AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTERILIZAÇÃO DE MACHOS DE *Diabrotica speciosa* (COLEOPTERA:
CHRYSOMELIDAE) COM IRRADIAÇÃO GAMA VISANDO CONTROLE EM
CULTURAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

MÁRCIO MARTINS DE ARAUJO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações.**

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

São Paulo

2017

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**ESTERILIZAÇÃO DE MACHOS DE *Diabrotica speciosa* (COLEOPTERA:
CHRYSOMELIDAE) COM IRRADIAÇÃO GAMA VISANDO CONTROLE EM
CULTURAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**

MÁRCIO MARTINS DE ARAUJO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações.**

Orientador:

Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

São Paulo

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em minha vida e ser fonte de força na contínua busca do conhecimento.

Ao Prof. Dr. Patrick Jack Spencer pela oportunidade, amizade, orientação e confiança depositada.

Ao meu amigo Prof. Dr. Fernando Javier Sanhueza Salas e toda sua equipe pela paciência, suporte técnico e coorientação.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/ USP pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear) pela concessão da bolsa de mestrado, tornando possível a realização e conclusão deste trabalho.

Ao Instituto Biológico – IB/ SP por permitir a realização de parte dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Valter Arthur do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/ USP, pelas valiosas sugestões que viabilizaram a realização desta pesquisa e amizade conquistada.

À Doutoranda Amada Aparecida de Oliveira do Centro de Estudo de Insetos Sociais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Rio Claro/ SP, companheira que me motiva diariamente só pelo fato de existir, além de auxiliar e realizar as análises histológicas das gônadas masculinas do inseto.

À minha mãe Sonia Regina Martins, exemplo de superação e perseverança, sempre apoiou e incentivou a realização do mesmo.

À empresa PROMIP por fornecer os exemplares de *Diabrotica speciosa*.

Ao meu amigo Doutorando Fabrício Caldeira Reis do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/ USP pelos conselhos e por disponibilizar o equipamento para registro das imagens.

Ao Dr. Crébio José Ávila pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste por disponibilizar referências inéditas e ensinar a metodologia de sexagem do inseto adulto.

À Engenheira Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/ USP pela colaboração na irradiação dos espécimes.

A todos os professores responsáveis pela aquisição de saber principalmente a Dr^a. Nanci do Nascimento (*In memoriam*), o Dr. Thiago de Araújo Mastrangelo, a M.^a Harumi Hojo e aos colegas e técnicos de laboratório que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

Muito obrigado!

“Não são os mais aptos nem os mais inteligentes os que sobrevivem, mas os que se adaptam melhor às mudanças.”

Charles Darwin

RESUMO

ARAUJO, M. M. **Esterilização de machos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) com irradiação gama visando o controle em culturas de importância econômica.** 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Diabrotica speciosa (Germar, 1824), causa danos diretos por alimentação e indiretos como vetor de vírus para diversos grupos de plantas. A principal forma de controle são os agroquímicos, portanto visando o manejo populacional sem impacto ambiental, o presente trabalho teve como objetivo determinar a dose de radiação gama que proporciona a esterilidade de machos, o seu consumo foliar e as alterações histológicas em suas gônadas. Os adultos foram submetidos à radiação gama (^{60}Co) no terceiro dia após a emergência nas doses de 0, 25, 50, 75 e 100 Gy a uma taxa de 0,808 KGy/hora, totalizando 20 repetições/ dose. A dose esterilizante baseou-se na fertilidade de fêmeas sexualmente maduras acasaladas por machos irradiados. Os casais foram individualizados em “arenas” e alimentados com folíolos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com gaze preta umedecida para oviposição. Os ovos foram tratados e dispostos em recipientes plásticos forrados com papel de filtro. Após a eclosão, as larvas foram transferidas para um recipiente maior com tampa telada contendo vermiculita fina e plântulas de milho (*Zea mays* L.) que foram substituídas a cada 10 dias, até a emergência do adulto. Após o 4º dia de irradiação disponibilizou-se um disco foliar de 3,2 cm de diâmetro por 24 horas, para cada casal. Os discos foram digitalizados e analisados no software ImageJ. Para avaliação das gônadas foram utilizados 3 machos por dose com 8 dias de idade dissecados em PBS e através da técnica de Hematoxilina – Eosina as laminaas foram avaliadas em microscópio óptico. Verificou-se que a esterilidade dos machos ocorreu a partir de 75 Gy e sua longevidade média foi de 12,5 dias. O consumo da área foliar dos casais constituídos por um macho estéril foi de 42,9% e a análise histológica testicular demonstrou desorganização nos tecidos e lacunas entre as células germinativas nas maiores doses de 75 Gy e 100 Gy.

Palavras-chave: *Diabrotica speciosa*, criação, controle, radiação gama, esterilidade.

ABSTRACT

ARAUJO, M. M. **Sterilization of males *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) with gamma irradiation for control in cultures of economic importance.** 2017. 79 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

Diabrotica speciosa (Germar, 1824), causes direct and indirect damage on crops by feeding and acting as virus vector for diverse groups of plants. The main control form is the use of agrochemicals so, aiming to manage the population without environment impact, the present work had as objective to determine the dose of gamma radiation that provides male sterility, its foliar consumption and gonads histological changes. Adult males were submitted to gamma radiation (^{60}Co) on the third day after emergence at doses of 0, 25, 50, 75 and 100 Gy at 0,808 K Gy/ hour rate, totaling 20 replicates/ dose. The sterilizing dose was based on the fertility of sexually mature non-irradiated females mated by irradiated males. The couples were individualized in "arenas" and fed with leaflets *Phaseolus vulgaris* L. with black gauze moistened for oviposition. Eggs were treated and arranged in plastic containers lined with filter paper. After hatching, larvae were transferred to a larger container with a cover cap containing fine vermiculite and maize seedlings (*Zea mays* L.), which were replaced every 10 days, until adult emergence. After the 4th day of irradiation, a leaf disc with 3.2 cm in diameter was available for 24 hours for each couple. The discs were scanned and analyzed in ImageJ software. To evaluate the gonads, 3 males with 8 days of age were used per dose. They were dissected in PBS, through the Hematoxylin-Eosin technique the laminas were evaluated under an optical microscope. We observed that male sterility occurred from 75 Gy and the average longevity of this group was of 12.5 days. Consumption of the leaf area by couples composed by a sterile male was 42.9% and the testicular histological analysis demonstrated tissue disorganization and gaps between germ cells at the highest doses of 75 Gy and 100 Gy.

Key words: *Diabrotica speciosa*, breeding, control, gamma radiation, sterility.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO.....	16
2.1	Objetivos específicos:	16
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1	Biogeografia do gênero <i>Diabrotica</i>	17
3.2	Controle e Impacto econômico	22
3.3	Resistência no gênero <i>Diabrotica</i>	26
3.4	Órgão Reprodutor Masculino.....	30
3.5	Técnica do Inseto Estéril (TIE)	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1	Ensaio de sobrevivência e fecundidade	42
4.2	Bioensaio de consumo Foliar	44
4.3	Efeito da Radiação nas gônadas masculinas	45
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	47
5.1	Consumo Foliar	47
5.2	Radioesterilização.....	49
5.3	Análise testicular por coloração com Hematoxilina e Eosina.....	54
6	CONCLUSÕES	59
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Espécies do gênero <i>Diabrotica</i> de distribuição temperada na América do Norte	17
Quadro 2 – Distribuição das espécies mais comuns do gênero <i>Diabrotica</i> na América do Sul	20
Quadro 3 – Exemplos de instalações de criação de insetos e os tipos de irradiadores utilizados para esterilização reprodutiva.....	37
Quadro 4 – Lista de aracnídeos e insetos submetidos à irradiação para obtenção da esterilidade	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias ($\pm$ EP) de consumo foliar dos casais de <i>D. speciosa</i> durante 24 horas de avaliação com 20 repetições por dose de radiação	47
Tabela 2 – Médias da fecundidade (número de ovos/fêmea) e viabilidade de larvas provenientes dos casais com machos submetidos à radiação gama, constando a porcentagem de adultos emergidos	49
Tabela 3 – Efeito das diferentes doses de radiação gama aplicada nos machos para determinar sua longevidade média	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diferenciação sexual do último segmento abdominal da pupa, lado esquerdo: *D. balteata*; lado direito: *D. speciosa*.....18
- Figura 2** – Adulto de *D. speciosa*.....19
- Figura 3** – Vista lateral e posterior de espécimes do gênero *Diabrotica* (A – Macho e B – Fêmea).....19
- Figura 4** – Distribuição de *D. speciosa* no território nacional, destacando os 500 municípios (amarelo) responsáveis por 65% da produção de milho em 200622
- Figura 5** – Diagrama esquemático da genitália masculina do gênero *Diabrotica* (à esquerda) e detalhe do lobo médio (à direita).....31
- Figura 6** – Ilustração esquemática dos órgãos reprodutivos internos do macho *D. undecimpunctata* Howardi.....32
- Figura 7** – Lado esquerdo – Desenho esquemático do espermatozoide de crisomélídeo; Lado Direito – corte transversal da região flagelar do espermatozoide de *D. speciosa* - A, acrossoma; Ab, um corpo acessório; AX, axonema; EL, camada extra-acrosomal; H, cabeça; Md, dois derivados mitocondriais; N, núcleo; Pc, dois corpúsculos “puff-like”; T, cauda33
- Figura 8** – Eficiência de Inseticidas e da TIE.....35
- Figura 9** – Irradiador Gammacell 220 instalado no CTR - IPEN com 35 lápis (fontes) dispostos simetricamente contendo 7 pastilhas de cobalto cada, sendo possível visualizar os machos de *D. speciosa* na câmara de amostra.....41
- Figura 10** – A: Gaiola de plástico transparente, folíolo de feijão e gaze preta como substrato para oviposição; B: Avaliação biológica dos casais de *D. speciosa* totalizando 20 repetições por dose em sala climatizada sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas42

Figura 11 – Etapas da criação de *D. speciosa* em laboratório: A – Remoção de ovos do substrato de oviposição por lavagem em água corrente; B – Acondicionamento dos ovos oriundos em recipientes de plástico com tampa hermética e papel filtro umedecido; C – Sementes pré-germinadas de milho para inoculação das larvas recém-eclodidas43

Figura 12 – Materiais utilizados no bioensaio de consumo foliar de feijão por *D. speciosa*: A – disco foliar de 3,2 cm para alimentação; B – Recipiente contendo um disco foliar e um casal de adultos; C – Disco foliar submetido à alimentação pelos adultos após 24 horas. D – Digitalizador contendo os discos foliares para obtenção das imagens.44

Figura 13 – Processos para fixação do testículo submetidos à técnica histológica de Hematoxilina e Eosina: A – Testículo de *D. speciosa*, B – Molde plástico contendo resina, polimerizador e testículos individualizados, C – Blocos fixados para corte em micrótomo, D – Cortes corados para secagem em estante de madeira e E – Microscópio óptico de campo claro LEICA DM75046

Figura 14 – Curvas de longevidade dos machos submetidos a doses crescentes de radiação gama. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14 horas.....53

Figura 15 – Corte longitudinal do testículo de *D. speciosa* após tratamento com radiação gama nas doses - A (200x) e B (400x): Grupo Controle; C (200x) e D (400x): Tratamento 25 Gy; E (200x) e F (400x): Tratamento 50 Gy. spz: espermatozóide; cf: células foliculares; cg: células germinativas; *cisto; cabeça de seta: “lacuna”. Coloração H&E55

Figura 16 – Corte longitudinal do testículo de *D. speciosa* após tratamento com radiação gama nas doses - G (200x) e H (400x): Tratamento 75 Gy; I (200x) e J (400x): Tratamento 100 Gy. spz: espermatozóide; cabeça de seta: “lacuna”; seta: desorganização das células germinativas. Coloração H&E56

1 INTRODUÇÃO

Diabrotica speciosa (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) é um inseto polífago, considerado uma das mais importantes pragas agrícolas da América Latina (VENTURA et al., 2001). Os adultos danificam a parte aérea de diversas culturas como as hortaliças (solanáceas, cucurbitáceas, crucíferas), feijoeiro, soja, girassol, milho causando desfolha, podendo se estender posteriormente às flores e às vagens (CARVALHO et al., 1982) e em alguns casos são vetores de patógenos (LAUMANN et al., 2003). Mais de dois adultos por planta de feijão, na primeira semana após a emergência, causam perdas acima de 50% na produção, podendo causar até a morte da planta (MAGALHÃES e CARVALHO, 1988).

Os ovos são depositados preferencialmente em solos escuros com elevado teor de matéria orgânica e umidade, próximo à planta hospedeira (MILANEZ e PARRA, 2000b), onde eclodem as larvas que se alimentam das raízes do milho, trigo, outros cereais e batata, causando danos severos ao sistema radicular das plantas, tornando-as menos produtiva e sujeita ao acamamento, elevando as perdas quando a colheita é realizada mecanicamente. Para a cultura do milho têm sido relatadas perdas na produção variando entre 10 e 13% devido ao ataque, quando ocorre alta infestação desta praga, principalmente na Região Sul do país (VIANA, 2010; MILANEZ e PARRA, 2000a).

A capacidade de postura de *D. speciosa* pode ser influenciada pela qualidade nutricional do alimento utilizado na fase larval ou na fase adulta (MILANEZ, 1995). Desse modo, a diversidade de plantas hospedeiras no campo pode influenciar o comportamento e a capacidade de postura desta praga (MARQUES et al. 1999).

Ávila e Parra (2002) avaliando o desenvolvimento de *D. speciosa* em diferentes hospedeiros (batata, milho, soja e feijão), constataram que a espécie hospedeira utilizada como alimento na fase larval afetou a duração e viabilidade do período larva-adulto assim como a capacidade de postura e longevidade do adulto, obtendo as maiores viabilidades em batata e milho. Já com os adultos as folhas de batata e feijão foram as mais adequadas, devido ao teor nutritivo e o aumento da fecundidade e a sobrevivência do inseto.

Adultos de *D. speciosa* preferem se alimentar de folhas de feijão, em vez de soja e folhas de milho. Tal fato explica por que os adultos desta espécie são

frequentemente encontrados causando maiores danos às folhas em plantas de feijoeiro em condições de campo, mesmo na presença de outras plantas hospedeiras (ÁVILA e PARRA, 2003).

Rosa et al. (2012) e Teodoro et al. (2014) buscando aperfeiçoar a criação de *D. speciosa* em laboratório observaram que uma dieta constituída de folíolos de feijão, rodela de cenoura e solução de mel a 10% propicia maior longevidade para os machos e apresenta elevado potencial de reprodução, com uma ótima viabilidade de ovos e alta fecundidade.

As atividades de movimentação, alimentação e vôo desse inseto também estão relacionadas com o aumento da temperatura em campo, acima dos 25° C os insetos consomem maior quantidade de área foliar, além disso, os mesmos se dispõem na parte superior das folhas migrando para parte inferior nas horas mais quentes, iluminadas e secas do dia (LAUMANN et al., 2003). Milanez e Parra (2000a) observam que o período de incubação de ovos de *D. speciosa* diminuiu com o aumento da temperatura, porém a viabilidade para temperaturas extremas (18 e 32°C) é baixa, sendo mais satisfatórias nas faixas de 20 a 30°C.

Estudos realizados por Pellegrino (2011) destacam a influência da pressão atmosférica no comportamento sexual dos insetos. No caso da *D. speciosa* o tempo despendido durante a corte e as sequências comportamentais na cópula são encurtadas nas condições de queda da pressão atmosférica, neste caso os machos permanecem imóveis mesmo na presença dos feromônios das fêmeas. Isto demonstra que o inseto pode detectar e ajustar seu comportamento em função dessas mudanças o que indica um valor adaptativo importante para sua sobrevivência frente às intempéries.

As estratégias de manejo para *D. speciosa* estão restritas ao controle químico (VENTURA et al., 2001), a utilização excessiva e inadequada dos inseticidas contribuem para o fenômeno da resistência, uma vez que os insetos possuem ciclo de vida curto e prole abundante, o que vem favorecer o surgimento de populações com diferentes características genéticas. A perpetuação de resistência a inseticidas em populações de insetos está relacionada com a frequência de sua utilização e é resultante não apenas da pressão seletiva desses compostos tóxicos sobre essas populações, como das características herdadas das espécies de insetos envolvidas (HEMINGWAY e RANSON, 2000).

