

CAROLINA DE OLIVEIRA BERNARDES

**ATIVIDADE DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EM
Trichogramma pretiosum (HYMENOPTERA:
TRICHOGRAMMATIDAE) E *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

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. Ricardo Antonio Polanczyk

Coorientador: Prof. Dr. Dirceu Pratissoli

ALEGRE
2009

CAROLINA DE OLIVEIRA BERNARDES

**ATIVIDADE DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) EM
Trichogramma pretiosum (HYMENOPTERA:
TRICHOGRAMMATIDAE) E *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

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 10 de dezembro de 2009.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Ulysses Rodrigues Vianna
Universidade Federal do Espírito Santo

Dr. Dori Edson Nava
(Embrapa)

DEDICO

Aos meus pais, Roberto e Sandra,

a minha irmã, Roberta

e ao meu namorado, Patrick.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre me dando força e me mostrando os caminhos por onde devo percorrer para superar os obstáculos da vida.

A minha família, pelo imenso apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI) do CCA/UFES, pelo suporte total dado a pesquisa.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de cursar o mestrado em Produção Vegetal.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela orientação.

Ao Prof. Dr. Dirceu Pratissoli, pela coorientação.

Ao Prof. Dr. Ulysses Rodrigues Vianna.

Ao Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do CCA/UFES, pelos ensinamentos.

Aos funcionários do NUDEMAFI, Dona Carlota, Carlos Magno e Leonardo, pela ajuda em tudo que precisei, pela amizade.

Aos amigos do NUDEMAFI: Camila, Débora, Eduardo, Fernando, Flávio, Gustavo, João Paulo, João Rafael, José Romário, Kharen, Larissa, Lígia, Lívia, Luiz Flávio, Luziani, Marcel, Marília, Marina, Marquinho, Priscila, Rafael, Rafael Dohler, Raul, Samara, Suelen, Tiago, Vando, Victor e Victor Lima.

RESUMO

A soja é considerada um dos produtos de maior importância para a economia brasileira e dentre as pragas mais importantes, que limitam a sua produção, destaca-se *Anticarsia gemmatalis*. Visando reduzir a utilização de inseticidas no controle de pragas, têm-se buscado alternativas de controle, dentre as quais a utilização do controle biológico. Entre os agentes de controle biológico se destacam a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) e os parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma*. Este estudo avalia a interação desses dois agentes de controle biológico utilizados no controle de *A. gemmatalis*. Inicialmente, foram feitos testes de seleção com onze linhagens de *Trichogramma*, sendo a linhagem *T. pretiosum* 12, a que apresentou melhor desempenho para esta praga. Testes de patogenicidade e virulência foram realizados com 23 isolados de Bt, além do produto comercial Dipel® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), para selecionar os mais agressivos para o inseto. Entretanto, os isolados 80, 997, 1054, 716 e 633 e o Dipel® foram os mais promissores. Por fim, foram realizados dois experimentos de interação entre o *T. pretiosum* 12, os isolados 80, 997, 1054, 716 e 633 e Dipel®. Foi observado que para o experimento em que os isolados foram misturados ao alimento houve uma interação positiva, em que os isolados 633 e 1054 causaram aumento no parasitismo. Com relação ao segundo experimento, foi observado que a imersão das cartelas com ovos de *A. gemmatalis* nas suspensões, contendo os diferentes isolados de Bt 80, 633, 716, 993, 1054 e o Dipel® reduziu o número total de ovos parasitados devido à repelência do *T. pretiosum* 12 aos ovos imersos em suspensão com Bt. Estudos histopatológicos da interação do Bt com as células do intestino médio de *Trichogramma* são necessários para elucidar como o Bt atua no inseto adulto. Esses estudos, aliados à caracterização molecular das toxinas presentes nos isolados, contribuirão para elucidar a interação parasitoide x entomopatógeno x hospedeiro.

Palavras Chave: Soja, Controle Biológico, *Bacillus thuringiensis*, *Trichogramma pretiosum*.

ABSTRACT

Soybean is considered one of the most important products to the Brazilian economy and among the most important pests, which make its production limited, *Anticarsia gemmatalis* is detached. Aiming to reduce the use of insecticides on the pests control, alternatives of control have been searched, among these the use of biological control. Among the biological control agents the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) and the egg parasitoids from the genus *Trichogramma* are detached. This study evaluates the interaction between these two biological control agents used on *A. gemmatalis* control. Initially selection tests were made with eleven *Trichogramma* strains and the strain *T. pretiosum* 12 was the one which presented best performance for this pest. Pathogenicity and virulence tests were carried out with 23 Bt isolates and the commercial product Dipel® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) to select the most virulent ones for the insect. This way the isolates 80, 997, 1054, 716, 633 and Dipel® were the most promising. With these results, two interaction experiments were performed among *T. pretiosum* 12, the isolates 80, 997, 1054, 716, 633 and Dipel®. It was observed that for the experiment in which the isolates were mixed to the food there was a positive interaction, where the isolates 633 and 1054 caused an increase on parasitism. Concerning the second experiment it was observed that the immersion of the cards containing *A. gemmatalis* eggs in the different Bt isolates 80, 633, 716, 993, 1054 and Dipel® reduced the total number of parasitized eggs due to repellence of *T. pretiosum* to the immersed eggs in Bt suspensions. Histopathologic studies of Bt interaction with *T. pretiosum* midgut cells are necessary to elucidate how Bt acts on the adult insect. These studies allied to molecular characterization of the toxins presented on the isolates will contribute to elucidate the interaction parasitoid x entomopathogen x host.

