

Susceptibilidade de larvas de *Cerotoma arcuata* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Bacillus thuringiensis* Berliner

Susceptibility of *Cerotoma arcuata* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae to *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin, *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Bacillus thuringiensis* Berliner

Maria Lucia França Teixeira^I Avílio Antonio Franco^{II}

RESUMO

Larvas de 2^a instar de *Cerotoma arcuata* foram avaliadas em relação à susceptibilidade aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e a bactéria *Bacillus thuringiensis* com as toxinas Cry3. Os insetos adultos foram mantidos em gaiolas e alimentados com plântulas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e as larvas em "gerbox" com cotilédones de plântulas de feijão recém-germinadas. Das oito estirpes de *B. bassiana* avaliadas, CG 156 e CG 213 causaram 100% de mortalidade das larvas, as duas estirpes de *M. anisopliae* CG 210 e CG 321 foram patogênicas, eliminando 80 e 100% das larvas de *C. arcuata*, e, das cinco estirpes de *B. thuringiensis* testadas, o isolado CG 940 causou 70% de mortalidade das larvas.

Palavras-chave: vaquinha, fungos entomopatogênicos, ä-endotoxina, controle biológico.

ABSTRACT

Second instar larvae of *Cerotoma arcuata* were evaluated concerning the susceptibility to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and *Bacillus thuringiensis* strains containing Cry3 toxin. Adults of *C. arcuata* were kept in large cages and fed on bean seedlings and the larvae were reared in 'gearbox' feeding on germinated *Phaseolus* bean cotyledons. Strains CG 156 and CG 213 of *B. bassiana* killed 100% of the insect larvae and strains CG 210 and CG 321 of *M. anisopliae* killed 80 and 100% of the insect larvae. Strain CG 940 of *B. thuringiensis* killed 70% of the insect larvae.

Key words: bean leaf beetle, entomopathogenic fungi, ä-endotoxin, biological control.

INTRODUÇÃO

Cerotoma arcuata Olivier é um crisomelídeo desfolhador de leguminosas comestíveis

como soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Devido à desfolha e à redução da capacidade fotossintética provocada pelos adultos, menos importância é dada aos danos causados por sua fase larval. Entretanto, as larvas do inseto alimentam-se de sementes em germinação, nódulos, raízes e da região do coleto (QUINTELA et al., 1991), podendo causar o tombamento e a morte de plântulas e, assim como os adultos, transmitir microorganismos fitopatogênicos, como o vírus do mosaico severo do caupi (SALAS et al., 1999). Quando a cultura obtém o nitrogênio através da simbiose com o rizóbio, comum em leguminosas, os danos se tornam mais graves. Larvas de *C. arcuata*, ao destruir os nódulos onde a fixação biológica ocorre, acarretam perdas de até 25% na produção de grãos de feijoeiro no campo (TEIXEIRA, 1993) e de 45% em casa de vegetação (TEIXEIRA et al., 1996). Em soja no campo, larvas de *C. trifurcata* (Förster) provocaram a redução de até 45% na fixação de N₂ (LAYTON, 1983). Em casa-de-vegetação, parâmetros relativos à fixação biológica de nitrogênio e ao crescimento foram reduzidos pela infestação de 30 larvas de *C. arcuatus* Olivier por planta (NAVA et al., 2003).

O controle biológico de *C. arcuata* pela susceptibilidade a microorganismos ocorre naturalmente, quando os fatores ambientais são favoráveis. Nestas ocasiões, estirpes de fungos entomopatogênicos como *B. bassiana* (Bals.) Vuillemin podem ser isoladas de adultos de *C. arcuata* encontrados em plantações, como conduzido por YAGINUMA et al. (1994) em soja no Cerrado.

^ILaboratório de Fitossanidade, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rua Jardim Botânico, 1008, 22460-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: malu@jbrj.gov.br.

^{II}Laboratório de Leguminosas, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil.

