

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

THIAGO GECHEL KLOSS

*Bacillus thuringiensis* E *Trichogramma* spp. **NO MANEJO DE  
POPULAÇÕES DE *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850)**

ALEGRE - ES  
2011

THIAGO GECHEL KLOSS

*Bacillus thuringiensis* E *Trichogramma* spp. **NO MANEJO DE  
POPULAÇÕES DE *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Dirceu Pratisoli

Coorientador: Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior

ALEGRE - ES  
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

K66b Kloss, Thiago Gechel, 1987-  
*Bacillus thuringiensis* e *Trichogramma* spp. no manejo de populações de *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) / Thiago Gechel Kloss. – 2011.  
68 f. : il.

Orientador: Dirceu Pratissoli.  
Coorientador: Hugo José Gonçalves dos Santos Junior.  
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Trichogrammatidae. 2. Himenóptero. 3. Pragas agrícolas -- Controle biológico. 4. Inseto -- Controle microbiano. I. Pratissoli, Dirceu. II. Santos Junior, Hugo José Gonçalves dos. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 63

---

**THIAGO GECHEL KLOSS**

***Bacillus thuringiensis* E *Trichogramma* spp. NO MANEJO DE POPULAÇÕES  
DE *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 02 de setembro de 2011

**COMISSÃO EXAMINADORA:**



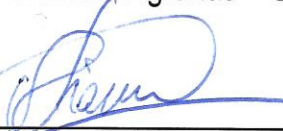
---

Prof. Dr. Dirceu Pratissoli  
Centro de Ciências Agrárias - UFES  
Orientador



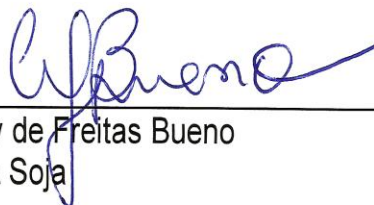
---

Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago  
Centro de Ciências Agrárias – UFES



---

Prof. Dr. Ulysses Rodrigues Vianna  
Centro de Ciências Agrárias – UFES



---

Dr. Adeney de Freitas Bueno  
EMBRAPA Soja

Dedico este trabalho à minha família que sempre me apoiou para que os meus sonhos fossem transformados em realidade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por este sonho realizado.

A minha Família, pelo apoio em tudo na minha vida, fazendo o possível e o impossível para me ajudar. Em especial, ao meu pai, que sempre me apoia e acredita nos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Dirceu Pratisoli, pela orientação e a oportunidade de cursar o mestrado em Produção Vegetal na UFES e ao meu coorientador, Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior, pela grande colaboração.

À estagiária do laboratório de entomologia do NUDEMAFI, Lorena Contarini Machado, pela enorme ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos proprietários dos locais de coleta das populações de *Helicoverpa zea*, Benjamim Hoffmann e Antônio, pela contribuição.

Aos professores Dr. Edvaldo Fialho dos Reis, Dr. Adésio Ferreira e aos amigos, Flávio Neves Celestino e Vando Miossi Rondelli, pela ajuda na análise dos dados.

Ao Prof. Fábio Ramos Alves, por possibilitar a utilização do laboratório de Microbiologia e pela atenção.

Aos funcionários e amigos do laboratório de entomologia do NUDEMAFI: Dona Carlota, Carlos Magno, Débora Melo, Lígia, Carol, Kharen, Marcel, João Paulo, Marquinho, Raul, Luziani, Priscila, José Romário, Fernando, Ingrid, Rômulo, Vitor, Hígor, Wilson, Amanda, Débora Fornazier, Eduardo Grecco e Leandro Pin. Em especial, ao Leonardo Mardgan, pela amizade durante esses dois anos de mestrado.

Aos amigos de sempre, pelo apoio e aos amigos conquistados em Alegre durante o mestrado: Elias, Amilton, Victor, João Paulo, Paulo Henrique, Paulinho, Walas, Cintia, Joyce e Cida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

"O segredo de uma vida empolgante não está em descobrir maravilhas, mas em procurá-las".

Augusto Ruschi

## **BIOGRAFIA**

Thiago Gechel Kloss, nascido em Itaguaçu, Estado do Espírito Santo, em 06 de junho de 1987, filho de Edgar Kloss e Suely Gechel Kloss. Coursou os estudos fundamentais na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio “Eurico Salles”, onde concluiu o ensino médio no ano de 2004. Aos 17 anos, ingressou no curso de Ciências Biológicas da Escola Superior São Francisco de Assis – ESFA, na cidade de Santa Teresa, ES. Durante a graduação, fez parte da equipe do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, atuando nas áreas de Educação Ambiental e Zoologia. Além disso, ingressou na pesquisa em entomologia através do programa de Iniciação Científica no ano de 2006. Aos 21 anos de idade, obteve o título de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas. Em seguida, fez parte da equipe docente da Escola Estadual de Ensino Médio “Dom Daniel Comboni”, na cidade de Nova Venécia, ES, onde atuou na área de ensino em Biologia e Ciência. Aos 22 anos de idade, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, atuando na área de controle biológico, sob a orientação do Prof. Dr. Dirceu Pratissoli. Aos 02 de setembro de 2011, defendeu sua dissertação, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, Área de Concentração em Fitossanidade (Entomologia).

## RESUMO

Entre os agentes de controle biológico destacam-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911) e o parasitoide de ovos *Trichogramma* Westwood (1833). Diversos fatores podem interferir na eficiência desses agentes e investigações são necessárias para se obter sucesso na utilização deles de forma isolada ou em conjunto. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi selecionar as populações de *Trichogramma* e os isolados ou formulados de *B. thuringiensis* mais adequados para o manejo de populações de *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) e avaliar a influência da variação populacional de *H. zea* nesses agentes. Além disso, foram avaliados os efeitos da interação entre eles nas populações hospedeiras. Na avaliação do agente *Trichogramma*, fêmeas de dez populações receberam individualmente cartelas contendo ovos de uma determinada população de *H. zea*. As características analisadas foram parasitismo (%), emergência dos indivíduos (%), razão sexual e número de adultos por ovo do hospedeiro. Na análise de *B. thuringiensis*, foram utilizados 34 isolados e os formulados comerciais Dipel® e Agree®, que foram inoculados sobre a dieta, na concentração  $3 \times 10^8$  esporos mL<sup>-1</sup>. Além disso, foi realizada a estimativa da concentração letal (CL<sub>50</sub>) para os isolados e formulados mais virulentos. Na avaliação da interação entre os agentes, cartelas com ovos das populações de *H. zea* foram pulverizados com diferentes isolados e formulados de *B. thuringiensis* e oferecidas para fêmeas de uma população de *Trichogramma*. As características avaliadas foram as mesmas descritas acima para as populações de *Trichogramma*, com exceção da longevidade das fêmeas. Os agentes de controle biológico *Trichogramma* e *B. thuringiensis* se mostraram adequados para o manejo de populações de *H. zea*. Além disso, o uso conjunto desses agentes gerou poucos efeitos negativos e em alguns casos até potencializou o parasitismo de *Trichogramma* sp., evidenciando que o uso deles em conjunto pode aumentar a eficiência de controle das populações de *H. zea*. Alterações ocasionadas pela diferença populacional nas características biológicas de *Trichogramma* e nos níveis de virulência dos isolados e formulados de *B. thuringiensis* foram registradas, porém essas variações não foram suficientes para gerar níveis indesejáveis dessas características no manejo das populações de insetos.

Palavras-chave: Controle microbiano. Parasitoides. Lagarta-da-espiga.

## ABSTRACT

Among the biological control agents, *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911) stands out the most and the egg parasitoid of *Trichogramma* Westwood (1833). Diverse factors can interfere with the effectiveness of these agents and investigations are necessary to succeed in the utilization of these agents isolated or together. In this case, the objective of this study was to select the populations of *Trichogramma* and the isolated or formulated of *B. thuringiensis* the most adequate for the management of populations of *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) and to evaluate the influence of variation in the populations of *H. zea* in these agents. Moreover, the effects of interaction between them in host populations were also evaluated. In the evaluation of the *Trichogramma* agents, ten females population, individually received a piece of cardboard containing eggs with a determined population of *H. zea*. The characteristics analyzed were parasitism (%), emergence of individuals (%), sex ratio and number of adults per host egg. In the analysis of *B. thuringiensis*, 34 isolates and the formulated commercial Agree® and Dipel® were used and also inoculated on a diet, in a concentration  $3 \times 10^8$  spores mL<sup>-1</sup>. Furthermore, lethal concentration of the isolates and more virulent formulates were estimated. In the assessment of the interaction between these agents, the cardboard with the eggs of population of *H. zea* were sprayed with different isolates and formulated *B. thuringiensis* and were offered the females of population of *Trichogramma*. The characteristics evaluated where the same previously described for the populations of *Trichogramma*, except the female longevity. The biological control agents *Trichogramma* and *B. thuringiensis* showed adequate for the management of the populations of *H. zea*. In addition, the use of the agents together generated few negative effects and in some cases even strengthened the parasites of *Trichogramma* sp., showing the use of them together which can increase the efficiency of the control of populations of *H. zea*. Alterations caused by the difference population of the biological characteristics of *Trichogramma* and in the levels of virulence of the isolates and formulated of *B. thuringiensis* were registered, but these variations weren't sufficient to generate undesirable levels of these characteristics in the management of the insect populations.

Keywords: Microbial control. Parasitoids. Corn earworm.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Parasitismo de *Trichogramma* spp. em duas populações de *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5$  °C, UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h.....37
- Tabela 2 - Emergência de indivíduos de *Trichogramma* spp. em duas populações de *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5$  °C, UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h. ....39
- Tabela 3 - Razão sexual de *Trichogramma* spp. em duas populações de *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5$  °C, UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h.....40
- Tabela 4 - Número de adultos de *Trichogramma* spp. gerados por ovo do hospedeiro *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5$  °C, UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h. ....42
- Tabela 5 - Atividade de isolados e formulados de *Bacillus thuringiensis* para lagartas de primeiro ínstar de duas diferentes populações de *Helicoverpa zea* (Alegre e Itaguaçu). ....51
- Tabela 6 - Curvas de concentração versus mortalidade e estimativa da  $CL_{50}$  de diferentes isolados e formulados de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de primeiro ínstar, pertencentes a populações de *Helicoverpa zea* ( $25 \pm 0,5$ °C, UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h). ....54
- Tabela 7 - Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre as características biológicas de percentagem de parasitismo, percentagem de emergência e número de adultos gerados por ovo de *Trichogramma* sp., utilizando uma população do hospedeiro *Helicoverpa zea* coletada no município de Alegre-ES ( $25 \pm 0,5$  °C, UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h). ....63
- Tabela 8 - Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre as características biológicas de percentagem de parasitismo, percentagem de emergência e número de adultos gerados por ovo de *Trichogramma* sp., utilizando uma população do hospedeiro *Helicoverpa zea* coletada no município de Itaguaçu-ES ( $25 \pm 0,5$ °C, UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h). ....65

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 <i>Helicoverpa zea</i> (BODDIE, 1850) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) .....	14
2.2 <i>Trichogramma</i> Westwood (1833) (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) .....	16
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner (1911) (BACILLACEAE) .....	19
2.4 INTERAÇÃO ENTRE OS AGENTES BIOLÓGICOS <i>Bacillus thuringiensis</i> E <i>Trichogramma</i> .....	22
2.5 REFERÊNCIAS .....	25
<b>3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE <i>Trichogramma</i> spp. EM POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa zea</i></b> .....	<b>30</b>
3.1 RESUMO.....	30
3.2 ABSTRACT .....	31
3.3 INTRODUÇÃO .....	31
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	33
<b>3.4.1 Criação de <i>Trichogramma</i> spp.</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.2 Coleta e Criação das populações de <i>H. zea</i></b> .....	<b>33</b>
<b>3.4.3 Características biológicas das populações de <i>Trichogramma</i> em diferentes populações hospedeiras</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.4 Análise dos dados</b> .....	<b>36</b>
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.6 CONCLUSÃO.....	42
3.7 REFERÊNCIAS.....	42
<b>4 PATOGENICIDADE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EM POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa zea</i></b> .....	<b>46</b>
4.1 RESUMO.....	46
4.2 ABSTRACT .....	47
4.3 INTRODUÇÃO .....	47
4.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	48
<b>4.4.1 Obtenção e multiplicação dos isolados de <i>B. thuringiensis</i></b> .....	<b>48</b>
<b>4.4.2 Suscetibilidade das populações de <i>H. zea</i> a <i>B. thuringiensis</i></b> .....	<b>49</b>
<b>4.4.3 Estimativa da concentração letal (CL<sub>50</sub>)</b> .....	<b>50</b>
<b>4.4.4 Análise dos dados</b> .....	<b>50</b>
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50

4.6 CONCLUSÃO.....	56
4.7 REFERÊNCIAS.....	56
<b>5 INTERAÇÃO ENTRE <i>Bacillus thuringiensis</i> E <i>Trichogramma</i> sp. EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa zea</i>.....</b>	<b>58</b>
5.1 RESUMO.....	58
5.2 ABSTRACT .....	59
5.3 INTRODUÇÃO .....	59
5.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	60
<b>5.4.1 Efeitos de <i>B. thuringiensis</i> sobre as características biológicas de <i>Trichogramma</i> sp.....</b>	<b>61</b>
<b>5.4.2 Análise dos dados .....</b>	<b>62</b>
5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.6 CONCLUSÃO.....	65
5.7 REFERÊNCIAS.....	66
<b>6 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>68</b>

# 1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção agrícola para atender à crescente demanda por alimentos, exportação de grãos e seus subprodutos tem impacto direto sobre o agroecossistema, pois está ligado ao uso intenso de insumos visando diminuir as perdas, causadas por fatores bióticos e abióticos, durante o processo produtivo (MAEDA; FORMAGGIO; SHIMABUKURO, 2008; ALHO, 2011). Os agrotóxicos, embora de grande importância no controle de pragas, são frequentemente utilizados em grandes quantidades, de forma errônea, causando uma série de problemas ao ambiente e aos agricultores (PRAÇA et al., 2004).

A partir disso, pode-se perceber a necessidade da aplicação de métodos alternativos, ecologicamente corretos, como o controle biológico. Entre os agentes de controle biológico existentes, destacam-se a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911) e o parasitoide de ovos *Trichogramma* Westwood (1833). O primeiro é o ingrediente ativo da maioria dos formulados com bactérias entomopatogênicas utilizados no mundo (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000) e o segundo é o parasitoide de ovos mais estudado e mais comercializado em todo mundo no controle, principalmente de lepidópteros-praga (PARRA; ZUCCHI, 2004; QUERINO; ZUCCHI; PINTO, 2010).

No Manejo Integrado de Pragas é importante a integração de dois ou mais métodos de controle dos insetos-pragas. No caso específico de *B. thuringiensis* e *Trichogramma*, os dois agentes de controle são empregados em conjunto, por exemplo, na cultura do tomate no México, na Colômbia e no Brasil (TRUMBLE; ALAVARADO-RODRIGUEZ, 1993; HAJI et al., 2002).

Embora os efeitos prejudiciais dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* sobre os inimigos naturais (insetos predadores, parasitoides e micro-organismos) sejam mínimos e/ou significativamente menores que os dos agrotóxicos (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000), esses não podem ser desprezados e estudos objetivando avaliar os efeitos dessa interação são necessários nas regiões onde ela é empregada em conjunto ou tem potencial de uso (PRATISSOLI et al., 2006).

Da mesma forma, o sucesso na utilização desses agentes de controle de forma isolada ou em conjunto está ligado à seleção de populações de *Trichogramma*

(PRATISSOLI; PARRA, 2001) e isolados de *B. thuringiensis* adequados para o controle de diferentes populações de insetos (POLANCZYK et al., 2008). Sabe-se que variações na suscetibilidade das populações a isolados e formulados de *B. thuringiensis* podem ocorrer devido a fatores como o isolamento geográfico das populações, que pode gerar um conseqüente isolamento reprodutivo (NDEMAH et al., 2001). Esse isolamento reprodutivo origina populações fisiologicamente diferentes e, conseqüentemente, com suscetibilidade diferencial (LÓPEZ-EDWARDS et al., 1999).

No entanto, estudo realizado por Pratissoli et al. (2007) avaliando a suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) geograficamente próximas, registrou pequenas alterações na patogenicidade provocada por *B. thuringiensis*, levantando assim dúvidas sobre a diferença na ação de agentes de controle biológico, em escalas geográficas reduzidas, onde isolamentos reprodutivos das populações podem não existir, devido, entre outros fatores, aos movimentos migratórios das espécies (WESTBROOK, 2008).

Com relação ao parasitoide de ovos *Trichogramma*, a eficiência das espécies no controle de insetos é influenciada por diferentes fatores, como temperatura, sinais químicos (voláteis) e inseticidas não seletivos (VINSON, 1997; PRATISSOLI et al., 2007; FATOUROS et al., 2008). No entanto, as influências das diferenças populacionais dos hospedeiros não foram ainda estudadas.