Key Words: Soybean, Biological control, *Bacillus thuringiensis*, *Trichogramma pretiosum*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 LITERATURA CITADA	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)	12
2.2 A BACTÉRIA ENTOMOPATOGÊNICA <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae)	13
2.3 O PARASITOIDE DE OVOS <i>Trichogramma</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae)	16
2.4 INTERAÇÃO <i>Bacillus thuringiensis</i> x <i>Trichogramma</i> x Noctuidae	19
2.5 LITERATURA CITADA	22
3 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) PARA O CONTROLE DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)	27
3.1 INTRODUÇÃO	29
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.4 CONCLUSÃO	36
3.5 LITERATURA CITADA	37
4 PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) PARA <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)	40 _Toc257719041
4.1 INTRODUÇÃO	42
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

4.4 CONCLUSÃO.....	49
4.5 LITERATURA CITADA.....	50
5 INTERAÇÃO <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) E <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) NO CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).....	53
5.1 INTRODUÇÃO.....	57
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.4 CONCLUSÃO.....	73
5.5 LITERATURA CITADA.....	74
6 CONCLUSÕES GERAIS	77

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) constitui um dos produtos de maior relevância para a economia brasileira, considerada a cultura de maior crescimento, na segunda metade do século XX. Sua posição se destaca no país como fonte de proteína e de óleo vegetal, para consumo interno ou através das exportações. Os países maiores produtores de soja são, também, os maiores exportadores, sendo o principal os Estados Unidos, seguidos pelo Brasil e Argentina (MAGRINI et. al., 1999).

Em 2008, as exportações brasileiras corresponderam a 36% das exportações mundiais de soja em grão, 23% do farelo e 16% do óleo de soja. Nesse mesmo ano, a produção da soja correspondeu a 27% da produção mundial de grãos, 14% do farelo e a 15% do óleo (CONAB, 2009).

Com destaque para as regiões Centro-Oeste e Sul do país, a safra 08/09 apresentou 10.073,9 mil ha em área, produtividade de 2.966 Kg/ha e produção de aproximadamente 29.880,1 mil toneladas para a região Centro-Oeste; e 8.595,5 mil ha em área, 2.570 Kg/ha de produtividade e produção de cerca de 22.092,7 mil toneladas na região Sul (CONAB, 2009).

Essa cultura, porém, está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos e dentre as pragas mais importantes, a *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), apresenta-se como a lagarta desfolhadora que acarreta maiores prejuízos para a cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000), sendo considerada uma das principais pragas da cultura da soja no Hemisfério Ocidental (TURNIPSEED & KOGAN, 1976).

Em sistemas de produção agrícola, o controle de pragas é realizado através de aplicações frequentes de inseticidas químicos, considerado método predominante para reduzir o risco de danos econômicos das culturas (NEGREIRO et. al., 2004). Mesmo que o controle químico tenha importância para esta finalidade, o uso de produtos de alta toxicidade e de amplo espectro pode resultar em efeitos adversos ao homem e ao ambiente (MOSCARDI & SOUZA, 2002).

O número de pesquisas com relação a microrganismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública tem aumentado devido ao elevado custo dos agrotóxicos e aumento da resistência das pragas a esses produtos. Além desses fatores, a crescente preocupação com o meio ambiente também tem grande contribuição para que as pesquisas aumentem, visando diminuir a agressão constante que o ecossistema vem sofrendo por intervenções do homem (DESTÉFANO, 2003).

Entre os agentes de controle biológico, destacam-se a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Eubacteriales: Bacillaceae) e o parasitoide de ovos *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). O primeiro é o ingrediente ativo da maioria dos bioinseticidas empregados mundialmente (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000) e o segundo é o parasitoide de ovos mais estudado e mais comercializado em todo mundo, no controle de lepidópteros-praga. Liberações inundativas de *Trichogramma* para controle de lepidópteros pragas são investigadas em mais de 50 países (SMITH, 1996).

No Manejo Integrado de Pragas, é comum a utilização de dois ou mais métodos de controle. Embora os efeitos prejudiciais dos bioinseticidas à base de Bt sobre os inimigos naturais (insetos predadores, parasitoides e microrganismos) sejam mínimos e/ou significativamente menores que os dos agrotóxicos, esses não podem ser desprezados e são necessários estudos em regiões onde essas táticas são empregadas em conjunto ou têm potencial de uso (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Dessa forma, este trabalho analisa o impacto de isolados/formulação de *B. thuringiensis* sobre *T. pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), utilizando *A. gemmatalis* como hospedeiro do parasitoide.

1.1 LITERATURA CITADA

CONAB. **Série histórica de produtividade.** Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 de novembro de 2009.