O que justifica a necessidade de técnicas eficientes e ecologicamente aceitáveis para o manejo populacional desses insetos. Assim por ser um método livre de resíduos que não necessita da inclusão de espécies exóticas, o tratamento com radiação é um aliado viável para o controle de pragas.

Para o sucesso da Técnica do Inseto Estéril, o ideal é que fêmeas da espécie em questão não aceitem mais de um macho durante o acasalamento. A esterilização causa mutação letal dominante ao nível de espermatozoides dos insetos, porém ela não impede a participação do gameta na formação do zigoto, mas impede a maturação do mesmo, eliminando a produção de descendentes. A quantidade de machos irradiados liberados deve ser nove vezes maior que a população natural existente (GALLO et al., 2002).

No caso da *D. speciosa* há esta possibilidade, pois a proporção sexual em campo é de um macho para uma fêmea (NAVA et al., 2016), além disso, Nardi (2010) estudando o comportamento sexual desta espécie constatou que 70% das fêmeas copula apenas uma vez, existindo uma minoria que pode ter até 4 copulas durante o seu ciclo, sendo esta predominantemente no quarto e quinto dia após a emergência, devido a maturação sexual da fêmea.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a dose de radiação gama que proporciona a esterilidade de machos da espécie *D. speciosa* visando seu controle através da Técnica de Macho Estéril.

2.1 Objetivos específicos:

- Determinar o consumo da área foliar dos casais compostos de machos estéreis e fêmeas férteis;
- Determinar a longevidade dos machos estéreis;
- Avaliar as diferenças histológicas nas gônadas dos machos não estéreis e estéreis.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biogeografia do gênero *Diabrotica*

O gênero *Diabrotica* (Chevrolat, 1844) (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) é composto por 338 espécies, sendo a maior diversidade de espécies encontrada na região Neotropical e apenas sete espécies são encontradas na região Neártica (Quadro 1). O gênero é separado em três grupos: *signifera*, *virgifera* e *fucata* (WILCOX, 1972). O Grupo Signifera aparentemente não apresentam importância agrônômica e são pouco conhecidas em termos bioecológicos. O Grupo Virgifera inclui as espécies univoltinas (apenas uma geração por ano) que apresentam diapausa no inverno na fase de ovo e a fase larval possui como hospedeiro algumas gramíneas. Por fim o Grupo Fucata, com o maior número de espécies, possui hábitos multivoltinos (várias gerações por ano), migrantes que no estágio larval são polípagas (BRANSON e KRYSAN, 1981).

Quadro 1 – Espécies do gênero *Diabrotica* de distribuição temperada na América do Norte.

Espécie	Distribuição
<i>D. balteata</i>	USA, México e Mesoamérica
<i>D. barberi</i>	Canadá e USA
<i>D. cristata</i>	USA e México
<i>D. lemniscata</i>	USA e México
<i>D. longicornis</i>	USA e Mexico
<i>D. undecimpunctata</i>	Canadá, USA, México e Mesoamérica
<i>D. virgifera</i>	Canadá, USA, México e Mesoamérica

Fonte: WASH e CABRERA (2016).

Aproximadamente 15 espécies e subespécies de *Diabrotica* são relatadas como pragas de 61 tipos de diferentes culturas. Uma das espécies do grupo *fucata* mais conhecidas, e com ocorrência em todos os Estados brasileiros é a *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824), um crisomelídeo polífago conhecido popularmente como vaquinha, patriota ou brasileirinho, devido à coloração de seu corpo (KRYSAN, 1986). As larvas são denominadas de “larva alfinete” pelo aspecto que seu corpo apresenta (alongado e fino) e pelas injúrias provocadas no tubérculo (GALLO et al., 2002).

Os ovos apresentam coloração branco-amarelada, medindo 0,5 mm de diâmetro, sendo colocados nas fendas do solo e o seu período de incubação dura em media 8,8 dias, com cerca de 400 ovos, distribuídos em massas de cerca de 30 ovos cada. As larvas apresentam três instares e têm coloração esbranquiçada, com cabeça e placa anal pretas, o corpo tem forma cilíndrica, sendo mais afilado na parte anterior, podendo atingir até 12 mm de comprimento e cerca de 1 mm de diâmetro. O período larval em media é de 17,5 dias a uma temperatura de 25°C e UR de 60%. Após completarem a fase, as larvas de *D. speciosa* constroem abrigos (câmaras pupais), para se transformarem em pré-pupa (4,8 dias) e pupa (6,9 dias) (MILANEZ, 1995). Por sua vez, as pupas do gênero *Diabrotica* são diferenciadas sexualmente pela presença de duas papilas na porção ventral, posicionada apicalmente no abdômen das fêmeas, enquanto nos machos é ausente (Figura 1) (CUTHBERT et al., 1968).

Figura 1 – Diferenciação sexual do último segmento abdominal da pupa, lado esquerdo: *D. balteata*; lado direito: *D. speciosa*.

Fonte: Lado esquerdo (CUTHBERT et al., 1968) e Lado direito (Autor da dissertação).

O adulto possui coloração esverdeada, antenas escuras, sendo os três segmentos basais mais claros principalmente o escapo, cabeça variando de pardo

avermelhado ao negro e labro, escutelo, metatorax, tíbias e tarsos negros, em cada élitro apresenta três manchas transversais de forma ovalada e coloração amarela (HAJI, 1981). Em geral medem cerca de 4 a 6 mm de comprimento (Figura 2), sexualmente as espécies deste gênero podem ser distintas visualmente, pela porção terminal do abdômen, que no macho se apresenta mais robusto com esclerito extra e o da fêmea mais afilada (Figura 3) (WHITE, 1977).

Figura 2 – Adulto de *D. speciosa*.

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 3 – Vista lateral e posterior de espécimes do gênero *Diabrotica* (A – Macho e B – Fêmea).

Fonte: Ilustração (WHITE, 1977); Foto (Autor da dissertação).

O ciclo biológico é inferior a dois meses, podendo ocorrer entre cinco a seis gerações por ano (multivoltino). A longevidade, o ritmo de postura e a fecundidade dependem do tipo planta hospedeira e condições ambientais nas fases

larval e adulta. Pode variar de 41,8 a 55,5 dias para os machos e de 51,6 a 58,5 dias para fêmeas (MILANEZ, 1995).

A cópula desta espécie predomina no período noturno (18 às 24 horas) e possui uma duração média de 2,7 horas. Fêmeas com idade superior a três dias apresentam capacidade de atração dos machos através dos feromônios sexuais e em alguns casos compostos cuticulares agem como feromônio sexual de contato (NARDI, 2010).

A maior diversidade do gênero *Diabrotica* encontra-se nas áreas tropicais a temperadas da América do Sul (Quadro 2), sua distribuição pode estar ligada tanto a fatores climáticos como por atividades humanas, sendo a *D. speciosa* a espécie mais adaptada aos diferentes tipos de ambiente, sobrevivendo em zonas com temperaturas mínimas médias invernais, máximas estivais e médias anuais entre - 3,4 a 11°C, 24 a 33,4°C e 12 a 21,2°C respectivamente, com altitudes de 0 a 3500 metros (WASH e CABRERA, 2016). Dados do EPPO Bulletin (2005) demonstram que tal espécie é uma das mais importantes pragas agrícolas da América Latina, com ocorrências na Argentina, Bolívia, Brasil (principalmente no leste e sul), Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela.

Quadro 2 – Distribuição das espécies mais comuns do gênero *Diabrotica* na América do Sul.

Espécie		Trópicos	Sub-trópico	Temperado
Citadas para um país	<i>D. amoena</i> Dalman	X	X	
	<i>D. alegrensis</i> Bechyné		X	
	<i>D. alexia</i> Bechyné	X		
	<i>D. allomorpha</i> Bechyné		X	
	<i>D. antonietta</i> Bechyné		X	
	<i>D. aracatuba</i> Bechyné		X	
	<i>D. atomaria</i> Jacoby	X		
	<i>D. atrilineata</i> Baly		X	X
	<i>D. bordoni</i> Bechyné & Bechyné	X		
	<i>D. brachyzga</i> Bechyné		X	
	<i>D. chromophora</i> Bechyné	X	X	
	<i>D. chloropus</i> Harold	X	X	
	<i>D. clarki</i> Weise	X	X	
	<i>D. chrysochlora</i> Bechyné	X		
	<i>D. delrio</i> Bowditch		X	
	<i>D. egleri</i> Bechyné	X		

	Espécie	Trópicos	Sub-trópico	Temperado
Citadas para um país	<i>D. extensa</i> Baly	X	X	
	<i>D. eustolia</i> Bechyné	X		
	<i>D. fallenia</i> Bechyné		X	
	<i>D. formosa</i> Baly	X		
	<i>D. fulfofasciata</i> Jacoby	X		
	<i>D. funérea</i> Bowditch	X		
	<i>D. grayella</i> Baly		X	
	<i>D. hathawayi</i> Marques	X		
	<i>D. helga</i> Bechyné	X		
	<i>D. hypolampra</i> Bechyné	X		
	<i>D. isohaeta</i> Bechyné & Bechyné	X		
	<i>D. lutescens</i> Baly		X	
	<i>D. mapiriensis</i> Bechyné	X		
	<i>D. myrna</i> Bechyné	X		
	<i>D. paranaenses</i> Marques	X	X	
	<i>D. pentazyga</i> Bechyné		X	
	<i>D. peruensis</i> Bowditch	X		
	<i>D. platysoma</i> Bechyné		X	
	<i>D. propylaea</i> Bechyné		X	
	<i>D. romana</i> Bechyné		X	
	<i>D. recki</i> Marques	X	X	
	<i>D. sebalidia</i> Bechyné	X		
	<i>D. serroazulensis</i> Bechyné	X	X	
	<i>D. silvai</i> Marques	X	X	
	<i>D. tijuquensis</i> Marques	X	X	X
	<i>D. varicornis</i> Jacoby	X		
	<i>D. wartensis</i> Cabrera & Sosa-Gómez		X	
Pragas de cultivo	<i>D. speciosa</i> (Germar)	X	X	X
	<i>D. viridula</i> (F.)	X	X	
	<i>D. sicuanica</i> Bechyné	X		
Endêmicas	<i>D. calchaqui</i> Cabrera & Cabrera Wash		X	
	<i>D. collicola</i> Cabrera & Cabrera Wash		X	
	<i>D. mauiliki</i> Barber	X	X	
	<i>D. minuta</i> Jacoby	X		
	<i>D. nigromaculata</i> Jacoby	X		
	<i>D. viridana</i>			X

Fonte: WASH e CABRERA (2016).

Silva et al. (2009) determinaram as localidades no Brasil que apresentam favorabilidade climática à ocorrência de *D. speciosa* e verificaram que os 500 municípios que produziram 20.000 ou mais toneladas de milho em 2006 (responsável por 65 % da produção nacional) estão sujeitos a influência desta praga (Figura 4).

Figura 4 – Distribuição de *D. speciosa* no território nacional, destacando os 500 municípios (amarelo) responsáveis por 65% da produção de milho em 2006.

Fonte: Silva et al. (2009).

3.2 Controle e Impacto econômico

A espécie *D. speciosa* causa elevadas perdas em inúmeras culturas, em sua fase adulta, alimentando-se da parte aérea de leguminosas (folhas largas), como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* L. Merrill), gramíneas (folhas estreitas) atacam o milho (*Zea mays* L.) e o arroz (*Oryza sativa*) (MARQUES et al., 1999), ainda, pode ser encontrado em lentilha (*Lens esculenta* N.), curcubitáceas como melancia (*Citrullus lanatus* Thumb. Mansf.), melão (*Cucumis melo* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) e abóbora (*Curcubita* spp.), nas solanáceas destacam-se a

batata (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), berinjela (*Solanum melongena* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) (GALLO et al., 2002) e o fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (MORAES e KOHLER, 2012). Além do girassol (*Helianthus annuus* L.), banana (*Musa* spp.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (ZUCCHI et al., 1993), uva (*Vitis vinifera* L.) (ROBERTO et al., 2001) e trigo (*Triticum aestivum* L.) (CIVIDANES et al., 1987).

As larvas, que possuem hábitos subterrâneos, danificam as raízes das plantas, preferencialmente de gramíneas como milho, leguminosas e tubérculos de batata, reduzindo a sustentação, a absorção de água e nutrientes, tornando-a menos produtiva como também mais suscetível às doenças radiculares e ao tombamento, o que acarreta de perdas da produção (KHALER et al., 1985).

As larvas apresentam uma distribuição em “reboleira”, sendo alta a variabilidade, ocorrendo de 0-100 larvas por planta. A mobilidade é pequena e o desenvolvimento da larva é favorecido pela maior umidade e matéria orgânica existente no solo. Cerca de 90% das larvas se concentram ao redor das plantas, sendo o primeiro instar disperso e os demais localizados na camada de 10 cm da superfície do solo (VIANA, 2010).

Além dos danos diretos causados pelo seu hábito alimentar, *D. speciosa* também atua como vetor de patógenos causador de viroses e doenças bacterianas para diversas espécies de plantas (LAUMANN et al., 2003; WALSH, 2003), incluindo o mosaico severo do caupi (*Cowpea Severe Mosaic Virus* – CpSMV) do gênero *Comovirus* e o vírus do mosaico amarelo do maracujazeiro (*Passion fruit Yellow Mosaic Virus* - PFYMV) do gênero *Tymovirus* (COSTA et al., 1978; NOVAES et al., 2000).

A transmissão de vírus por coleópteros pode ocorrer logo após a primeira tomada de alimento, quando a planta envolvida é suscetível, não há evidências de replicação do vírus no vetor, porém o período de latência pode alcançar dias ou até algumas semanas. A relação existente entre os vírus e os coleópteros vetores é a única a envolver ingestão do vírus contido no tecido foliar consumido e sua devolução à superfície da planta hospedeira, durante a regurgitação, fatores estes primordiais na transmissão (SALAS et al., 2010).

Em locais onde ocorre alta incidência de fitovírus veiculados por crisomelídeos, constata-se a presença de seus insetos vetores - com destaque para os gêneros *Cerotoma* e *Diabrotica* - e de suas plantas hospedeiras naturais em

grande número, sendo esses os mais importantes vetores de viroses nas Américas (VIANA, 2010).

No caso dos Estados Unidos se gasta anualmente um bilhão de dólares para o controle de três espécies do gênero *Diabrotica* (*D. virgifera virgifera* LeConte, *D. barberi* Smith e Lawrence e *D. undecimpunctata howardi* Barber) que atacam a cultura do milho e cerca de 100 milhões de dólares para o controle da praga em outras culturas (METCALF, 1986). Vale ressaltar que, em laboratório, Jackson (1986) observou um consumo menor das espécies norte-americanas, cuja proporção foi de 0,6 plântula de milho para cada larva nos primeiros 10 dias e 1,6 plântulas/larva até a formação de pupa, diferentemente da *D. speciosa* que exige o dobro de alimento para completar o seu desenvolvimento.

No Brasil o impacto econômico causado por larvas e adultos de *D. speciosa*, bem como a quantidade de recursos gastos para o seu controle ainda não foram estimados (ÁVILA e SANTANA, 2013), no entanto pode-se considerar o gasto significativo em defensivos, acarretando inclusive em danos ambientais.

Silva et al. (2003) avaliando os danos causados na cultura de feijão verificou que uma desfolha de 25%, aos 24 dias após a germinação, pode provocar uma redução de 21,7% na produtividade. No milho, em condições experimentais na estufa, Fogaça e Calafiori (1992) observaram que 5 larvas por planta podem causar diminuição de 73,3% da produção. Correlacionando os resultados obtidos no levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), onde o valor da produção em 2012 do feijão foi de aproximadamente R\$ 6, 2 bilhões e do milho foi R\$ 26, 8 bilhões, com os prejuízos ocasionados pela praga, pode-se inferir que a perda seria de aproximadamente R\$ 1, 4 bilhões para feijão e R\$ 19, 5 bilhões para milho.

Segundo Metcalf (1994) poucos são os inimigos naturais de *Diabrotica* spp., esse fato é resultado, em grande parte, pela adaptação entre Galerucinae e Cucurbitaceae. Os insetos adultos alimentam-se de plantas dessa família e armazenam substâncias tóxicas (cucurbitacinas) em seus corpos gordurosos, as quais possuem propriedades deterrentes aos predadores, parasitóides e patógenos.