Utilizando os agentes de controle biológico, *B. thuringiensis* e *Trichogramma*, foram avaliados, neste estudo, as populações de *Trichogramma* e os isolados ou formulados de *B. thuringiensis* mais adequados para o manejo de populações de *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) e a existência de variação nas características biológicas das populações de *Trichogramma* e nos níveis de virulência dos isolados e formulados de *B. thuringiensis* ocasionadas pela variação populacional de *H. zea*. Foi avaliada também a influência de *B. thuringiensis* sobre as características biológicas de *Trichogramma* sp., utilizando as populações de *H. zea* como hospedeira.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

*Helicoverpa zea* é uma espécie polífaga que pode causar danos econômicos em mais de 30 culturas (BLANCO et al., 2007), estando, portanto, entre as de maior importância econômica para a agricultura mundial (MATRANGOLO; CRUZ; DELLA LUCIA, 1998; ROWLEY; POPHAM; HARRISON, 2011). No Brasil é uma espécie bastante nociva às culturas do milho, tomate e algodão. Na cultura do milho, atua prejudicando a planta de três formas: (1) atacando os estilos-estigmas, impedindo a fertilização e, em consequência, gerando falhas nas espigas; (2) alimentando-se dos grãos leitosos e; (3) deixando orifícios na espiga ao ir para o solo empupar, que facilitam a entrada de micro-organismos, que podem causar podridões (GALLO et al., 2002). As infestações de *H. zea* nessa cultura podem chegar a 90% das espigas, reduzindo em até 8% a produtividade (SANTOS JUNIOR et al., 2009).

Na cultura do tomate, os primeiros sintomas podem ser percebidos através das cicatrizes deixadas quando esses insetos raspam a epiderme do fruto. Outro sintoma mais avançado é constatado quando se percebe nos frutos grandes perfurações irregulares na polpa (FORNAZIER; PRATISSOLI; MARTINS, 2010). Nessa cultura, pode causar perdas de 80% da produção, na ausência de aplicações de agrotóxicos (FRANÇA et al., 2000; CASTELO BRANCO et al., 2003). Na cultura do algodão, ataca as maçãs, reduzindo assim a produção. No entanto, é importante salientar, que com a adoção do algodão Bt em muitas localidades ocorreu uma redução na ocorrência dessa espécie e, conseqüentemente, na aplicação de agrotóxicos na cultura (TABASHNIK et al., 2008).

O adulto de *H. zea* mede de 30 a 40 mm de envergadura, geralmente apresenta as asas anteriores cinza-esverdeadas ou amareladas. O acasalamento ocorre logo após a emergência e a postura é feita ao anoitecer. Os ovos podem ser colocados em qualquer parte da planta. A fêmea pode colocar, durante toda a sua vida, que é de 12 a 15 dias, de 400 a 3.000 ovos. O ciclo completo dura, em média, de 30 a 40 dias (MATRANGOLO; CRUZ; DELLA LUCIA, 1998; GALLO et al., 2002).

Os ovos possuem formato hemisférico, medindo cerca de 1 mm de diâmetro. Eles têm coloração branca no início e posteriormente, próximo à eclosão, tornam-se marrons (GALLO et al., 2002). Esses ovos podem ser predados principalmente por Dermápteros, como *Doru luteipes* (SCUDDER, 1876) (Dermaptera: Forficulidae), que em laboratório são capazes de predação até 39 ovos por dia (CRUZ; ALVARENGA; FIGUEIREDO, 1995; MATRANGOLO; CRUZ; DELLA LUCIA, 1998). Além desses predadores, os ovos sofrem grande parasitismo por espécies do gênero *Trichogramma* (SÁ; PARRA, 1993), existindo uma preferência por ovos com idade de até 24 horas (PRATISSOLI; OLIVEIRA, 1999).

Após 3 a 5 dias da postura, dá-se a eclosão, surgindo as lagartas, de coloração branca com cabeça marrom (GALLO et al., 2002). As lagartas passam por cinco ecdises. No final do período larval, medem cerca de 40 a 50 mm de comprimento, possuindo coloração variável como verde, marrom, branco sujo e até preto com listras, de duas a três cores, longitudinais. A fase larval tem duração de 13 a 25 dias (FORNAZIER; PRATISSOLI; MARTINS, 2010). Antes de passar à pupa, a lagarta abandona a planta e penetra no solo, de 4 a 22 cm de profundidade. No solo, a lagarta faz uma espécie de célula ou câmara, com uma galeria de saída para a superfície por onde haverá a emergência do adulto. A pupa mede cerca de 20 mm de comprimento e possui coloração marrom. O período pupal é de 14 dias, podendo variar de acordo com a temperatura (GALLO et al., 2002). Nessa fase, fatores abióticos como precipitação e composição do solo podem contribuir para a morte dos indivíduos (BLANCO et al., 2007).

No entanto, esses fatores variam de acordo com a localidade, o que resulta em alterações na densidade da espécie (BLANCO et al., 2007). Além disso, na América do Norte, estudos relatam que as migrações ocorrem em várias espécies da família Noctuidae, entre elas *H. zea*. Essas migrações podem favorecer o aumento de infestações em plantações (WESTBROOK, 2008), pois com o aumento do fluxo gênico entre as populações, ocasionado pelas migrações, os insetos podem desenvolver resistência a alguns métodos de controle, decorrente do aumento na diversidade genética das populações (LÓPEZ-EDWARDS et al., 1999; JACKSON et al., 2006; PRATISSOLI et al., 2007).

Embora existam métodos biológicos eficientes para o controle de *H. zea*, o principal método ainda é o uso de inseticidas sintéticos. Porém, com a necessidade de

produção de alimentos mais saudáveis, as medidas biológicas vêm sendo estimuladas (SANTOS JUNIOR et al., 2009). Além disso, a resistência a determinados inseticidas ocorre em algumas populações, reforçando a necessidade do uso de medidas biológicas de controle (PIETRANTONIO et al., 2007), como inseticidas biológicos e inimigos naturais.

## 2.2 *Trichogramma* Westwood (1833) (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Parasitoides são espécies chaves para a regulação de populações de insetos (QUERINO; ZUCCHI; PINTO, 2010). Diversas espécies de parasitoides são usadas para o manejo de populações de insetos causadores de prejuízos na produção agrícola. Um exemplo são os membros da família Trichogrammatidae (Hymenoptera), que foram relatadas parasitando diversas espécies de importância econômica, principalmente da ordem Lepidoptera (PRATISSOLI et al., 2004; DELPUECH; DUPONT; ALLEMAND, 2010; DAVIES et al., 2011).

Essa família é representada por 89 gêneros e mais de 800 espécies distribuídas em todo o mundo, tanto em ambientes terrestres como em aquáticos. No Novo Mundo são conhecidos 56 gêneros, sendo 80% deles encontrados na América do Norte. No entanto, a família é pouco conhecida na América Central e do Sul, com 37 e 41 gêneros, respectivamente. No Brasil é conhecida a ocorrência de 28 gêneros. A maior parte dos registros na América do Sul é relativo aos gêneros *Trichogramma* e *Trichogrammatoidea*, cujas espécies são muito utilizadas em programas de controle biológico aplicado (QUERINO; ZUCCHI; PINTO, 2010).

O gênero *Trichogramma* ocorre em todos os ambientes terrestres do planeta, sendo conhecidas 210 espécies no mundo (PINTO, 2006). No Novo Mundo são conhecidas 60 espécies na América do Norte, 22 na América Central e 41 na América do Sul. Considerando somente as espécies nativas na América do Sul, o Brasil abriga o maior número de espécies (26), seguido por Venezuela (13), Colômbia (9) e Peru (7) (ZUCCHI; QUERINO; MONTEIRO, 2010). Porém, devido à sua pequena dimensão (menos de 1 mm), as espécies do gênero *Trichogramma* podem ser potencialmente transportadas pelo vento e, intencionalmente ou não, pelo homem de um país a outro em um curto período de tempo, tornando investigações da distribuição

geográfica natural das espécies difíceis de serem realizadas (QUERINO; ZUCCHI; PINTO, 2010).

*Trichogramma* é capaz de parasitar ovos de mais de 200 espécies de insetos causadores de danos econômicos, pertencentes a diversas ordens (DELPUECH; DUPONT; ALLEMAND, 2010), demonstrando uma modificação da sua ação inicial, que, segundo análises filogenéticas, era restrita à ordem Coleoptera (OWEN et al., 2007).

O modo de reprodução mais comum desse gênero, como nos Hymenoptera em geral, é a arrenotoquia, ou seja, ovos fertilizados produzem fêmeas diploides e ovos não-fertilizados produzem machos haploides. Outro modo menos comum é a telitoquia, caracterizada pela produção de fêmeas diploides de ovos fertilizados e não fertilizados. Em *Trichogramma* existem duas formas de telitoquia: a reversível (associada a infecções por bactérias do gênero *Wolbachia*) e a não reversível (VINSON, 1997; BESERRA; QUERINO; PARRA, 2003).

Diversos fatores tais como temperatura, sinais químicos e inseticidas, podem interferir na eficiência de parasitismo de *Trichogramma*. Por exemplo, sabe-se que a temperatura na qual ocorre o maior parasitismo, está geralmente relacionada às condições térmicas do local de origem das populações (PRATISSOLI et al., 2007). Além disso, baixas temperaturas podem induzir diapausa nos indivíduos, afetando a eficiência deles em campo (REZNIK; VAGHINA; VOINOVICH, 2008).

Os sinais químicos naturais (voláteis) são utilizados pelas espécies de *Trichogramma*, principalmente para encontrar ovos dos hospedeiros e parceiros sexuais (VINSON, 1997). Algumas substâncias liberadas pelos machos de algumas espécies de lepidópteros durante o acasalamento, que possui a função de repelir machos da mesma espécie (antiafrodisíacas), podem tornar-se pistas importantes para as espécies de *Trichogramma* localizarem os ovos do hospedeiro (FATOUROS et al., 2008; FATOUROS et al., 2009; MILONAS; MAZOMENOS; KONSTANTOPOULOU, 2009).

Por outro lado, algumas substâncias sintéticas podem reduzir o parasitismo nas espécies de *Trichogramma* em campo. Por exemplo, clopirifós podem afetar a detecção dos feromônios sexuais pelos machos de *Trichogramma semblidis* (AURIVILLIUS, 1898) e *Trichogramma evanescens* Westwood (1833), resultando no

acasalamento entre espécies diferentes (DELPUECH; DUPONT; ALLEMAND, 2010). Esse acasalamento interespecífico afeta a razão sexual, devido ao grande número de ovos não fertilizados, e interfere diretamente na manutenção das populações de *Trichogramma* em campo.

Estudos com o objetivo de gerar conhecimento para a aplicação de *Trichogramma* spp. em campo têm sido conduzidos nos últimos anos. A partir deles, o uso desses parasitoides tem aumentado especialmente para potencializar o controle de *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) nos cultivos de cana-de-açúcar. Essas liberações estão sendo realizadas atualmente em 300 mil hectares, sendo utilizada principalmente a espécie *Trichogramma galloi* Zucchi (1988) (PARRA, 2010).

Essa mesma espécie de *Trichogramma* está começando a ser usada para controlar *D. saccharalis* em cultura do milho. *Trichogramma pretiosum* Riley (1879) está sendo utilizado para o controle de *Tuta absoluta* (MEYRICK, 1917) em cultivos de tomate e *Trichogramma atopovirilia* Oatman; Platner (1983) para o controle de *S. frugiperda* em milho (PARRA, 2010).

Além de *S. frugiperda*, investigações sobre o potencial de *Trichogramma* para o controle de outras espécies de Noctuídeos com importância econômica, tais como *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818), *Heliothis virescens* (FABRICIUS, 1777) e *H. zea*, são registradas na literatura (PARON; CRUZ; CIOCIOLA, 1998; ZACHRISSON; PARRA, 1998; ANDRADE et al., 2009; VIANNA et al., 2011).

Para *H. zea*, estudos detalhados com o objetivo de aplicar os resultados em campo foram realizados (SÁ; PARRA, 1993; SÁ; PARRA; NETO, 1993). Entretanto, programas de controle dessa espécie com *Trichogramma* são raros, pois como mencionado anteriormente, o controle dela é realizado, principalmente através de inseticidas sintéticos (SANTOS JUNIOR et al., 2009).

Esses estudos demonstraram que três liberações de 100.000 adultos de *T. pretiosum* por hectare de milho podem incrementar em até cinco vezes o parasitismo dos ovos de *H. zea* (SÁ; PARRA, 1993). Essas liberações devem começar quando existe a presença de 20% das plantas com estilo-estigma e devem ser realizadas em 100 pontos por hectare, pois a capacidade de dispersão de *T. pretiosum* em plantios de milho, em um período de 36 horas, corresponde a uma área de 80 a 102 m<sup>2</sup> (SÁ; PARRA; NETO, 1993).

Além disso, para o sucesso no controle por *Trichogramma*, além dos fatores discutidos até aqui, talvez o mais importante seja a identificação e seleção de uma população adequada (ZUCCHI; QUERINO; MONTEIRO, 2010). Pois, embora *Trichogramma* seja classificado como parasitoide generalista (QUERINO; ZUCCHI; PINTO, 2010), resultados demonstram que as espécies e populações podem apresentar afinidade por determinados hospedeiros, em razão do comportamento de busca orientado por estímulos, das características nutricionais e morfológicas do ovo, além de fatores abióticos já mencionados (PRATISSOLI; PARRA, 2001; MANSFIELD; MILLS, 2004).

### 2.3 *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911) (BACILLACEAE)

O patógeno de insetos mais utilizado no mundo é a bactéria *Bacillus thuringiensis*, que atualmente corresponde a 2% do total de inseticida comercializados (BRAVO et al., 2011). É uma bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis por sua atividade tóxica (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

*B. thuringiensis* foi descrito pela primeira vez por Berliner em 1911, quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella* (ZELLER, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae). Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado. Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome de *B. thuringiensis*, não foi o primeiro isolamento desse patógeno. Em 1901, o biólogo S. Ishiwata isolou a bactéria que era o agente causal da “sotto-disease”. Em 1908, Iwabuchi a denominou como *Bacillus sotto* Ishiwata, que posteriormente foi considerado nome inválido e o nome mais recente (*Bacillus thuringiensis*) foi mantido (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Esporos de *B. thuringiensis* podem ser isolados de diversos ambientes, tais como: solo, rizosfera, água doce, crustáceos, anelídeos e mamíferos insetívoros (RAYMOND et al., 2010). As inclusões cristalinas produzidas durante a esporulação são geralmente espécie-específicas, porém algumas toxinas possuem efeito patogênico para mais de uma espécie de inseto (VAN FRANKENHUYZEN, 2009).

Após a ingestão dessas inclusões cristalinas pelo inseto, os cristais são solubilizados no intestino em pH alcalino, liberando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas (proteínases) são convertidas em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos. Essas toxinas hidrolisadas atravessam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio do inseto, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção ele cessa a alimentação (COPPING; MENN, 2000; POLANCZYK; ALVES, 2003; RAYMOND et al., 2010).

Para a expressão da completa virulência desse patógeno, estudos demonstram que o auxílio de outras bactérias presentes no trato digestivo dos insetos pode ser necessário. Estudo desenvolvido com *Lymantria dispar* (LINNAEUS, 1758) demonstrou que, com o uso de determinados antibióticos que eliminam algumas bactérias como *Enterococcus* sp. e *Enterobacter* sp., ocorre uma redução na mortalidade das lagartas de *L. dispar* de 95% para cerca de 60% (BRODERICK; RAFFA; HANDELSMAN, 2006). Isso sugeriu que essas bactérias, quando presentes no trato digestivo, inativam enzimas e antimicrobianos que impedem a ação de *B. thuringiensis*. No entanto, estudos recentes contestam esse fato (RAYMOND et al., 2010), ressaltando que a atenuação do efeito de *B. thuringiensis* não é provocada pela ausência das bactérias, mas sim pela exposição prévia das lagartas ao antibiótico.

As primeiras tentativas de utilização de *B. thuringiensis* no controle de insetos causadores de danos econômicos foram feitas na Europa somente 20 anos após a sua descoberta (POLANCZYK et al., 2008). Até o momento, o alvo principal dos programas de controle e das pesquisas em laboratório são espécies de Lepidópteros, principalmente as pertencentes à família Noctuidae (VAN FRANKENHUYZEN, 2009), sendo que o primeiro projeto brasileiro teve como objetivo o controle da lagarta-do-cartucho da cultura do milho, *S. frugiperda*.

Atualmente, existem diversos produtos a base de *B. thuringiensis* no mercado brasileiro, sendo Dipel® o mais utilizado no controle de diversos lepidópteros-praga

(GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). Além dele, Able<sup>®</sup>, Agree<sup>®</sup>, Bac-Control WP<sup>®</sup>, Bactur WP<sup>®</sup>, Xentari<sup>®</sup>, Bactospeine<sup>®</sup> e Thuricide<sup>®</sup> são alguns exemplos dos produtos comercializados no país.

Na América Latina, embora a pesquisa em alguns países encontre-se em estágio avançado, a produção fica restrita à Cuba e, mais recentemente, ao México, sendo que nos demais países há a utilização somente dos produtos importados, o que aumenta diretamente o custo de controle dos insetos em campo e, indiretamente, o custo final de produção (POLANCZYK et al., 2008).