DESTÉFANO, R.H.R. **Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos.** 2003. Tese de doutorado. ESALQ/USP Piracicaba, 72. 2003.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety.*** Chichester: John Wiley, 350 p. 2000.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado.** Londrina: Embrapa Soja. 70p. (Circular Técnica/EMBRAPA Soja, n. 30). 2000.

MAGRINI, E.A.; BOTELHO, P.S.M.; SILVEIRA NETO, S. Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Scientia agrícola.** Vol. 56. n.3. Julho 1999.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L. de. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 24, p. 22-29, 2002.

NEGREIRO, M. C. C. DE; ANDRADE, F. G. DE; FALLEIROS, A. M. F. Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 293-308, 2004.

SMITH, S.M. Biological control with *Trichogramma*: advances, and potencial of their use. **Annual Review of Entomology**, v.41, p.373-406, 1996.

TURNIPSEED, S. G. & KOGAN, M. Soybean entomology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 21, p. 247-282, 1976.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*) é a principal desfolhadora da cultura da soja e se destaca por ser muito ativa e por apresentar grande agilidade. Uma lagarta pode consumir cerca de 90 cm² de folhas para completar o seu desenvolvimento. No Brasil, é encontrada em todos os locais de cultivo (HOFFMAN-CAMPO et al., 2000). Inclusive, esse noctuídeo é praga importante em outras culturas, tais como amendoim, alfafa e pastagens (GALLO et al., 2002).

Os ovos de *A. gemmatalis* são de coloração branca, ligeiramente achatados, depositados geralmente na face inferior das folhas isoladamente, embora possam ser encontrados nas hastes e pecíolos em elevadas infestações (GALLO et. al., 2002). A duração da fase de ovo pode variar de acordo com a temperatura de 3 a 4 dias (temperaturas de 30°C a 26°C, respectivamente) (MAGRINI et. al., 1999). A postura é realizada durante a noite, com pico de oviposição entre 21 e 23 horas, sendo que é maior com decréscimo da temperatura e com aumento da umidade. As lagartas recém-eclodidas se alimentam das folhas (GALLO et. al., 2002).

Dependendo das condições ambientais, o estágio larval pode apresentar de cinco a seis ínstars, chegando a medir de 40-50 mm de comprimento (GAZZONI et. al., 1998). As lagartas apresentam variado padrão de coloração e manchas ao longo de seu ciclo de desenvolvimento. A maioria das lagartas geralmente apresenta coloração verde, com cinco estrias brancas longitudinais sobre o dorso, em condições de alta população assumem a coloração negra, mantendo as estrias brancas. (GALLO et. al., 2002).

Possuem quatro pares de falsas pernas abdominais. No segundo instar, aparece uma linha lateral negra e o primeiro e segundo par de prolegos abdominais são aproximadamente 25 a 50% maiores que os prolegos do terceiro par, respectivamente. O segundo instar dura de três a quatro dias e podem chegar a nove mm de comprimento. O terceiro instar também dura de três a quatro dias e a

lagarta pode atingir até 16 mm de comprimento. O quarto e quinto instar duram de três a quatro dias e podem alcançar até 25 mm em comprimento. O sexto instar dura cinco dias, completando 25 dias de ciclo larval (SILVA, 1981).

No estágio de pré-pupa, os insetos têm seu tamanho reduzido para 25 milímetros de comprimento, a lagarta para de se alimentar, fica encolhida com aspecto umedecido e coloração rósea no dorso. Esta fase dura cerca de dois dias, ocorrendo no solo a pouca profundidade e após uma semana o adulto emerge (SCHMIDT et. al., 2001).

As pupas de *A. gemmatalis* apresentam coloração verde clara no primeiro dia, tornando-se marrons em seguida. Ficam quase pretas, próxima a emergência do adulto e medem em torno de 17 a 20mm de comprimento. As lagartas de *A. gemmatalis* empupam, em campo, em uma profundidade de cerca de 2 cm da superfície do solo. A duração da fase de pupa é de sete a nove dias no solo (COSTILLA, 1988).

Os adultos são mariposas de coloração marrom-acinzentada e hábitos noturnos. Quando em repouso, as asas anteriores cobrem todo o seu corpo, notando-se perfeitamente uma linha que cruza ambas as asas diagonalmente (GALLO et. al., 2002). Apresentam asas com envergadura de cerca de 40 mm de envergadura. O acasalamento ocorre durante o período noturno (SCHMIDT et. al., 2001).

2.2 A BACTÉRIA ENTOMOPATOGÊNICA *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae)

A crescente preocupação com o ambiente, além do aumento da resistência das pragas a agrotóxicos, fez com que o número de pesquisas envolvendo microrganismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública aumentasse (DESTÉFANO, 2003). Entre esses organismos, destacam-se bactérias, fungos e vírus que são agentes naturais de controle de pragas e que podem ser cultivados em laboratórios e/ou escala industrial (BARRETO, 2005).

A bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* conhecida vulgarmente como Bt, lidera os estudos de patologia e controle microbiano, desde sua descoberta, sendo atualmente um dos principais patógenos de insetos utilizados no controle de pragas agrícolas (LORD, 2005). Aproximadamente, 200 produtos a base de Bt correspondem a 97% do mercado mundial de bioinseticidas (BRAR et al., 2006). Esses produtos são usados principalmente em países desenvolvidos como os Estados Unidos (POLANCZYK & ALVES 2003).

Em 1911, o Bt foi descrito pela primeira vez por Berliner, quando este isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae). Em seguida, o *B. thuringiensis* foi nomeado dessa forma em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde foi encontrado o primeiro inseto infectado. Esta foi a primeira descrição utilizando o nome de *Bacillus thuringiensis*, no entanto esse não foi o primeiro isolamento do patógeno. Em 1901, o biólogo S. Ishiwatta isolou a bactéria que era o agente causal da “sotto-disease”. Em 1908, Iwabuchi a denominou como *B. sotto* Ishiwatta, que foi, posteriormente, considerado como nome inválido e o nome mais recente (*Bacillus thuringiensis*) foi mantido (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000).

Embora o termo Bt seja geralmente empregado para uma única espécie, levando em consideração aspectos taxonômicos, essa bactéria pertence a um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* e *B. weihenstephanensis*). Esse complexo é denominado *B. cereus* (POLANCZYK & ALVES 2003).

B. thuringiensis 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). Com isso, tem atraído o interesse mundial no que se refere a aplicações em manejo de pragas devido à sua atividade pesticida específica.(SCHNEPF et al., 1998).

Essa bactéria é encontrada em diferentes ambientes. Por isso, cepas foram isoladas ao redor do mundo em diferentes habitats, incluindo solo, insetos, plantas e grãos estocados (SCHNEPF et al., 1998). Ela se desenvolve em condições aeróbicas, em meios artificiais bastante simples. Sob certas restrições, como ausência de nutrientes

ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, entrando em processo de esporulação durante a fase estacionária (YAMAMOTO & DEAN, 2000).

No início da esporulação, *B. thuringiensis* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, razão pela qual elas são denominadas Cry (YAMAMOTO & DEAN, 2000). Estas toxinas são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto que a porção C-terminal determina a forma da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

O mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* envolve a solubilização do cristal no intestino médio do inseto, processamento proteolítico da protoxina por proteases presentes no intestino médio, ligação da toxina Cry a receptores no intestino médio e inserção da toxina na membrana apical para criar canais ou poros (SCHNEPF et al., 1998).

Um inseto suscetível deve ingerir esporos + cristais para que esses se tornem ativos. Os cristais são solubilizados em pH alcalino, originando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas (proteínases) são convertidas em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos (δ -endotoxinas). As toxinas hidrolizadas cruzam a membrana peritrófica e se ligam a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, 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, o inseto cessa a alimentação (COPPING & MENN, 2000).

Embora os produtos comerciais disponíveis se restrinjam ao controle de lepidópteros, dípteros e coleópteros, mais de 1.000 espécies de insetos, pertencentes a diversas ordens de insetos, são suscetíveis a esse patógeno (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Dos 572 lepidópteros suscetíveis ao Bt, 83 são noctuídeos, o que demonstra o alto potencial desse entomopatógeno no controle de noctuídeos-praga (Tabela 1).

A formulação de pesticidas à base de *B. thuringiensis* foi favorecida devido à eficácia e especificidade das cepas de Bt no controle de insetos praga. Desde o primeiro produto

lançado na França em 1938, mais de 100 formulações foram colocadas no mercado mundial. Atualmente, esses produtos são responsáveis por mais de 90% do faturamento com bioinseticidas. O continente americano é responsável por 50% desse mercado, principalmente os Estados Unidos e Canadá, sendo que a América Latina representa apenas 8 a 10% do total (TAMEZ-GUERRA et al., 2000).

Tabela 1- Espécies de insetos suscetíveis a *Bacillus thuringiensis* (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000)

Ordem	Número de espécies
Lepidoptera (Noctuidae)	572 (83)
Diptera	266
Coleoptera	106
Hymenoptera	62
Hemiptera	48
Siphonaptera	7
Orthoptera	6
Isoptera	5
Neuroptera	4
Thysanoptera	3
Total	1.079

2.3 O PARASITOIDE DE OVOS *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae)

O gênero *Trichogramma* é o maior da família Trichogrammatidae, com aproximadamente 210 espécies descritas. São exclusivamente parasitoides de ovos, com inúmeros hospedeiros, principalmente Lepidoptera (PINTO, 2006). Na América do Sul, 38 espécies têm sido registradas, sendo que destas 25 espécies são registradas no Brasil (QUERINO & ZUCCHI, 2003).

As espécies de *Trichogramma* são de tamanho pequeno, com aproximadamente 0,2 a 1,5 mm, são solitárias ou gregárias, endoparasitoides primários de ovos de insetos

(PINTO, 1997). *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é dentre essas, a mais comum em diferentes regiões. No Brasil, ela tem sido registrada nas regiões Centro-Oeste, Nordeste, Sul e Sudeste. Na região Sudeste, encontra-se o maior número de registro desta espécie (QUERINO, 2002).

