-da-bananeira *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae).

4.3.3 Análise de sobrevivência dos adultos de *Rhynchophorus palmarum* tratados com fungos entomopatogênicos

Com relação à sobrevivência média, ou seja, o tempo de vida dos adultos de *R. palmarum* após serem alimentados com seções do colmo de cana-de-açúcar tratadas com os fungos entomopatogênicos, na concentração 10^7 conídios.mL⁻¹ foi possível verificar que houve diferença significativa entre o isolado CPATC 032 (12,25 dias) e o isolado T9, o produto Boveril® e a testemunha, com médias entre 14 e 19 dias (Tabela 13).

Pode-se constatar que os insetos alimentados com a cana-de-açúcar tratada com o isolado CPATC 032, na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, apresentou sobrevivência de aproximadamente 11 dias, não diferindo apenas do produto Boveril®, com sobrevivência aproximada de 13 dias (Tabela 13). Esses valores divergem dos resultados encontrados por outros autores, possivelmente, devido aos insetos não estarem em contato direto com a solução fúngica. Como por exemplo, Nussenbaum; Lecuona (2012) verificaram que adultos de *A. grandis* tratados durante 15 segundos com os isolados de *B. bassiana* Bb 23, Bb 286, Bb 301 e Bb 302, apresentaram sobrevivência média de 7 a 9 dias.

Por outro lado, Lo Verde et al. (2015) ao tratar adultos de *R. ferrugineus* com o isolado L1 de *B. bassiana* durante 30 segundos na concentração 10^8 conídios.mL⁻¹, constataram sobrevivência aproximada de 23 dias.

A sobrevivência média dos adultos de *R. palmarum* expostos ao alimento tratado com a concentração 10^9 conídios.mL⁻¹ do produto Boveril® e dos isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 foi de 12 a 15 dias, não diferindo entre si. O isolado T9 apresentou sobrevivência

média de 17 dias, não diferindo apenas da testemunha (Tabela 13). Os resultados deste estudo mostraram-se mais eficientes que os encontrados por Dembilio et al. (2010), os quais verificaram que a sobrevivência média dos adultos de *R. ferrugineus* imersos na suspensão fúngica do isolado EABb 07/06-Rf de *B. bassiana*, durante 90 segundos, foi de 16 dias.

Tabela 13 - Média \pm EP¹ da sobrevivência (dias) de adultos de *Rhynchophorus palmarum* alimentados com cana-de-açúcar tratada com fungos entomopatogênicos nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 conídios.mL⁻¹. (Temp. $26 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h).

Tratamentos	-----Concentração (conídios.mL ⁻¹)-----		
	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹
Testemunha	19,50 \pm 0,50 a	19,50 \pm 0,50 a	19,50 \pm 0,50 a
IBCB 66	13,00 \pm 0,00 abc	17,75 \pm 0,95 a	14,78 \pm 1,62 bc
CPATC 032	12,25 \pm 1,81 c	11,77 \pm 1,14 c	12,87 \pm 1,25 cd
CPATC 057	13,33 \pm 0,56 abc	15,91 \pm 1,25 ab	15,85 \pm 1,18 abc
Boveril ^{®2}	14,50 \pm 0,50 ab	13,60 \pm 0,51 abc	12,70 \pm 2,07 cd
T9	16,00 \pm 0,00 a	16,00 \pm 4,00 a	17,00 \pm 2,52 ab
	$\chi^2 = 11,50^*$	$\chi^2 = 17,60^*$	$\chi^2 = 14,83^*$

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Log-Rank por pares de isolados após análise de sobrevivência pelo método Kaplan-Meyer.

²Produto comercial Boveril[®] PM PL63/Koppert Biological Systems, à base do fungo *Beauveria bassiana*.

*Significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Autora (2014).

4.3.4 Determinação da Concentração Letal (CL₅₀) para adultos de *Rhynchophorus palmarum*

Com base nos valores de mortalidade confirmada dos adultos de *R. palmarum* alimentados com cana-de-açúcar tratada com os fungos, todos os isolados foram selecionados para determinar a CL₅₀, entretanto, apenas o isolado CPATC 032 apresentou-se viável (menor CL₅₀) no controle de *R. palmarum* em condições de laboratório. A CL₅₀ do isolado CPATC 032 foi estimada em $1,11 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ com limites inferior e superior de $5,47 \times 10^7$ e $3,83 \times 10^{15}$, respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14 - Estimativa da Concentração Letal (CL₅₀) para os fungos entomopatogênicos sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum*. (Temp. 26 ± 1°C, UR 60 ± 10% e fotofase de 12 h).