Diabrotica spp. alimenta-se compulsivamente de substratos que contenham cucurbitacinas, que é uma substância extremamente amarga ao paladar. Os insetos adultos são capazes de detectar estas substâncias em pequenas quantidades (nanogramas) através de receptores sensoriais específicos localizados

no palpo maxilar (METCALF et al., 1987). Por induzir os insetos à alimentação, faz-se uso dessas com armadilhas contendo inseticidas, contudo Weissling e Meinke (1991) observaram que para otimizar a eficácia das iscas, é necessário desenvolver formulações que sejam aderentes às folhas evitando a perda de efeito com a ação das chuvas.

Tallamy et al. (1998) mostraram que ovos e larvas de crisomelídeos (*D. undecimpunctata howardi*) contendo curcubitacinas, devido ao armazenamento deste composto sequestrado das curcubitáceas, sobreviveram a exposição ao fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, sugerindo que este composto apresenta efeito antimicrobiano contra patógenos.

O controle biológico com fungos entomopatogênicos é a forma mais comum de epizootias, pois não necessitam de ingestão para causar infecções aos insetos, podem invadir seus hospedeiros através das membranas segmentares do exoesqueleto. Sendo assim, infectam estágios de insetos que não se alimentam, como ovos e pupas. O sítio de invasão é geralmente entre as peças bucais ou através dos espiráculos, onde a pouca esclerotinização facilita a penetração dos conídios. Os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok possuem conídios hidrofóbicos que se aderem à cutícula dos insetos através de interações não-específicas (CHARNLEY, 1997). Todavia a falha na adesão do conídio à cutícula do inseto pode ser um dos fatores de especificidade do fungo ao hospedeiro. Portanto a cutícula do inseto também pode ser não somente a primeira, mas a maior barreira para invasão no hospedeiro, assim como a umidade relativa e a temperatura que são fatores limitantes ao seu desenvolvimento. Devido à interferência destes fatores nos processo infectivos dos fungos, são utilizadas combinações dos fungos com baixas dosagens de inseticidas (MICHELI, 2005).

Como forma de controle alternativo de *D. speciosa*, Assis et al. (2011), utilizando terra diatomácea, sedimento constituído principalmente por sílica (58-91%), obtiveram resultados de redução na área foliar consumida em batateira pela mortalidade dos insetos após 48 horas da aplicação. Costa et al. (2012), testaram diferentes doses de pó de neem (160, 80, 40, 20 e 10 mg, por 25 g de solo) via solo para controle de larvas em milho, buscando redução do uso de inseticidas e constataram que mesmo as menores doses (20 mg) apresentaram controle eficiente das larvas.

Porem o uso de produtos químicos ainda tem sido a principal forma de controle destes insetos. Os adultos são controlados por pulverizações foliares, contudo os inseticidas perdem seus efeitos rapidamente ocasionando reinfestação na cultura, por isso, os agricultores normalmente fazem várias aplicações durante o ciclo. Já as larvas são controladas por aplicações de inseticidas no solo, produtos estes que são caros e podem causar danos ao ambiente (ARRUDA-GATTI e VENTURA 2003).

Estatísticas sobre mercado e demanda brasileira por defensivos agrícolas revelam que as culturas de soja, milho e do feijão representam, em 2015, cerca de 64% dos dispêndios totais (US\$ 9.608.426,00 bilhões), sendo respectivamente US\$ 4 bilhões, US\$ 960 milhões e US\$ 192 milhões. Os estados que apresentam maiores gastos referentes ao controle são: Mato Grosso (23%), seguido por São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul cada um com 13% (SINDIVEG, 2016).

3.3 Resistência no gênero *Diabrotica*

A redução da sensibilidade aos modos de ação dos inseticidas por parte dos insetos pode ser causada por diferentes mecanismos, tais como: modificações comportamentais, onde o inseto reconhece a presença do inseticida e evita contato com ele; redução na penetração cuticular, associada a modificações na sua composição; resistência metabólica, por aumento da capacidade de metabolização desses produtos, por meio de enzimas de destoxificação; e modificação nos sítios alvos dos inseticidas (MOREIRA et al., 2013).

Nos EUA o uso intensivo de inseticidas organoclorados aplicados no solo nas décadas de 1950 e 1960 levou ao desenvolvimento da resistência na larva de *D. virgifera*. A falta de eficácia no controle foi registrada pela primeira vez no estado de Nebraska em 1959, e durante 1960 e 1961, o problema tornou-se generalizado em toda a região produtora de milho (BALL e WEEKMAN, 1962).

Cuthbert e Reid (1962) testando em laboratório a ação de alguns defensivos químicos de solo em larvas de *Diabrotica balteata* LeConte coletados na cidade de Charleston (Carolina do Sul) e Arnaudville (Luisiana), observaram a ineficiência da aldrin (organoclorado) contra os espécimes de ambas as áreas.

Neste período a resistência a aldrin estava presente em diversos estados dos EUA especificamente no oeste de Iowa, no norte do Kansas, noroeste do

Missouri, sudoeste Minnesota, e sudeste do Dakota do Sul para espécies do gênero *Diabrotica*, como *D. virgifera* e *Diabrotica longicornis* (Say) também relatada em Wisconsin (HAMILTON, 1965; CHIO et al., 1978).

Parimi et al. (2006), com intuito em determinar a estabilidade da resistência na ausência de pressão seletiva em 2002 a metil-parathion (organofosforado) e aldrin, nas populações adultas resistentes de *D. virgifera* coletada em campo no estado de Nebraska e de laboratório criadas na ausência de seleção durante 5 a 6 gerações, verificaram que a resistência é relativamente estável, tanto nas populações de laboratório como nas de campo, onde ela se mostrou presente em graus diferentes, sendo respectivamente de 19 e 13 vezes maior para metil-parathion e de 204 e 125 vezes maior para aldrin, mesmo após quatro décadas desde que esta classe química foi proibida, demonstrando que ambos os traços de resistência são estáveis na ausência de pressão de seleção e que nenhum dos dois mecanismos está associado a uma desvantagem física.

Com relação aos mecanismos de resistência Scharf et al. (1999) realizando bioensaios de concentração letal a carbaril (carbamato) para 12 populações de *D. virgifera* coletadas nos Estados de Indiana, Illinois, Iowa, Kansas, Nebraska, Ohio, Pensilvânia, Dakota do Sul, Texas e Virgínia, identificaram resistência em apenas duas populações em Nebraska, vinculadas a enzimas de detoxificação, as monooxigenases do citocromo P450 e esterases.

Wright et al. (2000) avaliaram três grupos químicos de aplicação em solo, piretroide (teflutrina), carbamato (carbofuran) e organofosforado (clorpirifós, terbufós e metil-parathion) frente a uma população resistente de *D. virgifera* coletada no condado de Phelps – Nebraska. Descobriram que no terceiro instar larval a resistência ocorre também de maneira metabólica, por meio de enzimas esterases que hidrolisam as ligações ésteres destes compostos. Assim os mecanismos fisiológicos envolvidos na ocorrência de resistência incluem a oxidação à base de citocromo P450 e hidrólise por esterases por metil-parathion e carbaril em populações distintas de Nebraska (SCHARF et al., 2001).

A principal estratégia de controle de adultos de *D. virgifera* nos Condados de Phelps e Yorks utilizados por mais de 20 anos são as aplicações aéreas de carbaril e metil-parathion (inibidores de acetilcolinesterase), sendo assim para determinar essa pressão de seleção Meinke et al. (1998) avaliaram a suscetibilidade nessas populações e constataram que a resistência se mantinha presente nas

gerações, indicando que esta sensibilidade é hereditária. Outro produto químico testado e pouco utilizado nestas regiões foi a bifentrina (piretróide que atua sobre os canais de sódio) que demonstrou valores elevados para dose letal mediana, isto significa que os mecanismos de desintoxicação metabólica não são específicos, pois a resistência ao grupo dos carbamatos e organofosforados afeta a suscetibilidade a bifentrina.

Dentre as técnicas que envolvem o manejo de inseticida para controle da *D. virgifera* existe aquela que utiliza a mistura com iscas de cucurbitacinas (Invite EC), que estimula a alimentação compulsiva dos insetos deste gênero. Estudos de Buuk et al. (2014) relatam que esta substância é mais atraente para os machos jovens que não têm nenhuma experiência anterior diferentemente de besouros mais velhos ou aqueles que já foram expostos a mesma. Desses com experiência anterior a esta substância, as fêmeas jovens se alimentam mais do que os machos da mesma idade, em contra partida os machos mais velhos consomem mais do que as fêmeas de mesma idade.

Sabendo-se que as enzimas de destoxificação (monooxigenases e esterases) concentram-se no intestino do inseto, Siegfried et al. (2004) avaliaram o efeito desta mistura (inseticida+cucurbitacina) utilizando combinação com carbaril em quatro áreas, uma em Iowa (Kansas), duas em Indiana (Illinois) e uma em Dakota do Sul, comparando os espécimes de *D. virgifera* em campos tratados e não tratados. Observaram que nas três das primeiras áreas a resposta a carbaril diminuiu significativamente de 1997 a 2002, resultado comparável aos relatados por Zhu et al. (2001). Ambos os autores mostram que depois de apenas quatro anos de aplicação de uma mistura isca-inseticida a susceptibilidade da concentração letal de 90% da população dos besouros foi até 20 vezes menor. Em paralelo com a seleção para resistência ao inseticida nestas áreas a resposta desses insetos para cucurbitacinas também diminuiu. Estes resultados mostram claramente que em larga escala a aplicação em longo prazo de uma única substância ativa, pode conduzir a uma eficácia reduzida e, finalmente, a resistência ao agroquímico.

Parimi et al. (2003) verificando o efeito da mistura de isca - inseticida em populações resistentes dos Condados de York e Phelps e populações susceptíveis do Condado de Saunders constataram que a utilização do indoxacarbe (oxadiazina) e fipronil (pirazol) poderia ser uma alternativa para substituir o carbaril, uma vez que ambos apresentam modos de ação único, como bloqueadores de canais de sódio e

antagonistas de neurotransmissores GABA (ácido gama - aminobutírico) respectivamente, além disso, na alimentação ambos foram comparáveis em termos de resposta à isca cucurbitacina, podendo esta ser uma estratégia de manejo da resistência.

Já no Brasil, poucos estudos relatam a ineficácia de defensivos químicos para o controle da *D. speciosa*. Levine e Olomi-Sadeghi (1991), na sua revisão sobre o manejo das larvas desta espécie sugerem que a ação de inseticidas no solo, tem sido inconsistente, devido aos níveis altamente variáveis de degradação, aumento da biodegradação e a resistência do besouro detectado no final da década de 1970, pelo uso de carbofuran, principalmente em áreas com histórico de intensa utilização do inseticida.

Na literatura nacional é possível verificar a ação de doses mínimas dos inseticidas, Maraus et al. (2011) avaliando a ação de diferentes doses de teflubenzuron e alfacipermetrina (75 g/L) pulverizados em uma variedade de batata semente Ágata no município de Maringá (PR), constatou que as doses de 15 e 30g i.a./ 100L não apresentaram controle superior a 80%, o que Garcia (2002) considera um fator preponderante para o desenvolvimento da resistência da praga.

Viana e Marochi (2002) analisando a eficiência de diversos inseticidas no controle de larvas de *D. speciosa* e *D. viridula* em oito regiões de Ponta Grossa (PR) verificaram que o tratamento de sementes com thiodicarb e furathiocarb (carbamato), fipronil, imidacloprid (neocotinóide) e fipronil+thiodicarb apresentaram baixo controle de larvas.

Em Pelotas (RS) Salles e Grutzmacher (1999) observaram que a dose de 2 L i.a./ ha de clorpirifós (organofosforado) aplicado no sulco do plantio de batata demonstrou baixa proteção para os tubérculos frente a ação da larva alfinete. Já em uma plantação de feijão da variedade Pérola no município de Ipuçu (SC) Vargas et al. (2008) averiguou que a pulverização com os inseticidas deltametrina (4g de i.a/ha), imidacloprid (105g de i.a/ha), metamidofós (300 g de i.a/ha), não apresentaram eficiência no controle de adultos de *D. speciosa*, durante os 21 dias de avaliação.

Portanto, não são apenas os fatores genéticos e bioecológicos que estão envolvidos na resistência, mas também, procedimentos operacionais adotados como a frequência de tratamentos, falta de rotação de princípio ativo e exposição à subdosagens do inseticida que neste caso leva à eliminação de indivíduos

homozigotos susceptíveis (SS), entretanto, os heterozigotos (RS) resistentes são favorecidos (SABATINI, 2003).

Em certos casos, a aplicação de defensivos no solo se torna menos grave do que a pulverização superficial e ou aérea, pois os inseticidas de solo protegem apenas uma parte da raiz (sulco ou uma banda de 18 cm) e baseados em estudos que relatam que as larvas de *D. virgifera* podem se deslocar até 1 metro no solo para encontrar raízes de um hospedeiro adequado (SHORT e LUEDTKE, 1970) pode-se inferir que este método permite a sobrevivência de uma percentagem variável de besouros não selecionados e consequentemente a manutenção de alelos de suscetibilidade de uma população.

3.4 Órgão Reprodutor Masculino

As estruturas reprodutivas nos insetos constituem-se por órgãos mesodérmicos, como as gônadas (ovários-testículos) e ectodérmicos, como os outros órgãos associados (fêmeas: ovidutos laterais, oviduto comum, glândulas acessórias, vagina, bursa copulatrix, espermateca e sua glândula; machos: ductos deferentes, vesícula seminal, ducto ejaculatório, glândulas acessórias, órgão copulador - edeago) (CHAPMAN, 1998; GALLO et al., 2002).

Em Coleoptera, a genitália masculina interna é pouco estudada e o funcionamento das estruturas masculinas internas ainda não é bem compreendido. No entanto, as estruturas morfológicas dos genitais masculinos têm sido amplamente utilizadas para taxonomia e sistemática. Os órgãos genitais proporcionam, em muitos casos, os caracteres taxonomicamente úteis para distinguir organismos ao nível de espécie, geralmente onde não há características morfológicas suficientes para esse fim (SOUZA et al., 2013).

O edeago no gênero *Diabrotica*, formado de lobo médio e tégmen, concorda com o padrão galerucíneo – o lobo médio é uma estrutura aproximadamente cilíndrica, alongada, em volta do qual encontra-se o tégmen reduzido, membranoso, normalmente em forma de “Y” (MOURA, 2009). Uma segunda estrutura membranosa, o spiculum gastrale em forma de “V”, pode envolver o edeago apicalmente. O comprimento do edeago normalmente não ultrapassa o maior comprimento abdominal. Lateralmente, em geral o lobo médio tem a porção basal recurvada. O óstio pode estar protegido por uma aba apical de formato

variável, que pode ser articulada. O saco interno pode apresentar escleritos em número e formato variável (Figura 5) (PRADO, 2015).

Figura 5 – Diagrama esquemático da genitália masculina do gênero *Diabrotica* (à esquerda) e detalhe do lobo médio (à direita).

Fonte: Prado (2015).

O aparelho reprodutivo masculino nos insetos tem como principais funções a produção e o armazenamento de espermatozoides, bem como seu transporte de uma forma viável, para o aparelho reprodutivo feminino. Morfologicamente, o aparelho reprodutivo masculino consiste em um par de testículos, os quais possuem uma série de folículos testiculares (onde são produzidos os espermatozoides) que variam em organização e número dependendo da espécie. Os túbulos ou folículos testiculares abrem-se separadamente em dutos espermáticos, denominados vasos deferentes. Os vasos deferentes se alargam para formar a vesícula seminal, que é o órgão responsável pelo armazenamento de espermatozoides. O aparelho reprodutivo masculino também possui um par de glândulas acessórias. Os vasos deferentes pares unem-se no local onde levam ao duto ejaculatório, que é responsável por transportar o sêmen até o gonóporo (GULLAN e CRANSTON, 2014; CHAPMAN 1998).