O sucesso na utilização de *B. thuringiensis* depende da atenção a alguns aspectos, como o conhecimento sobre a biologia e/ou comportamento dos insetos-alvo. Por exemplo, a biologia de *Ecdytolopha aurantiana* (LIMA, 1927) e *T. absoluta*, pragas muito importantes em citros e tomate, respectivamente, pode interferir no êxito da aplicação de *B. thuringiensis*. As larvas da primeira espécie, após a eclosão, permanecem pouco tempo na superfície do fruto e as larvas da segunda espécie permanecem quase toda fase larval no interior da folha. Em ambos os casos, as formas imaturas dos insetos ficam pouco tempo expostas ao *B. thuringiensis*, fato que, se não for conhecido, compromete todo o manejo desses insetos (POLANCZYK et al., 2008).

Variação na suscetibilidade pode ocorrer ainda devido a fatores como resistência adquirida pelas populações aos bioinseticidas (TABASHNIK et al., 2008) e ao isolamento geográfico das populações, que pode gerar um consequente isolamento reprodutivo (NDEMAH et al., 2001). Esse isolamento reprodutivo origina populações fisiologicamente diferentes e consequentemente com suscetibilidade diferencial (LÓPEZ-EDWARDS et al., 1999).

No Brasil, alguns estudos foram conduzidos para avaliar esse efeito populacional. Polanczyk; Alves e Padulla (2005) demonstraram que populações de *S. frugiperda* de três diferentes regiões do Brasil (Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul), apresentam diferentes níveis de suscetibilidade ao mesmo isolado de *B. thuringiensis*. Já Pratissoli et al. (2007), avaliando a suscetibilidade de populações de *S. frugiperda*, coletadas em duas localidades brasileiras (Minas Gerais e Espírito Santo), registraram diferença apenas para dois isolados entre os 31 testados, relacionando esse fato à pequena variação geográfica (307 km) entre os habitats

das duas populações (Sete Lagoas - Minas Gerais e Alegre - Espírito Santo), onde estas foram coletadas.

Além disso, essa similaridade no efeito de *B. thuringiensis* entre populações geograficamente próximas evidencia que diferenças populacionais podem não ocorrer em escalas geográficas reduzidas, sendo possivelmente resultado dos movimentos migratórios das espécies, como mencionados anteriormente (WESTBROOK, 2008). Sendo assim, esses resultados demonstram a necessidade de um amplo monitoramento para verificar a existência dessas variações entre as populações desse inseto, o que irá contribuir de forma significativa para a utilização mais eficaz desse patógeno (POLANCZYK et al., 2008).

#### 2.4 INTERAÇÃO ENTRE OS AGENTES BIOLÓGICOS *Bacillus thuringiensis* E *Trichogramma*

O aumento da atividade agrícola tem provocado um desequilíbrio ecológico, fazendo-se necessária a utilização de produtos seletivos que não afetem o equilíbrio entre as pragas e seus predadores, parasitoides e patógenos (DENT, 2000). Além disso, a interação entre agentes de controle das espécies praga em agroecossistemas é uma premissa do manejo de insetos em campo. Entretanto, para a correta utilização desses métodos em conjunto, estudos são necessários para avaliar os possíveis efeitos dessa interação (ALVES, 1998; POLANCZYK et al., 2006).

Em relação a *B. thuringiensis*, embora os efeitos prejudiciais sobre os inimigos naturais (parasitoides, patógenos e predadores) sejam mínimos e/ou significativamente menores que os dos agrotóxicos, eles não podem ser desprezados e estudos são necessários em regiões nas quais essas táticas são empregadas ou tem potencial de uso (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Os primeiros estudos sobre a interação desses agentes biológicos foram realizados na antiga União Soviética, que demonstraram que *B. thuringiensis* era capaz de afetar as características biológicas das espécies de *Trichogramma*. No entanto, os formulados de *B. thuringiensis* utilizados nos experimentos continham toxinas, hoje

indesejáveis (exotoxinas), o que pode explicar os resultados prejudiciais do *B. thuringiensis* sobre *Trichogramma* spp. (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Estudos em que as exotoxinas foram eliminadas durante o processo de centrifugação, assegurando o uso somente das toxinas dos cristais (d-endotoxina), demonstram poucas alterações do *B. thuringiensis* sobre as características biológicas de *Trichogramma* spp. sendo determinadas alterações decorrentes do modo de contato entre esses agentes biológicos, principalmente por meio da inoculação de esporos no alimento do parasitoide e sobre os ovos hospedeiros (POLANCZYK et al., 2006; PRATISSOLI et al., 2006; BERNARDES, 2009; SANTOS JUNIOR, 2009; VIANNA et al., 2009; FERREIRA, 2010).

Nos estudos em que *B. thuringiensis* foi inoculado no mel oferecido como alimento para espécies de *Trichogramma*, houve um aumento na velocidade do parasitismo, sendo que os parasitoides que tiveram contato com os entomopatógenos atingiram o nível de parasitismo acumulado de 80% mais rapidamente em relação aos parasitoides que não tiveram contato (POLANCZYK et al., 2006; PRATISSOLI et al., 2006; BERNARDES, 2009). Isso demonstra que o uso desses agentes em conjunto pode fornecer uma rápida redução dos níveis populacionais da praga (POLANCZYK et al., 2006). Esse fenômeno é conhecido como hormese, sendo caracterizado pela presença de respostas biológicas favoráveis a organismos benéficos, quando expostos aos agentes estressores em quantidades pequenas (FORBES, 2000; BESTETE, 2011). Estudos indicam que esse fenômeno pode ser uma adaptação evolutiva para assegurar a sobrevivência da progênie rapidamente em situações de perigo (FORBES, 2000).

Bernardes (2009), baseada em Bezerrides et al. (2004), ressalta que esse efeito já foi observado na interação entre *Trichogramma* e um alcaloide presente nos ovos de *Utethesia ornatix* (LINNAEUS, 1758) (Lepidoptera: Arctiidae). As lagartas dessa espécie se alimentam de plantas com esse alcaloide, o qual permanece no inseto adulto e também nos ovos que a fêmea oviposita. Essa substância tem como função proteger *U. ornatix* contra o parasitismo de *Trichogramma ostriniae* (PANG; CHEN, 1974). Porém, a fêmea do parasitoide, ao perceber a presença do alcaloide na postura, aumenta a taxa de parasitismo para garantir a sobrevivência da espécie, vencendo assim o mecanismo de defesa do inseto.

Entretanto, a presença da bactéria no trato digestivo de insetos adultos parece ser capaz apenas de produzir esse parasitismo rápido, não gerando o desenvolvimento da doença no parasitoide. Essa constatação pode estar relacionada à anatomia intestinal dos parasitoides adultos, pois para ocorrer a doença, são necessários receptores que fazem a ligação da toxina com as células epiteliais do intestino médio. Esses receptores são normalmente encontrados no intestino médio das formas imaturas (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000), impossibilitando assim, o efeito letal das toxinas em adultos de *Trichogramma* e favorecendo ainda mais o uso desses agentes no manejo de insetos causadores de danos econômicos.

Além disso, a interação positiva entre esses agentes, que resulta no aumento da velocidade de parasitismo, pode variar de acordo com a espécie de *Trichogramma* e isolados/formulados de *B. thuringiensis*, pois em algumas avaliações realizadas em laboratório não foram observados efeitos benéficos (BERNARDES, 2009; SANTOS JUNIOR, 2009; VIANNA et al., 2009; FERREIRA, 2010).

Ainda, as demais características biológicas de *Trichogramma* (emergência de indivíduos, número de indivíduos gerados por ovo do hospedeiro e razão sexual) dificilmente são alteradas quando *B. thuringiensis* é inoculado no alimento do parasitoide (BERNARDES, 2009; SANTOS JUNIOR, 2009). As poucas alterações encontradas foram relativas, principalmente a emergência dos indivíduos, fato demonstrado para *Trichogramma pratissolii* Querino; Zucchi (2003) (PRATISSOLI et al., 2006) e *T. pretiosum* (FERREIRA, 2010). Entretanto, alterações no parasitismo quando *B. thuringiensis* estava presente no mel foram registradas por Ferreira (2010), utilizando ovos de *S. frugiperda* como hospedeiro do parasitoide. Alterações nessas características biológicas quando *B. thuringiensis* está presente sobre os ovos do hospedeiro só foram registradas por Bernardes (2009). Sendo que, as alterações do parasitismo ocorreram quando os ovos de *A. gemmatalis* foram imersos em uma solução contendo *B. thuringiensis*, indicando assim, que o parasitoide não precisa ingerir os esporos/cristais para sofrer alguma alteração comportamental.

No entanto, pode-se perceber a partir desses estudos que as alterações variam em relação ao isolado de *B. thuringiensis* e à espécie de *Trichogramma*. Dessa forma, fica evidente a necessidade de estudos detalhados sobre a interação entre *B. thuringiensis* e *Trichogramma*, avaliando principalmente características morfológicas no

intestino dos parasitoides adultos e também na interação entre esses agentes em campo.

## 2.5 REFERÊNCIAS

- ALHO, C.J.R. Concluding remarks: overall impacts on biodiversity and future perspectives for conservation in the Pantanal biome. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 71, p. 337-341, 2011.
- ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ANDRADE, G.S. et al. Parasitismo de ovos de *Heliothis virescens* por *Trichogramma* spp. pode ser afetado por cultivares de algodão. **Acta Scientiarum Agronomia**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 569-573, 2009.
- BERNARDES, C.O. **Atividade de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) em *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2009.
- BESERRA, E.B.; QUERINO, R.B.; PARRA, J.R.P. Ocorrência de ginandromorfismo em *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, p. 507-509, 2003.
- BESTETE, L. R. **Produtos alternativos e associação com *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym.:Trichogrammatidae) visando o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) em tomateiro**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.
- BLANCO, C.A. et al. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. **Florida Entomologist**, Florida, v.90, n.4, 2007.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431, 2011.
- BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 41, p. 15196-15199, 2006.
- CASTELO BRANCO, M. et al. Inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e broca-grande e seu impacto sobre *Trichogramma pretiosum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 652-654, 2003.
- COPPING, L.G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000.
- CRUZ, I., ALVARENGA, C.D.; FIGUEIREDO, P.E.F. Biologia de *Doru luteipes*(Scudder) e sua capacidade predatória de ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, p.273-278, 1995.

- DAVIES, A. P. et al. Using *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) for insect pest biological control in cotton crops: an Australian perspective. **Australian Journal of Entomology**. Austrália, doi: 10.1111/j.1440-6055.2011.00827.x, 2011.
- DELPUECH, J.M.; DUPONT, C.; ALLEMAND, R. Decrease in Fecundity Induced by Interspecific Mating Between Two *Trichogramma* Parasitoid Species. **Journal of Economic Entomology**, USA, v. 39, n. 2, p. 535-544, 2010.
- DENT, D. **Insect pest management**. Cambridge: CabiBioscience, 2000.
- FATOUROS, N.E. et al. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, Oxford, v.19, n.3, p.677-689, 2008.
- FATOUROS, N.E. et al. Anti-aphrodisiac Compounds of Male Butterflies Increase the Risk of Egg Parasitoid Attack by Inducing Plant Synomone Production. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 1373–1381, 2009.
- FERREIRA, L.S. **Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e suas interações**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.
- FORBES, V.E. Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology**, Reino Unido, v. 14, p. 12-24, 2000.
- FORNAZIER, M.; PRATISSOLI, D.; MARTINS, D.S. Principais pragas da cultura do tomateiro estaqueado na região das montanhas do Espírito Santo. In: INCAPER. **Tomate**. Vitória: Incaper, 2010. p.185-226.
- FRANÇA, F.H. et al. Manejo integrado de pragas. In: SILVA J.B.C.; GIORDANO L.B. (Org.). **Tomate para processamento industrial**. Brasília: Embrapa SPI, 2000, p.112-127.
- GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, 2000.
- HAJI, F.N.P. et al. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro. In: PARRA, J.R.P. et al. (Ed.). **Controle biológico no Brasil, parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 477- 494.
- JACKSON, R.E, et al. Genetic Variation for Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Eastern North Carolina. **Journal of Economic Entomology**, USA, v. 99, n. 5, p.1790-1797, 2006.
- LÓPEZ-EDWARDS, M. et al. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, Florida, v. 82, n. 2, p. 254-262, 1999.
- MAEDA, E.E.; FORMAGGIO, A.R.; SHIMABUKURO, Y.E. Análise histórica das transformações da floresta Amazônica em áreas agrícolas na bacia do Rio Suia-Miçu. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v. 20, p. 5-24, 2008.
- MANSFIELD, S.; MILLS, N.J.A comparison of methodologies for the assessment of host preference of the gregarious egg parasitoid *Trichogramma platneri*. **Biological Control**.v. 29, p. 332-340, 2004.

- MATRANGOLO, W.J.R.; CRUZ, I.; DELLA LUCIA, T.M.C. Densidade Populacional de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) nas Fases de Ovo, Larva e Adulto em Milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.27, n.1, p.21-28, 1998.
- MILONAS, P.; MAZOMENOS, B.E; KONSTANTOPOULOU, M.A. Kairomonal effect of sex pheromone components of two lepidopteran olive pests on *Trichogramma* wasps. **Insect Science**, China, v.16, p. 131-136, 2009.
- NDEMAH, R. et al. Distribution, relative importance and effect of lepidopterous borers on maize yields in forest zone and mid-altitude of Cameroon. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v.94, p. 1434-1444, 2001.
- OWEN, A.K. et al. A molecular phylogeny of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with an evaluation of the utility of their male genitalia for higher level classification. **Systematic Entomology**, Reino Unido, v. 32, p. 227–251, 2007.
- PARON, M.J.F.O.; CRUZ, I.; CIOCIOLA, A.I. Efeito de Genótipos de Milho no Parasitismo por *Trichogramma* spp. em Ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, n.3, p. 435-441, 1998.
- PARRA, J.R.P. Egg Parasitoids Commercialization in the New World. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Piracicaba: Springer, p. 373-388, 2010.
- PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, A. *Trichogramma* in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomology**, Londrina, n. 33, v. 3, p. 271-281, 2004.
- PIETRANTONIO, P.V. et al. Detection and evolution of resistance to the pyrethroidcypermethrin in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Texas. **Environmental Entomology**, USA, v. 36, n. 5, p. 1174-1188, 2007.
- PINTO, J.D.A. review of the New World genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, Washington, v. 15, p. 38-163, 2006.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: umabrevevisão. **Agrociencia**, México, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.
- POLANCZYK, R.A.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biopesticides International**, Índia, v. 1, n. 1/2, p. 114-124, 2005.
- POLANCZYK, R.A. et al. Interação entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas. **Acta Scientiarum Agronomia**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 233-239, 2006.
- POLANCZYK, R.A. et al. Utilização de *Bacillus thuringiensis* visando ao controle de pragas agrícolas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Org.) **Controle Microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.111-136.
- PRAÇA, L.B. et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, 2004.

- PRATISSOLI, D.; OLIVEIRA, H.N. Influência da idade dos ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie) no parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.891-896, 1999.
- PRATISSOLI, D; PARRA, J.R.P. Seleção de linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle das traças *Tuta absoluta* (Meyrick) e *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 277-282, 2001.
- PRATISSOLI, D. et al. Efeito da ausência de hospedeiro e de alimento sobre aspectos biológicos de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v. 26, p.281-286, 2004.
- PRATISSOLI, D. et al. Desempenho de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) sob efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.369-377, 2006.
- PRATISSOLI, D. et al. Efeito entomotóxico de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* em duas populações de *Spodoptera frugiperda* oriundas de Minas Gerais e do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.6, n.2, p.140-148, 2007.
- QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A.; PINTO, J.D. Systematics of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a Focus on the Genera Attacking Lepidoptera. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Piracicaba: Springer, 2010. p. 191-218.
- RAYMOND, B. et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**. v. 18, n. 5, p. 189-194, 2010.
- REZNIK, S.Y.A; VAGHINA, N.P.; VOINOVICH, N.D. Diapause induction in *Trichogramma embryophagum* Htg. (Hym., Trichogrammatidae): the dynamics of thermosensitivity. **Journal of Applied Entomology**, v. 132, p. 502–509, 2008.
- ROWLEY, D.L., POPHAM, H.J.R., HARRISON, R.L. Genetic variation and virulence of nucleo polyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.107, p.112–126, 2011.
- SÁ, L.A.N.; PARRA, J.R.P. Efeito do número e intervalo entre liberações de *Trichogramma pretiosum* Riley no parasitismo e controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) em milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.50, n.3, p.355-359, 1993.
- SÁ, L.A.N.; PARRA, J.R.P.; NETO, S.S. Capacidade de dispersão de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para controle de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) em milho. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.50, n.2, p.226-231, 1993.
- SANTOS JUNIOR, H.J.G. et al. Suscetibilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.635-641, 2009.
- SANTOS JUNIOR, H.J.G. Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) e populações de *Trichogramma* spp. (Westwood) (Hym.: Trichogrammatidae) para o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.:

- Noctuidae**). 2009. 65 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.
- TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to Btcrops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 199-202, 2008.
- TRUMBLE, J.; ALVARADO-RODRIGUEZ, B. Development of economic evaluation of an IPM program for fresh market tomato production in Mexico. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 43, p. 267-284, 1993.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 01, p. 1-16, 2009.
- VIANNA, U.R. et al. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effect on descendant generation. **Ecotoxicology**, v.18, n.2, p. 180-186, 2009.
- VIANNA, U.R. et al. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.81-87, 2011.
- VINSON, S.B. Comportamento da seleção hospedeira de parasitoides de ovos com ênfase na família Trichogrammatidae. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (eds.) **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 67-119.
- WESTBROOK, J.K. Noctuid migration in Texas within the nocturnal aeroecological boundary layer. **Integrative and Comparative Biology**, USA, v. 48, n. 1, p. 99-106, 2008.
- ZACHRISSON, B.; PARRA, J.R.P. Capacidade de dispersão de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para o controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em soja. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.55, p.133- 137, 1998.
- ZUCCHI, R.A.; QUERINO, R.B.; MONTEIRO, R.C. Diversity and Hosts of *Trichogramma* in the New World, with Emphasis in South America. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma**. Piracicaba: Springer, p. 219-237, 2010.