Isolado	CL ₅₀ (conídios.mL ⁻¹) (IC 95%) ²	χ^2 ⁽³⁾	Valor P ⁽⁴⁾	β ⁽⁵⁾
IBCB 66	3,21x10 ¹⁵ (7,38x10 ⁹ – 2,37x10 ¹⁸)	0,03	0,88	0,68
CPATC 032	1,11x10 ⁹ (5,47x10 ⁷ – 3,83x10 ¹⁵)	0,11	0,74	0,41
CPATC 057	5,16x10 ⁹ (8,32x10 ⁸ – 1,41x10 ³⁷)	0,32	0,57	0,38
Boveril^{®1}	2,78x10 ¹⁵ (5,67x10 ⁹ – 1,09x10 ¹⁹)	0,00	0,97	0,57
T9	1,34x10 ¹⁹ (-)	0,02	0,89	0,28

¹Produto comercial Boveril® PM PL63/Koppert Biological Systems, à base do fungo *Beauveria bassiana*.

²(IC 95%) = Intervalo de Confiança (5% de significância).

³ χ^2 = Teste de Qui-quadrado.

⁴Valor P = Probabilidade (5% de significância).

⁵ β = Coeficiente angular da reta.

Fonte: Autora (2014).

Apesar de as condições de temperatura e umidade estarem favoráveis à boa atuação dos isolados IBCB 66, CPATC 057 e T9, e do produto Boveril[®], os resultados não foram satisfatórios, atestando que tais isolados são patogênicos aos adultos de *R. palmarum*, entretanto, não apresentam agressividade acentuada para estimar um menor valor da CL₅₀, tornando-os economicamente inviáveis. Contudo, outros isolados da mesma espécie podem apresentar resultados mais promissores, como verificado por Sabbour (2013), o qual estimou a CL₅₀ para o isolado estoque 1 de *B. bassiana*, obtido da Unidade de Micologia da França, sobre fêmeas e machos de *R. ferrugineus* em 3,11x10⁴ e 3,09x10⁴ conídios.mL⁻¹, respectivamente.

Nussenbaum; Lecuona (2012) estimaram a CL₅₀ dos isolados de *B. bassiana* Bb 23, Bb 286, Bb 301 e Bb 302 sobre adultos de *A. grandis* em 8,63x10⁷, 1,45x10⁸, 4,47x10⁷ e 4,76x10⁷ conídios.mL⁻¹, respectivamente. Ao tratar adultos de *R. ferrugineus* com o isolado EABb 07/06-Rf de *B. bassiana* nas concentrações 6,73x10⁶, 6,73x10⁷, 6,73x10⁸ e 6,73x10⁹ conídios.mL⁻¹, Dembilio et al. (2010) estimaram a CL₅₀ em 3,0x10⁹, apresentando-se menos eficiente que o isolado CPATC 032 sobre os adultos *R. palmarum*.

4.3.5 Determinação do Tempo Letal (TL₅₀) para adultos de *Rhynchophorus palmarum*

Por meio da análise de Probit, as concentrações de 10⁸ e 10⁹ conídios.mL⁻¹ dos isolados IBCB 66, CPATC 032, CPATC 057 e T9, e do produto comercial Boveril[®] foram selecionadas para a determinação do TL₅₀. A concentração 10⁷ conídios.mL⁻¹ não foi selecionada para estimar o TL₅₀ devido a baixa porcentagem da mortalidade durante o período de avaliação e, conseqüentemente, por apresentar valores elevados do TL₅₀.

Na concentração 10⁸, os isolados CPATC 032 e CPATC 057 apresentaram melhores desempenhos durante os 20 dias de avaliação do experimento. O TL₅₀ do isolado CPATC 032 de *B. bassiana* foi estimado em 17,61 dias com limites inferior e superior de 15,89 e 20,31 dias, respectivamente. Em relação ao isolado CPATC 057, o TL₅₀ foi estimado em 23,11 dias com limites inferior e superior de 20,28 e 29,29 dias, respectivamente (Tabela 15).

Tabela 15 - Estimativa do Tempo Letal (TL₅₀) para os fungos entomopatogênicos na concentração 10⁸ conídios.mL⁻¹ sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum* (Temp. 26 ± 1°C, UR 60 ± 10% e fotofase de 12 h).