No gênero *Diabrotica* os machos possuem testículos proximais e estruturas acessórias (Figura 6). Os dois testículos ovóides, às vezes em forma de rim, são normalmente envolvidos por uma fina bainha membranosa para formar uma estrutura de um só lobo. Cada testículo, no entanto, é separado por uma fina

membrana, é oco no centro e amarelo claro em imagos jovens, mas com a idade torna-se alaranjado (MENDOZA, 1964).

Figura 6 – Ilustração esquemática dos órgãos reprodutivos internos do macho *D. undecimpunctata* Howardi.

Fonte: Mendoza (1964).

Dentro de cada folículo as células germinativas estão organizadas em cistos circundados por células somáticas epiteliais, onde ocorre a espermatogênese. O cisto é essencialmente um conjunto de células germinativas circundadas por uma célula somática de natureza epitelial e o número de espermatozoides encontrados em seu interior é quase sempre constante e específico para cada espécie, sendo representados por uma função de 2^n – onde “n” corresponde ao número total de divisões mitóticas goniais (VIRKKI, 1969). Na extremidade distal de cada folículo testicular as células germinativas se dividem para produzir as espermatogônias, células que se multiplicam por mitose formando os espermatócitos que por sua vez se dividem meioticamente para produzir espermátides e através de transformações morfofuncionais (espermio gênese), resultam em espermatozoides aptos para fecundar o ovócito. Os cistos contendo células em estágios iniciais (espermatogônias e espermatócitos) se localizam próximo às células apicais do testículo e os cistos contendo espermátides e espermatozoides se posicionam

próximos ao vaso deferente (PHILLIPS, 1970). O tamanho dos espermatozoides em crisomelídeos varia de 90 a 700 μm de comprimento (BACCETTI e DACCORDI, 1988).

A espermiogênese em *D. speciosa* ocorre dentro de cistos nos quais os espermatozoides estão dispostos em feixes paralelos e cada feixe é suportado por uma célula somática ou cística, seu espermatozoide é filiforme, tem pouco citoplasma e duas regiões distintas designadas cabeça e cauda. A cabeça do esperma consiste no núcleo e no complexo acrossomal, produzido pelo complexo de Golgi. No material nuclear, após a coalescência da cromatina obtém-se um núcleo compacto com ausência de microtúbulos citoplasmáticos. O acrossoma começa seu desenvolvimento como um corpúsculo esférico, o grânulo pró-acrosomal, que se prende ao envelope nuclear por uma membrana intersticial densa. Na cauda espermática, observa-se um axonema com arranjo típico de $9 + 9 + 2$ (par central de microtúbulos, nove duplos periféricos e nove microtúbulos acessórios), duas derivadas mitocondriais, um corpo acessório com duas expansões corpusculares – “puff-like”, que lhe confere forma simétrica (Figura 7) (FERNANDES e BÃO, 1996).

Figura 7 – Lado esquerdo – Desenho esquemático do espermatozoide de crisomelídeo; Lado Direito – corte transversal da região flagelar do espermatozoide de *D. speciosa* - A, acrossoma; Ab, um corpo acessório; AX, axonema; EL, camada extra-acrosomal; H, cabeça; Md, dois derivados mitocondriais; N, núcleo; Pc, dois corpúsculos “puff-like”; T, cauda.

Fonte: Lado esquerdo (BACCETTI e DACCORDI, 1988) e Lado direito (FERNANDES e BÃO, 1996).

De acordo com Virkki (1969) os insetos das ordens mais basais possuem um número maior de células espermáticas por cisto do que àqueles das ordens mais derivadas. Portanto, no interior de categorias sistemáticas, grupos e espécies mais recentes tendem a possuir menos espermatozóides por cisto, ou seja, essa redução parece apresentar um valor adaptativo para a especialização da população.

No caso dos insetos esterilizados, Seo et al. (1990) constataram que machos de *Ceratitis capitata* (Diptera) irradiados transferem menos espermatozoides que machos selvagens. Em termos de fisiologia e comportamento, insetos machos submetidos à radiação gama não devem ser totalmente estéreis, mantendo a competitividade com os selvagens (WHITTEN e MAHON, 2005).

3.5 Técnica do Inseto Estéril (TIE)

A técnica de inseto estéril (TIE) consiste na liberação de machos e/ou fêmeas esterilizados, em um ecossistema definido permitindo a sua competição com outros da população natural (selvagem), considerada da mesma espécie. Os insetos estéreis acasalarão com a população selvagem e não gerarão descendentes. Repetidas liberações de insetos estéreis levam a uma redução na população da praga. Os insetos submetidos à radiação ionizante apresentam os seguintes distúrbios: infecundidade nas fêmeas, aspermia ou inativação nos machos, incapacidade de acasalar, mutação letal dominante nas células reprodutivas dos machos ou das fêmeas (GALLO et al., 2002).

Para a irradiação de insetos, geralmente são utilizados irradiadores de raios gama, devido à sua alta energia e penetração, mas os elétrons gerados por aceleradores que operem abaixo de 10 MeV e os raios X gerados por feixe de elétrons de energia abaixo de 5 MeV são outras opções práticas. As fontes mais comuns de raios gama são os radioisótopos Cobalto 60 e Césio 137, com meia-vida de 5,6 anos e 30 anos respectivamente. Normalmente os estádios irradiados para obtenção de esterilidade são o pupal ou adulto, pois é nesses que os insetos apresentam maior diferença de sensibilidade entre os tecidos somáticos e gaméticos (SGRILLO et al., 1974).

Em relação às características de um inseto passível de controle pela TIE, os seguintes requisitos devem ser observados: (1) o emprego dessa tecnologia deve ser economicamente viável; (2) o inseto deve se reproduzir sexualmente através de

cópulas; (3) deve existir tecnologia eficiente e econômica para a criação massal de insetos; (4) os indivíduos estéreis devem apresentar rápida e ampla dispersão no ecossistema, buscando prontamente a fêmea selvagem e competindo com os machos férteis; (5) a irradiação ou outro método esterilizante deve produzir esterilidade sem afetar o comportamento ou longevidade dos machos; (6) as fêmeas devem preferencialmente acasalar uma só vez e (7) o inseto a ser controlado deve ter, em uma fase do seu ciclo natural, uma baixa população (KNIPLING, 1955).

É importante destacar que para a viabilização de um programa de erradicação de insetos-praga, a aplicação da TIE deve ser realizada principalmente em locais onde há isolamento geográfico e/ou climático, sendo efetiva somente quando aplicada em área ampla, visando à população total da praga na região e não somente dentro de pomares isolados (DIAS e GARCIA, 2014). Deve haver inicialmente um controle químico seletivo para redução da população selvagem. Na Figura 8, observa-se que a TIE é mais efetiva quando aplicada em níveis populacionais mais baixos e quando o controle químico perde efetividade (FELDMANN e HENDRICHS, 2001).

Figura 8 – Eficiência de Inseticidas e da TIE.

Fonte: Feldmann e Hendrichs (2001).

Hunter (1912) foi o pioneiro no uso de radiações ionizantes em Entomologia, usando raio-X em *Sitophilus oryzae* (L.) (Ordem Coleoptera). Entretanto, não obteve resultados satisfatórios, porque a sua ampola emitia radiações de baixa energia. Runner (1916) verificou que adultos da *Lasioderma serricorne* (F.) (Ord. Coleoptera), praga das plantações de tabaco, considerada na

época o mais importante cultivo não comestível do mundo, quando submetidos a raios-X, tornavam-se estéreis, constituindo assim o primeiro trabalho de pesquisa com radiações ionizantes em insetos, com resultados satisfatórios. Muller (1927) demonstrou que a radiação ionizante provocava um grande número de mutações letais na mosca *Drosophila melanogaster*, sendo uma das principais consequências à infertilidade nas fêmeas.

A Técnica do inseto estéril considerada um tipo de controle autocida, foi idealizada em 1937, pelo entomologista Edward F. Knipling para o controle da *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera, Calliphoridae) espécie de mosca varejeira que possui como característica, o hábito de depositar seus ovos em tecidos lesionados de animais de sangue quente para o desenvolvimento de suas larvas, a qual causava sérios prejuízos à bovinocultura norte americana (KLASSEN e CURTIS, 2005).

Knipling (1955) observou as características monogâmicas das fêmeas desta espécie, que copulam uma única vez durante sua vida, fato que possibilita a esterilidade induzida em insetos machos inviabilizando os descendentes da espécie. Assim em 1954 na ilha de Curaçao, localizada a 65 quilômetros da Venezuela, foi realizado a liberação de pupas irradiadas de *C. hominivorax* em uma área de aproximadamente 435 Km², no período de duas vezes por semana. A liberação de machos estéreis alcançou uma frequência de 155 machos/ Km²/ semana, promovendo um “valor estéril” inicial de 69%, que aumentou posteriormente, chegando a desejáveis 100%. Esta atividade foi mantida por 14 semanas, até obter um grau satisfatório de eliminação do vetor.

Com o sucesso obtido a técnica foi incorporada ao programa integrado de manejo de pragas erradicando a espécie em diversos locais: Flórida em 1958; Sudoeste dos Estados Unidos e México em 1962; região do Caribe em 1975 – Porto Rico e Ilhas Virgens; África do Norte em 1989; América Central em 1984 – Belize e Guatemala 1994, El Salvador 1995, Honduras 1996, Nicarágua 1999, Costa Rica 2000, e Panamá 2001, neste caso sendo mantida uma barreira permanente através da liberação de insetos estéreis na divisa com a Colômbia com objetivo de impedir a recolonização por moscas oriundas da América do Sul (MASTRANGELO, 2011; KLASSEN e CURTIS, 2005; TORRES, 2006).

No Brasil o primeiro trabalho com irradiação de insetos foi feito por Gallo (1960) que expôs pupas de *Ceratitis capitata* (Wied.) e pupas de *Diatraea*

saccharalis (F.) à radiação gama proveniente do Berílio com o objetivo de obter insetos estéreis. Atualmente, vários países possuem programas nacionais de TIE, como por exemplo biofábricas (Quadro 3) para criação de *C. capitata* (África do Sul, Argentina, Brasil, Chile, EUA, Guatemala, México, Peru, Portugal, Tunísia e Tailândia), algumas espécies dos gêneros *Anastrepha* (México e EUA) e *Bactrocera* (EUA, Japão, Malásia) para o controle (supressão) e/ou erradicação (PARANHOS, 2005).

Quadro 3 – Exemplos de instalações de criação de insetos e os tipos de irradiadores utilizados para esterilização reprodutiva.

Localização	Inseto	Dose (Gy)	Modelo do Irradiador (Fabricante)	Fonte
África do Sul	<i>C. capitata</i>	90	Panorâmico	Co-60
Argentina	<i>C. capitata</i>	110	IMCO – 20	Co-60
BRASIL	<i>C. capitata</i>	95	RS 2400 (RADSOURCE)	Raio-X
Canada	<i>Cydia pomonella</i>	150	Gammacell 220 (NORDION)	Co-60
Chile	<i>C. capitata</i>	120	Gammacell 220 (NORDION)	Co-60
EUA (Hawaii)	<i>C. capitata</i>	140	Husman 521 (2 unidades – ISOMEDIX)	Cs-137
		120	Gammacell 220 (NORDION)	Co-60
EUA (Texas)	<i>Anastrepha ludens</i>	70	Husman 521 (ISOMEDIX)	Cs-137
Filipinas	<i>Bactrocera philippinensis</i>	64 – 104	GB 651PT (NORDION)	Co-60
Guatemala	<i>C. capitata</i>	100 – 145	Gammacell 220E (2 unidades – NORDION)	Co-60
			Gammacell 220R (J. L. SHEPHERD)	Co-60
			Husman 521A (ISOMEDIX)	Cs-137
			Husman 521 (ISOMEDIX)	Cs-137
México	<i>A. ludens</i>	80	JS – 7400 (NORDION)	Co-60
	<i>A. obliqua</i>	80		
	<i>C. capitata</i>	100		
	<i>C. hominivorax</i>	80	Husman 520 (3 unidades – ISOMEDIX)	Cs-137
Portugal	<i>C. capitata</i>	100	Gammacell 220 (NORDION)	Co-60
Tailândia	<i>Bactrocera dorsalis</i>	90	Gammacell 220 (NORDION)	Co-60

Fonte: baseado em Bakri et al. (2005b).

O uso de radiação para esterilizar insetos inclui vantagens como: aumento insignificante de temperatura durante o processo, os insetos estéreis podem ser liberados imediatamente após a irradiação, e a radiação pode passar através de diversos materiais, permitindo que os insetos sejam irradiados, mesmo após terem sido embalados (BAKRI et al., 2005b).

O modo de ação das radiações ionizantes em células vivas consiste em uma cadeia de reações oxidativas que vão ocorrendo durante a irradiação, formando metabólitos altamente reativos como radicais livres, ocasionando danos irreversíveis ao DNA, como quebras cromossômicas e mutações letais (MASTRANGELO; WALDER, 2011). As rupturas cromossômicas não interferem na capacidade dos gametas de participarem da fertilização, dessa forma o espermatozóide afetado fertiliza o óvulo da maneira normal, e as principais mutações letais matam a maioria dos embriões durante as primeiras divisões de clivagem (KLASSEN, 2005).

De acordo com a lei de Bergonie e Tribondeau, as células mais sensíveis à radiação ionizante são aquelas que estão em intenso processo de divisão mitótica, enquanto células somáticas são menos sensíveis devido à perda da capacidade de divisão celular, portanto a radiosensibilidade se fará mais presente em espermatócitos e espermatogônias, que são células germinativas ainda em intenso processo de divisão celular (BAKRI et al., 2005b).

Durante o fenômeno de divisão celular, mais precisamente no início da prófase, cromossomos fragmentados sofrem replicação normal, porém, durante a metáfase, as extremidades quebradas podem fundir-se, levando à formação de cromossomos dicêntricos (dois centrômeros) e/ou fragmentos acêntricos (sem centrômero). O fragmento acêntrico é freqüentemente perdido, enquanto que o fragmento dicêntrico pode ocasionar a formação de pontes durante a anáfase, levando a mais quebras cromossômicas. Todo este processo repete-se em vários ciclos, levando à acumulação de sérios desequilíbrios, como mutações, na molécula de DNA e consequentemente, comprometimento da informação genética que será repassada às células filhas (ROBINSON, 2005).

Na revisão Bakri et al. (2005a) sobre doses de radiação para desinfestação e esterilização reprodutiva de artrópodes foram encontradas 2750 referências, publicadas nas últimas décadas. No total 308 espécies de artrópodes, principalmente de importância econômica, distribuídos em 197 gêneros, 84 famílias, 8 ordens de insetos e 2 ordens de aracnídeos, foram submetidas a estudos de

irradiação para fins de pesquisa, biocontrole ou Programas de controle de pragas que integram o TIE ou a desinfestação pós-colheita. Destas espécies, 25 são Acari, 2 são Araneae, 73 são Coleoptera, 85 são Diptera, 5 são Dictyoptera, 26 são Hemiptera, 6 são Hymenoptera, 75 são Lepidoptera, 1 é Orthoptera e 10 são Thysanoptera (Quadro 4), ou seja, quase 80% destas espécies pertencem apenas a três ordens, isto é, Diptera, Lepidoptera e Coleoptera.

Quadro 4 – Lista de aracnídeos e insetos submetidos à irradiação para obtenção da esterilidade.