Por meio de bioensaios com *B. bassiana*, LORD et al. (1987) verificaram que, apesar de o fungo ter sido letal ao adulto, o patógeno não contribuiu para a diminuição significativa da redução dos danos causados pelo inseto, assim como da oviposição e da viabilidade dos ovos. Por outro lado, devido à importância dos danos provocados pelas larvas do inseto, foi realizada tentativa de controle no solo e em sementes, utilizando-se conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* (Metsch.) Sorokin (SÁ et al., 1989; QUINTELA et al., 1990), apresentando, nesse estágio, alta susceptibilidade aos patógenos.

A família Chrysomelidae possui várias espécies de coleópteros susceptíveis à bactéria *B. thuringiensis* Berliner, destacando-se: *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (COOPER, et al., 2004) e *Diabrotica virgifera virgifera* Le conte. (MOELLENBECK et al., 2001). A associação do fungo *B. bassiana* e da bactéria *B. thuringiensis* tem sido testada contra vários insetos, geralmente sem interação significativa (KRIEG, 1971). Isoladamente, a bactéria *B. thuringiensis* foi utilizada com sucesso no controle da infestação por adultos e larvas de *C. ruficornis* Olivier na cultura de batata (*Solanum tuberosum* L.), com taxa de mortalidade de até 100% após 72 horas (AMBANG et al., 2002).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar em laboratório a susceptibilidade de larvas de 2º instar de *C. arcuata* às estirpes de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *B. thuringiensis* isoladas de *Cerotoma* sp. e/ou de outros crisomelídeos.

MATERIAL E MÉTODOS

Adultos de *C. arcuata* coletados manualmente em lavoura de feijão localizada no Campo Experimental da Embrapa-Agrobiologia foram dispostos em gaiolas confeccionadas em madeira e tela de "nylon", em ambiente sob temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 horas e umidade relativa (UR) de $70 \pm 20\%$.

Os insetos foram alimentados com plantas de feijão *P. vulgaris* cv. "Carioca 80" crescidas em copos com vermiculita estéril por quinze dias e posteriormente transferidas para tubos de ensaio com água, onde foram fixadas com algodão na altura dos caules e trocadas semanalmente, evitando a reposição diária de folhas (CARDONA et al., 1982; RAJNAUTH et al., 1987; HEINECK & CORSEUIL, 1995).

Como substrato para postura dos insetos, utilizou-se vermiculita estéril em placas de Petri revestidas por tecido preto, fino, do tipo "nylon" (ABREU NETO, 1999), para impedir a passagem dos ovos para a vermiculita, que foi mantida úmida para

evitar o ressecamento desses ovos. Os tubos foram inclinados sobre as placas, de modo que a parte aérea das plântulas recobrisse toda a região de postura.

Os ovos foram retirados diariamente com o auxílio de um pincel, individualizados e transferidos para placas de Petri contendo duas camadas de papel de filtro umedecido, que permaneceram em ambiente sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 14 horas e UR de $70 \pm 20\%$.

Avaliou-se o número de dias decorridos para a eclosão das larvas. As larvas neonatas foram transferidas com o auxílio de um pincel para caixas do tipo "gerbox", contendo papel de filtro úmido e feijão pré-germinado, sendo colocadas duas larvas por plântula, uma em cada cotilédone sem a casca.

As sementes de feijão foram previamente desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio 1% e pré-germinadas durante seis dias em papel de germinação, em câmara incubadora. Os recipientes permaneceram tampados, em temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e UR de $70 \pm 20\%$ em ausência de luz, simulando o ambiente natural das larvas no interior do solo, junto ao sistema radicular.

Para a medição do pH intestinal, importante para a ação das toxinas de *B. thuringiensis*, utilizaram-se larvas de *C. arcuata* de 10 dias de idade. As mesmas larvas foram colocadas sobre lâminas de vidro, e submetidas a choque elétrico de 10 volts, utilizando-se um potenciômetro (Powerstar). Os eletrodos foram colocados sobre as porções central e final das larvas e, após a regurgitação, o líquido foi diluído em uma gota de água deionizada, sendo o seu pH medido com o auxílio de fita indicadora da marca Merck (SILVA-WERNECK et al., 1995).