## Capítulo 1

### **3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE *Trichogramma* spp. EM POPULAÇÕES DE *Helicoverpa zea***

#### 3.1 RESUMO

O conhecimento sobre as características biológicas de *Trichogramma* WESTWOOD (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é fundamental para o sucesso na utilização desses parasitoides em campo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação das características biológicas de *Trichogramma* spp., submetidas ao parasitismo de populações de *H. zea*. Foram utilizadas 40 fêmeas de cada uma das dez populações de *Trichogramma* estudadas, sendo que cada grupo de 20 fêmeas recebeu individualmente cartelas com ovos de uma determinada população de *H. zea*. Foi permitido o parasitismo por 24 horas. Após o nascimento e a morte dos descendentes, foram verificadas as características biológicas de parasitismo (%), emergência dos indivíduos (%), razão sexual e número de adultos por ovo do hospedeiro. As características biológicas de determinadas populações de *Trichogramma* referentes à percentagem de parasitismo, emergência e razão sexual variaram em relação às populações de *H. zea*. Sugere-se que as variações nutricionais nos ovos das populações hospedeiras foram responsáveis pelas diferenças encontradas nessas características, porém estudos sobre a variação nutricional nos ovos de populações de lepidópteros são necessários para confirmar essa sugestão. No entanto, apesar da variação entre as populações hospedeiras, a maioria dos valores das características biológicas não atingiram níveis indesejáveis para o uso em programas de manejo de *H. zea*. De acordo com as características relevantes para o uso nesses programas, deve-se destacar a população *Trichogramma* sp. pelo elevado parasitismo e a população de *Trichogramma acacioi*, pelo grande número de fêmeas produzidas.

Palavras-Chave: Trichogrammatidae. Controle biológico. Parasitoides de ovos.

### 3.2 ABSTRACT

The knowledge about the biological characteristics of *Trichogramma* WESTWOOD (Hymenoptera: Trichogrammatidae) is fundamental for a successful use of these parasitoids in the field. In this case, the objective of this study was to evaluate the variation of the biological characteristics of *Trichogramma* ssp., submitted to the parasitism of populations of *H. zea*. Forty females were used in each of the ten populations of *Trichogramma* studied, being that each group of 20 females, individually received a cardboard with twenty eggs of a determined population of *H. zea*. It was permitted a parasitism for twenty-four hours. After the birth and the death of the descendants and later verified the biological characteristics of parasitism (%), emergence of the individuals (%), sex ratio and number of adults per host egg. The biological characteristics were determined populations of *Trichogramma* related to the percentage of parasitism, emergence and sex ratio varied in relation to the population of *H. zea*. It is suggested that the nutritional variations in the eggs of the host populations were responsible for the difference found in these characteristics, however studies about the nutritional variations in the eggs of the lepidopteran populations are necessary to confirm this suggestions. Nevertheless, despite the variation between the host populations, most of the values of biological variations didn't reach undesirable levels for the use in management programs of *H. zea*. According to the relevant characteristics for the use of these programs, it should be noteworthy the populations *Trichogramma* sp. for the elevated parasitism and the population of *Trichogramma acacicoi*, due to the large number of females produced.

Keywords: Trichogrammatidae. Biological control. Egg parasitoids.

### 3.3 INTRODUÇÃO

Parasitoides são espécies chaves para a regulação de populações de insetos (QUERINO; ZUCCHI; PINTO, 2010). Diversas espécies são usadas para o controle de muitos insetos em sistemas agrícolas, especialmente os parasitoides de ovos, como os do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (PRATISSOLI et al., 2004; DELPUECH; DUPONT; ALLEMAND, 2010), que possui

210 espécies conhecidas no mundo, distribuídas em todos os ambientes terrestres do planeta (PINTO, 2006).

Esses parasitoides são capazes de parasitar mais de 200 espécies de insetos causadores de danos econômicos, principalmente da ordem Lepidoptera (PRATISSOLI et al., 2004; DELPUECH; DUPONT; ALLEMAND, 2010), nas quais causam a morte dos embriões em desenvolvimento (JARJEES; MERRITT, 2004). No entanto, para a obtenção de sucesso na utilização deles nas culturas, o conhecimento sobre as características biológicas das populações é fundamental (PRATISSOLI; PARRA, 2001).

Essas características podem ser altamente influenciadas por fatores bióticos e abióticos, tais como: características nutricionais do ovo (VINSON, 2010), temperatura (PRATISSOLI et al., 2007), idade do ovo, (PRATISSOLI; OLIVEIRA, 1999), inseticidas (VIANNA et al., 2009), sinais químicos produzidos pelas espécies hospedeiras (FATOUROS et al., 2008; FATOUROS et al., 2009; MILONAS; MAZOMENOS; KONSTANTOPOULOU, 2009), acasalamento (PRATISSOLI et al., 2009), entre outros. Entretanto, até o momento não foi relatada a interferência de alguns aspectos bióticos nas características biológicas de *Trichogramma*, como a influência da variação populacional do hospedeiro.

Em Lepidoptera, o isolamento geográfico das populações pode gerar variações genéticas, que resultam em adaptações fisiológicas e morfológicas nas espécies (LÓPEZ-EDWARDS et al. 1999). Em relação à variação morfológica, alterações no ovo são registradas em alguns grupos filogeneticamente próximos de Lepidoptera, sendo reflexo da variação relativa à fêmea adulta, pois o córion é produzido pelas células do folículo no ovário, e a superfície externa é frequentemente esculpida com o padrão que reflete a forma das células do folículo (MOTA, 1989). Essas alterações morfológicas podem, portanto, alterar as relações de parasitismo entre as espécies, já que características externas do ovo são consideradas importantes na seleção hospedeira realizada por parasitoides de ovos (VINSON, 2010).

Utilizando diferentes populações de *Trichogramma*, foi avaliada neste estudo a variação das características biológicas de populações de *Trichogramma* submetidas ao parasitismo de populações de *H. zea*.

## 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.4.1 Criação de *Trichogramma* spp.

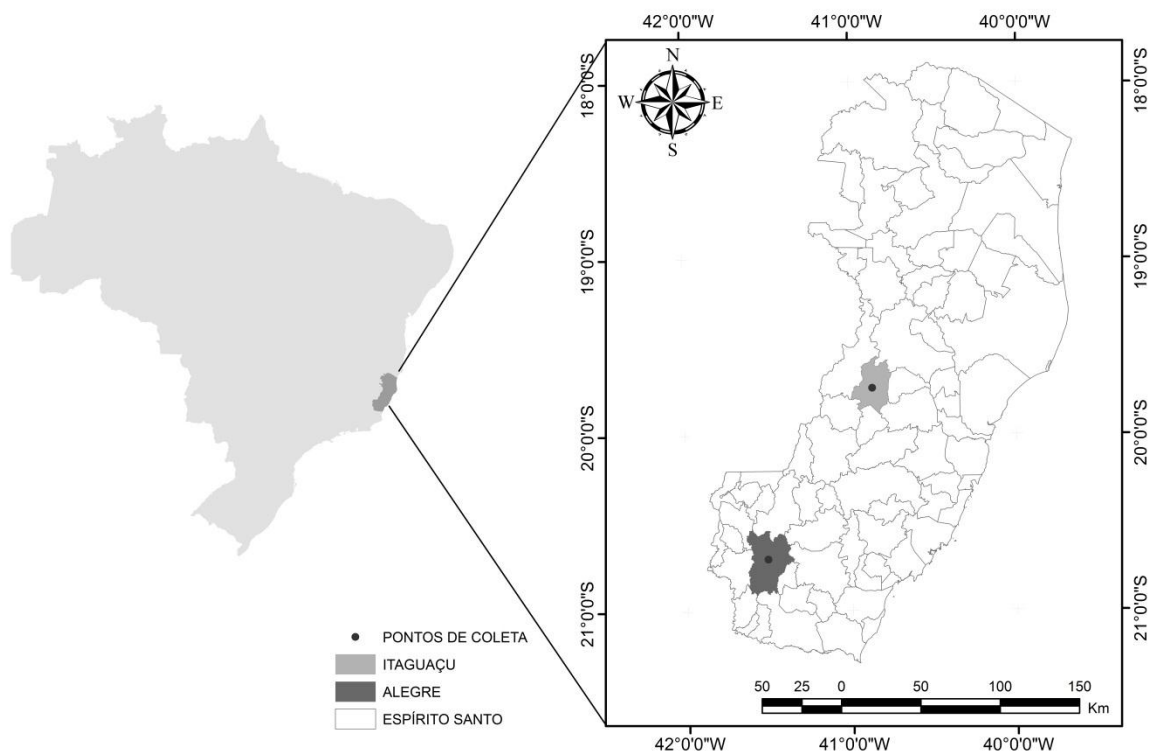
As espécies de *Trichogramma* utilizadas foram provenientes do biotério de *Trichogramma* do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI) da Universidade Federal do Espírito Santo, sendo elas: *Trichogramma acacioi*, *Trichogramma exigum* e *Trichogramma pretiosum*. Foi utilizada uma população de *Trichogramma acacioi*, quatro populações de *Trichogramma exigum*, quatro populações de *Trichogramma pretiosum* e uma espécie em processo de identificação, *Trichogramma* sp.

A criação das espécies de *Trichogramma* foi realizada em ovos do hospedeiro *A. kuehniella* colados com goma arábica 10% em retângulos de cartolina azul celeste (8,0 x 2,0 cm) e inviabilizados por exposição à lâmpada germicida por 50 minutos de acordo com metodologia adaptada de Parra (1997). Esse hospedeiro foi criado em dieta à base de farelo de trigo e milho na proporção de 2:1 acrescida de 30 gramas de levedura de cerveja por kg de dieta. A dieta foi previamente homogeneizada e distribuída em caixas plásticas de 30 x 25 x 10 cm e em cada caixa foram distribuídos aleatoriamente 0,3 g de ovos desse hospedeiro alternativo. Os adultos emergidos foram coletados diariamente e transferidos para gaiolas de tubo PVC de 20 cm de diâmetro por 25 cm de altura, contendo no seu interior tiras de tela de “nylon”, dobradas em zig-zag, para a oviposição. A parte superior das gaiolas foi fechada com tela de tecido “voil” para evitar a fuga dos adultos. Os ovos foram coletados diariamente durante cinco dias e armazenados em câmara climatizada a uma temperatura de  $3 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 3.4.2 Coleta e Criação das populações de *H. zea*

A coleta das populações foi realizada em plantios de milho distanciados por 117 km, localizados no município de Alegre-ES (20°45'50" S, 41°31'58" O) e de Itaguaçu-ES (19°48'07" S, 40°51'21" O) (Figura 1). Esses municípios apresentam clima semelhante, classificado como Tropical Brasil Central (IBGE, 2011). As altitudes dos locais de coleta nos municípios de Itaguaçu e Alegre foram respectivamente, 140 e 320 metros.

A criação foi desenvolvida em sala climatizada ( $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h). Os adultos de *H. zea* foram mantidos em gaiolas de PVC (20 cm de diâmetro x 25 cm de altura) revestidos internamente com folha de papel branco, sendo as extremidades fechadas com tecido do tipo “voil”. Diariamente, uma solução de mel a 10% foi oferecida como substrato alimentar. Os ovos de *H. zea* depositados na parede interna dos tubos e no tecido foram coletados e acondicionados em recipientes plásticos. Após a eclosão, as lagartas foram individualizadas em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm) preenchidos em até 1/4 de seu volume com dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e farelo de soja (GIOLO et al., 2006). Após o resfriamento da dieta, as lagartas foram transferidas para os tubos, sendo mantidas nesses recipientes até o período pupal.



**Figura 1** – Localização dos pontos de coleta das populações de *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) nos municípios de Alegre-ES e Itaguaçu-ES.

### **3.4.3 Características biológicas das populações de *Trichogramma* em diferentes populações hospedeiras**

A análise das características biológicas das populações de *Trichogramma* submetidas ao parasitismo em populações de *H. zea* foi realizada por meio da individualização de 40 fêmeas de cada população de *Trichogramma* em tubos de vidro (3,5 cm de comprimento x 0,7 cm de diâmetro). Para um grupo de 20 fêmeas, foram oferecidas 20 cartelas (uma cartela por fêmea) contendo 30 ovos com idade de 0 a 24 horas da população de *H. zea* de Itaguaçu e para o outro grupo de 20 fêmeas, também foram oferecidas 20 cartelas (uma cartela por fêmea), porém contendo em cada cartela 30 ovos da população de Alegre com a mesma idade. As cartelas foram confeccionadas com cartolina azul celeste (3,0 x 0,5 cm), sendo os ovos colados com goma arábica a 10%.

Permitiu-se o parasitismo por 24 horas. Após esse período, as cartelas contendo os ovos parasitados foram transferidas para outros tubos de vidro com as mesmas dimensões citadas anteriormente e acondicionadas em câmara climatizada ( $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h) até a emergência e morte dos descendentes. Para evitar a predação de ovos parasitados pelas lagartas emergidas dos ovos não parasitados, foi realizado um monitoramento diário até o quinto dia após o parasitismo. Esse período de monitoramento foi baseado no limite máximo de tempo necessário para a eclosão das lagartas de *H. zea*, avaliado durante a criação em laboratório. Quando as lagartas foram detectadas nesse período de monitoramento, elas foram retiradas com auxílio de um pincel e eliminadas.

Após esse período de monitoramento, as cartelas foram transferidas para sacolas plásticas (5 x 22 cm) com o objetivo de facilitar a análise das características biológicas dos parasitoides descendentes. Após a emergência e a morte deles, as características biológicas analisadas foram: parasitismo (%), emergência dos indivíduos (%), razão sexual e número de adultos por ovo do hospedeiro.

### 3.4.4 Análise dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições por tratamento em esquema fatorial 2x10 (populações de *H. zea* x populações de *Trichogramma*). As populações de *Trichogramma* e *H. zea* foram consideradas variáveis categóricas (fator fixo) e as características biológicas de *Trichogramma*, como variáveis dependentes. Os valores de cada característica foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, quando necessário.

## 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existiu interação significativa entre as populações de *Trichogramma* e *H. zea*, nas características biológicas de parasitismo ( $F_{9:380}=23,91$ ;  $P<0,001$ ), emergência dos parasitoides ( $F_{9:380}=5,82$ ;  $P<0,001$ ) e razão sexual ( $F_{9:370}=3,82$ ;  $p=0,0001$ ). Dessa forma, para cada característica procedeu-se o desdobramento do fator populações de *Trichogramma* dentro de cada nível de populações de *H. zea* e vice-versa.

As características de parasitismo, emergência dos parasitoides e razão sexual variaram em relação à população hospedeira. Porém, o número de indivíduos gerados por ovo do hospedeiro não apresentou interação significativa com a população hospedeira ( $F_{9:380}=1,31$ ;  $P=0,2295$ ) e não variou em relação às populações de *H. zea*.

Analisando separadamente o parasitismo, pode-se perceber interferência das populações de *H. zea* nas populações *Trichogramma* sp., *T. exigum* 7, *T. exigum* 5 e *T. pretiosum* 16 (Tabela 1). Na população de *H. zea* de Alegre, a população do parasitoide que apresentou a maior percentagem de parasitismo foi *Trichogramma* sp. (83,33%) e na população de *H. zea* de Itaguaçu, quatro populações do parasitoide apresentaram as melhores médias (*Trichogramma* sp., *T. exigum* 7, *T. pretiosum* 12 e *T. pretiosum* 14), sendo registrada uma variação de 32,03% a 37,54% entre elas (Tabela 1).

Tabela 1 - Parasitismo de *Trichogramma* spp. em duas populações de *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h

População de <i>Trichogramma</i>	PARASITISMO (%)	
	Alegre <sup>1</sup>	Itaguaçu <sup>1</sup>
<i>Trichogramma</i> sp.	83,33±2,82 Aa	34,28±2,85 Ba
<i>T. exigum</i> 7	54,66±2,04 Ab	37,54±2,87 Ba
<i>T. exigum</i> 5	51,83±2,84 Ab	27,32±2,74 Bb
<i>T. pretiosum</i> 16	34,52±2,60 Ac	27,77±2,99 Bb
<i>T. acacioi</i>	30,52±1,45 Ac	25,61±1,84 Ab
<i>T. pretiosum</i> 12	29,66±3,22 Ac	32,47±3,05 Aa
<i>T. pretiosum</i> 14	28,83±2,01 Ac	32,03±3,13 Aa
<i>T. exigum</i> 2	21,16±1,71 Ad	19,74±1,92 Ac
<i>T. exigum</i> 4	20,97±1,34 Ad	14,84±0,91 Ac
<i>T. pretiosum</i> 15	17,25±1,39 Ad	20,47±1,54 Ac

<sup>1</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente (Scott-Knott 5%).