O uso de *Trichogramma* em programas de controle biológico de insetos é desenvolvido, principalmente pela possibilidade de criação massal em laboratório, primeiramente em ovos de *Sitotroga cerealella* Olivier, 1819 (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae). Flanders, em 1926, iniciou os trabalhos de multiplicação massiva com *Trichogramma* sobre ovos de *S. cerealella*, técnica que se dispersou rapidamente em diversos países (NAVARRO, 1998).

No Brasil, a utilização de *Trichogramma* spp. é pequena, se comparado com outros países (PARRA et al., 2004), o caso mais relevante de controle biológico aplicado com a utilização desse parasitoide, refere-se ao uso de *T. pretiosum* para o controle da traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), importado da Colômbia e depois criado em ovos de *S. cerealella* pela Embrapa Semiárido em Petrolina (HAJI et al., 2002).

A escolha de agrotóxicos seletivos que controlem as pragas sem causar efeitos negativos sobre os organismos benéficos, deve ser estudada, para que não limite a utilização de *Trichogramma*. Assim, são necessários testes padronizados de seletividade, com base nas normas da IOBC (International Organization of Biological Control), para se ter sucesso nas liberações. Alguns estudos compararam a relativa toxicidade de agrotóxicos, incluindo inseticidas, fungicidas e herbicidas com vistas à indicação dos produtos mais seletivos em casos de liberação dos parasitoides (LI et al., 1993).

As espécies de *Trichogramma* são holometabólicas e seu desenvolvimento embrionário e larval ocorre no interior do ovo de outros insetos e são apnêusticos, sendo as exigências de oxigênio muito baixas, durante a fase larval (DE LA TORRE, 1993). O processo de desenvolvimento passa pela fase de ovo, larva, pré-pupa e pupa. Na fase de pupa, com o desenvolvimento do parasitoide, o ovo do hospedeiro

se torna escuro em virtude da esclerotização da cutícula, sendo uma característica marcante de parasitismo por *Trichogramma* (CÔNSOLI et al., 1995).

O modo de reprodução pode ser arrenótoca e telítoca, sendo que o primeiro é mais comum, em que todos os ovos fertilizados produzem fêmeas diploides e ovos não fertilizados produzem machos haploides. O modo de reprodução telítoca, ou partenogênese completa, caracteriza-se pelo fato de ovos fertilizados e não fertilizados produzirem fêmeas diploides. Entre espécies de *Trichogramma*, existem duas formas de telitoquia: reversível (associada a infecções microbianas) e a não reversível (STOUTHAMER; LUCK, HAMILTON, 1990). Nas espécies que apresentam partenogênese completa, a telitoquia é causada por α -proteobactérias do gênero *Wolbachia* conhecidas por induzir partenogênese em várias espécies de *Trichogramma* (STOUTHAMER, 1993).

O número de ovos colocados pelo parasitoide e a razão sexual são variáveis. O primeiro varia em virtude da qualidade e do volume do ovo do hospedeiro. E a razão sexual é influenciada pela temperatura, umidade, idade da fêmea, da wolbachia (α -proteobactérias) e pelo hospedeiro. Sendo este último o mais importante, pois há o reconhecimento da idade do ovo antes da oviposição e também pela competição de qualidade de nutrientes no interior do hospedeiro (VINSON, 1997).

Estudos que antecedam a liberação dos parasitoides devem ser realizados, para definição de espécies e/ou linhagens a serem liberadas, em função de seus parâmetros biológicos e comportamentais. Uma vez que a estação de liberação seja definida, a habilidade de dispersão do parasitoide deve ser avaliada para determinar o número de pontos de liberação (ZACHRISSON & PARRA, 1998). A forma de liberação pode ser bem simples, através da liberação de adultos de *containers* de plástico ou vidro, andando através do campo, ou de uma forma mais sofisticada, por avião, utilizando cápsulas biodegradáveis que previnam o ataque de predadores. (PARRA & ZUCCHI, 2004).

O número de parasitoides a ser liberado deve ser definido em laboratório, testes de campo e semicampo, evitando-se assim, a redução na eficiência de *Trichogramma*, devido à competição intraespecífica. Tal fenômeno é explicado pela diminuição da probabilidade do parasitoide encontrar um ovo não parasitado, à medida que a densidade do inimigo natural aumenta. Portanto, a densidade do hospedeiro numa

determinada cultura e mesmo em diferentes variedades, tem papel preponderante na definição do número de parasitoides a serem liberados (KNIPLING, 1977).

Em Citrus e em outras plantações de frutíferas, liberações variam de 70.000 a 3,8 milhões de parasitoides/ha, ou 9.000 a 50.000 parasitoides/planta (MILLS et al., 2000). Em muitos países, números fixos de parasitoides são liberados pela facilidade, sem levar em consideração a população existente da praga, o que poderia ser uma das razões para o insucesso dos programas de controle biológico (PARRA & ZUCCHI, 2004).