Testes de patogenicidade

As estirpes de *B. bassiana* CG 218, CG 224 e as de *M. anisopliae* CG 210 e CG 321 foram isoladas de *C. arcuata*. As estirpes de *B. bassiana* CG 61, CG 79, CG 156, CG 213, CG 225 e CG 253 de outros coleópteros da família Chrysomelidae foram todas provenientes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Os isolados estocados em tubos de ensaio em meio BDA (batata-dextrose-ágar) foram repicados, suspensos em 1ml de água estéril e inoculados separadamente em erlenmeyers de 250 ml, contendo 50g de arroz branco parboilizado e autoclavado com 30ml de água destilada por 30 minutos. Posteriormente, foram mantidos em câmara em temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 horas por quatorze dias. Após o crescimento dos fungos, para separá-los do substrato, lavou-se o arroz com uma solução de água estéril de volume conhecido, contendo

0,1% de Tween 80®, posteriormente filtrada em gaze estéril. Para calcular a concentração de conídios, uma amostra de cada suspensão foi diluída, seguindo-se a contagem direta em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de Neubauer (ALVES & MORAES, 1998). Para a viabilidade de conídios, cada amostra de suspensão foi diluída até a concentração de 10^8 conídios ml^{-1} , utilizando-se dez microlitros para incubação em placas com meio BDA, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 horas. A contagem de esporos germinados foi feita através de leitura em microscópio óptico (ALVES & MORAES, 1998), garantindo uma concentração mínima de 10^{10} conídios ml^{-1} e viabilidade acima de 92%.

Cada copo do tipo “coletor universal”, com fundo revestido de papel de filtro e autoclavado, recebeu duas plântulas de feijão recém-germinado, com uma larva de 2ª instar por planta, sobre os cotilédones. Sobre as plântulas e as larvas, aspergiu-se, por meio de uma pipeta Pasteur com pêra, 1ml da suspensão e, para a testemunha, utilizou-se água destilada. Os copos foram fechados e mantidos a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de 70% em ausência de luz, e avaliados após sete dias. Para cada tratamento com *B. bassiana*, foram realizadas cinco repetições e com *M. anisopliae* quatro repetições, sendo cada copo uma repetição.

Foram utilizadas quatro estirpes de *B. thuringiensis* CG 904, CG 940, CG 946 e CG 948 provenientes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, selecionadas entre 50 estirpes através da técnica PCR (polymerase chain reaction), para identificação de duas subclasses de genes *cry*: *cry3A* e *cry3B*, ambas tóxicas para coleópteros (MARQUEZ, 1996). A estirpe CG 948 contém a proteína Cry3A, e as demais estirpes contém a proteína Cry3, mas não estão incluídas nas subclasses A ou B.

As estirpes foram repicadas de tubos de ensaio inclinados com meio Ágar Nutritivo para erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio Caldo Nutritivo (ALVES, 1998). A seguir, os erlenmeyers foram incubados em “shaker” a 200 rpm / 30°C / 48 horas, quando foram feitas lâminas a fresco, e também lâminas coradas com Amido Black e/ou Coomassie Blue, para facilitar a visualização dos cristais. As lâminas foram observadas em microscópio óptico com e sem contraste de fase para verificar se as estirpes apresentavam grande quantidade de cristais e esporos e se havia contaminantes. Para o cálculo da concentração de esporos, uma amostra de cada suspensão foi diluída, seguindo-se a contagem direta em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de Neubauer, assegurando o mínimo de 10^{10} esporos viáveis ml^{-1} .

Cada copo do tipo “coletor universal”, com fundo revestido de papel de filtro e autoclavado,

recebeu duas plântulas de feijão recém-germinado. As plântulas foram previamente imersas nas suspensões por uma hora e a testemunha em caldo nutritivo puro e receberam uma larva de 2ª instar por planta, sobre os cotilédones. Os copos foram fechados e estocados a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de 70% e ausência de luz, e avaliados após sete dias. Para cada tratamento, utilizaram-se cinco repetições com dois indivíduos.