Isolado	TL ₅₀ (dias) (IC 95%) ²	χ^2 ⁽³⁾	Valor P ⁽⁴⁾	β ⁽⁵⁾
IBCB 66	24,86 (21,66 – 42,67)	1,53	1,00	9,61
CPATC 032	17,61 (15,89 – 20,31)	4,99	0,99	3,53
CPATC 057	23,11 (20,28 – 29,29)	5,24	0,99	4,70
Boveril[®]	25,61 (21,84 – 36,37)	6,96	0,99	5,11
T9	55,79 (30,83 – 13.945)	2,97	1,00	3,25

¹Produto comercial Boveril[®] PM PL63/Koppert Biological Systems, à base do fungo *Beauveria bassiana*.

²(IC 95%) = Intervalo de Confiança (5% de significância).

³ χ^2 = Teste de Qui-quadrado.

⁴Valor P = Probabilidade (5% de significância).

⁵ β = Coeficiente angular da reta.

Fonte: Autora (2014).

Na concentração 10⁹, os isolados CPATC 032 e CPATC 057 também apresentaram os melhores resultados para o período avaliado. O TL₅₀ do isolado CPATC 032 foi estimado em 17,25 dias com limites inferior e superior de 15,40 e 20,13 dias, respectivamente. Em relação ao isolado CPATC 057, o TL₅₀ foi estimado em 21,92 dias com limites inferior e superior de 19,44 e 26,84 dias, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16 - Estimativa do Tempo Letal (TL₅₀) para os fungos entomopatogênicos na concentração 10⁹ conídios.mL⁻¹ sobre adultos de *Rhynchophorus palmarum*. (Temp. 26 ± 1°C, UR 60 ± 10% e fotofase de 12 h).

Isolado	TL ₅₀ (dias) (IC 95%) ²	χ^2 ⁽³⁾	Valor P ⁽⁴⁾	β ⁽⁵⁾
IBCB 66	32,31 (24,89 – 54,15)	9,81	0,94	2,69
CPATC 032	17,25 (15,40 – 20,13)	7,91	0,98	3,07
CPATC 057	21,92 (19,44 – 26,84)	5,81	0,99	4,49
Boveril^{®1}	38,51 (26,77 – 80,16)	4,44	0,99	1,67
T9	42,19 (27,67 – 461,05)	2,93	1,00	3,98

¹Produto comercial Boveril[®] PM PL63/Koppert Biological Systems, à base do fungo *Beauveria bassiana*.

²(IC 95%) = Intervalo de Confiança (5% de significância).

³ χ^2 = Teste de Qui-quadrado.

⁴Valor P = Probabilidade (5% de significância).

⁵ β = Coeficiente angular da reta.

Fonte: Autora (2014).

Loureiro; Moino Júnior (2007), ao testar a patogenicidade do isolado IBCB 66 na concentração 10⁸ conídios.mL⁻¹, pulverizando-os sobre adultos do predador *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera: Anthocoridae), determinaram que o TL₅₀ foi de 4,97 dias. Da mesma forma, Pinto et al. (2012) estudando a patogenicidade do isolado IBCB 66, no mesmo modo de aplicação, na concentração 10⁹ conídios.mL⁻¹ sobre adultos do psilídio *Diaphorina citri* (Kuwayama, 1908) (Psyllidae: Hemiptera), constataram que o TL₅₀ foi de 5,7 dias. Tais resultados não corroboram com os encontrados no presente estudo, possivelmente por pertencerem a ordens de insetos distintas e/ou devido ao contato direto desses insetos com a suspensão fúngica através da pulverização.

Sheeba et al. (2001), testando a eficácia do isolado MTCC 2028 de *B. bassiana* sobre *S. oryzae* nas concentrações 3,2x10⁵, 2,5x10⁶ e 3,9x10⁷ conídios.mL⁻¹, estimaram o TL₅₀ em 38,5 dias, 27 dias e 13,25 dias, respectivamente.

4.4 CONCLUSÕES

- ✓ O produto comercial Boveril[®] e os isolados IBCB 66, CPATC 032 e CPATC 057 de *B. bassiana*, e T9 de *T. harzianum*, são patogênicos a *R. palmarum*;
- ✓ Os isolados CPATC 032 e CPATC 057 utilizados na concentração de 10^9 conídios.mL⁻¹ são promissores no controle de *R. palmarum*;
- ✓ Com base nos valores da CL₅₀ e TL₅₀, apenas o uso do isolado CPATC 032 apresenta-se economicamente viável no controle de *R. palmarum* sob condições de laboratório.