Classe	Ordem	Famílias (gênero, espécies)	Dose Esterilizante (Gy)
Arachnida	Acari	Acaridae (4,5); Argasidae (2,2); Dermanyssidae (1,1); Eriophyidae (1,1); Ixodidae (4,6); Oligonychidae (1,1); Siteroptidae (1,1); Tenuipalpidae (1,1); Tetranychidae (2,7).	31 a 305
	Aranea	Eresidae (1,1); Pholocidae (1,1).	20 a 150
	Coleóptera	Anobiidae (3,4); Bostrichidae (2,1); Bruchidae (3,5); Cerambycidae (1,1); Chrysomelidae (3,2); Cleridae (1,1); Coccinellidae (1,1); Curculionidae (19,26); Dermestidae (3,7); Laemophloeidae (1,3); Lyctidae (1,1); Scarabaeidae (5,5); Scolytidae (1,1); Silvanidae (2,3); Ptinidae (1,1); Tenebrionidae (8,11).	15 a 211
	Dictyoptera	Blaberidae (1,1); Blattellidae (1,2), Blattidae (1,1); Oxyhaloidae (1,1).	5 a 140
Insecta	Diptera	Agromyzidae (1,1); Anthomyiidae (1,2); Calliphoridae (3,5); Ceratopogonidae (1,1); Chloropidae (1,1); Culicidae (3,14); Cuterebridae (1,1); Drosophilidae (1,5); Glossinidae (1,8); Muscidae (4,6); Oestridae (1,2); Piophilidae (1,1); Psilidae (1,1); Sarcophagidae (1,1); Sciaridae (1,1); Tachinidae (1,1); Tephritidae (6,34).	20 a 200
	Hemiptera	Aleyrodidae (3,4); Aphididae (2,2); Cicadellidae (1,1); Coccidae (1,1); Coreidae (2,2); Diaspididae (2,2); Delphacidae (2,3); Lygaeidae (1,1); Miridae (1,1); Pentatomidae (2,3); Pseudococcidae (2,2); Pyrrhocoridae (1,1); Reduviidae (3,3).	10 a 200

Classe	Ordem	Famílias (gênero, espécies)	Dose Esterilizante (Gy)
Insecta	Hymenoptera	Apidae (1,1); Braconidae (2,2); Eulophidae (1,1); Formicidae (1,1); Pteromalidae (1,1).	80 a 100
	Lepidoptera	Arctiidae (2,2); Bombycidae (1,2); Cossidae (1,1); Gelecheiidae (4,4); Lymantriidae (2,2); Lyonetiidae (1,1); Noctuidae (6,13); Pieridae (1,1); Plutellidae (1,1); Pyralidae (13,21); Sphingidae (1,1); Tineidae (1,1); Thaumetopoeidae (1,1); Tortricidae (16,20); Yponomeutidae (3,4).	40 a 400
	Orthoptera	Acrididae (1,1)	4
	Thysanoptera	Phlaeothripidae (1,1); Thripidae (5,9).	100

Fonte: baseado em Bakri et al. (2005a).

Com relação aos custos desta técnica, no EUA a erradicação da mosca varejeira foi orçada em 12 milhões de dólares e os lucros obtidos foram da ordem de 275 milhões de dólares até 1975 (GALLO et al., 2002). No Chile, após 8 anos de um programa intensivo com TIE, a mosca do mediterrâneo foi erradicada em 1995 da província de Arica. Desde então, as exportações de frutas cresceram para atingir 2 milhões de toneladas de frutas, principalmente uvas de mesa, maçãs, kiwis, abacate e pêssegos, com valor, em 2002, de US\$ 1,6 bilhões. A cada ano, o governo chileno gasta uma média US\$ 4 milhões para manter o país livre de moscas das frutas, sendo a relação benefício/custo em torno de 17:1 (MASTRANGELO, 2009).

Analisando agora apenas os ganhos indiretos pela sociedade que um programa de TIE pode trazer, um estudo na Jordânia mostrou que uma média de 94 toneladas de inseticidas era aplicada anualmente para o controle de *C. capitata* (o que representava 33,8% do total de inseticidas usados no país), e que US\$ 550.000 eram gastos por ano só para o tratamento de casos de envenenamento de trabalhadores durante a aplicação. O estudo concluiu que esse custo poderia cair substancialmente com a adoção de um programa integrando a TIE (IAEA, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os adultos de *D. speciosa* foram provenientes de uma biofábrica denominada PROMIP, localizada no município de Engenheiro Coelho/SP (Região Metropolitana de Campinas).

Parte dos estudos foi realizada no Insetário do Instituto Biológico de São Paulo, onde machos e fêmeas foram identificados de acordo com White (1977), observando-se a morfologia externa da genitália, na região apical do abdome. A identificação histológica das gônadas masculinas foi realizada no laboratório de Histologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro (SP).

Os machos utilizados nos bioensaios foram irradiados no Centro de Tecnologia das Radiações no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), com uma fonte de Cobalto – 60 do tipo Gammacell 220 da Atomic Energy of Canadá Ltda, com taxa de dose de 0,808 KGy/hora e atividade de $3.534,13 \times 10^{10}$ Bq no início dos experimentos (Figura 9).

Figura 9 – Irradiador Gammacell 220 instalado no CTR - IPEN com 35 lápis (fontes) dispostos simetricamente contendo 7 pastilhas de cobalto cada, sendo possível visualizar os machos de *D. speciosa* na câmara de amostra.

Fonte: Autor da dissertação.

4.1 Ensaios de sobrevivência e fecundidade

Os adultos recém-emergidos da criação comercial foram sexados e após o terceiro dia os machos foram irradiados em doses crescentes de radiação gama: 0 (controle), 25, 50, 75 e 100 Gy, totalizando 20 repetições por dose. Os casais foram então individualizados em pequenas gaiolas (copos de 400mL) de plástico transparente. O topo dessa gaiola possui uma pequena abertura circular vedada com tecido *voil*, para permitir aeração. Os casais foram alimentados com folíolos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* 'Carioca') mantidos em pequeno vidro com água. Dentro de cada gaiola foi colocado um recipiente plástico medindo 3 cm de diâmetro por 1cm de altura, contendo no seu interior gaze umedecida de cor preta, utilizado como substrato de oviposição (Figura 10) (MILANEZ, 1995). A cada quatro dias o alimento era trocado e os ovos contados.

Figura 10 – A: Gaiola de plástico transparente, folíolo de feijão e gaze preta como substrato para oviposição; B: Avaliação biológica dos casais de *D. speciosa* totalizando 20 repetições por dose em sala climatizada sob temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 14 horas.

Fonte: Autor da dissertação.

Caso houvesse registro de morte do macho em qualquer tempo e da fêmea antes de no máximo seis dias a partir da montagem do casal, estes eram substituídos por novos indivíduos, formando-se uma nova repetição, uma vez que as fêmeas liberam feromônios sexuais a partir dos três dias de idade (3-5 e 6-15 dias) segundo Nardi (2010).

Baseado na metodologia de Ávila et al. (2000) os ovos foram retirados do substrato de oviposição, lavando-se a gaze em água corrente sobre um tecido fino (*voil*), onde ficarão retidos (Figura 11 A). Para evitar a contaminação por fungos

durante o período de incubação, os ovos foram tratados com solução de sulfato de cobre (CuSO_4) da Merck a 1%, durante dois minutos e, em seguida, transferidos com auxílio de pincel de cerdas finas para recipientes plásticos (9 cm de diâmetro x 4 cm de altura) com tampa, forradas com papel de filtro umedecido (Figura 11 B).

Depois da eclosão, as larvas foram alimentadas com radículas seminais de plântulas de milho pipoca (*Zea mays* L. 'Everta'), para diminuir a contaminação por fungos, as sementes de milho foram tratadas com hipoclorito de sódio na concentração de 3% por um período de imersão de 5 minutos (ZORATO et al., 2001) e colocadas para germinar em vermiculita fina esterilizada umedecida com água destilada. Cerca de 100 larvas foram mantidas por recipiente plástico, sendo um menor (19 cm de largura x 7,5 cm de altura) preenchido com 80 g de vermiculita fina esterilizada e umedecida com 160 mL de água destilada contendo as 100 radículas de plântulas de milho que por sua vez eram cobertas com 100 g de vermiculita e 200 mL de água (Figura 11 C). Após 10 dias, tais larvas, foram transferidas por peneiramento para outro recipiente maior (24 cm de largura x 8,5 cm de altura) contendo o dobro de substrato e de novas plântulas de milho até a emergência (ÁVILA et al., 2000).

Figura 11 – Etapas da criação de *D. speciosa* em laboratório: A – Remoção de ovos do substrato de oviposição por lavagem em água corrente; B – Acondicionamento dos ovos oriundos em recipientes de plástico com tampa hermética e papel filtro umedecido; C – Sementes pré-germinadas de milho para inoculação das larvas recém-eclodidas.

Fonte: Autor da dissertação.

Neste experimento determinou-se a longevidade do macho irradiado, a fecundidade (nº de ovos/fêmea) e a viabilidade no período larva-adulto. O teste foi conduzido usando delineamento inteiramente casualizado. As gaiolas e os

recipientes contendo os ovos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), umidade relativa ($60 \pm 10\%$) e fotoperíodo (fotofase 14h) (ÁVILA e PARRA, 2003). Os resultados foram submetidos ao método de Probito (FINNEY, 1971), utilizando o programa POLO PLUS (LEORA SOFTWARE, 2003), para determinar o efeito da dose sobre a longevidade, e a dose esterilizante através da análise de variância onde as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (ARTHUR e ARTHUR, 2006).

4.2 Bioensaio de consumo Foliar

A fim de avaliar o consumo médio de um casal de adultos de *D. speciosa* foi conduzido outro experimento com plantas de feijoeiro - tipo carioca cultivadas em casa de vegetação para a alimentação dos insetos.

Seguindo a metodologia adotada pela Ruzicki (2015) com algumas alterações, foram extraídos discos foliares de 3,2 cm de diâmetro, cortados com vazador de metal, onde era mantido o pecíolo da folha para o acondicionamento em vidro com água. Quatro dias após a irradiação dos machos foi inserido um disco foliar em cada gaiola com um macho e uma fêmea, permanecendo por 24 horas, totalizando 20 repetições por dose (Figura 12 A e B).

Figura 12 – Materiais utilizados no bioensaio de consumo foliar de feijão por *D. speciosa*: A – disco foliar de 3,2 cm para alimentação; B – Recipiente contendo um disco foliar e um casal de adultos; C – Disco foliar submetido à alimentação pelos adultos após 24 horas. D – Digitalizador contendo os discos foliares para obtenção das imagens.

Fonte: Autor da dissertação.

Após esse período, os discos foliares foram retirados para análise da área foliar, a partir da digitalização (HP Photosmart C4680) dos discos foliares após as 24 horas de consumo pelos insetos, e processamento das imagens no software ImageJ versão 1.46R (Figura 12 C e D). Neste as imagens eram marcadas com a cor preta e analisadas em cm² (FERREIRA e RASBAND, 2012). Assim, a área foliar consumida pelo inseto (AFC) foi obtida pela diferença entre a área foliar inicial (AFI = 8,038 cm²) e a área foliar remanescente após 24 horas (AFR).

Este bioensaio foi realizado em delineamento completamente casualizado, os valores obtidos foram submetidos ao teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada sob temperatura de 25±2°C, 60 ± 10% de umidade relativa e fotofase de 14 horas.

4.3 Efeito da Radiação nas gônadas masculinas

Neste ensaio 3 machos irradiados nas doses mencionadas anteriormente, com 8 dias de idade (sexualmente maduros), foram mantidos sob condições de refrigeração (aproximadamente 4 °C por 6 min) e dissecados em solução tampão fosfato salino (PBS) (YUVAL et al., 1996).

Através da técnica de Hematoxilina de Harris – Eosina aquosa, os testículos foram fixados com paraformaldeído a 4% por cinco dias. A desidratação foi realizada com banhos em uma série crescente de álcoois (15% a 95%) que foram substituídos em um intervalo de duas horas, o álcool 70% foi mantido “overnight”. Ao fim do processo de desidratação, as peças foram incluídas em moldes plásticos contendo resina e polimerizador (Figura 13). Os blocos foram seccionados em micrótomo LEICA RM 2255, com secções de 6 µm de espessura, que foram recolhidas em lâminas de vidro previamente limpas. As lâminas contendo as secções foram coradas pela hematoxilina de Harris durante 10 minutos. Depois de lavadas por cinco minutos em água corrente, foram coradas pela eosina aquosa, por mais cinco minutos, e novamente lavadas em água corrente. Após secagem ao ar livre em suportes de madeira, as lâminas foram mergulhadas em xilol e, em seguida, cobertas com bálsamo do Canadá e lamínula. As lâminas permanentes foram examinadas e fotodocumentadas em microscópio óptico de campo claro LEICA DM750 (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

Figura 13 – Processos para fixação do testículo submetidos à técnica histológica de Hematoxilina e Eosina: A – Testículo de *D. speciosa*, B – Molde plástico contendo resina, polimerizador e testículos individualizados, C – Blocos fixados para corte em micrótomo, D – Cortes corados para secagem em estante de madeira e E – Microscópio óptico de campo claro LEICA DM750.

Fonte: Autor da dissertação.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Consumo Foliar

Os danos mais severos causados por *D. speciosa* em plantas hospedeiras são decorrentes do consumo da área foliar pelos adultos, em especial na fase de plântula. Quando altas populações ocorrem nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura, não havendo área foliar disponível, os insetos podem consumir o broto apical, causando, em decorrência, a morte das plântulas (ROSOLEM e MARUBAYASHI, 1994).

Nos bioensaios de consumo foliar foi possível observar que o aumento de dose aplicado sobre o macho provoca diminuição no consumo do casal. No presente trabalho considerou-se uma área foliar de 8,038 cm². Os casais compostos por machos irradiados com 75 e 100 Gy apresentaram um consumo de 3,4 e 3,0 cm² o que corresponde respectivamente a 42,9 e 37,3% da área. Enquanto os machos do controle e os irradiados com dose de 25 Gy não demonstraram diferenças estatísticas, consumindo de 66,2 e 62,4 % da área foliar (Tabela 1) em 24 horas.

Tabela 1 – Médias ($\pm$ EP) de consumo foliar dos casais de *D. speciosa* durante 24 horas de avaliação com 20 repetições por dose de radiação.

Dose (Gy)	Média	Erro padrão ($\pm$)	Consumo (%)
Controle	5,32 a	1,51	66,18
25	5,02 a	1,59	62,45
50	4,13 ab	1,98	51,38
75	3,45 ab	1,91	42,92
100	3,00 b	1,89	37,32
C.V. %		26,99	

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de significância.

CV: coeficiente de variação

Nos testes sem chance de escolha com área foliar de 7,065 cm², Ruzicki (2015) buscou caracterizar a preferência alimentar de adultos de *D. speciosa* em seis genótipos de feijoeiro (Campeiro, Uirapuru, Esplendor, Tuiuiú, Tiziu e Soberano) por 24 horas e verificou que 1 único adulto consome entre 1,04 e 1,19 cm², não

havendo diferença no consumo entre os genótipos, o que corresponde a aproximadamente 16,84% da área foliar.

Marques et al. (1999) compararam a desfolha em 4 tipos de plantas hospedeiras, feijão, soja, milho e arroz, aos 50 dias de emergência e observaram que 5 casais de *D. speciosa* em 72 horas consomem uma área foliar acima de 20 cm² em um feijoeiro, demonstrando a preferência do inseto por leguminosas em relação às gramíneas onde o consumo foi menor que 10 cm².

Já Bitencourt (2007) avaliando o consumo foliar em diferentes hospedeiros (feijão, soja, nabo e milho), disponibilizou dois discos com área foliar de 3,8 cm² para dois casais de *D. speciosa* sob confinamento e observou um menor consumo em feijão com aproximadamente 6,2 cm² (81,58%) e maior em milho com 7,6 cm² (100%). Resultado similar ao obtido por Ávila e Parra (2003) que utilizaram a mesma metodologia porém disponibilizaram círculos foliares de feijão, soja, batata e milho com 15,9 cm² de área para dois casais de *D. speciosa* durante 24 horas e constataram menor consumo da área foliar no feijão (4 cm²) e maior no milho com valores acima de 5 cm², provavelmente esta diferença ocorreu como compensação pela baixa qualidade nutricional da gramínea em relação às leguminosas.

Laumann et al. (2003) verificaram em laboratório que consumo de área foliar no feijão pelas fêmeas ($0,89 \pm 0,41$ cm²/dia) foi significativamente maior que a área foliar consumida pelos machos ($0,52 \pm 0,41$ cm²/dia), este maior consumo pode ser explicado pelo maior tamanho corporal das fêmeas ou pela necessidade de maior quantidade de recursos destinados à produção de ovos.

Segundo Silva et al. (2003) na fase inicial da cultura (uma semana após a emergência) dois insetos por planta já podem provocar desfolha de até 16%, em 24 horas de alimentação, resultando em vagens de menor peso, fato que prejudica a qualidade e o preço do produto para comércio. Conforme observado por Oliveira e Ramos (2012), quanto maior a desfolha menor será o peso da vagem; mesmo que esta planta apresente uma recuperação no seu crescimento sua capacidade produtiva será afetada. A presença do inseto-praga na fase inicial da cultura, mesmo em baixas populações, deverá ser considerada como um fator de risco.