Essa variação do parasitismo em cada população do hospedeiro é decorrente de características fenotípicas inerentes às populações do parasitoide, ou seja, populações de *Trichogramma* apresentam diferentes agressividades para um determinado hospedeiro (MILLS; KUHLMANN, 2000). Variações do parasitismo podem ser registradas inclusive quando os parasitoides estão sobre fortes pressões ambientais (VIANNA et al., 2011), como a presença de inseticidas (VIANNA et al., 2009) e a falta de recurso alimentar (PRATISSOLI et al., 2009). Isso evidencia a relevância da seleção de populações de *Trichogramma* adequadas para o controle das populações hospedeiras em campo.

Parasitoides do gênero *Trichogramma* possuem capacidade de reconhecer a qualidade do hospedeiro (COLAZZA et al., 2010), sendo que o processo de aceitação de um hospedeiro ocorre através de investigações externas, com as antenas, ou internamente, com o ovipositor, e a decisão de aceitar ou rejeitar o hospedeiro é mediada pelas características químicas e físicas do hospedeiro (VINSON, 1998). Em relação ao ovo, além das pistas químicas, o volume, a espessura do córion e o seu conteúdo nutricional podem influenciar as características biológicas do parasitoide (MANSFIELD; MILLS, 2002; VIANNA et al., 2011). Essas diferenças no ovo possivelmente ocorreram entre as populações de *H. zea* e influenciaram o parasitismo de algumas populações de *Trichogramma*.

Como consequência da variação nos hospedeiros, adaptações fenotípicas podem ser encontradas em algumas espécies de *Trichogramma* (QUERINO; ZUCCHI,

2002), a exemplo de variações no tamanho dos adultos, na quantidade de gametas produzidos e no tamanho dos órgãos reprodutores, quando as espécies são submetidas ao desenvolvimento em hospedeiro de diferentes tamanhos (MARTEL; DARROUZET; BOIVIN, 2011).

Essas adaptações são resultantes da plasticidade fenotípica existente nesses parasitoides, que é a capacidade que um determinado genótipo possui em expressar diferentes fenótipos como resposta a mudanças no ambiente, resultando assim em adaptações capazes de contornar variações ambientais existentes (ROFF, 2002).

Sendo assim, é plausível pensar que em longo prazo, a plasticidade fenotípica das espécies pode contornar a possível barreira imposta pela variação populacional do hospedeiro. Esse fato poderia contornar os efeitos negativos encontrados no presente estudo, possivelmente relacionados a aspectos qualitativos dos ovos. Além disso, deve-se ressaltar que essa adaptação pode se desenvolver mais facilmente em culturas onde a manutenção do parasitoide no ambiente é possível, como nas culturas perenes (PRATISSOLI et al., 2009), pois em culturas anuais o parasitoide provavelmente não teria tempo suficiente para desenvolvê-la, uma vez que, com o declínio da cultura, a disponibilidade de hospedeiros é brutalmente reduzida. Entretanto, estudos sobre a manifestação dessa plasticidade fenotípica de *Trichogramma* em diferentes culturas e populações do mesmo hospedeiro são necessários.

A emergência dos indivíduos em *T. exigum* 5, *T. pretiosum* 14 e *T. pretiosum* 15 foi influenciada pelas populações do hospedeiro. Entretanto, a porcentagem de emergência das populações submetidas aos ovos da população de *H. zea* foi considerada alta. As populações de *Trichogramma* apresentaram diferenças na população de *H. zea* de Alegre, sendo registrada a menor emergência para a população *T. pretiosum* 15 e a maior para *T. acacioi*. Já na população de *H. zea* de Itaguaçu, diferenças na emergência dos parasitoides não foram encontradas (Tabela 2).

Tabela 2 - Emergência de indivíduos de *Trichogramma* spp. em duas populações de *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h

População de <i>Trichogramma</i>	EMERGÊNCIA DE INDIVÍDUOS (%)	
	Alegre <sup>1</sup>	Itaguaçu <sup>1</sup>
<i>Trichogramma</i> sp.	98,15±0,59 Aa	88,21±3,18 Aa
<i>T. exigum</i> 7	99,54±0,45 Aa	100,00±0,0 Aa
<i>T. exigum</i> 5	98,95±0,72 Aa	88,32±5,97 Ba
<i>T. pretiosum</i> 16	92,34±4,92 Ab	95,00±5,00 Aa
<i>T. acacioi</i>	100,00±0,00 Aa	99,50±0,5 Aa
<i>T. pretiosum</i> 12	96,93±1,51 Aa	97,92±1,86 Aa
<i>T. pretiosum</i> 14	86,60±5,47 Bb	100,00±0,00 Aa
<i>T. exigum</i> 2	88,33±6,95 Ab	93,07±3,02 Aa
<i>T. exigum</i> 4	91,76±5,24 Ab	100,00±0,00 Aa
<i>T. pretiosum</i> 15	65,64±8,05 Bc	100,00±0,00 Aa

<sup>1</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente (Scott-Knott 5%).

Estudos com ovos de *H. zea* com a mesma idade utilizada neste estudo (24 horas), registraram percentagens de emergência semelhantes (PRATISSOLI; OLIVEIRA, 1999) (Tabela 2), evidenciando a adequação desse hospedeiro para o desenvolvimento de *Trichogramma*. Além disso, sabe-se que esses parasitoides não sofrem alterações morfológicas quando se desenvolvem em ovos de *H. zea*, fato que ocorre em hospedeiros alternativos, como *Sitotroga cerealella* (OLIVIER, 1789) (Lepidoptera: Gelechiidae) (KAZMER; LUCK, 1995), e que esta ligado ao valor nutricional dos ovos hospedeiros.

Ovos da população de *H. zea* de Alegre alteraram estatisticamente a emergência dos parasitoides das populações *T. pretiosum* 14 e *T. pretiosum* 15 (Tabela 2). Porém, na população *T. exigum* 5, os ovos de Alegre apresentaram a maior média de emergência. Essa contradição pode sugerir que o efeito das populações hospedeiras pode ser diferente para cada espécie, ou seja, não existe um padrão, e determinadas populações hospedeiras adequadas para algumas populações de *Trichogramma* podem não ser adequadas para outras. No entanto, a variação registrada neste estudo não foi suficiente para comprometer o uso dessas populações de *Trichogramma* em campo. Porém, estudos em espécies ou populações de *Trichogramma* nas quais existe o interesse de uso em programas de controle são necessários para verificar se essa variação pode ocorrer em níveis mais elevados do que o registrado neste estudo, o que poderá comprometer o manejo das populações hospedeiras em campo.

A razão sexual apresentou diferença estatística entre a população de *H. zea* para *T. exigum* 5, *T. pretiosum* 16, *T. exigum* 2 e *T. pretiosum* 15 (Tabela 3). Além disso, também houve variação dentro de cada população do hospedeiro, sendo registrada para a população de Alegre uma variação entre 0,66 a 1,00 e para a população de Itaguaçu entre 0,69 a 1,00. O valor da razão sexual 1,00 nas duas populações do hospedeiro só ocorreu para a população de *T. acacioi*, que já havia demonstrado valores relevantes para as características de parasitismo (Tabela 1) e emergência (Tabela 2). E, como apresentado anteriormente, essa população não apresentou variação nas características biológicas em relação à população do hospedeiro, evidenciando a importância dela para o manejo de *H. zea*.

Tabela 3 - Razão sexual de *Trichogramma* spp. em duas populações de *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h

População de <i>Trichogramma</i>	RAZÃO SEXUAL			
	Alegre <sup>1</sup>		Itaguaçu <sup>1</sup>	
<i>Trichogramma</i> sp.	0,93±0,004	Aa	0,87±0,04	Ab
<i>T. exigum</i> 7	0,84±0,04	Ab	0,85±0,03	Ab
<i>T. exigum</i> 5	0,83±0,06	Ab	0,69±0,05	Bc
<i>T. pretiosum</i> 16	0,72±0,04	Bc	0,81±0,02	Ab
<i>T. acacioi</i>	1,00±0,00	Aa	1,00±0,00	Aa
<i>T. pretiosum</i> 12	0,66±0,04	Ac	0,73±0,04	Ac
<i>T. pretiosum</i> 14	0,94±0,005	Ac	1,00±0,00	Aa
<i>T. exigum</i> 2	0,90±0,00	Bb	1,00±0,00	Aa
<i>T. exigum</i> 4	0,95±0,00	Aa	0,99±0,004	Aa
<i>T. pretiosum</i> 15	0,84±0,007	Bb	1,00±0,00	Aa

<sup>1</sup> Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente (Scott-Knott 5%).

A variação intraespecífica de *Trichogramma* registrada em cada população de *H. zea* é comum de ocorrer para essa característica (ANDRADE et al., 2009). Além disso, diferenças na razão sexual podem estar relacionadas a fatores como densidade (PRATISSOLI et al., 2005) ou qualidade nutricional do hospedeiro (VINSON, 2010). No entanto, a densidade de ovos utilizada nesses experimentos foi a mesma para as duas populações de *H. zea*, evidenciando novamente que diferenças nutricionais podem existir entre os ovos das populações hospedeiras, causando alterações nas características biológicas.

Entretanto, a diferença gerada pela população hospedeira não foi capaz de reduzir essa característica a níveis indesejáveis nas criações massais desses parasitoides,

(inferior a 0,5) (VIANNA et al., 2011). Fato esse que comprova o potencial desse parasitoide no controle das populações de *H. zea* em campo (LUIZ; MAGRO, 2007).

O número de adultos gerados por ovo do hospedeiro foi a única característica que não demonstrou variação em relação à população do hospedeiro ( $F_{1:380}=3,89$ ;  $P=0,06$ ). O número médio de indivíduos por ovo não foi superior a 2, tendo variado de 1,19 a 1,73 (Tabela 4), semelhante ao registrado por outros autores para espécies de Noctuidae (ANDRADE et al., 2009; VIANNA et al., 2011).

A menor média dessa característica foi registrada para a população *Trichogramma* sp., o que pode ser reflexo das adaptações geradas por essa população no seu ambiente natural. A coleta dessa população foi realizada na borda de um fragmento de floresta Atlântica no município de Itaguaçu, ES (19°48'53"S, 40°52'11"O), onde existem, adjacentes a esse fragmento florestal, cultivos de milho praticamente durante todo o ano e conseqüentemente hospedeiros disponíveis frequentemente.

Sabe-se que na presença de grandes quantidades de ovos hospedeiros, é vantajoso para as fêmeas de *Trichogramma* colocarem uma quantidade menor de progênie por ovo, pois resulta na produção de fêmeas maiores e mais fecundas, já que mais nutrientes estarão disponíveis para a sua assimilação e desenvolvimento (VINSON, 1997). O aumento no número de adultos por hospedeiro, além de poder diminuir a qualidade do indivíduo gerado, pode refletir na eficiência de controle, já que poderá resultar em uma menor quantidade de ovos parasitados (BESERRA; DIAS; PARRA, 2003).

Dessa forma, é plausível concluir que essa população do parasitoide refletiu, nos experimentos em laboratório, adaptações adquiridas no ambiente natural. Tal fato demonstra que, mesmo após algumas gerações em hospedeiro alternativo (*A. kuehniella*), características comportamentais podem ser mantidas no parasitoide.

Tabela 4 - Número de adultos de *Trichogramma* spp. gerados por ovo do hospedeiro *Helicoverpa zea*. Temperatura:  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h.

População de <i>Trichogramma</i>	NÚMERO DE ADULTOS GERADOS POR OVO DO HOSPEDEIRO
	Média <sup>1</sup>
<i>Trichogramma</i> sp.	1,19 $\pm$ 0,03 c
<i>T. exigum</i> 7	1,60 $\pm$ 0,05 a
<i>T. exigum</i> 5	1,40 $\pm$ 0,05 b
<i>T. pretiosum</i> 16	1,56 $\pm$ 0,07 a
<i>T. acacioi</i>	1,73 $\pm$ 0,05 a
<i>T. pretiosum</i> 12	1,50 $\pm$ 0,04 a
<i>T. pretiosum</i> 14	1,47 $\pm$ 0,06 a
<i>T. exigum</i> 2	1,63 $\pm$ 0,09 a
<i>T. exigum</i> 4	1,66 $\pm$ 0,07 a
<i>T. pretiosum</i> 15	1,64 $\pm$ 0,10 a

<sup>1</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula não diferem estatisticamente (Scott-Knott 5%).

### 3.6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que de acordo com as características relevantes para o uso de *Trichogramma* no manejo de *H. zea*, constituídas pela percentagem de parasitismo e número de fêmeas geradas, as populações *Trichogramma* sp. e *Trichogramma acacioi* obtiveram os melhores resultados respectivamente. Além disso, foi verificado que algumas características biológicas variam em relação às populações de *H. zea*. No entanto, para a maioria das populações de *Trichogramma*, essa variação não é suficiente para gerar níveis indesejáveis para o uso no manejo de populações de *H. zea*.

### 3.7 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G.S. et al. Parasitismo de ovos de *Heliothis virescens* por *Trichogramma* spp. pode ser afetado por cultivares de algodão. **Acta Scientiarum Agronomia**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 569-573, 2009.
- BESERRA, E.B; DIAS, C.T.S.; PARRA, J.R.P. Características biológicas de linhagens de *Trichogramma pretiosum* desenvolvidas em ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Acta Scientiarum Agronomia**, Maringá, v.25, n.2, p. 479-483, 2003.
- COLAZZA, S. et al. Host Searching by Egg Parasitoids: Exploitation of Host Chemical Cues. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Egg Parasitoids in**

**Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Piracicaba: Springer, 2010. p. 191-218.

DELPUECH, J.M.; DUPONT, C.; ALLEMAND, R. Decrease in Fecundity Induced by Interspecific Mating Between Two *Trichogramma* Parasitoid Species. **Journal of Economic Entomology**, USA, v. 39, n. 2, p. 535-544, 2010.

FATOUROS, N.E. et al. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, Oxford, v.19, n.3, p. 677-689, 2008.

FATOUROS, N.E. et al. Anti-aphrodisiac Compounds of Male Butterflies Increase the Risk of Egg Parasitoid Attack by Inducing Plant Synomone Production. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 1373-1381, 2009.

GIOLO, F. P. et al. Biologia de *Helicoverpa zea* (BODDIE, 1850) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) em duas dietas artificiais. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 2, p. 167-171, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapas Interativos**. Disponível em <<http://mapas.ibge.gov.br/clima/viewer.htm>>. Acesso em 14 set. 2011.

JARJEES, E.A.; MERRITT, D.J. The effect of parasitization by *Trichogramma australicum* on *Helicoverpa armigera* host eggs and embryos. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 1-8, 2004.

KAZMER, D.J., LUCK, R.F. Field tests of the size-fitness hypothesis in the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum*. **Ecology**, Ithaca, v. 76, p. 412-425, 1995.

LÓPEZ-EDWARDS, M. et al. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, Florida, v. 82, n. 2, p. 254-262, 1999.

LUIZ, C.B.F.; MAGRO, S.R. Controle biológico das pragas da espiga, sobre parâmetros qualitativos e quantitativos na cultura do milho de safrinha em Ubiratã/PR. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.2, n.1, p. 13-21, 2007.

MANSFIELD, S.; MILLS, N.J. Host Egg Characteristics, Physiological Host Range, and Parasitism Following Inundative Releases of *Trichogramma platneri* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in Walnut Orchards. **Ecological Entomology**, v.31, p.723-731, 2002.

MARTEL, V.; DARROUZET, E.; BOIVIN, G. Phenotypic plasticity in the reproductive traits of a parasitoid. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 682-687, 2011.

MILLS, N.J.; KUHLMANN, U. The relationship between egg load and fecundity among *Trichogramma* parasitoids. **Ecological Entomology**, v.25, p.315-324, 2000.

MILONAS, P.; MAZOMENOS, B.E; KONSTANTOPOULOU, M.A. Kairomonal effect of sex pheromone components of two lepidopteran olive pests on *Trichogramma* wasps. **Insect Science**, China, v.16, p. 131-136, 2009.

MOTA, P.C. **Análise filogenética de Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae) com base nos ovos: relação com plantas hospedeiras**. 1989. 212 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.).

***Trichogramma* e o controle biológico aplicado.** Piracicaba: Fealq, 1997. p.121-150.

PINTO, J.D. A review of the New World genera of Trichogrammatidae (Hymenoptera). **Journal of Hymenoptera Research**, Washington, v.15, p. 38-163, 2006.

PRATISSOLI, D.; OLIVEIRA, H.N. Influência da idade dos ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie) no parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p. 891-896, 1999.

PRATISSOLI, D; PARRA, J.R.P. Seleção de Linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o Controle das Traças *Tuta absoluta* (Meyrick) e *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 277-282, 2001.