Os insetos mortos durante os experimentos por *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram colocados em frascos individuais, mantidos em estufa a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e examinados diariamente para avaliar a presença de micélio e a esporulação. Os insetos mortos no experimento com *B. thuringiensis* foram lavados em água estéril antes da retirada de uma porção da hemolinfa, que foi diluída em 1 ml de água estéril para verificação de esporos e cristais em microscópio (ALVES, 1998).

Os dados de porcentagem de mortalidade foram transformados para $\sqrt{x + 1}$ antes da análise estatística. A análise estatística constou de análise de variância seguida de comparação de médias pelo Teste de Tukey ($p = 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema de criação de *C. arcuata* foi eficiente para produzir larvas de 2ª instar em quantidade suficiente para serem utilizadas nos bioensaios. O período de incubação de ovos foi de cinco a nove dias, em que maior porcentagem de eclosão de larvas tendeu a ser no sétimo dia, com uma média de 64,5%, na mesma faixa observada por HEINECK & CORSEUIL (1995) e RAJNAUTH et al. (1987).

Foram obtidos nos bioensaios altos níveis de mortalidade pela inoculação com estirpes dos fungos, confirmada pelo crescimento de micélio e esporulação após a morte dos insetos (Figuras 1 e 2). Dentre os oito isolados de *B. bassiana* avaliados, as estirpes CG 156, CG 213 foram eficientes no controle de larvas de *C. arcuata*, eliminando 100% das larvas. As estirpes CG 79, CG 61, CG 224, CG 218, CG 225 e CG 253, apesar de eliminarem de 50 até 87,5% das larvas, não diferiram significativamente da testemunha (Figura 1). As duas estirpes de *M. anisopliae* CG 210 e CG 321 eliminaram 80 e 100% das larvas de *C. arcuata*, respectivamente, sendo a fase larval do inseto susceptível a ambas (Figura 2). A aplicação no solo e em sementes do conjunto de estirpes de *B. bassiana* e *M. anisopliae* avaliado neste experimento reduziu os danos provocados pelas larvas de *C. arcuata* e beneficiou o rendimento de grãos de feijoeiro no campo (TEIXEIRA, 1998). Resultados semelhantes foram