REFERÊNCIAS

- Almeida, A.M.B. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, p.489-493, 2009.
- Alves, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. n.4. p.289-382.
- Alves, S.B.; Moraes, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. n.4. p.765-777.
- Alves, R.T.; Faria, M. Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. **Documentos – EMBRAPA**, Planaltina, DF, Março, 2010. n.286.
- Carneiro, A.A. et al. Caracterização molecular de fungos entomopatogênicos utilizados no controle biológico de pragas do milho – *Beauveria bassiana* versus *Spodoptera frugiperda*. **Comunicado Técnico – EMBRAPA**, Sete Lagoas, MG, novembro, 2004. n.93.
- Costa Lima, A. **Insetos do Brasil**. Seropédica: Série Didática, n.9, 1952, 372p.
- Dembilio, O. et al. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.104, p.214-221, 2010.
- Ferreira, J.M.S. Controle biológico do agente transmissor do nematoide causador do anel-vermelho-do-coqueiro. **Circular Técnica – EMBRAPA**, Aracaju, SE, Outubro, 2002. n.31.
- Giometti, F.H.C. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de adultos do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.167-169, 2010.
- González, I. et al. Induction of chitinases and glucanases in *Trichoderma* spp. strains intended for biological control. **Biotechnología Aplicada**, v.29, p.12-16, 2012.
- Lamovšek, J.; Urek, G.; Trdan, S. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the Pests. **Acta agriculturae Slovenica**, v.101, n.2, p.263-275, 2013.

- Lazzarini, G.M.J. **Efeito da umidade sobre a germinação in vitro de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e atividade contra *Triatoma infestans***. 2005. 46f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2005.
- Leite, L.G. et al. **Produção de fungos entomopatogênicos**. Ribeirão Preto: A.S.P., 2003. 92p.
- Lo Verde, G. et al. Pathogenicity bioassays of isolates of *Beauveria bassiana* on *Rhynchophorus ferrugineus*. **Pest Management Science**, v.71, n.2, p.323-328, 2015.
- Loureiro, E.D.; Moino Júnior, A. Patogenicidade de fungos entomopatogênicos a *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae). **BioAssay**, v.2, n.10, p.1-8, 2007.
- Mendonça, M.C. **Contribuição ao controle biológico de *Rhynchophorus palmarum* - atividade de voo, eficiência de autoinoculação e caracterização molecular de isolados de *Beauveria bassiana***. 2007. 97f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.
- Nussenbaum, A.L.; Lecuona, R.E. Selection of *Beauveria bassiana* sensu lato and *Metarhizium anisopliae* sensu lato isolates as microbial control agents against the boll weevil (*Anthonomus grandis*) in Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p.1-7, 2012.
- OEPP. Organization Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes. *Rhynchophorus palmarum*. European and Mediterranean Plant Protection Organization. OEPP/EPPO, **Bulletin OEPP/EPPO**, v.35, p.468-471, 2005.
- Pedrini, N. et al. *Beauveria bassiana* infection alters colony development and defensive secretions of the beetles *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Journal of Economic Entomology**, v.103, n.4, p.1094-1099, 2010.
- Pinto, A.P.F. et al. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psilídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.12, p.1673-1680, 2012.
- Pires, L.M. et al. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua compatibilidade com alguns inseticidas usados na cultura do tomateiro. **Neotropical Entomology**, v.39, n.6, p.977-984, 2010.
- Rondelli, V.M. et al. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* potenciais para o controle da traça-das-crucíferas. **Horticultura Brasileira**, v.30, n.3, p.391-396, 2012.

Sabbour, M.M. Preliminary investigations into the bio-control of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* by using *Beauveria bassiana* isolates in Egypt. **Emerging Issues in the Natural and Applied Sciences**, v.3, n.1, p.85-99, 2013.

Santos, P.R. **Identificação de isolados de *Trichoderma* spp. Utilizando marcadores do tipo RAPD e DNA Barcode**. 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SAS Institute Inc. Statistical Analysis System user's guide. **SAS Institute**. Version 9.0, Cary, 2002.

Shakeri, J.; Foster, H.A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.961–968, 2007.

Sheeba, G. et al. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.36, n.1, p.117-120, 2001.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi possível determinar uma técnica viável de criação de *R. palmarum*, visto que, as dietas artificiais desenvolvidas mostraram-se promissoras, embora ainda não sejam ideais, necessitando de alguns ajustes para que a criação massal de *R. palmarum* seja contínua em laboratório.

Com base nos dados de mortalidade confirmada, sobrevivência média, CL_{50} e TL_{50} , pode-se afirmar que o isolado CPATC 032 mostrou maior virulência sobre os adultos de *R. palmarum*, ocasionando elevados índices de mortalidade em um menor período de tempo, podendo apresentar ótimos resultados quando testados nessas condições de laboratório.