PRATISSOLI, D. et al. Efeito da ausência de hospedeiro e de alimento sobre aspectos biológicos de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v. 26, p. 281-286, 2004.

PRATISSOLI, D. et al. Influência da densidade de ovos de *Spodoptera frugiperda* em alguns aspectos biológicos de três espécies de *Trichogramma*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.4, n.1, p. 1-7, 2005.

PRATISSOLI, D. et al. Tabela de vida de fertilidade de cinco linhagens de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym.: Trichogrammatidae) criadas em ovos de *Tuta absoluta* (Merick) (Lep.: Gelechiidae), sob temperaturas constantes e alternadas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p. 618-622, 2007.

PRATISSOLI, D. et al. Adult Feeding and Mating Effects on the Biological Potential and Parasitism of *Trichogramma pretiosum* and *T. acacioi*(Hym.:Trichogrammatidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, p. 1057-1062, 2009.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A. Intraspecific variation in *Trichogramma bruni* Nagaraja, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) associated with different hosts. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.62, p. 665-679, 2002.

QUERINO, R.B.; ZUCCHI, R.A.; PINTO, J.D. Systematics of the Trichogrammatidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) with a Focus on the Genera Attacking Lepidoptera. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Piracicaba: Springer, 2010. p. 191-218.

ROFF, D.A. **Life History Evolution**. Sinauer Associates Inc: Sunderland, 2002.

VIANNA, U.R. et al. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effect on descendant generation. **Ecotoxicology**, v.18, n.2, p. 180-186, 2009.

VIANNA, U.R. et al. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p. 81-87, 2011.

VINSON, S.B. Comportamento da seleção hospedeira de parasitoides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (eds.)

***Trichogramma* e o controle biológico aplicado.** Piracicaba: FEALQ, 1997, p. 67-119.

VINSON, S.B. The general host selection behavior of parasitoid hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. **Biological Control**, v.11, p. 79–96, 1998.

VINSON, S.B. Nutritional Ecology of Insect Egg Parasitoids. In: CÔNSOLI, F.L.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma***. Piracicaba: Springer, 2010. p. 25-56.

## Capítulo 2

### 4 PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* EM POPULAÇÕES DE *Helicoverpa zea*

#### 4.1 RESUMO

O sucesso na utilização de *B. thuringiensis* depende de alguns fatores, entre eles, o conhecimento sobre a influência da variação populacional dos insetos e a seleção de isolados adequados para o manejo das populações. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar isolados e formulados com altos níveis de virulência para o uso no manejo de populações de *H. zea* e verificar a interferência da variação populacional nesses níveis. As populações foram coletas em duas localidades distanciadas por 107 km. Foram testados 34 isolados e os formulados comerciais Dipel<sup>®</sup> e Agree<sup>®</sup>. Os bioensaios foram realizados em bandejas contendo microtubos de acrílico, preenchidos com dieta artificial. Em cada microtubo, foi inoculado, sobre a dieta, 50 µL de cada isolado ou formulado comercial, na concentração  $3 \times 10^8$  esporos mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, 50 lagartas de primeiro ínstar foram acondicionadas individualmente, formando um determinado tratamento. A mortalidade foi avaliada diariamente até o 7º dia. Foi realizada também a estimativa da concentração letal (CL<sub>50</sub>) para os isolados e formulados mais virulentos. No teste de suscetibilidade, foi registrada variação nos níveis de virulência entre as populações, somente para isolados 984, 545, 661, 166, 685, 694 e 221, os quais não causaram elevados níveis de mortalidades. Os níveis de mortalidade mais elevados foram registrados para os isolados 21, 23, 25, 229 e para os formulados Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>. Porém, variações foram observadas na estimativa da CL<sub>50</sub> desses isolados e formulados, demonstrando que potencialmente têm ocorrido pressões de seleção diferenciais entre as populações.

Palavras-Chave: Controle microbiano. Lagarta-da-espiga. Entomopatógenos.

## 4.2 ABSTRACT

The successful utilization of *B. thuringiensis* depends on some factors, between them, the knowledge of the influence of insect population variation and selection of the isolates adequate for the management of populations. Therefore, the objective of this study was to evaluate isolated and formulated with high levels of virulence for use in the management of populations of *H. zea* and check the interference of the population variation in these levels. The populations were collected in two distant locations about 107km. Thirty-four isolates and commercial formulated Agree<sup>®</sup> and Dipel<sup>®</sup> were tested. Bioassays were done in trays containing acrylic micro tubes, filled with artificial diet. In each micro tube was inoculated on a diet, 50 ml of each isolate or commercial formulated, in a concentration  $3 \times 10^8$  spores mL<sup>-1</sup>. Subsequently, 50 first caterpillars instar were placed individually, forming a determined treatment. Mortality was daily evaluated until the 7th day. An estimate of the lethal concentration (CL<sub>50</sub>) for the isolates and more virulent formulates was also done. In the test of susceptibility, it was registered variation in the virulence levels, only for isolates 984, 545, 661, 166, 685, 694 and 221, which didn't cause elevated levels of mortality. The levels of mortality more elevated were registered for the isolates 21, 23, 25, 229 and for the formulated Agree<sup>®</sup> and Dipel<sup>®</sup>. However, variations were observed in the estimate of CL<sub>50</sub> in these isolates and formulated, showing potentially occurrence of pressure in different selections among the populations.

Keywords: Microbial control. Corn earworm. Entomopathogenic.

## 4.3 INTRODUÇÃO

A maioria dos insetos abriga no intestino uma microbiota substancial que inclui bactérias, fungos e protozoários (TERRA; FERREIRA, 2009). Por sua vez, as bactérias presentes no intestino podem ser classificadas em Gram-positivas ou negativas. Entre as Gram-positivas, algumas auxiliam na digestão dos alimentos, porém outras são patogênicas e recebem grande atenção dos pesquisadores devido ao potencial para o controle de insetos-praga (PRIEST, 2000; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Entre as bactérias entomopatogênicas, a que possui maior importância é *B. thuringiensis*, que corresponde em torno de 2% do total de inseticidas comercializados (BRAVO et al., 2011). É uma bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela sua atividade tóxica (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

O sucesso na utilização de *B. thuringiensis* depende da atenção a alguns aspectos, dentre estes, a seleção de isolados adequados para o controle de populações de insetos e estudos sobre a interferência da variação populacional (POLANCZYK et al., 2008) na eficiência desse patógeno. A variação na suscetibilidade das populações aos isolados ou formulados pode ocorrer devido a fatores como o isolamento geográfico das populações (LÓPEZ-EDWARDS et al., 1999). Esse isolamento pode gerar problemas reprodutivos (NDEMAH et al., 2001), originando populações fisiologicamente diferentes e conseqüentemente com suscetibilidade diferencial (LÓPEZ-EDWARDS et al., 1999).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi selecionar isolados e formulados com altos níveis de virulência para o uso no manejo de populações de *H. zea* e verificar a interferência da variação populacional nesses níveis.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta e criação das populações de *H. zea* ocorreu, conforme descrito no capítulo anterior.

##### **4.4.1 Obtenção e multiplicação dos isolados de *B. thuringiensis***

Foram utilizados 34 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de amostras de solo e dois formulados comerciais. Os formulados utilizados foram Dipel<sup>®</sup>, fabricado por Abbott Laboratories, lote 024-07-10 e Agree<sup>®</sup> fabricado por Bio Controle Métodos de Controles de Pragas Ltda, lote 003-09-5000. Os isolados utilizados neste experimento foram provenientes da ESALQ/USP, os quais fazem parte do banco de entomopatógenos do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI) do Centro de Ciências Agrárias da UFES.

Para multiplicação dos isolados, foi utilizado o meio de cultura BHI (“Brain Heart Infusion” ou Infusão de Cérebro e Coração - HIMEDIA), sob agitação orbital a 250 rpm por 72 h a 30 °C, para um crescimento padrão dos mesmos. Após a lise bacteriana, a mistura contendo esporos, cristais e células vegetativas foi centrifugada com o objetivo de eliminar as toxinas indesejáveis e restos de meio de cultura. Para cada isolado, o procedimento foi repetido três vezes por 20 minutos a 5.000 rpm consecutivamente. Após a última centrifugação, o material de cada isolado foi ressuspensão em água destilada estéril. Em seguida, uma alíquota de 1mL da suspensão foi diluída 100 vezes em água destilada, e a concentração de esporos determinada por meio de leitura em câmara de Neubauer<sup>®</sup>. Após a leitura, a concentração de cada isolado foi ajustada para  $3 \times 10^8$  esporos mL<sup>-1</sup> por meio de diluições sequenciais.

A concentração das suspensões dos formulados comerciais também foram ajustadas para  $3 \times 10^8$  esporos mL<sup>-1</sup>, conforme descrito para os isolados, não sendo, portanto, baseada nas recomendações do fabricante.

#### **4.4.2 Suscetibilidade das populações de *H. zea* a *B. thuringiensis***

Os ensaios para cada população foram conduzidos separadamente em câmara climatizada ( $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h). Foram realizados em bandejas confeccionadas com microtubos de acrílico de 3,0 cm x 2,0 cm de diâmetro, onde  $\frac{1}{4}$  dos tubos foram preenchidos com a mesma dieta artificial utilizada na fase de criação de *H. zea*. Posteriormente, 50  $\mu\text{L}$  de cada isolado ou formulado comercial, na concentração  $3 \times 10^8$  esporos mL<sup>-1</sup>, foi inoculado nos microtubos de acrílico.

Após a evaporação do excesso de umidade, 50 lagartas de primeiro ínstar foram acondicionadas individualmente. Cada grupo de 5 lagartas constituiu um tratamento, perfazendo, dessa forma, 10 repetições por tratamento. O mesmo procedimento foi realizado para a testemunha, mas utilizando somente água destilada estéril sobre a dieta. A avaliação do número de lagartas mortas ocorreu diariamente até o 7º dia, sendo iniciada 24h após a inoculação dos insetos.

#### 4.4.3 Estimativa da concentração letal (CL<sub>50</sub>)

Os isolados e formulados de *B. thuringiensis*, que proporcionaram mortalidade de 100%, foram submetidos a bioensaios para estimativa da CL<sub>50</sub>. Para cada concentração, também foram utilizadas 10 repetições formadas por grupos de 5 lagartas de primeiro ínstar. As condições experimentais foram as mesmas do teste de suscetibilidade. Para cada isolado ou formulado, foram testadas seis concentrações, as quais foram estabelecidas em ensaios preliminares. Para a testemunha, foi utilizada água destilada estéril. Cada ensaio foi composto por 350 lagartas. A avaliação do número de lagartas mortas ocorreu diariamente, até o 5º dia, sendo iniciada 24h após a inoculação dos insetos.

#### 4.4.4 Análise dos dados

O teste de suscetibilidade das populações de *H. zea* aos isolados e formulados foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com 37 tratamentos e 10 repetições por tratamento, perfazendo 1.850 insetos, no esquema fatorial 2x36 (populações de *H. zea* x isolados e formulados de *B. thuringiensis*). Os isolados e formulados de *B. thuringiensis* e as populações de *H. zea* foram considerados variáveis categóricas (fator fixo) e as mortalidades corrigidas obtidas em cada interação, como variáveis dependentes. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância e as médias de mortalidade corrigidas foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, quando necessário, sendo que essa correção foi feita usando a fórmula de Abbott (ALVES et al., 1998). As CL<sub>50</sub> foram estimadas por meio da análise de Probit, com o auxílio do programa computacional POLO-PC.

### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise das mortalidades no teste de suscetibilidade foi observada interação significativa entre os isolados/formulados de *B. thuringiensis* e as populações de *H. zea* ( $F_{35;648}$ ;  $P < 0,001$ ). Dessa forma, procedeu-se o desdobramento do fator isolados/formulados de *B. thuringiensis* dentro de cada nível de populações e vice-versa (Tabela 5).

Tabela 5 - Atividade de isolados e formulados de *Bacillus thuringiensis* para lagartas de primeiro ínstar de duas diferentes populações de *Helicoverpa zea* (Alegre e Itaguaçu)

Isolados/Formulados	Mortalidade (%)	
	População Alegre	População Itaguaçu
Dipel®	100,00 ± 0,00 a A	100,00 ± 0,00 a A
Agree®	100,00 ± 0,00 a A	100,00 ± 0,00 a A
Isolado 21	100,00 ± 0,00 a A	100,00 ± 0,00 a A
Isolado 23	100,00 ± 0,00 a A	100,00 ± 0,00 a A
Isolado 25	100,00 ± 0,00 a A	100,00 ± 0,00 a A
Isolado 229	100,00 ± 0,00 a A	100,00 ± 0,00 a A
Isolado 984	30,43 ± 4,34 b A	15,95 ± 5,68 c B
Isolado 545	27,82 ± 7,28 b A	0,00 ± 0,00 d B
Isolado 86	20,43 ± 5,22 c A	11,70 ± 4,60 c A
Isolado 661	20,43 ± 4,10 c A	5,95 ± 2,43 d B
Isolado 166	18,26 ± 3,82 c B	44,68 ± 6,50 b A
Isolado 685	15,65 ± 4,54 c A	1,48 ± 1,48 d B
Isolado 297	15,21 ± 6,35 c A	8,08 ± 3,82 d A
Isolado 557	12,17 ± 4,24 d A	4,46 ± 2,27 d A
Isolado 238	10,00 ± 3,43 d A	5,95 ± 2,43 d A
Isolado 975	9,56 ± 4,52 d A	15,31 ± 5,91 c A
Isolado 222	9,56 ± 4,52 d A	14,68 ± 4,17 c A
Isolado 643	8,69 ± 3,54 d A	0,00 ± 0,00 d A
Isolado 676	8,69 ± 3,54 d A	2,97 ± 1,98 d A
Isolado 559	8,26 ± 4,60 d A	15,31 ± 4,99 c A
Isolado 690	8,26 ± 4,60 d A	13,82 ± 5,22 c A
Isolado 694	7,39 ± 3,60 d B	18,93 ± 5,06 c A
Isolado 195	7,39 ± 3,61 d A	5,10 ± 3,75 d A
Isolado 466	6,08 ± 3,62 d A	4,46 ± 2,27 d A
Isolado 290	4,78 ± 3,57 d A	2,97 ± 1,98 d A
Isolado 1113	4,78 ± 3,57 d A	11,06 ± 3,64 c A
Isolado 467	3,91 ± 1,99 d A	5,95 ± 2,43 d A
Isolado 1055	3,91 ± 1,99 d A	9,57 ± 3,76 c A
Isolado 221	3,47 ± 3,47 d B	13,19 ± 4,42 c A
Isolado 267	2,60 ± 1,73 d A	1,48 ± 1,48 d A
Isolado 478	2,60 ± 1,73 d A	5,95 ± 2,43 d A
Isolado 87	2,60 ± 1,73 d A	11,70 ± 4,60 c A
Isolado 1179	1,30 ± 1,30 d A	8,72 ± 5,75 d A
Isolado 66	1,30 ± 1,30 d A	6,59 ± 3,82 d A
Isolado 167	1,30 ± 1,30 d A	1,48 ± 1,48 d A
Isolado 619	0,00 ± 0,00 d A	1,48 ± 1,48 d A

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente (Scott-Knott 5%). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente (Teste F 5%).

Nessa avaliação, os isolados 984, 545, 661, 166, 685, 694 e 221 apresentaram diferenças nos níveis de virulência entre as populações, no entanto esses isolados não se destacaram como os mais virulentos.

Em ambas as populações de *H. zea*, os formulados comerciais Dipel<sup>®</sup>, Agree<sup>®</sup> e os isolados 21, 23, 25, 229 foram os mais agressivos, provocando a morte de 100% das lagartas (Tabela 5). Entretanto, a mortalidade para todos os outros isolados independentes da população hospedeira ficou abaixo de 50%, sendo que, na população de Alegre, os isolados 984, 545, 86 e 661 apresentaram mortalidade entre 20 e 31%, os isolados 166, 685, 297, 557 e 238, entre 10 e 20%. Os demais isolados apresentaram mortalidades abaixo de 10% (Tabela 5). Já para a população de *H. zea* de Itaguaçu, apenas um isolado (166) apresentou mortalidade elevada (44,68%). Entre os demais, dez isolados (984, 86, 975, 222, 559, 690, 694, 1113, 221, 87) apresentaram mortalidade entre 10 e 20% e os 19 isolados restantes obtiveram mortalidade inferior a 10%. Esses resultados mostram que os isolados 21, 23, 25, 229 e os formulados Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup> são promissores para o manejo de *H. zea* independente da variação populacional e podem ser usados em futuros trabalhos para o controle dessa espécie.

Variação na mortalidade de *H. zea* já foi registrada por Santos Junior et al. (2009), sendo que para os 13 isolados e dois formulados testados por esses autores, nove apresentaram mortalidade corrigida acima de 90% e seis apresentaram valores inferiores a 34%. Além disso, estudos com isolados evidenciaram que em alguns casos a maioria deles pode apresentar baixa virulência, como registrado no presente estudo. Por exemplo, Loguercio et al. (2001) testaram 3.408 isolados nativos e somente 3,3% causaram mortalidade acima de 75%, sendo que 52% mostraram-se pouco ativos (0 a 10%). Polanczyk; Alves e Padulla (2005) testaram 83 isolados em lagartas de *S. frugiperda* e registraram mortalidades inferiores a 30% para a maioria deles.