5.2 Radioesterilização

Os valores médios de fertilidade obtidos nos tratamentos entre machos de *D. speciosa* irradiados com diferentes doses de radiação gama e cruzados com fêmeas férteis normais estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias da fecundidade (número de ovos/fêmea) e viabilidade de larvas provenientes dos casais com machos submetidos à radiação gama, constando a porcentagem de adultos emergidos.

Dose (Gy)	Soma total de ovos	Fecundidade (n° ovos)	Viabilidade	(%) Adultos
Controle	2107	104,3 a	75,3 a	57,3
25	4911	225,3 a	35,9 ab	51,7
50	4766	231,6 a	25,7 ab	53,3
75	4522	224,1 a	0,3 b	0
100	4703	235,1 a	0 b	0
C.V. (%)		13,6	19,7	

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de significância.

CV: coeficiente de variação

A fertilidade diminuiu à medida que se aumentou a dose de radiação, evidenciando uma relação direta entre grau de esterilidade nos machos e aumento da dose, como consequência a fecundidade das fêmeas se elevou. A dose que resultou em esterilidade foi a partir de 75 Gy, com valor médio de 0,3 larvas (0,13%) que não completaram o seu desenvolvimento, enquanto que o controle (0 Gy) apresentou uma viabilidade média de 75,3 de larvas (72,2%), com 57% alcançando a fase adulta.

Em alguns experimentos relacionados ao ciclo biológico de *D. speciosa*, Ávila et al. (2000) verificaram que o número de ovos por fêmea alimentada com folíolos de feijão era de 1724,1 ovos, com uma viabilidade no período de larva – adulto de 75,7% que foi aumentada para 82% quando se inoculava uma larva por plântula de milho e a equivalência de duas plântulas aos dez dias da inoculação. Ávila e Parra (2002) avaliando a capacidade reprodutiva em diferentes hospedeiros observaram que a utilização de feijão resultou em uma fecundidade de 600 ovos, com viabilidade de 75,9% de adultos. Já Bitencourt (2007) utilizando a mesma

metodologia obteve uma capacidade de postura similar com 746,6 ovos, porem uma viabilidade reduzida de 26%. Teodoro et al. (2014) por sua vez, diante do mesmo tipo de dieta constatou cerca de 3766 ovos por fêmea com viabilidade de 70,4% no período de larva – adulto.

Tais diferenças comparadas ao controle deste estudo podem estar relacionadas à ocorrência de alguns fungos no alimento durante o desenvolvimento do período larval. Além disso, Ávila e Parra (2001) relatam que a idade fisiológica do feijoeiro influencia o comportamento, a sobrevivência e a taxa de reprodução dos adultos de *D. speciosa*, assim as variações de concentrações e disponibilidade de nitrogênio no tecido foliar para a nutrição do inseto afetam a capacidade de postura que é determinada pela ovogênese, processo fisiológico regulado pela disponibilidade de nutrientes presentes no corpo da fêmea (MATTSON, 1980; WHEELER, 1996).

O resultado encontrado no presente trabalho difere dos estudos de radioesterilização realizados por Branson et al. (1978) com outro crisomelídeo na cidade de Brookings, Dakota do Sul (EUA), onde os machos adultos de *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, expostos imediatamente após a emergência ou 1 dia depois a radiação gama de 7 a 35 Gy com taxa de 8 Gy/h, se mostraram estéreis, sem reduzir significativamente o seu tempo de vida, a partir de 28 Gy, e que as fêmeas acasalavam com os machos realizando posturas inférteis.

Esta diferença de sensibilidade à radiação provavelmente se deve a metodologia utilizada, taxa de dose de irradiação, idade das fases do ciclo evolutivo dos insetos e condições climáticas, que são os fatores mais importantes que contribuem para que ocorram discrepâncias nos resultados. A interação da radiação gama com os organismos provoca ionização e decomposição da água, levando à formação de radicais livres, que afetam grupos proteicos enzimáticos, alterando o metabolismo e o DNA da célula que, continua a reproduzir-se, levando a mutação celular e fragmentação dos cromossomos e do cromatídeo; ou a morte celular (SILVA e ARTHUR, 2004).

Na literatura diversos estudos com coleópteros, principalmente pragas de produtos armazenados, apresentam doses distintas de esterilização. Rodrigues et al. (1980) utilizando a radiação gama em ovos e adultos no “gorgulho-do-feijão”, *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Bruchidae), verificaram que a esterilização nos machos ocorre com uma dose de 120 Gy e nas fêmeas com 100 Gy, sendo a dose

letal para adultos de 2400 Gy. Já a radiosensibilidade dos ovos varia de acordo com seu desenvolvimento, ou seja, a mortalidade dos embriões de 24 horas ocorreu com 10 Gy e daqueles de 96 horas com 80 Gy. Fontes et al. (2003) buscaram determinar a dose letal nas forma imaturas desse inseto em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) e observaram que sobre uma taxa de dose de 55 Gy/hora a dose desinfestante correspondeu a 100 Gy, enquanto que sobre uma taxa de dose de 1418 Gy/hora foi de 25 Gy, demonstrando que quanto maior a taxa de dose, mais rápido é o processo de irradiação e maior é o efeito induzido pela radiação aos sistemas biológicos.

Arthur et al. (1980) pesquisaram a dose esterilizante para adultos de *Acanthoscelides obtectus* Say (Bruchidae) através da pesagem do feijão (*P. vulgaris*) infestado e constataram que doses acima de 100 Gy provoca esterilidade e a partir de 90 Gy as perdas do substrato ofertado são inferiores a 0,5%.

Costa et al. (1986) utilizando doses crescentes de radiação gama em adultos de *Ryzopertha dominica* Fabricius (Bostrichidae) observaram que as doses de 60 e 70 Gy aumentam a esperança de vida dos insetos e 7% e 21%, enquanto a dose esterilizante de 100 Gy diminuiu esta em até 42%.

Wiendl e Arthur (1975) estudando os efeitos causados pelas radiações gama em *Lasioderma serricorne* Fabricius (Anobiidae) observaram que a dose esterilizante para as pupas foi de 100 Gy e para os adultos foi de aproximadamente 90 Gy havendo uma reprodução de apenas 0,25%, sendo que a dose letal para os ovos foi 50 Gy e para adultos situou-se acima dos 4750 Gy, eliminando apenas 10,3% da população após 24 horas.

Fontes (1994) buscou determinar as doses esterilizante e letal para as fases do ciclo evolutivo de *Tribolium castaneum* Herbst (Tenebrionidae), através de doses crescentes de radiação gama. As doses letal e esterilizante para os ovos foram respectivamente 30 e 20 Gy, na fase larval foi de 25 Gy, e nas fases de pupa e adulto as doses esterilizantes foram 50 e 75 Gy, sendo a dose letal imediata para adultos foi 1500 Gy. Além disso, verificou-se que a longevidade do inseto foi afetada com doses acima de 75 Gy.

Arthur e Arthur (2006) testando o controle de *Sitophilus linearis* Herbst (Curculionidae) em frutos de tamarindo através da mesma técnica verificaram que 50 Gy foi suficiente para causar a esterilização e 200 Gy foi a dose letal para os insetos

adultos desta espécie, sendo esta dose recomendada para desinfestação quarentenária do fruto infestado, conservando suas propriedades organolépticas.

Na agricultura Silva (1973) visando controlar a “broca-do-café” *Hypothenemus hampei* Ferrari (Curculionidae) através da radiação gama verificou que a dose letal para as larvas e pupas foram 3500 e 4000 Gy respectivamente, enquanto para os adultos, fora dos grãos foi de 4750 Gy e dentro foi de 5250 Gy, o que demonstra a capacidade de absorção da radiação pelos grãos. Referindo-se a esterilidade observou que na dose de 150 Gy não houve descendência porem maior sobrevivência em todas as fases de desenvolvimento da praga, dessa forma determinou que a melhor faixa de tratamento encontra-se entre 250 e 500 Gy, pois diminui a longevidade e alimentação do mesmo.

No caso da *D. speciosa* a longevidade mostrou-se dependente da dose aplicada (Tabela 3), os machos irradiados com doses de 75 Gy e 100 Gy sobreviveram em media 12,5 dias e 13,5 dias respectivamente, os irradiados com 50 Gy apesar da fertilidade viveram 17,4 dias. Já os machos submetidos a doses de 25 Gy apresentaram elevada expectativa de vida, assim como o próprio controle, não demonstrando diferenças significativas (Figura 14).

Tabela 3 – Efeito das diferentes doses de radiação gama aplicada nos machos para determinar sua longevidade média.

Dose (Gy)	TL50 (95% I.C.)	TL99 (95% I.C.)	Coefficiente Angular $\pm$ EP	X ²	G.L.
Controle	43,62 (40,71 – 46,40)	96,18 (82,92 – 121,27)	6,78 $\pm$ 0,80	5,54	10
25	27,53 (24,68 – 30,57)	120,55 (90,60 – 188,65)	3,63 $\pm$ 0,43	6,09	12
50	13,59 (12,97 – 14,11)	17,41 (16,28 – 19,91)	21,65 $\pm$ 4,05	2,11	3
75	11,24 (10,98 – 11,49)	12,56 (12,12 – 13,61)	48,35 $\pm$ 10,22	0,28	2
100	11,88 (11,58 – 12,17)	13,58 (13,02 – 14,90)	39,95 $\pm$ 8,17	0,08	1

I.C. = Intervalo de confiança/ X² = qui-quadrado/ G.L. = Grau de Liberdade.

Figura 14 – Curvas de longevidade dos machos submetidos a doses crescentes de radiação gama. Temperatura: $25\pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14 horas.

Fonte: Autor da dissertação.

Arthur et al. (1994) notaram que a dose de 25 Gy não afeta a longevidade dos adultos do “bicudo da cana-de-açúcar” *Sphenophorus levis* Vaurie (Curculionidae) mas induz a mutação letal dominante nas células germinativas, causando esterilização. Outro estudo com curculionídeos que atacam palmeiras,

realizado por AL-Ayedh e Rasool (2010), constataram que as doses radiação gama a partir de 15 Gy aplicada sobre o *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, afeta tanto o tempo de vida dos machos como diminui a eclosão dos ovos.

Segundo Mayer e Brazzel (1966) dois requisitos considerados essenciais para o sucesso da técnica do macho estéril: (1) os machos irradiados devem sobreviver 10-15 dias e ser capazes de competir com machos normais para fêmeas no campo. (2) Os machos tratados não devem recuperar a fertilidade durante a sua vida de acasalamento.

Ávila et al. (2000) observaram que a longevidade de machos alimentados com folíolos de feijão provenientes de uma dieta natural em vermiculita foi de 76,6 dias aproximadamente. Bitencourt (2007) utilizando o mesmo alimento verificou que os machos sobreviviam em média 48,4 dias. Já Teodoro et al. (2014) constatou uma longevidade de 56 dias para os machos. De acordo com esses autores, essas diferenças podem ser atribuídas às distintas metodologias empregadas para criação ou manutenção dos insetos, embora o mesmo alimento tenha sido utilizado nas fases larval e adulta, assim como diferentes populações de *D. speciosa* utilizadas.

Wiendl et al. (1994) relacionando a longevidade de adultos de *Cryptolestes pusillus* Schoenherr (Cucujidae) com a temperatura após irradiação gama observou que a radiohormesis se manifesta quando os insetos são expostos a uma dose de 50 Gy e mantidos à uma temperatura de 25°C resultando em um aumento de vida de 25%, enquanto que na temperatura de 30°C bastou uma dose de 25 Gy para aumentar a expectativa em 137%. A partir da dose esterilizante de 100 Gy independente do fator abiótico houve sensível diminuição em suas vidas médias, fato que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho.

5.3 Análise testicular por coloração com Hematoxilina e Eosina

Com o intuito de verificar se o tecido testicular sofre alteração após irradiação, foram realizadas técnicas de histologia com coloração H&E. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e a partir das fotomicrografias obtidas verificamos uma desorganização do tecido (Figura 16: seta) nas maiores doses de radiação (75 Gy e 100 Gy). Sugere-se que as alterações estruturais observadas podem ser decorrentes da irradiação, uma vez que o tecido dos grupos tratados apresentou lacunas (cabeça de seta) entre as células germinativas (cg) sem

delimitação de membrana (Figura 16 G, H, I e J), quando comparados ao grupo controle (Figura 15 A e B).

Figura 15 – Corte longitudinal do testículo de *D. speciosa* após tratamento com radiação gama nas doses - A (200x) e B (400x): Grupo Controle; C (200x) e D (400x): Tratamento 25 Gy; E (200x) e F (400x): Tratamento 50 Gy. spz: espermatozóide; cf: células foliculares; cg: células germinativas; *cisto; cabeça de seta: “lacuna”. Coloração H&E.

Figura 16 – Corte longitudinal do testículo de *D. speciosa* após tratamento com radiação gama nas doses - G (200x) e H (400x): Tratamento 75 Gy; I (200x) e J (400x): Tratamento 100 Gy. spz: espermatozóide; cabeça de seta: “lacuna”; seta: desorganização das células germinativas. Coloração H&E.

Paoli et al. (2014) ao comparar os espermatozoides não irradiados e irradiados de *R. ferrugineus* (80 Gy), não observaram diferenças ultraestruturais exceto algumas anormalidades em cistos com espermátides em maturação que mostraram um número aumentado de axonemas flagelares e mitocôndrias. Kumano et al. (2009) com dose esterilizante de 150 Gy para machos de *Euscepes postfasciatus* Fairmaire (Curculionidae) detectaram que os espermatozoides irradiado contidos nas espermatecas de fêmeas acasaladas se comportam de forma idêntica ao esperma não irradiado durante pelo menos 14 dias. Dessa forma, podemos supor que as diferenças esperadas envolvem o material genético e não as características morfológicas do aparelho reprodutor em coleópteros adultos.

Earle e Nilakhe (1977) estudando as mudanças nas células germinativas irradiadas em doses fracionadas e agudas em outro curculionídeo, o *Anthonomus*

grandis Boheman, conhecido como “bicudo-do-algodoeiro”, constataram que a espermátide é o estágio celular mais sensível à indução de mutações letais dominantes, cerca de 10 vezes mais comparado ao esperma maduro. Além disso, a produção de esperma entre os dias 5 e 8 após o tratamento com 25 Gy foi reduzida em cerca de 70%. O decréscimo do número de espermatozoides assim como a redução no tamanho dos testículos também foi observado em machos de *C. capitata* provenientes de pupas irradiadas 24h antes da emergência por Rocha (2011), mesmo em doses baixas de 30 Gy a radiação gama afetou negativamente as gônadas.

Segundo Oyediran (2002) os descendentes de fêmeas de *D. undecimpunctata howardi* Barber e *D. undecimpunctata undecimpunctata* Mannerheim duplamente acasaladas são gerados pelos últimos parceiros de acasalamento, isso demonstra a importância de não haver grandes mudanças na qualidade e quantidade de espermatozoides, pós irradiação, para sua competição caso haja recópula.

Em *D. virgifera* LeConte para inseminação máxima na fêmea a cópula deve ter uma duração de 3 a 4 horas, sendo que entre 0,5 e 4 h após o início da cópula, o macho deposita um espermatóforo completo (um saco gelatinoso em forma de pêra) dentro da bursa copulatrix da fêmea. Os espermatozoides são depositados no espermatóforo entre 1,5 e 4 h após o início da cópula e estes migram para a espermateca durante os 3 dias seguintes. Os espermatóforos dentro das fêmeas acasaladas começam a degenerar 5 dias após o acasalamento e desaparecem por 7 dias, os espermatozoides por sua vez permanecem viáveis dentro da espermateca por até 40 dias após o acasalamento (LEW e BALL, 1980).

Tallamy et al. (2002) estudando o comportamento do acasalamento em *Diabrotica undecimpunctata howardi* verificaram que quando os machos transferem um volume espermático suficiente para as fêmeas não ocorre recópula, caso contrário cerca de 55% das fêmeas copulam com mais de um macho para manter as espermatecas cheias com sêmen. Tal fato se deve a qualidade de cortejo durante a cópula: a velocidade com que os machos acariciam com suas antenas induz a fêmea a relaxar os grandes músculos que mantêm o ducto vaginal dobrado, o que exige um grande gasto energético, assim este movimento inicialmente deve ser intenso para que em seguida o mesmo consiga introduzir por completo o edeago e obter sucesso em sua descendência.