2.4 INTERAÇÃO *Bacillus thuringiensis* x *Trichogramma* x Noctuidae

É comum em programas de Manejo Integrado de Pragas, a interação *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* como agentes de controle como, por exemplo, na cultura do tomate no México, Colômbia e Brasil (HAJI et al., 2002). Embora os efeitos prejudiciais dos bioinseticidas à base de Bt sobre os inimigos naturais sejam mínimos e/ou significativamente menores que os dos agrotóxicos, esses não podem ser desprezados. Estudos são necessários em regiões onde essas táticas são empregadas em conjunto ou têm potencial de uso. No entanto, estudos a respeito da interação Bt x *Trichogramma* x insetos-alvo são difíceis de serem feitos devido ao grande número de isolados existentes (mais de 60.000), dessa forma cada caso deve ser analisado separadamente (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000).

Pratissoli et al. (2006) e Polanczyk et al. (2006) estudaram o efeito de isolados de *B. thuringiensis* sobre o parasitoide de ovos *Trichogramma* spp. Ambos os trabalhos mostraram que Bt não afeta o parasitismo de *Trichogramma pratissoli* Querino & Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e *T. pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), mas alguns isolados afetaram a emergência da progênie de *T. pratissoli*. Nas análises, foi utilizado como hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella*. Esses resultados sugerem a necessidade de estudos detalhados sobre a interação Bt e *Trichogramma*.

Apesar dos produtos à base de Bt corresponderem a menos de 1% do mercado mundial de inseticidas, Glare & O'Callaghan (2000) salientam a importância de estudos sobre o impacto ambiental desse entomopatógeno, visando principalmente demonstrar a sua capacidade de substituir ou interagir com os inseticidas convencionais, minimizando os riscos ambientais. Hansen & Salamitou (2000) ressaltam que os riscos em utilizar Bt devem ser sempre comparados aos riscos de utilizar agrotóxicos, com impacto reconhecidamente maior sobre o ambiente. Glare & O'Callaghan (2000) consideram que generalizações a respeito da interação Bt - *Trichogramma* - insetos-alvo são difíceis, devido ao grande número de isolados existentes (mais de 60.000) e que cada caso deve ser analisado separadamente, com muito cuidado, como demonstrado nas Tabelas 2 e 3.

As Tabelas 2 e 3 demonstram que os quatro dos mais importantes noctuídeos pragas são suscetíveis a diferentes linhagens/subespécies de Bt e que algumas dessas subespécies têm ou não efeito sobre *Trichogramma* spp.

Tabela 2 - Atividade de *Bacillus thuringiensis* (Bt) sobre *Anticarsia gemmatalis*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens* e *Spodoptera frugiperda* (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000)

Linhagem/Subespécie Bt	Noctuídeo suscetível
<i>Bt aizawai</i> e <i>Bt kurstaki</i>	<i>Anticarsia gemmatalis</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Heliothis virescens</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>Bt alesti</i> e <i>Bt thuringiensis</i>	<i>H. zea</i> , <i>H. virescens</i> e <i>S. frugiperda</i>
<i>Bt darmstadiensis</i>	<i>H. virescens</i> e <i>S. frugiperda</i>
<i>Bt dendrolimus</i> , <i>Bt galleriae</i> , <i>Bt entomocidus</i> e <i>Bt tenebrionis</i>	<i>H. virescens</i>
<i>Bt kenya</i> , <i>Bt sotto</i> , <i>Bt oyamensis</i> e <i>Bt tolworthi</i>	<i>S. frugiperda</i>

Tabela 3 - Atividade de *Bacillus thuringiensis* (Bt) sobre *Trichogramma* spp. (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000)

Linhagem/Subespécie Bt	<i>Trichogramma</i> spp. suscetível
<i>Bt dendrolimus</i>	<i>Trichogramma</i> sp.
<i>Bt kustaki</i>	<i>T. cacoeciae</i> e <i>T. pretiosum</i>
<i>Bt thuringiensis</i>	<i>Trichogramma</i> sp.

Linhagem/Subespécie Bt	<i>Trichogramma</i> spp. não suscetível
<i>Bt dendrolimus</i>	<i>T. euproctidius</i> , <i>T. evanescens</i> e <i>Trichogramma</i> sp.
<i>Bt galleriae</i>	<i>T. cacoeciae pallida</i> , <i>T. embryophagum</i> , <i>T. euproctidius</i> , <i>T. evanescens</i> e <i>T. pallidum</i>
<i>Bt israelensis</i>	<i>T. evanescens</i>
<i>Bt kurstaki</i>	<i>T. cacoeciae</i> , <i>T. carverae</i> , <i>T. embryophagum</i> , <i>T. evanescens</i> , <i>T. exiguum</i> , <i>T. japonicum</i> , <i>T. maidis</i> , <i>T. nubillale</i> , <i>T. pallidum</i> , <i>T. platneri</i> e <i>T. pretiosum</i>
<i>Bt thuringiensis</i>	<i>T. cacoeciae</i> , <i>T. evanescens</i> e <i>T. pallidum</i>

2.5 LITERATURA CITADA

BARRETO, M.R. **Prospecção e caracterização de Genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja.** 2005. Tese (doutorado em Biologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 14. 2005.