Já as diferenças na ação de *B. thuringiensis* entre as populações registradas neste trabalho corroboram com estudo realizado no México por Aguilar-Medel et al. (2007), no qual foram observadas diferenças entre quatro populações de *H. zea*. Da mesma forma, estudos com outras espécies de Noctuídeos também avaliaram diferenças populacionais na suscetibilidade a *B. thuringiensis*. López-Edwards et al. (1999), utilizando cinco populações de *S. frugiperda* coletadas no México, observaram que diferenças ocorrem entre algumas populações. Essa diferença foi correlacionada ao isolamento geográfico das populações de *S. frugiperda*, que resultou em um

consequente isolamento reprodutivo, originando populações fisiologicamente diferentes e com suscetibilidade diferencial para o *B. thuringiensis*.

No Brasil, estudos com *S. frugiperda* também registraram variações na suscetibilidade a *B. thuringiensis*. Polanczyk; Alves e Padulla (2005) verificaram diferenças em três populações, sendo elas provenientes dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul. Do total de 83 isolados testados, foram encontradas diferenças em 39. Já Pratisoli et al. (2007) verificaram diferenças somente em dois isolados (6,45%), para os 31 testados entre populações de Minas Gerais e do Espírito Santo, concluindo que esse fato pode ser explicado pela proximidade geográfica entre as cidades de Sete Lagoas (Minas Gerais) e Alegre (Espírito Santo), onde as populações foram coletadas.

No entanto, populações de *Helicoverpa armigera* (HÜBNER, 1808) da Austrália, coletadas nos mesmos locais e também em localidades próximas, apresentaram diferenciação genética (SCOTT et al., 2003,2005) capazes de alterar o efeito de entomopatógenos, como registrado no presente estudo. Esse fato demonstra que a escala geográfica não é um bom fator para prever variações na suscetibilidade a *B. thuringiensis*, pois essas variações existentes provavelmente estão ligadas a adaptações das populações ao seu habitat, o que deve originar uma grande variação fisiológica entre as populações, refletida na eficiência de determinados isolados.

Variações na ação de *B. thuringiensis* entre populações de Noctuídeos como *H. zea*, estão ligadas a alterações que podem ser explicadas por uma série de fatores, relacionados ou não, ligados ao modo de ação desse patógeno, como: dissolução do cristal, ativação da protoxina e ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal. Em relação aos receptores das toxinas Cry, alterações fisiológicas e histológicas causadas pelo isolamento geográfico das populações podem levar a alterações qualitativas e quantitativas neles. Esse fato resulta em suscetibilidade diferencial a um determinado isolado de *B. thuringiensis*. (POLANCZYK; ALVES; PADULLA, 2005), pois a relação entre as proteínas Cry e as proteínas da superfície localizada nas microvilosidades das células intestinais das lagartas é muito específica (BRAVO et al., 2011).

Na estimativa da concentração letal (CL<sub>50</sub>), houve acréscimo na porcentagem de mortalidade das lagartas de *H. zea* com o aumento da concentração de esporos,

independente da população (Tabela 6). Além disso, em todas as avaliações os dados adequaram-se ao modelo de Probit, mostrando um qui-quadrado não significativo e baixa heterogeneidade. Com a análise dos intervalos de confiança, foi possível determinar diferenças significativas entre as populações para os formulados Agree® e Dipel® (Tabela 6), sendo que a maior virulência em ambos os formulados ocorreu na população de Itaguaçu, evidenciada por meio dos menores valores de CL<sub>50</sub> registrados em relação à população de Alegre (Tabela 6). Essa diferença não está provavelmente ligada a diferentes pressões de seleção exercida pela aplicação desses produtos, pois em ambos os locais de coletas das populações a aplicação deles nunca ocorreu, segundo informações dos proprietários das áreas de plantio.

Tabela 6 - Curvas de concentração versus mortalidade e estimativa da CL<sub>50</sub> de diferentes isolados e formulados de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de primeiro ínstar, pertencentes a populações de *Helicoverpa zea* (25 ± 0,5°C, UR de 65 ± 5% e fotofase de 14 h).

População	Isolado/ Formulado	Inclinação ±EPM	CL <sub>50</sub> (esporos/ml) (IC a 95%)	GL	χ <sup>2</sup>
ALEGRE	21	0,9 ± 0,19	1,34 x 10 <sup>6</sup> (3,00 x 10 <sup>5</sup> – 3,03 x 10 <sup>6</sup> )	5	9,87
ITAGUAÇU	21	1,7 ± 0,31	2,01 x 10 <sup>5</sup> (8,25 x 10 <sup>4</sup> - 4,00 x 10 <sup>5</sup> )	3	4,12
ALEGRE	23	1,2 ± 0,17	6,55 x 10 <sup>5</sup> (4,19 x 10 <sup>5</sup> – 9,34 x 10 <sup>5</sup> )	5	2,51
ITAGUAÇU	23	1,1 ± 0,11	2,62 x 10 <sup>5</sup> (1,03 x 10 <sup>5</sup> - 5,55 x 10 <sup>5</sup> )	3	3,14
ALEGRE	25	1,0 ± 0,12	3,90 x 10 <sup>5</sup> (2,29 x 10 <sup>5</sup> – 6,29 x 10 <sup>5</sup> )	3	2,39
ITAGUAÇU	25	1,5 ± 0,20	2,02 x 10 <sup>5</sup> (8,09 x 10 <sup>4</sup> – 4,16 x 10 <sup>5</sup> )	3	4,00
ALEGRE	229	0,9 ± 0,90	3,89 x 10 <sup>5</sup> (1,78 x 10 <sup>5</sup> – 6,44 x 10 <sup>5</sup> )	4	1,50
ITAGUAÇU	229	9,4 ± 0,99	2,93 x 10 <sup>5</sup> (7,61 x 10 <sup>4</sup> – 7,88 x 10 <sup>5</sup> )	4	6,78
ALEGRE	AGREE®	1,5 ± 0,18	3,44 x 10 <sup>6</sup> (2,49 x 10 <sup>6</sup> – 4,65 x 10 <sup>6</sup> )	4	3,87
ITAGUAÇU	AGREE®	2,3 ± 0,32	3,64 x 10 <sup>5</sup> (2,85 x 10 <sup>5</sup> – 4,48 x 10 <sup>5</sup> )	3	2,21
ALEGRE	DIPEL®	4,5 ± 0,91	1,31 x 10 <sup>6</sup> (9,92 x 10 <sup>5</sup> – 1,64 x 10 <sup>6</sup> )	5	6,46
ITAGUAÇU	DIPEL®	1,8 ± 0,21	4,33 x 10 <sup>5</sup> (3,39 x 10 <sup>5</sup> – 5,59 x 10 <sup>5</sup> )	3	1,57

Analisando separadamente cada população, foi possível verificar variações na virulência somente na população de Alegre (Tabela 6). Variações desse tipo na  $CL_{50}$  já foram observadas em alguns estudos com *H. zea*, utilizando principalmente toxinas produzidas em plantas Bt (KARIM; GOULD; DEAN, 2000; ALI; LUTTRELL, 2009). A variação na população de Alegre demonstrou que os isolados 23, 25 e 229 possuem maior virulência em relação ao isolado 21 e aos formulados Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup> (Tabela 6). Porém, não foi possível determinar o isolado mais virulento, uma vez que não houve diferença significativa entre eles. No entanto, os valores de  $CL_{50}$  foram baixos, indicando a adequação destes para o controle dessa população. Já na população de Itaguaçu, não foi possível determinar o isolado/formulado mais virulento, pois as  $CL_{50}$  que variaram de 2,01 a  $4,33 \times 10^5$ , não apresentaram diferenças entre os intervalos de confiança a 95%.

As inclinações das curvas de concentração-mortalidade dos formulados e isolados também variaram entre as populações (Tabela 6). Nos isolados 21, 25, 229 e no formulado Agree<sup>®</sup>, pode-se observar uma menor inclinação das curvas para a população de Alegre. Entretanto, para o formulado Dipel<sup>®</sup> e para o isolado 23, a menor inclinação foi observada para a população de Itaguaçu (Tabela 6). A inclinação dessa curva indica a variabilidade entre os indivíduos da população (KERNS; GAYLOR, 1992). Curvas com menor inclinação indicam maior variabilidade genética, sugerindo a presença de mais de um genótipo na população, ou seja, uma maior heterogeneidade de resposta ao bioinseticida (SIQUEIRA; GUEDES; PIKANÇO, 2000), que pode resultar na resistência dessas populações aos bioinseticidas. Isso mostra que potencialmente têm ocorrido pressões de seleção diferencial e/ou diversidade genética entre as populações, o que pode explicar a variabilidade observada nesses resultados. Porém, como mencionado anteriormente, essas pressões de seleção não são decorrentes do contato com formulados de *B. thuringiensis*.

No entanto, deve-se ressaltar que o comportamento desses isolados e formulados em condições de campo pode sofrer variações mediante a influência de fatores bióticos e abióticos (SANTOS JUNIOR et al., 2009), o que poderá modificar os níveis de virulência obtidos nas populações.

#### 4.6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que houve variabilidade nos níveis de virulência entre as populações para os isolados 984, 545, 661, 166, 685, 694 e 229, demonstrando que potencialmente têm ocorrido pressões de seleção diferenciais entre as populações. Os isolados e formulados mais promissores para o manejo de populações de *H. zea* foram 21, 23, 25, 229, Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

- AGUILAR-MEDEL, S. et al. Susceptibilidad de *Helicoverpa zea* (Boddie) a la  $\delta$ -endotoxina Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Agrociencia**, México, v. 41, p. 653-662, 2007.
- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Response Estimates for Assessing Heliothine Susceptibility to Bt Toxins. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 102, p.1935-1947, 2009.
- ALVES, S.B. et al. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.765-778.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431, 2011.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000.
- KARIM, S.; GOULD, F.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* d-Endotoxin proteins show a correlation in toxicity and short circuit current inhibition against *Helicoverpa zea*. **Current Microbiology**, v. 41, p. 214–219, 2000.
- KERNS, D.L.; GAYLOR, M.J. Insecticide resistance in field populations of the cotton aphid (Homoptera: Aphididae). **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 85, p. 1-8, 1992.
- LOGUERCIO, L.L. et al. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a cry constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**, Reino Unido, v. 32, p. 362-367, 2001.
- LÓPEZ-EDWARDS, M. et al. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, Florida, v. 82, n. 2, p. 254-262, 1999.
- NDEMAH, R. et al. Distribution, relative importance and effect of lepidopterous borers on maize yields in forest zone and mid-altitude of Cameroon. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 94, p. 1434–1444, 2001.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociencia**, México, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

- POLANCZYK, R.A.; ALVES, S.B.; PADULLA, L.F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biopesticides International**, Jalandhar, v. 1, n. 1/2, p. 114-124, 2005.
- POLANCZYK, R.A. et al. Utilização de *Bacillus thuringiensis* visando ao controle de pragas agrícolas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Org.). **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.111-136.
- PRATISSOLI, D. et al. Efeito entomotóxico de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* em duas populações de *Spodoptera frugiperda* oriundas de Minas Gerais e do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.6, n.2, p.140-148, 2007.
- PRIEST, F.G. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.p.1-22.
- SANTOS JUNIOR, H. J. G. et al. Suscetibilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.4, p.635-641, 2009.
- SCOTT, K.D. et al. Genetic shifts in *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) over a year in the Dawson/Callide Valleys. **Australian Journal of Agricultural Research**, Austrália, v. 54, p. 739–744, 2003.
- SCOTT, K.D. et al. Assessing moth migration and population structuring in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) at the regional scale: example from the Darling Downs, Australia. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 98, p. 2210–2219, 2005.
- SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepdoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, Reino Unido, v. 2, p. 147-153, 2000.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Fisiologia molecular e evolutiva do processo digestivo dos insetos. In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (Ed.) **Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.p. 175-210.

### Capítulo 3

## 5 INTERAÇÃO ENTRE *Bacillus thuringiensis* E *Trichogramma* sp. EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Helicoverpa zea*

### 5.1 RESUMO

A utilização conjunta de agentes de controle biológico em agroecossistemas é uma premissa do manejo de insetos em campo, sendo que estudos são necessários para avaliar os efeitos dessa interação. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aplicação de *B. thuringiensis* sobre as características biológicas de *Trichogramma* sp. em populações do hospedeiro *H. zea*. Para isso, cartelas com ovos de duas populações de *H. zea* foram pulverizados com diferentes isolados e formulados de *B. thuringiensis* em Torre de Potter na concentração de  $3 \times 10^8$  esporos/mL e oferecidas para *Trichogramma* sp. O parasitismo das cartelas foi permitido por 24 horas. Após esse período, as cartelas foram retiradas e as fêmeas armazenadas em câmara de incubação para a avaliação da longevidade delas. Após a emergência e morte dos parasitoides descendentes, foram analisadas as características biológicas de parasitismo (%), emergência dos indivíduos (%), razão sexual e número de adultos gerados por ovo. Foi observada que a interação entre alguns isolados e populações de *Trichogramma* pode otimizar o controle de determinadas populações de *H. zea*, pois houve aumento na percentagem de parasitismo de *Trichogramma* sp. com a aplicação dos isolados 21, 23, 229 e do formulado Agree<sup>®</sup> sobre os ovos da população de *H. zea* de Alegre. Entretanto, alterações negativas foram registradas na população de Itaguaçu para as características de emergência de indivíduos e número de adultos gerados por ovo hospedeiro. Esse fato evidencia que, para o sucesso na utilização desses agentes em conjunto, é preciso realizar estudos detalhados sobre quais isolados de *B. thuringiensis* e populações de *Trichogramma* possuem interação positiva para o manejo de diferentes populações de *H. zea*.

Palavras-chave: Trichogrammatidae. Entomopatógenos. Manejo Integrado.

## 5.2 ABSTRACT

The joint use of biological control agents in the agroecosystems is a premise of insect management in the field, being that studies are necessary to evaluate the effects of these interactions. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of application of *B. thuringiensis* on the biological characteristics of *Trichogramma* sp. in host population of *H. zea*. Due to this, cardboards with eggs of the two populations of *H. zea* were sprayed with different isolates and formulate of *B. thuringiensis* in Potter's Tower in the concentrations of  $3 \times 10^8$  spores/mL and offered to *Trichogramma* sp. The parasitism of the cardboard was allowed for twenty-four hours. After this period, the cardboards were removed and the females were stored in the incubation chamber for assessment of longevity. After the emergence and death of the descendants parasitoids, was analyzed the biological characteristics of the parasitism (%), emergence of individuals (%), sex ratio and number of adults generated per egg. It was observed that the interaction between some isolates and population of *Trichogramma* can optimize the control of determined populations of *H. zea* because there was an increase in the percentage of parasitism of *Trichogramma* sp. with the application of isolates 21, 23, 229 and the formulated Agree<sup>®</sup> on the eggs of the population *H. zea* in Alegre. Nevertheless, negative alterations were registered in the population of Itaguaçu to the emergent characteristics of individuals and number of adults generated per host egg. This fact shows that for successful utilizations of these agents together, it is needed to realize detailed studies about which isolates of *B. thuringiensis* and populations of *Trichogramma* have positive interaction for the management of different populations of *H. zea*.

Keywords: Entomopathogenic, Thrichogrammatidae, Integrated Management.

## 5.3 INTRODUÇÃO

O aumento da atividade agrícola tem provocado um desequilíbrio ecológico, fazendo-se necessária a utilização de produtos seletivos que não afetem o equilíbrio entre insetos-praga e seus inimigos naturais (DENT, 2000). Além disso, a interação entre agentes de controle em agroecossistemas é uma premissa do manejo de insetos em campo. Para a correta utilização desses métodos em conjunto, estudos

são necessários para avaliar os possíveis efeitos dessa interação (POLANCZYK et al., 2006).

Entre os agentes de controle, pode-se destacar o uso da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* e o parasitoide de ovos do gênero *Trichogramma*. A primeira é uma bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). O segundo agente de controle, *Trichogramma*, é capaz de parasitar mais de 200 espécies de insetos causadores de danos econômicos, principalmente da ordem Lepidoptera (PRATISSOLI et al., 2004; DELPUECH; DUPONT; ALLEMAND, 2010), sendo utilizado em vários países.

Estudos realizados para avaliar o potencial do uso conjunto desses dois agentes demonstram poucas alterações do *B. thuringiensis* sobre as características biológicas de *Trichogramma* spp., principalmente através da presença de *B. thuringiensis* no alimento e nos ovos submetidos ao parasitoide (POLANCZYK et al., 2006; PRATISSOLI et al., 2006; BERNARDES, 2009; SANTOS JUNIOR, 2009; VIANNA et al., 2009; FERREIRA, 2010). No entanto, as alterações nas características biológicas de *Trichogramma* são variadas nesses estudos, sugerindo que fatores relacionados à população hospedeira, espécie do parasitoide ou isolado de *B. thuringiensis*, podem influenciar essa interação.

Utilizando os agentes de controle biológico, *B. thuringiensis* e *Trichogramma*, foi avaliado neste estudo os efeitos da aplicação de *B. thuringiensis* sobre as características biológicas de *Trichogramma* sp. em diferentes populações do hospedeiro *H. zea*.