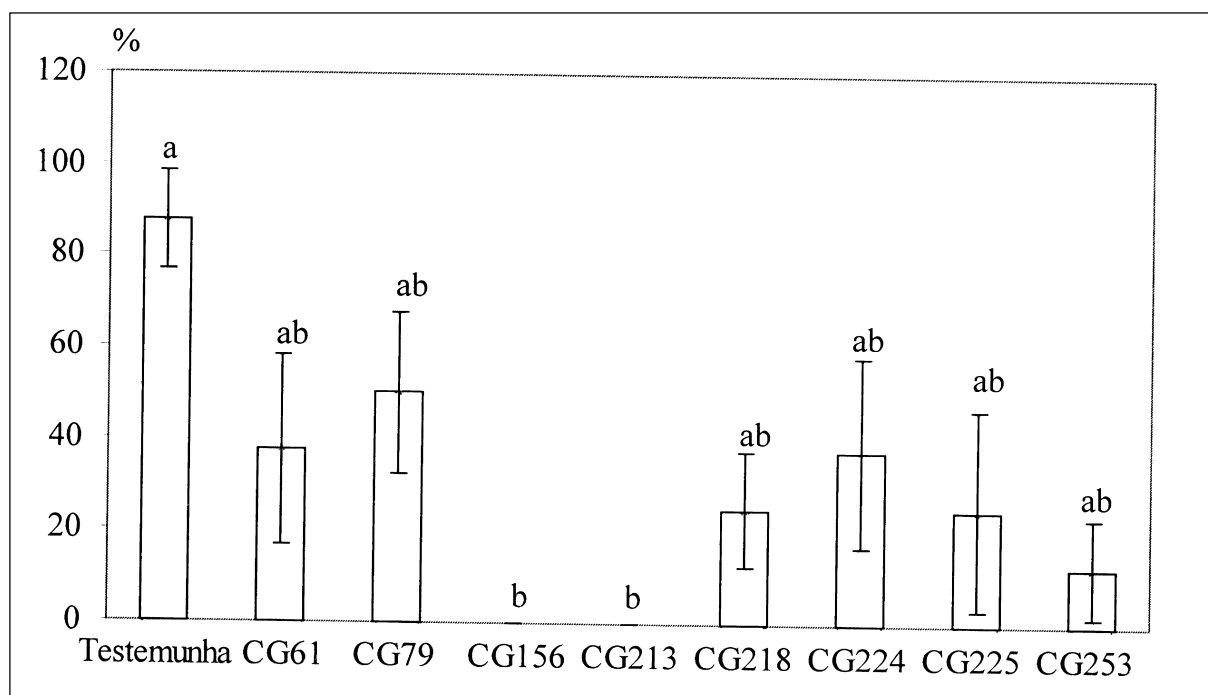


Figura 1 - Efeito de *B. bassiana* na sobrevivência de larvas de *C. arcuata*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P = 0,05$).

obtidos em casa-de-vegetação através da pulverização de quatro isolados de *B. bassiana* e quatro isolados de *M. anisopliae* no solo em doses equivalentes a 500 e 1.000 g de conídios / ha ou de sua aplicação nas sementes em doses equivalentes a 250 e 500 g de conídios / 60 kg de sementes, tendo sido os isolados eficientes no controle de larvas de 1ª instar de *C. arcuata* (QUINTELA et al. 1990). A patogenicidade das estirpes CP 1 e CP 7 de *B. bassiana* e E 6 e Phil 7 de *M. anisopliae* para larvas de *C. arcuata* também foi confirmada pela aplicação dos isolados na superfície do solo, junto ao colo de plantas de caupi (SÁ et al., 1989). A estirpe de *B. bassiana* FHD 13 destacou-se em bioensaio entre dezesseis isolados de fungos, causando a mortalidade

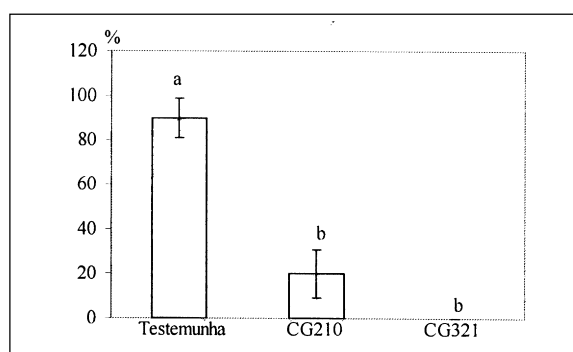


Figura 2 - Efeito de *M. anisopliae* na sobrevivência de larvas de *C. arcuata*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P = 0,05$).

de até 70% das larvas de 3ª instar de *D. speciosa* Germar (CONSOLO et al. 2003). A aplicação de *B. bassiana* e *M. anisopliae* no solo reduziu a emergência de adultos e os danos causados por larvas de *D. undecimpunctata* Howardi às raízes de milho (*Zea mays* L.), sendo que a concentração estável de $2,7 \times 10^5$ UFC (unidades formadoras de colônia) de *M. anisopliae* / cm³ de solo preveniu os danos provocados pelas larvas aos coletores e raízes e evitou a emergência de adultos, comparando-se à testemunha sem inseto (KRUEGER & ROBERTS, 1997).

A utilização de estirpes de fungos isoladas de *Ceratomyia* sp. ou de outros crisomelídeos pode ter favorecido a susceptibilidade das larvas aos isolados testados. GARCIA et al. (1999) avaliaram a toxicidade de dez estirpes de *B. bassiana* para larvas de *Epilachna varivestis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) e constataram que as estirpes provenientes de coleópteros foram mais tóxicas do que as isoladas de insetos de outras ordens.

As estirpes de *B. thuringiensis* CG 904, CG 946 e CG 948 reduziram em até 30% o número de larvas de *C. arcuata*, sem diferir da testemunha (Figura 3). A variação natural verificada por SIEGFRIED et al. (2005) na susceptibilidade de larvas provenientes de gerações e populações distintas de *D. virgifera virgifera* LeConte à toxina de *B. thuringiensis*, provavelmente, foi limitada pela utilização de larvas de *C. arcuata* provenientes de mesma população e geração.