Esses fatores reforçam a premissa da TME, no qual a radiação ionizante não deve comprometer o comportamento e competitividade sexual do inseto. Dessa forma, a caracterização estrutural e ultraestrutural dos espermatozoides torna-se relevante para programas voltados ao controle físico, químico e manipulação genética de insetos pragas através de machos estéreis e semi-estéreis.

No presente estudo técnicas complementares de microscopia fazem-se necessárias para uma análise mais detalhada da morfologia celular do testículo após tratamento com radiação. Ensaio posteriores com o uso de Microscopia Eletrônica de Transmissão podem esclarecer se o tratamento com Cobalto 60 causa alterações na organização das organelas e morfologia do núcleo das células afetadas, além disso, marcações do citoesqueleto podem trazer informações quanto à integridade e mobilidade do espermatozoide.

6 CONCLUSÕES

- A esterilidade de machos de *D. speciosa* foi obtida a partir de 75 Gy;
- A longevidade dos machos irradiados em média foi de 12,5 dias na dose de 75 Gy;
- O consumo da área foliar dos casais constituídos por um macho estéril foi de 42,9%, diferentemente de um casal normal que apresenta 66,2% de consumo em apenas 24 horas;
- A análise histológica das gônadas masculinas demonstrou desorganização no tecido testicular e diversas lacunas entre as células germinativas foram observadas nas maiores doses de 75 Gy e 100 Gy.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa se propôs verificar qual a dose de radiação gama necessária para esterilizar machos de *D. speciosa*, avaliando o impacto dessa técnica sobre o ciclo de vida do inseto. Durante o experimento observou-se que o indivíduo estéril sobrevive o suficiente para efetuar a cópula, requisitos estes essenciais preconizados pela literatura, mesmo diante de uma desorganização no tecido gonadal, além disso, os mesmos apresentam um apetite inferior comparado aos selvagens.

Levando-se em consideração esses aspectos a utilização da Técnica do Macho Estéril para controle *D. speciosa* em laboratório se mostrou promissora, contudo novos estudos são necessários para se estabelecer uma estratégia de implantação do programa em campo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AYEDH, H. Y.; RASOOL, K. G. Determination of the optimum sterilizing radiation dose for control of the red date palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv.(Coleoptera: Curculionidae). **Crop Protection**, v. 29, n. 12, p. 1377 – 1380, 2010.

ARRUDA-GATTI, I. C.; VENTURA, M. U. Iscas contendo cucurbitacinas para o manejo de *Diabrotica* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 2, p. 331 – 336, 2003.

ARTHUR, V.; ARTHUR, P. B. Controle de "*Sitophilus linearis*" (Herbst) (Coleóptera: Curculionidae) em "*Tamarindus indica*" através da radiação gama do Cobalto-60. **Boletín de Sanidade Vegetal Plagas**, v. 32, n. 1, p. 121 – 124, 2006.

ARTHUR, V.; CAMPANHOLA, C.; DOMARCO, R. E.; WIENDL, F. M.; SGRILLO, R. B. Determinação da dose esterilizante de radiação gama do Cobalto-60 para imagos de *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831)(Col., Bruchidae). **Energia Nuclear na Agricultura**, v. 2, n. 1, p. 1 – 7, 1980.

ARTHUR, V.; PRECETTI, O.; ARRIGONI, E. Determinação da dose esterilizante de radiação gama para adultos de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col: Curculionidae) praga da cana-de-açúcar. **Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 19, p. 23 – 29, 1994.

ASSIS, F. A., MORAES, J. C., NASCIMENTO, A. M., FRANÇOSO, J. Effects of diatomaceous earth on *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824)(Coleoptera: Chrysomelidae) in potato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 482 – 486, 2011.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P.. Desenvolvimento de *Diabrotica speciosa* (Germar)(Coleoptera: Chrysomelidae) em diferentes Hospedeiros. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 739 – 743, 2002.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Influência da idade do feijoeiro sobre o consumo foliar e fecundidade de *Diabrotica speciosa*. **Revista de Agricultura**, v. 76, p. 299 – 306, 2001.

ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Leaf consumption by *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) adults on different host plants. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 789 – 792, 2003.

ÁVILA, C. J.; SANTANA, A. G. *Diabrotica speciosa*: an Important Soil Pest in South America. In: PENA, J. E. (Ed). **Potential Invasive Pests of Agricultural Crops**. CAB International, 2013. p. 75 – 84.

ÁVILA, C. J.; TABAI, A. C.; PARRA, J. R. P. Comparação de Técnicas para Criação de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em Dietas Natural e Artificial. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 257 – 267, 2000.

BACCETTI, B.; DACCORDI, M. Sperm structure and phylogeny of the Chrysomelidae. In: JOLIVET, P.; PETITPIERRE, E.; HSIAO, T. H. (Ed.). **Biology of Chrysomelidae**. The Netherlands: Springer, 1988. p. 357 – 377.

BAKRI, A.; HEATHER, N.; HENDRICH, J.; FERRIS, I. Fifty years of radiation biology in entomology: lessons learned from IDIDAS. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 98, n. 1, p. 1 – 12, 2005 (a).

BAKRI, A.; MEHTA, K.; LANCE, D. R. Sterilizing insects with ionizing radiation. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. The Netherlands: Springer, 2005 (b). p. 233 – 268.

BALL, H. J.; WEEKMAN, G. T. Insecticide resistance in the adult western corn rootworm in Nebraska. **Journal of Economic Entomology**, v. 55, n. 4, p. 439 – 441, 1962.

BITENCOURT, D. R. **Biologia, Capacidade Reprodutiva e Consumo Foliar de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1892) (Coleoptera: Chrysomelidae) em Diferentes Hospedeiros**. 2007. 48f. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados – MS, 2007.

BRANSON, T. F.; GUSS, P. L.; JACKSON, J. J. Sterilizing male western corn rootworms with gamma radiation (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, p. 270 – 273, 1978.

BRANSON, T. F.; KRYSAN, J. L. Feeding and oviposition behavior and life cycle strategies of *Diabrotica*: an evolutionary view with amplications for rest management. **Environmental Entomology**, v. 10, p. 826 – 831, 1981.

BUUK, C.; GLOYNA, K.; THIEME, T.; HEIMBACH, U. Laboratory test of the potential for using insecticide-cucurbitacin mixtures for controlling the quarantine pest *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). **Julius-Kühn-Archiv**, n. 444, p. 93 – 101, 2014.

CARVALHO, S. M.; HOHMANN, C. L., CARVALHO, A. O. R. **Pragas do feijoeiro no Estado do Paraná - Manual para Identificação no Campo**. Londrina, IAPAR, 1982, 41p.

CHAPMAN, Reginald Frederick. **The insects: structure and function** (4th ed.), Cambridge University Press, 1998, 788 p.

CHARNLEY, A. K. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In.: WICKLOW, D. T.; SODERSTROM, B. E. (Ed.). **The Mycota IV: Environmental and microbial relationships**. Berlin Heidelberg: Springer – Verlag, 1997. p. 185 – 201.

CHIO, H.; CHANG, C. S.; METCALF, R. L.; SHAW, J. Susceptibility of four species of *Diabrotica* to insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 71, n. 3, 389 – 393, 1978.

CIVIDANES, F. J.; SILVESTRE, L. H.; THOMAZINI, M. J. Levantamento populacional de insetos na cultura de trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 8, p. 14 – 16, 1987.

COSTA, C. L.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; SANTOS, A. A.; MESQUITA, R. C. M.; FREIRE, F. R. F. *Ceratoma arcuata* (Oliv.) um crisomelídeo vetor do mosaico da *Vigna* no Brasil. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 3, n. 2, p. 81 – 82, 1978.

COSTA, E. N.; SOUZA, B. H. S.; FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; RIBEIRO, Z. A.; BELLO, M. M.; JUNIOR, A. L. B. **Efeitos de pó de nim aplicado via solo no controle de larvas de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) e sobre o desenvolvimento de plantas de milho.** In. XXIX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, Águas de Lindóia, 2012. p. 873 – 878.

COSTA, N.; ARTHUR, V.; WIENDL, F. M.; WALDER, J. M. M. Efeitos da Radiação Gama em adultos de *Rhyzoperta dominica* (Fabr., 1792) (Coleoptera: Bostrichidae), Praga do Trigo Armazenado. **Energia Nuclear Agrícola**, Piracicaba, v. 7(1/2), p. 53 – 63, 1986.

CUTHBERT, F. P.; REID, W. J. Laboratory tests of compounds for toxicity to larvae of the banded cucumber beetle. **ARS (Series) (United States. Agricultural Research Service)**, p. 33 – 72, 1962.

CUTHBERT, F. P.; CREIGHTON, C. S.; CUTHBERT, R. B. Mass Rearing Banded Cucumber Beetles, with Notes on Rearing Spotted and Striped Cucumber Beetles. **Journal of Economic Entomology**, v. 61, n. 1, p. 288 – 292, 1968.

DIAS, N. P.; GARCIA, F. R. M. Fundamentos da Técnica do Inseto Estéril (TIE) para o Controle de Mocas-das-Frutas (Diptera, Tephritidae). Divulgação Técnica. **Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 58 – 62, 2014.

EARLE, N. W.; NILAKHE, S. S. Radiosensitivity of different stages of spermatogenesis in the boll weevil. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 70, n. 2, p. 229 – 233, 1977.

EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. Bulletin 35, p. 374 – 376, 2005. Disponível em - <http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Diabrotica_speciosa/DS_Diabrotica_speciosa.pdf> - Acesso em 20 de Maio de 2014.

FELDMANN, U.; HENDRICH, J. Integrating the sterile insect technique as a key component of area-wide tsetse and trypanosomiasis intervention. **Food and Agriculture Organization**, v. 3, 2001. 66p.

FERNANDES, A. P.; BÃO, S. N. Ultrastructural study of the spermiogenesis and localization of tubulin in spermatid and spermatozoon of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Cytobios**, v. 86, n. 347, p. 231 – 241, 1996.

FERREIRA, T; RASBAND, W. **ImageJ user guide. Revised Edition**, New York, v. 1.43, 185 p., 2012.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3ª edição - London: Cambridge University Press, 315p., 1971.

FOGACA, M. S.; CALAFIORI, M. H. Danos de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) em milho (*Zea mays* L.). **Ecossistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 17, p. 69 – 72, 1992.

FONTES, L. S. **Efeitos da radiação gama do cobalto – 60 nas Fases do Ciclo Evolutivo de *Tribolium castaneum* (Herbst. 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)**. 1994, 64f. Tese (Doutorado em Ciências: Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo – SP, 1994.

FONTES, L. S.; ARTHUR, V.; ARTHUR, P. B. Influência da taxa de dose de radiação gama do cobalto-60 para desinfestação de feijão caupi (*Vigna unguiculata*, L.) infestado com formas imaturas de *Callosobruchus maculatus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, suplemento 3, p. 21 – 23, 2003.

GALLO, D. Radioisótopos no controle de pragas. **O Solo**, v.7, p. 30 – 31, 1960.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, v. 10, 2002. 920 p.

GARCIA, F. R. M. **Zoologia agrícola: manejo ecológico de pragas**, 2. ed. Porto Alegre: Rígel, 2002. 248 p.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **The insects: an outline of entomology** (5th ed.), Wiley-Blackwell, 2014. 624 p.

HAJI, N. F. P. **Biologia, dano e controle do adulto de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) na cultura da batatinha (*Solanum tuberosum* L.)**. 1981. 53 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1981.

HAMILTON, E. W. Aldrin resistance in corn rootworm beetles. **Journal of Economic Entomology**, v. 58, n. 2, p. 296 – 300, 1965.

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide Resistance in Insect Vectors of Human Disease. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 45, n. 1, p. 371 – 391, 2000.

HUNTER, W. D. Results of experiments to determine the effects of Roentgen rays upon insects. **Journal of Economic Entomology**, v. 5, p. 188 – 193, 1912.

IAEA. **Economic evaluation of three alternative methods for control of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Israel, Jordan, Lebanon, Syrian Arab Republic and Territories under the jurisdiction of the Palestinian Authority.** Vienna, 2001. (IAEA-TECDOC, 1265). Disponível em: <http://wwwpub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/te_1265_prn.pdf> Acesso em 02 de Maio de 2017.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Agrícola Municipal (PAM — 2012).** Rio de Janeiro, v. 39, p. 1 – 101. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default.shtm>>. Acesso em 26 de Setembro de 2014.

JACKSON, J. J. Rearing and handling of *Diabrotica virgifera* and *Diabrotica undecimpunctata howardi*. In: KRYSAN, J. L.; MILLER, T. A. (Ed.), **Methods for study of pest *Diabrotica***. New York, Springer Verlag, 1986. p. 25 – 47.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Editora Santos, 1983. p. 48 – 81.

KHALER, A. L.; OLNES, A. E.; SUTTER, G. R.; DYBING, C. D.; DEVINE, O. J. Root damage by corn rootworm and nutrient content in maize. **Agronomy Journal**, v. 77, n. 5, p. 769 – 774, 1985.

KLASSEN, W. Area-Wide Integrated Pest Management and the Sterile Insect Technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management.** The Netherlands: Springer, 2005. p. 39 – 68.

KLASSEN, W.; CURTIS, C. F.; History of the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management.** The Netherlands: Springer, 2005. p. 3 – 36.

KNIPLING, E. F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 48, p. 459 – 462, 1955.

KRYSAN, L. J. Introduction: biology, distribution and identification of pest *Diabrotica*. In: KRYSAN, J. L.; MILLER, T. A. (Ed.). **Methods for the study of pest *Diabrotica***. New York, Springer - Verlag, 1986. p. 1 – 23.

KUMANO, N.; HARAGUCHI, D.; KOHAMA, T. Sperm storage and viability within females of *Euscepes postfasciatus*: effect of irradiation on sperm abundance and viability within female. **Journal of insect physiology**, v. 55, n. 9, p. 813 – 817, 2009.

LAUMANN, R. A.; RIBEIRO, P. H.; RAMOS, N.; PIRES, C. S. S.; SCHMIDT, F. G. V., BORGES, M.; MORAIS, M. C. B.; SUJII, E. R. Ritmos diários de atividades comportamentais de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) relacionados à temperatura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico 90**, 2003. 6 p.

LEORA SOFTWARE. Polo. In: ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H. K.; RUSSEL, R. M. (Ed.). **A user's guide to probit or logit analysis**. Berkeley: LeOra Software. p. 7-11., 2003.

LEVINE, E.; OLOUMI-SADEGHI, H. Management of diabroticite rootworms in corn. **Annual Review of Entomology**, v. 36, n. 1, p. 229 – 255, 1991.

LEW, A. C.; BALL, H. J. Effect of copulation time on spermatozoan transfer of *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 73, n. 4, p. 360 – 361, 1980.

MAGALHÃES, B. P.; CARVALHO, S. M. Insetos associados à cultura. In: ZIMMERMAN, M. J.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.) **Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa do Potássio e do Fósforo, 1988. p. 573 – 589.

MARAUS, P. F.; SANTOS, H. S.; FILHO, J. U. T. B.; BUZANINI, A. C.; BARBIERI, B. R. Eficiência de inseticidas no controle de *Diabrotica speciosa* na cultura da batata. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 744 – 749, 2011.

MARQUES, G. B. C.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P. Danos causados por larvas e adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 34, n. 11, p. 1983 – 1986, 1999.

MASTRANGELO, Thiago de Araujo. **Esterilização de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) com raios-X para Programas de Técnica do Inseto Estéril**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2009.

MASTRANGELO, T. A. **Metodologia de produção de moscas estéreis de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Díptera: Calliphoridae) no Brasil**. 2011. 116 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2011.

MASTRANGELO, T.; WALDER, J.; Use of Radiation and Isotopes in Insects, Radioisotopes. **Applications in Bio-Medical Science**, INTECH, v. 2, p. 67 – 92, 2011. Disponível em: <<http://cdn.intechopen.com/pdfs/23690.pdf>> Acesso em 10 de maio de 2017.

MATTSON, W. J. Herbivory in relation to plant nitrogen content. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.11, p.119 – 161, 1980.