#### 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta e criação das populações de *H. zea* e a criação dos parasitoides ocorreu conforme descrito no capítulo 1. A obtenção e a multiplicação dos isolados de *B. thuringiensis* ocorreu conforme descrito no capítulo 2.

#### 5.4.1 Efeitos de *B. thuringiensis* sobre as características biológicas de *Trichogramma* sp.

Para investigar os possíveis efeitos dessa relação em cada população de *H. zea*, foram confeccionadas cartelas de cartolina azul celeste (2,5 x 0,5 cm), contendo ovos das populações de *H. zea* colados com goma arábica a 10%. Os experimentos em cada população de *H. zea* foram conduzidos separadamente. Para cada população, foram utilizadas 105 cartelas contendo 15 ovos cada. A cada grupo de 15 cartelas, foi pulverizada uma suspensão com os isolados ou formulados selecionados (21, 23, 25, 229, Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>) e o controle (água destilada esterelizada), totalizando assim 15 repetições por tratamento. As pulverizações foram realizadas com auxílio de Torre de Potter à pressão de 15 libras pol<sup>-2</sup>, aplicando-se um volume de 6 mL sobre as cartelas. Após a pulverização, as cartelas foram secas em capela de fluxo para eliminar o excesso de água.

Em seguida, foram individualizadas 105 fêmeas recém-emergidas de *Trichogramma* sp., em tubos (4 x 1 cm), contendo uma gotícula de mel em sua parede para a alimentação. Cada fêmea recebeu uma cartela azul celeste (2,5 x 0,5cm), previamente pulverizada. Os experimentos foram mantidos em câmaras climatizadas, reguladas a temperaturas de 25 ± 0,5°C, UR de 65 ± 5% e fotofase de 14 horas.

Os ovos utilizados possuíam idade de 0 a 24 horas, sendo essa a idade de maior parasitismo em ovos de *H. zea*, de acordo com Pratissoli; Oliveira (1999). O parasitismo foi permitido por 24 horas. Após esse período, as cartelas contendo os ovos parasitados foram transferidas para outros tubos com as mesmas dimensões e acondicionadas em câmara climatizada (25 ± 0,5°C, UR de 65 ± 5% e fotofase de 14h). A longevidade das fêmeas que parasitaram as cartelas foi acompanhada diariamente para verificar possíveis efeitos letais do *B. thuringiensis*.

Para evitar a utilização dos ovos parasitados como recurso alimentar pelas lagartas emergidas dos ovos que não sofreram parasitismo, foi realizado um monitoramento diário até o quinto dia após o parasitismo. Esse período de monitoramento foi baseado no limite máximo de tempo necessário para a eclosão das lagartas de *H. zea*, avaliado durante a criação em laboratório. Quando as lagartas foram detectadas nesse período de monitoramento, estas foram retiradas com auxílio de um pincel e eliminadas. Após a emergência e morte dos parasitoides descendentes,

foram analisadas as seguintes características biológicas: parasitismo (%), emergência dos indivíduos (%), razão sexual e número de adultos gerados por ovo.

#### 5.4.2 Análise dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições para cada combinação *Trichogramma/B. thuringiensis*. A análise das possíveis alterações nas características biológicas de *Trichogramma*, provocada pelos isolados/formulados de *B. thuringiensis*, foi realizada separadamente em cada população de *H. zea*. Essa medida foi adotada mediante a constatação prévia de que a espécie do parasitoide utilizada apresenta diferenças nas características biológicas, provocadas pela variação populacional de *H. zea*. Sendo assim, para cada análise, foi utilizada uma Análise de Variância, a de 5% probabilidade, considerando a espécie de *Trichogramma* e os isolados/formulados de *B. thuringiensis* como variáveis categóricas (fator fixo) e as características biológicas obtidas em cada interação, como variáveis dependentes. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, quando necessário.

### 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação dos isolados 21, 25, 229 e do formulado comercial Agree<sup>®</sup> potencializou o parasitismo na população hospedeira coletada em Alegre ( $F_6=3,53$ ;  $P=0,003$ ) (Tabela 7), porém não apresentou potencialização na população de Itaguaçu ( $F_6=1,86$ ;  $P=0,094$ ) (Tabela 8).

Essa ausência de efeito provocada por *B. thuringiensis* nas características biológicas de *Trichogramma* sp. obtida na população de *H. zea* de Itaguaçu já foi verificada em alguns estudos (WANG et al., 2007, SANTOS JUNIOR, 2009), inclusive em milho geneticamente modificado expressando as proteínas inseticidas Cry1A(b) e VIP 3A (FERNANDES et al., 2007), demonstrando a variação dos efeitos dessa interação.

Tabela 7 - Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre as características biológicas de percentagem de parasitismo, percentagem de emergência e número de adultos gerados por ovo de *Trichogramma* sp., utilizando uma população do hospedeiro *Helicoverpa zea* coletada no município de Alegre-ES ( $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h)

Tratamentos	Características Biológicas de <i>Trichogramma</i>		
	<sup>1</sup> Parasitismo (%)	<sup>2</sup> Emergência de indivíduos (%)	<sup>2</sup> Adultos por ovo
Tsp. + Controle	83,10 ± 3,67 b	100,00 ± 0,00 a	1,45 ± 0,07 a
Tsp. + Dipel <sup>®</sup>	79,99 ± 3,44 b	100,00 ± 0,00 a	1,40 ± 0,06 a
Tsp. + Agree <sup>®</sup>	89,77 ± 2,33 a	100,00 ± 0,00 a	1,32 ± 0,10 a
Tsp. + 21	92,44 ± 1,82 a	100,00 ± 0,00 a	1,35 ± 0,08 a
Tsp. + 23	83,10 ± 4,50 b	100,00 ± 0,00 a	1,35 ± 0,08 a
Tsp. + 25	93,33 ± 1,45 a	100,00 ± 0,00 a	1,29 ± 0,07 a
Tsp. + 229	92,44 ± 6,45 a	100,00 ± 0,00 a	1,46 ± 0,12 a

<sup>1</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente (Scott-Knott 5%).

<sup>2</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente (Teste F 5%).

As diferenças encontradas na população de Alegre, entretanto, são resultantes do fenômeno conhecido como hormese. Esse fenômeno é caracterizado pela presença de respostas biológicas favoráveis a organismos benéficos quando expostos aos agentes estressores em quantidades pequenas, como efeitos estimulatórios (FORBES, 2000; BESTETE, 2011). Isso sugere que a concentração utilizada do agente estressor *B. thuringiensis* ( $3 \times 10^8$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ ) não ameaça os indivíduos de *Trichogramma* sp.

Resultados semelhantes foram registrados na interação entre isolados de *B. thuringiensis* e *Trichogramma pratissolii* (QUERINO; ZUCCHI, 2003), utilizando ovos de *A. kuehniella*. Neste estudo, pode-se verificar que os parasitoides que receberam alimento contaminado com *B. thuringiensis* atingiram o nível de parasitismo acumulado de 80% mais rápido do que os parasitoides que não receberam alimento contaminado, ou seja, houve aceleração do parasitismo provocado pelo contato com *B. thuringiensis* (PRATISSOLI et al., 2006).

Acréscimo no número total de ovos parasitados por indivíduos de *T. pretiosum*, que ingeriram alimento contaminado por *B. thuringiensis*, foram verificados utilizando ovos de *A. gemmatalis* como hospedeiro (BERNARDES, 2009). Nesse caso, a hormese deve ocorrer por meio de alterações nos processos fisiológicos, provocadas pela ingestão da toxina produzida por essa bactéria, porém os detalhes dessas alterações fisiológicas não foram esclarecidos.

Em estudo conduzido por Ferreira (2010), no qual as cartelas com os ovos de *S. frugiperda* foram imersas em soluções com *B. thuringiensis*, também foi registrado aumento do parasitismo desses tratamentos, em relação ao controle, que foi constituído pela imersão das cartelas em água destilada esterilizada. Esse fato demonstra que, assim como no presente estudo, onde *B. thuringiensis* foi pulverizado sobre as cartelas com os ovos das populações hospedeiras, o parasitoide não precisa necessariamente ingerir a toxina para sofrer alterações. Isso sugere que o fenômeno da hormese não é necessariamente decorrente das alterações fisiológicas provocadas pela ingestão das toxinas, pois tanto na imersão das cartelas como na pulverização delas por *B. thuringiensis*, a ingestão provavelmente não ocorre. Porém, independente dos fatores que promovam esse fenômeno, deve-se considerara relevância dele para o manejo dos insetos em campo.

A percentagem de emergência dos indivíduos foi alterada somente na população de Itaguaçu ( $F_6=17,99$ ;  $P<0,0001$ ), sendo que para a população de Alegre houve 100% de emergência em todos os tratamentos. As alterações na população de Itaguaçu foram observadas nas interações do parasitoide com os isolados 21, 23 e 229, sendo registrada a menor emergência nesse último isolado (Tabela 8).

Alterações na emergência dos indivíduos também foram observadas por Pratissoli et al. (2006), porém estiveram ausentes no estudo desenvolvido por Vianna et al. (2009), evidenciando a variação das características biológicas de acordo com o isolado de *B. thuringiensis* e a população do parasitoide utilizada. Nos casos em que essa redução ocorrer, deve-se realizar mais liberações massais do parasitoide para alcançar os resultados esperados.

O número de adultos gerados por ovo do hospedeiro só foi alterado pelo isolado 229 na população de Itaguaçu ( $F_6=7,87$ ;  $P<0,0001$ ), ressaltando o efeito que esse isolado exerceu sobre o desenvolvimento do parasitoide nessa população (Tabela 8). Entre os demais tratamentos, o valor ficou em torno de um, sendo essa uma vantagem maior no desenvolvimento de espécies de *Trichogramma*, pois uma quantidade maior de nutrientes estará disponível para a assimilação e desenvolvimento do parasitoide, gerando, com isso, indivíduos maiores e mais competitivos (BESSERA; DIAS; PARRA, 2003).

Tabela 8 - Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre as características biológicas de percentagem de parasitismo, percentagem de emergência e número de adultos gerados por ovo de *Trichogramma* sp., utilizando uma população do hospedeiro *Helicoverpa zea* coletada no município de Itaguaçu-ES ( $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , UR de  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14 h)

Tratamentos	Características Biológicas de <i>Trichogramma</i>		
	<sup>2</sup> Parasitismo (%)	<sup>1</sup> Emergência de indivíduos (%)	<sup>1</sup> Adultos por ovo
Tsp. + Controle	86,66 $\pm$ 2,83 a	93,42 $\pm$ 1,91 a	1,62 $\pm$ 0,12 a
Tsp. + Dipel <sup>®</sup>	76,44 $\pm$ 7,40 a	72,81 $\pm$ 9,85 a	1,59 $\pm$ 0,20 a
Tsp. + Agree <sup>®</sup>	79,10 $\pm$ 8,49 a	83,25 $\pm$ 11,46 a	1,37 $\pm$ 0,18 a
Tsp. + 21	87,55 $\pm$ 8,50 a	49,51 $\pm$ 8,66 b	1,59 $\pm$ 0,20 a
Tsp. + 23	82,21 $\pm$ 8,39 a	27,61 $\pm$ 7,43 c	1,10 $\pm$ 0,22 a
Tsp. + 25	84,88 $\pm$ 3,47 a	66,86 $\pm$ 9,34 a	1,24 $\pm$ 0,14 a
Tsp. + 229	76,88 $\pm$ 4,15 a	7,83 $\pm$ 5,13 c	0,30 $\pm$ 0,17 b

<sup>1</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente (Scott-Knott 5%).

<sup>2</sup>Médias ( $\pm$  EP) seguidas da mesma letra minúscula nas colunas, não diferem estatisticamente (Teste F 5%).

A razão sexual não foi influenciada pela aplicação de *B. thuringiensis* nas populações de Alegre ( $F_6=1,33$ ;  $P=0,250$ ) e Itaguaçu ( $F_6=0,58$ ;  $P=0,739$ ), variando de 0,91 a 0,94 na população de Alegre e de 0,91 a 0,96 na população de Itaguaçu. Valores desse nível são desejáveis em programas de controle biológico, pois quanto maior o número de fêmeas, maior o potencial de controle (VIANNA et al., 2011).

A longevidade também não diferiu para as populações de Alegre ( $F_6=0,98$ ;  $P=0,437$ ) e Itaguaçu ( $F_6=0,43$ ;  $P=0,857$ ), sendo registrada variação de 2,53 a 3,53 na população de Alegre e de 5,60 a 6,46 para a população de Itaguaçu. Isso demonstra que, mesmo sendo capaz de alterar algumas características biológicas do parasitoide, *B. thuringiensis* não é patogênico para espécies de *Trichogramma*, ressaltando a importância da utilização desses dois métodos no manejo de populações de *H. zea* em campo.

## 5.6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a interação entre alguns isolados e populações de *Trichogramma* pode otimizar o controle de determinadas populações de *H. zea*. Entretanto, alterações negativas podem ocorrer em determinadas características biológicas dos parasitoides, evidenciando que para o sucesso na utilização desses agentes em conjunto, é preciso realizar estudos detalhados sobre quais isolados de

*B. thuringiensis* e populações de *Trichogramma* possuem interação positiva para o manejo de diferentes populações de insetos.

## 5.7 REFERÊNCIAS

- BERNARDES, C.O. **Atividade de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) em *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2009.
- BESERRA, E.B.; DIAS, C.T.S.; PARRA, J.R.P. Características biológicas de linhagens de *Trichogramma pretiosum* desenvolvidas em ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 25, p. 479-483, 2003.
- BESTETE, L.R. **Produtos alternativos e associação com *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym.:Trichogrammatidae) visando o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) em tomateiro**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.
- DELPUECH, J.M.; DUPONT, C.; ALLEMAND, R. Decrease in Fecundity Induced by Interspecific Mating Between Two *Trichogramma* Parasitoid Species. **Journal of Economic Entomology**, Washington, v. 39, n. 2, p. 535-544, 2010.
- DENT, D. **Insect pest management**. Cambridge: Cabi Bioscience, 2000.
- FERNANDES, O.A. Short-term assessment of Bt maize on non-target arthropods in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 3, p.249-255, 2007.
- FERREIRA, L.S. **Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera:Trichogrammatidae) para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e suas interações**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2010.
- FORBES, V.E. Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology**, Reino Unido, v. 14, p. 12-24, 2000.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley& Sons, 2000.
- POLANCZYK, R.A. et al. Interação entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 233-239, 2006.
- PRATISSOLI, D.; OLIVEIRA, H.N. Influência da idade dos ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie) no parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.891-896, 1999.
- PRATISSOLI, D. et al. Efeito da ausência de hospedeiro e de alimento sobre aspectos biológicos de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera:

Trichogrammatidae). **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v. 26, p.281-286, 2004.

PRATISSOLI, D. et al. Desempenho de *Trichogramma pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera, Trichogrammatidae) em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) sob efeito de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.369-377, 2006.

SANTOS JUNIOR, H.J.G. dos. **Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) e populações de *Trichogramma* spp. (Westwood) (Hym.:Trichogrammatidae) para o controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae)**. 2009. 65 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

VIANNA, U.R. et al. Insecticide toxicity to *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) females and effect on descendant generation. **Ecotoxicology**, v.18, n.2, p. 180-186, 2009.

VIANNA, U.R. et al. Espécies e/ou linhagens de *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para o controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.81-87, 2011.

WANG, Z.Y.; WU, Y.; HE, K.L.; BAI, S.X. Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostrinia* in laboratory conditions. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v.60, p. 49-55, 2007.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Os agentes de controle biológico *Trichogramma* spp. e *B. thuringiensis* se mostraram adequados para o manejo de populações de *H. zea*. De acordo com as características relevantes para o uso deles, pode-se destacar a população *Trichogramma* sp. pelo elevado parasitismo, a população de *T. acacioi*, pelo grande número de fêmeas produzidas, os isolados 21, 23, 25, 229 e os formulados Agree<sup>®</sup> e Dipel<sup>®</sup>, pela alta virulência. Além disso, o uso conjunto desses agentes gerou poucos efeitos negativos e em alguns casos até potencializou o parasitismo de *Trichogramma* sp., evidenciando que o uso desses agentes em conjunto pode aumentar a eficiência no manejo das populações de *H. zea*. No entanto, essa potencialização foi registrada somente em uma população de *H. zea* e com a aplicação de determinados isolados e formulados, o que sugere que estudos futuros devem investigar quais isolados de *B. thuringiensis* e populações de *Trichogramma* apresentam interação positiva para o manejo de populações de *H. zea*. Entretanto, sugere-se que essas investigações sejam realizadas com parasitoides e formulados existentes comercialmente, o que facilitaria o uso integrado deles pelos agricultores.

Alterações ocasionadas pela diferença populacional nas características biológicas de *Trichogramma* e nos níveis de virulência dos isolados e formulados de *B. thuringiensis* foram registradas. Entretanto, essas variações não foram suficientes para gerar níveis indesejáveis dessas características no manejo das populações de *H. zea*. Porém, estudos detalhados são necessários para verificar se em diferentes escalas geográficas podem existir variações maiores, capazes de comprometer o uso desses agentes.