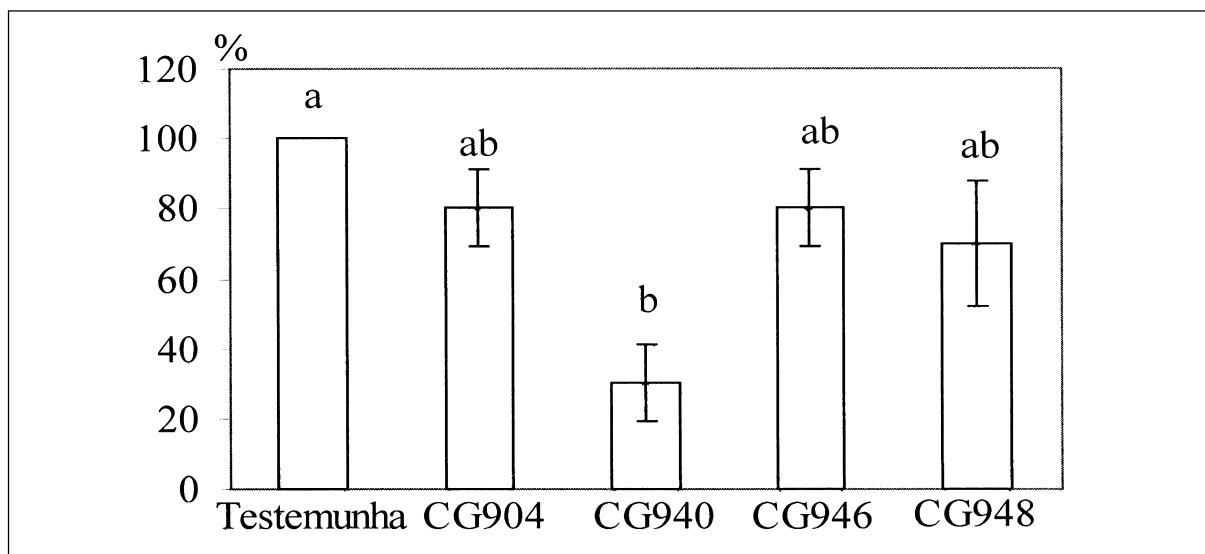


Figura 3 - Efeito de *B. thuringiensis* na sobrevivência de larvas de *C. arcuata*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P = 0,05$).

A estirpe de *B. thuringiensis* CG 940 foi patogênica para 70% das larvas de *C. arcuata* (Figura 3), cujo pH intestinal está na faixa de seis a sete, sendo considerada eficiente para o seu controle. Apesar de o pH intestinal alcalino ter sido considerado por alguns autores como determinante para a susceptibilidade das larvas de insetos ao *B. thuringiensis* (WILSON & BENOIT, 1993), estudos posteriores da interação entre a delta-endotoxina Cry 1C e as vesículas fosfolipídicas revelaram que a capacidade da toxina de aumentar a permeabilidade da membrana foi incrementada quando o pH do meio era menor do que cinco (BUTKO et al., 1994). Cristais de *B. thuringiensis* var. san diego dissolveram em pH maior que 10 e menor que 4, sendo que a solubilização em pH ácido foi mais lenta, porém com a mesma eficiência. Além disso, a toxicidade das soluções ácida e alcalina para a larva de 3º instar de *Cryomela scripta* Fabricius foi igual (KOLLER et al., 1992), indicando que um valor de pH não-alcalino do intestino do inseto não impede que o inseto seja susceptível ao *B. thuringiensis*.