BRAR, S. K.; TYAGI, V. R. D.; VALÉRIO, J. R. Recent advances in downstream processes and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, 41:323-42, 2006.

CÔNSOLI, F.L. & PARRA J.R.P.. Effects of constant and alternating temperatures on *Trichogramma galloi* Zucchi (Hym., Trichogrammatidae) biology II parasitism capacity and longevity. **Journal of Applied Entomology**. 119: 667-670. 1995.

COPPING, L. G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v.56, n.5, p.651-676, 2000.

COSTILLA, M. Biología e importância de la oruga verde de la soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Industrial y Agrícola de Tucumán**, v. 65, n. 1-2, p. 169-184, 1988.

DESTÉFANO, R.H.R. **Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos.** 2003. Tese de doutorado. ESALQ/USP Piracicaba, 72. 2003.

DE LA TORRE, S.L. ***Trichogramma: biología, sistemática y aplicación.*** La Habana: Editorial Científico Técnica, 316 p. 1993.

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

GAZONNI, D. L.; PEDROSO JUNIOR, M.; GARAGORRY, F.; MOSCARDI, F. Mathematical simulation model of the velvetbean caterpillar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, p. 385-396, 1998.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Chichester: John Wiley, 350 p. 2000.

HAJI, F.N.D.; PREZOTTI, L.; CARNEIRO, J.S.; ALENCAR, J.A. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro industrial. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CÔRREA FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, cap. 28, p. 477-494. 2002.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.41-64. 2000.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja. 70p. (Circular Técnica/EMBRAPA Soja, n. 30). 2000.

KNIPLING, E.F. The theoretical basis for augmentation of natural enemies. In: RIDGWAY, R.L.; VINSON, S.B. (Ed.). **Biological control by augmentation of natural enemies**. New York: Plenum Press, p. 79-123. 1977.

LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxina from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v.353. n.7, p.815-821, 1991.

LI, S.Y.; SIROIS, G.M.; LUCZYNSKI, A.; HENDERSON, D.E. Indigenous *Trichogramma* (Hym.: Trichogrammatidae) parasiting eggs of *Rhopobota naevana* (Lep.: Tortricidae) on cranberries in British Columbia. **Entomophaga**, Paris, v. 38, p. 313-315, 1993.

LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, 89:19-29, 2005.

MAGRINI, E.A.; BOTELHO, P.S.M.; SILVEIRA NETO, S. Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Scientia agrícola**. Vol. 56. n.3. Julho 1999.

MILLS, N.; PICKEL, C.; MANSFIELD, S.; MCDUGALL, S.; BUCHNER, R.; APRILE, J.; EDSTROM, J.; ELKINS, R.; HASEY, J.; KELLEY, K.; KRUEGER, B.; OLSON, B. & STOCKER, R. Mass releases of *Trichogramma* wasps can reduce damage from codling moth. **California Agriculture**. 56: 22-25. 2000.

NAVARRO, M.A. *Trichogramma* spp. Producción, uso y manejo em Colômbia. 176p. 1998.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. *Trichogramma* in Brazil: Feasibility of Use after Twenty Years of Research. **Neotropical Entomology**. 2004.

PINTO, J.D. Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, cap. 1, p. 13-39. 1997.

POLANCZYK, R.A & ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**. 7:1-10. 2003.

POLANCZYK, R.A.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U.R.; OLIVEIRA, R.G. dos S.; ANDRADE, G.S. Interação entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Acta Scientiarum**, v.28, n.2, p.233-239, 2006.

PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R.A.; VIANNA, U.R.; ANDRADE, G.S.; OLIVEIRA, R.G.S. 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, mar-abr, 2006.

QUERINO, R.B. **Taxonomia do gênero *Trichogramma* Westwood, 1833 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) na América do Sul**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" /ESALQ, Piracicaba-SP. 214p. 2002.

QUERINO, R.B. & R.A. ZUCCHI. New species of *Trichogramma* Westwood associated whit lepidopterous eggs in Brazil. **Zootaxa** 163: 1-10. 2003

SILVA, R. F. P. **Aspectos biológicos e nutrição de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera – Noctuidae) em meios natural e artificial e influência da temperatura e fotoperíodo no seu desenvolvimento.** 1981. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, 130p. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP. 1981

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. AND DEAN D. H.; *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p. 775–806. 1998.

STOUTHAMER, R.; LUCK, R.F.; HAMILTON, W.D. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) to revert to sex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 87, p. 2424-2427, 1990.

STOUTHAMER, R. The use of sexual versus asexual wasps in biological control. **Entomophaga**, Paris, v. 38, p. 3-6, 1993.

TAMEZ-GUERRA, P.; MCGUIRE, M. R.; BEHLE, R. W.; SHASHA, B. S.; WONG, L. J. G. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.2, p.219-225, 2000.

VINSON, S.B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitoides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. **Trichogramma e o controle biológico aplicado.** Piracicaba: FEALQ, cap. 4, p. 67-120. 1997.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bactéria: from laboratory to field application.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 81-100. 2000.