MAYER, M. S.; BRAZZEL, J. R. Laboratory studies to sterilize the boll weevil with radiation. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 59, n. 2, p. 284 – 290, 1966.

MEINKE, L. J.; SIEGFRIED, B. D.; WRIGHT, R. J.; CHANDLER, L. D. Adult susceptibility of Nebraska western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) populations to selected insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, n. 3, p. 594 – 600, 1998.

MENDOZA, C. E. **Morphology of southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) reproductive systems and their histochemistry in relation to apholate**. 1964. 107f. (Ph.D. Entomology) - Iowa State University of Science and Technology, Ames - Iowa, 1964.

METCALF, R. L. Chemical ecology of Diabroticites. In: JOLIVET, P. H.; COX, M. L.; PETITPIERRE, E. (Ed.) **Novel aspects of the biology of Chrysomelidae**. Series Entomologica 50, Kluwer, 1994. p. 153 – 169.

METCALF, R. L. Foreword, p. vii-xvi. In: KRYSAN, J. L.; MILLER, T. A. (Ed.). **Methods for the study of *Diabrotica***. New York, Springer-Verlag, 1986. 260 p.

METCALF, R. L.; FERGUNSON, J. E.; LAMPMAN, R.; ANDERSEN, J. F. Dry cucurbitacin-containing baits for controlling diabroticide beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 80, p. 870 – 875, 1987.

MICHELI, A. **Variabilidade intraespecífica, inimigos naturais e avaliação da mistura de fungos entomopatogênicos e inseticidas para o controle de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 2005. 153 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Biologia e exigências térmicas de *Diabrotica speciosa* (Germar)(Coleoptera: Chrysomelidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 1, p. 23 – 29, 2000 (a).

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Preferência de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) para oviposição em diferentes tipos e umidade de solos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 155 – 158, 2000 (b).

MILANEZ, J. M. **Técnicas de criação e bioecologia de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 1995. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

MORAES, J.; KOHLER, A. Flutuação populacional e distribuição espacial de *Diabrotica speciosa* Germar, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae) em cultivo orgânico de tabaco. **Bioikos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 87 – 94, 2012.

MOREIRA, M. F.; MANSUR, J. F.; FIGUEIRA-MANSUR, J. Resistência e Inseticidas: Estratégias, Desafios e Perspectivas no Controle de Insetos. In: SILVA NETO, M. A. C.; WINTER, C.; TERMIGNONI, C. (Ed.). **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, 2013. 23 p.

MOURA, L. A. Morfologia comparada da genitália masculina de Galerucini (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 15 – 22, 2009.

MULLER, H. J. Artificial transmutation of the gene. **Science**, New York, v. 66, p. 84 – 87, 1927.

NARDI, C. **Estímulos olfativos envolvidos no comportamento sexual e na seleção hospedeira de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae)**. 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

NAVA, D. E.; ÁVILA, C. J.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N.; MILANEZ, J. M. PINTO, A. S. Técnicas de Criação de *Diabrotica speciosa*. In: NAVA, D. E.; ÁVILA, C. J.; PINTO, A. S (Ed.). ***Diabrotica speciosa***. Occasio, 2016. p. 47 – 55.

NOVAES, Q. S.; MELETTI, L. M. M.; VIEIRA, M. L. C.; REZENDE, J. A. M. Seleção preliminar de maracujazeiro para tolerância ao Passion Fruit woodiness virus. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, 425 p., 2000.

OLIVEIRA, M. B.; RAMOS, V. M. Simulação de dano de *Diabrotica* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) para estimativa de nível de ação. **Agrarian**, v. 5, n. 16, p. 181-186, 2012.

OYEDIRAN, I. O. **Sperm precedence in two *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) subspecies demonstrated phenotypically and by Random Amplified Polymorphic DNA-polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)**. 2002. 120f. (Ph.D. Entomology) - University of Nebraska, Lincoln, 2002.

PAOLI, F.; DALLAI, R.; CRISTOFARO, M.; ARNONE, S.; FRANCARDI, V.; ROVERSI, P. F. Morphology of the male reproductive system, sperm ultrastructure and γ -irradiation of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Dryophthoridae). **Tissue and Cell**, v. 46, n. 4, p. 274 – 285, 2014.

PARANHOS, B. A. J. **Técnica do inseto estéril e controle biológico: métodos ambientalmente seguros e eficazes no combate às moscas-das-frutas**. In: I SIMPÓSIO DE MANGA DO VALE DO SÃO FRANCISCO, Juazeiro, Bahia, 2005. 11p.

PARIMI, S.; MEINKE, L. J.; FRENCH, B. W.; CHANDLER, L. D.; SIEGFRIED, B. D. Stability and persistence of aldrin and methyl-parathion resistance in western corn rootworm populations (Coleoptera: Chrysomelidae). **Crop Protection**, v. 25, n. 3, 269 – 274, 2006.

PARIMI, S.; MEINKE, L. J.; NOWATZKI, T. M., CHANDLER, L. D.; FRENCH, B. W.; SIEGFRIED, B. D. Toxicity of insecticide-bait mixtures to insecticide resistant and susceptible western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). **Crop Protection**, v. 22, n. 5, p. 781 – 786, 2003.

PELLEGRINO, A. C. **Influência da pressão atmosférica no comportamento sexual dos insetos**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestre em Ciências: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2011.

PHILLIPS, D. M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 44, n. 2, p. 243 – 277, 1970.

PRADO, L. R. **Análise cladística da seção Diabroticites Chapuis, 1875 (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae, Luperini)**. 2015. 155 f. Tese (Doutorado em Ciências: Zoologia) – Universidade de São Paulo – SP, 2015.

ROBERTO, S. R.; GENTA, W.; VENTURA, M. *Diabrotica speciosa* (Ger.) (Coleoptera: Chrysomelidae): new pest in table grape orchards. **Neotropical Entomology**, v, 30, p. 721 – 722, 2001.

ROBINSON, A. S. Genetic Basis of the Sterile Insect Technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. The Netherlands: Springer, 2005. p. 95 – 114.

ROCHA, A. C. P. **Determinação da dose de radiação gama esterilizante pela avaliação dos parâmetros biológicos de machos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), linhagem tsl-Vienna 8**. 2011. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, 2011.

RODRIGUES, Z.; FERREIRA, D.; RÊGO, A.; OLIVEIRA, M. Esterilização e efeitos letais da radiação gama em ovos de adultos de *Callosobruchus maculatus* (FABRICIUS, 1792) (Coleoptera, Bruchidae) nas condições bioecológicas do Nordeste Brasileiro. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 3, n. 2, p. 195 – 203, 1980.

ROSA, A. P. S. A.; TRECHA, C. O.; LIMA, C. V.; TEODORO, J. S.; MEDINA, L. B.; HELLWIG, L. Aperfeiçoamento da Técnica de Criação de Adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) em Dieta Natural. **Embrapa Clima Temperado. Comunicado Técnico 297**, 2012. 8 p.

ROSOLEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. Seja o doutor do seu feijoeiro. Encarte do Informações Agronômicas, n.68. **Potafos - Arquivo do Agrônomo**, n. 7, p. 01 – 18, 1994.

RUNNER, G. A. Effects of roentgen ray on the tabaco cigarette and results of experiment with new roentgen tube. **Journal of Agriculturae Research**, v.66, n.11, p. 383 – 388, 1916.

RUZICKI, M. **Interação *Diabrotica speciosa* e genótipos de *Phaseolus vulgaris*: preferência alimentar e tabela de vida**. 2015. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava – PR, 2015.

SABATINI, G. Técnicas moleculares no diagnóstico da resistência. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 29 – 32, 2003.

SALAS, F. J. S.; CHAVES, A. L. R.; GONÇALVES, M. C.; EIRAS, M.; BARADAS, M. M. Princípios de Vírus em Plantas. In: SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. (Ed.). **Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. p. 347 – 392.

SALLES, L. A.; GRUTZMACHER, A. D. Eficiência do inseticida clorpirifós no controle de larvas de *Diabrotica speciosa* (Germ.) (Coleoptera: Chrysomelidae) na cultura da batata. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 195 – 197, 1999.

SCHARF, M. E.; MEINKE, L. J.; SIEGFRIED, B. D.; WRIGHT, R. J.; CHANDLER, L. D. Carbaryl susceptibility, diagnostic concentration determination, and synergism for US populations of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 1, p. 33 – 39, 1999.

SCHARF, M. E.; PARIMI, S.; MEINKE, L. J.; CHANDLER, L. D.; SIEGFRIED, B. D. Expression and induction of three family 4 cytochrome P450 (CYP4)* genes identified from insecticide-resistant and susceptible western corn rootworms, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Insect Molecular Biology**, v. 10, n. 2, p. 139 – 146, 2001.

SEO, S. T.; VARGAS, R. I.; GILMORE, J. E.; KURASHIMA, R. S.; FUJIMOTO, M. S. Sperm transfer in normal and gamma-irradiated, laboratory-reared Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n. 5, p. 1949 – 1953, 1990.

SGRILLO, R. B.; WIENDL, F. M.; PACHECO, J. M.; WALDER, J. M. M.; DOMARCO, R. E. **A técnica do inseto estéril**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA, Piracicaba, 1974. 22p (Publicação Especial do CENA).

SHORT, D.E.; LUEDTKE, R.J. Larval migration of the western corn rootworms. **Journal of Economic Entomology**, v. 63, n. 3, p. 325 – 326, 1970.

SIEGFRIED, B. D.; MEINKE, L. J.; PARIMI, S.; SCHARF, M. E.; NOWATZKI, T. J.; ZHOU, X.; CHANDLER, L. D. Monitoring western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) susceptibility to carbaryl and cucurbitacin baits in the areawide management pilot program. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 5, p. 1726 – 1733, 2004.

SILVA, A., L. Efeito da radiação gama sobre os diferentes estágios de desenvolvimento da broca do café *Hypothenemus hampei* Ferr. 1867 (Coleoptera: Scolytidae). **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária (Brasil)**, v. 3, n. 1, p. 64 – 78, 1973.

SILVA, A. L.; VELOSO, V. R. S.; CRISPIM, C. M. P.; BRAZ, V. C.; SANTOS, L. P.; CARVALHO, M. P. Avaliação do efeito de desfolha na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, n. 2, p. 83 – 87, 2003.

SILVA, L. K. F.; ARTHUR, V. Efeito do Fracionamento de Dose de Radiação Gama sobre *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763)(Col.: Curculionidae); *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792)(Col.: Bostrichidae) e *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797)(Col.: Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 2, p. 253 – 256, 2004.

SILVA, S. F.; LARANJA, R. E. P. ; PALHARES de MELO, L. A. M. ; OLIVEIRA, M. R. V. **Distribuição geográfica de localidades do Brasil com favorabilidade climática à ocorrência de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) com base na estimação do valor esperado de gerações da praga.** In: 12º ENCUESTRO DE GEÓGRAFOS DE AMÉRICA LATINA. Montevideo, 2009. 12p. Disponível em: <<http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal12/Nuevastecnologias/Sig/38.pdf>> Acesso em 10 de maio de 2017.

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. Balanço 2015: Setor de Agroquímicos Confirma Queda de Vendas. **Agroanalysis**, v. 36, n. 4, p. 42 – 43, 2016.

SOUZA, C. R.; LIMA, T.; PASCHOAL, L. R.; PIOVEZAN, R. **Biologia da Reprodução de algumas ordens de insetos.** 2013. 162f. Trabalho de Revisão (Zoologia). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro – SP, 2013.

TALLAMY, D. W.; POWELL, B. E.; MCCLAFFERTY, J. A. Male traits under cryptic female choice in the spotted cucumber beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Behavioral Ecology**, v. 13, n. 4, p. 511 – 518, 2002.

TALLAMY, D. W.; WHITTINGTON, D. P.; DEFURIO, F.; FONTAINE, D. A.; GORSKI, P. M.; GOTHRO, P. W. Sequestered cucurbitacins and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Moniliales: Moniliaceae) on spotted cucumber beetle eggs and larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, v. 27, n. 2, p. 366 – 372, 1998.

TEODORO, J. S.; TRECHA, C. O.; MEDINA, L. B.; HELLWIG, L.; LIMA, C. V.; ROSA, A. P. S. A. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Diabrotica speciosa* (Col.: Chrysomelidae) em dieta natural. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 238 – 243, 2014.

TORRES, T. T. **Variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites**. 2006. 138 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2006.

VARGAS, E. R.; GARCIA, F. R. M.; ZANELLA, V. J. Avaliação de inseticidas no controle de adultos de *Diabrotica speciosa* (Coleoptera, Chrysomelidae) em lavoura de feijoeiro. **Revista Biociências**, v. 10, n. 3, 2008.

VENTURA, M. U.; MELLO, E. P.; OLIVEIRA, A. R.; SIMONELLI, F.; MARQUES, F. A.; ZARBIN, P. H. Males are attracted by female traps: a new perspective for management of *Diabrotica speciosa* (Germar)(Coleoptera: Chrysomelidae) using sexual pheromone. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 3, p. 361 – 364, 2001.

VIANA, P. A.; MAROCHI, A. Controle Químico da Larva de *Diabrotica* spp. na Cultura do Milho em Sistema de Plantio Direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 2, p. 1 – 11, 2002.

VIANA, P. A. Manejo de *Diabrotica speciosa* na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica 141**, 2010. 6p.

VIRKKI, N. Sperm bundles and phylogenesis. **Cell and Tissue Research**, v. 101, n. 1, p. 13 – 27, 1969.

WALSH, G. C. Host range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms, with notes on other species of Diabroticina. **Environmental entomology**, v. 32, n. 2, p. 276 – 285, 2003.

WALSH, G. C.; CABRERA, N. Biogeografia de Espécies de *Diabrotica latu sensu* Neotropicais. In: NAVA, D. E.; ÁVILA, C. J.; PINTO, A. S. (Ed.) ***Diabrotica speciosa***. Occasio, 2016. p. 17 – 32.

WEISSLING, T. J.; MEINKE, L. J. Semiochemical - Insecticide bait placement and vertical distribution of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) adults: implications for management. **Environmental Entomology**, Lanham, v.20, n.3, p. 945 – 952, 1991.

WHEELER, D. The role of nourishment in oogenesis. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.41, p. 407 – 431, 1996.

WIENDL, F. M.; ARTHUR, V. Efeitos da Radiação Gama em *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792) (Coleoptera, Anobiidae). **ESALQ – Boletim Científico, BC-025**, Piracicaba, 14p., 1975.

WIENDL, F. M.; ARTHUR, V.; WIENDL, J. A.; PELUTZEN, F. G. Longevidade e reprodução de *Cryptolestes pusillus* (Schoenherr)(Col., Cucujidae) após irradiação gama. **Scientia Agrícola**, v. 51, n. 2, p. 222 – 225, 1994.

WHITE, R. Sexual characters of species of *Diabrotica* (Chrysomelidae: Coleoptera). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 70, n. 2, p. 168 – 168, 1977.

WHITTEN, M.; MAHON, R. Misconceptions and Constraints. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. The Netherlands: Springer, 2005. p. 95 – 114.

WILCOX, J. A. Galerucinae: Luperini: Diabroticina. **Manchester, Coleopterorum Catalogus Supplementa**, Berlin, v.78. n. 2, p. 296 – 431, 1972.

WRIGHT, R. J.; SCHARF, M. E.; MEINKE, L. J.; ZHOU, X.; SIEGFRIED, B. D.; CHANDLER, L. D. Larval susceptibility of an insecticide-resistant western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) population to soil insecticides: laboratory bioassays, assays of detoxification enzymes, and field performance. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 1, p. 7 – 13, 2000.

YUVAL, B.; BLAY, S.; KASPI, R. Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 89, n. 3, p. 486 – 492, 1996.

ZHU, K. Y.; WILDE, G. E.; HIGGINS, R. A.; SLODERBECK, P. E.; BUSCHMAN, L. L.; SHUFRAN, R. A.; WHITWORTH, R.J.; STARKEY, S.R.; HE, F. Evidence of evolving carbaryl resistance in western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) in areawide-managed cornfields in north central Kansas. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, n. 4, p. 929 – 934, 2001.

ZORATO, M. F.; HOMECHIN, M.; HENNING, A. A. Efeitos da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microrganismos em sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 159 – 166, 2001.

ZUCCHI, R. A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba, FEALQ, 1993. 139p.