D. speciosa apresenta pH intestinal considerado baixo para a expressão da delta-endotoxina, estando este na faixa entre cinco e seis (SILVA-WERNECK et al. 1995). Entretanto, a susceptibilidade de *Diabrotica* spp. às toxinas de *B. thuringiensis* é amplamente estudada. Experimentos avaliam a expressão de novas delta-endotoxinas em milho transgênico (MOELLENBECK et al., 2001; AL-DEEB & WILDE, 2005), variações mais letais das toxinas (VAUGHN et al., 2005), mecanismos responsáveis pela seletividade da toxina para *D. undecimpunctata*

(GALITSKY et al., 2001), assim como os efeitos em insetos não-alvos (AL-DEEB & WILDE, 2003). Esses exemplos indicam que a faixa neutra de pH do intestino das larvas de *C. arcuata* não impede que o inseto seja controlado com o patógeno *B. thuringiensis*, como verificado neste experimento pela mortalidade causada pela estirpe CG 940. A eficácia de *B. thuringiensis* no controle de *C. ruficornis* em batata no campo foi confirmada pela paralização de larvas e adultos ocorrida uma hora após a aplicação de uma suspensão de 1,4 g de esporos / L, resultando em ganhos de 32% no rendimento da cultura (AMBANG et al., 2002)

CONCLUSÕES

Os isolados CG 156 e CG 213 de *B. bassiana* e CG 321 de *M. anisopliae* causaram maior mortalidade de larvas de *C. arcuata*, sendo mais eficientes no controle deste inseto do que todos os isolados de *B. thuringiensis* testados.

A susceptibilidade de larvas de *C. arcuata* a isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *B. thuringiensis* selecionados em bioensaios mostra perspectivas promissoras para seu uso no solo, em condições de campo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro durante a execução do trabalho. A Bruno Rezende Silva, pela revisão do abstract.

REFERÊNCIAS

- ABREU NETO, J.R.M.V. **Produção de ovos de *Cerotoma arcuata* (Olivier) (Coleoptera: Chrysomelidae) efeito de cor de substrato e fotoperíodo.** 1999. 52f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Curso de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa.
- AL-DEEB, M.A.; WILDE, G.E. Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin on western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) biology. **Journal of the Kansas Entomological Society**, Lawrence, v.78, n.2, p.142-152, 2005.
- AL-DEEB, M.A.; WILDE, G.E. Effect of Bt corn expressing the Cry3Bb1 toxin for corn rootworm control on aboveground nontarget arthropods. **Environmental Entomology**, Lanham, v.32, n.5, p.1164-1170, 2003.
- ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos.** 2.ed. São Paulo: Fealq, 1998. 1168p.
- ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos.** 2.ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.765-777.
- AMBANG, Z. et al. Evaluation de l'efficacité de la *Bacillus thuringiensis* contre les larves et imagos de *Andrector ruficornis* sur des plants de *Solanum tuberosum* au Cameroun. **Tropicultura**, Brussels, v.20, n.3, p.113-117, 2002.
- BUTKO, P. et al. Membrane interactions and surface hydrophobicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIC. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.340, p.89-92, 1994.
- CARDONA, C. et al. Evaluation of damage to common beans by larvae and adults of *Diabrotica balteata* and *Cerotoma facialis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.75, n.2, p.324-327, 1982.
- CONSOLO, V.F. et al. Pathogenicity, formulation and storage of insect pathogenic hyphomycetous fungi tested against *Diabrotica speciosa*. **BioControl**, Dordrecht, v.48, n.6, p.705-712, 2003.
- COOPER, S.G. et al. Combining genetic engineering and traditional breeding to provide elevated resistance in potatoes to Colorado potato beetle. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Oxford, v.112, n.1, p.37-46, 2004.
- GALITSKY, N. et al. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v.57, n.8, p.1101-1109, 2001.
- GARCIA, G.C. et al. Toxicological assessment of *Beauveria bassiana* against Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae). **Southwestern Entomologist**, Dallas, v.24, n.3, p.255-259, 1999.
- HEINECK, M.A.; CORSEUIL, E. Ciclo vital e consumo alimentar de adultos de *Cerotoma arcuata tingomariana* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae) em soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.24, n.3, p.579-586, 1995.
- KOLLER, C.N. et al. Characterization of the pH mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native delta-endotoxin crystals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.184, n.2, p.692-699, 1992.
- KRIEG, A. Interactions between pathogens. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. **Microbial control of insects and mites.** London: Academic, 1971. p.459-467.
- KRUEGER, S.R.; ROBERTS, D.W. Soil treatment with entomopathogenic fungi for corn rootworm (*Diabrotica* spp.) larval control. **Biological Control**, Orlando, v.9, n.1, p.67-74, 1997.
- LAYTON, B.M. **The effects of feeding by bean leaf beetle larvae, *Cerotoma trifurcata* (Foster), on nodulation and nitrogen fixation of soybeans.** 1983. 105f. Tese (Mestrado em Entomologia) - Curso de Pós-graduação em Entomologia, Louisiana State University.
- LORD, J.C. et al. Effects of the fungus *Beauveria bassiana* (Bal.) Vuill behavior, oviposition, and susceptibility to secondary infections of adult *Cerotoma arcuata* (Olivier, 1791) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.16, n.1, p.187-197, 1987.
- MARQUEZ, A.M. **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* contendo genes tipo Cry III tóxicas para *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae).** 1996. 117f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- MOELLENBECK, D.J. et al. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. **Nature-Biotechnology**, New York, v.19, n.7, p.668-672, 2001.
- NAVA, E.D. et al. Danos causados por diferentes densidades de larvas de *Cerotoma arcuatus* em plantas de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.10, p.1217-1222, 2003.
- QUINTELA, E.D. et al. **Principais pragas do caupi no Brasil.** Goiânia: Embrapa-Cnpaf, 1991. 38p. (Documentos, 35).
- QUINTELA, E.D. et al. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Cerotoma arcuata* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepdoptera: Pyralidae). In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 3., 1990, Vitória, ES. **Resumos...** Vitória: Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, 1990. n.39.
- RAJNAUTH, G.L. et al. Laboratory rearing of *Cerotoma arcuata* (Oliv.), a beetle vector of cowpea severe mosaic virus. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.64, n.3, p.191-192, 1987.
- SÁ, G.S. de et al. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* às larvas de *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) no solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12., 1989, Belo Horizonte, MG. **Resumos...** Belo Horizonte: Sociedade Entomológica do Brasil, 1989. v.1, 263p. p.225.

- SALAS, F.J.S et al. Tentativas de transmissão de um isolado do vírus do mosaico severo do caupi (CpSMV-SP) por artrópodos, em laboratório. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.56, p.413-420, 1999.
- SIEGFRIED, B.D. et al. Baseline susceptibility of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) to Cry3Bb1 *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.98, n.4, p.1320-1324, 2005.
- SILVA-WERNECK, J.O. et al. Técnica de criação de *Diabrotica speciosa* (Germ.) (Coleoptera: Chrysomelidae) para bioensaios com bacilos e fungos entomopatogênicos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.45-52, 1995.
- TEIXEIRA, M.L.F. **Efeito da cobertura morta e da aplicação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin e *Bacillus thuringiensis* Berliner, no controle biológico de *Cerotoma arcuata* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) em feijoeiro.** 1998. 126f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo, Biologia do Solo) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- TEIXEIRA, M.L.F. et al. Effects of *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) on the predation of nodules and on N₂-fixation of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.89, p.165-169, 1996.
- TEIXEIRA, M.L.F. **Efeito de *Cerotoma arcuata* Olivier (Coleoptera: Chrysomelidae) na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** 1993. 176f. Tese (Mestrado em Ciência do Solo - Biologia do Solo) – Curso de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- VAUGHN, T. et al. A method of controlling corn rootworm feeding using *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize. **Crop-Science**, Madison, v.45, n.3, p.931-938, 2005.
- WILSON, G.R.; BENOIT, T.G. Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.62, p.87-89, 1993.
- YAGINUMA, K. et al. **Isolation and use of entomogenous fungi in the Cerrados for the control of insect pests.** Planaltina: Embrapa-Cpac, 1994. p.215-225. (Relatório Técnico do Projeto Nipo-Brasileiro de Cooperação em Pesquisa Agrícola).