ZACHRISSON, B.S.A. & J.R.P. PARRA. Capacidade de dispersão de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 para o controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em soja. **Scientia Agricola**. 55: 133-137. 1998.

3 SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) PARA O CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

Dentre as pragas mais importantes na cultura da soja, destaca-se *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, que causa desfolhas e acarreta os maiores prejuízos para a cultura. No manejo integrado de pragas, o parasitoide de ovos *Trichogramma* é estudado como uma forma de controle dessa praga. Este trabalho avalia as características biológicas de onze linhagens de *Trichogramma pretiosum* criados em ovos de *Anticarsia gemmatalis*, visando selecionar aquela com melhor desempenho, para utilização em programas de controle biológico dessa praga. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 15 repetições. Foram individualizadas 15 fêmeas de cada linhagem em tubos de vidro. Cartelas azuis foram utilizadas para a fixação dos ovos de *A. gemmatalis* (20 ovos por cartela), que foram oferecidas às fêmeas do parasitoide por 24 horas. Após esse período, as fêmeas foram retiradas dos tubos e as cartelas foram acondicionadas em sacolas plásticas. Após a morte dos descendentes, os seguintes parâmetros biológicos foram avaliados: parasitismo, viabilidade, razão sexual e número de insetos por ovo. A porcentagem de parasitismo variou entre 5,3 a 53,5%, sendo o maior valor observado para o *T. pretiosum*, linhagem 12; e o menor, para *T. pretiosum*, linhagem 8. O parâmetro porcentagem de viabilidade foi satisfatório para todas as linhagens, ficando acima de 85%. Para a razão sexual, as médias obtidas foram satisfatórias, pois variaram de 0,9 a 1,0, ficando acima de 0,5, o que é essencial para criação massal do parasitoide. O número de parasitoides por ovo variou de 0,87 a 2,04. Devido aos maiores valores observados no parasitismo, *T. pretiosum* 12 foi a linhagem de melhor desempenho em laboratório, quando criada sobre ovos de *A. gemmatalis*.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, parasitoide de ovos, lagarta-da-soja.

3 SELECTION OF *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) STRAINS FOR *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) CONTROL

ABSTRACT

Among the most important pests in soybean, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, is detached causing defoliations and originating the higher damages to the culture. On the Integrated Pest Management the parasitoid *Trichogramma* has been studied as a way of controlling this pest. This work evaluates the biological characteristics of eleven strains of *Trichogramma pretiosum* reared on *Anticarsia gemmatalis* eggs, aiming to select the one with best performance, to use in biological control programs of the pest. The experiment was carried out on entirely randomized design, with 15 replications. Fifteen females of each strain were individualized in glass tubes. Blue cards were used for the fixation of *A. gemmatalis* eggs (20 eggs per card), which were offered to the parasitoid females for 24 hours. After this period the females were withdrew from the tubes and the cards were arranged in plastic bags. After the descendants death the following biological parameters were evaluated: parasitism, viability, sexual ratio and number of individuals emerged per eggs. The parasitism percentage varied among 5,3 to 53,5%, with the higher value observed to *T. pretiosum* strain 12 and the smaller to *T. pretiosum* strain 8. The parameter viability percentage was satisfactory for all the lineages staying above 85%. For the sexual ratio the means obtained were satisfactory varying from 0.9 to 1.0 staying above 0.5 what is essential for the massal rearing of the parasitoid. The number of parasitoids per eggs varied from 0.87 to 2.04. *T. pretiosum* 12 was the strain with best performance in laboratory when reared on *A. gemmatalis* eggs, due to the higher values observed on parasitism.

KEY WORDS: Biological control, parasitism, velvetbean caterpillar.

3.1 INTRODUÇÃO

A soja é uma cultura de grande interesse sócio-econômico, em função dos teores elevados de proteína, da produtividade de grãos e da possibilidade de adaptação a ambientes diversos (ROCHA et. al., 2002). No Brasil, o plantio de soja aumentou significativamente, em área e produtividade, no Sul a partir de 1970, e se expandiu para as demais regiões do país. Entretanto, dentre os fatores que contribuem para limitar o aumento da produtividade da soja no país, destacam-se os insetos-praga, que podem atacar as folhas, as hastes ou as raízes. (MOSCARDI et al., 1999). Dentre as pragas mais importantes na cultura da soja, temos a *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), que causa desfolha e acarreta os maiores prejuízos para a cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Com relação ao controle de pragas, deve-se levar em consideração a integração de diversos métodos de controle menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. O controle biológico é uma das táticas que tem mostrado bons resultados no controle de pragas, principalmente da Ordem Lepidoptera, apresentando alto potencial de sucesso, por meio de liberações inundativas de inimigos naturais, pois se pode reduzir a população das pragas para um nível inferior ao nível de dano econômico, de forma análoga ao uso de agrotóxicos (PARRA; ZUCCHI; SILVEIRA NETO, 1987).

Os parasitoides do gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) estão entre os mais criados e usados como inimigos naturais no mundo. Todo ano eles são liberados em mais de 16 milhões de hectares em plantações anuais (em sua maior parte) e perenes (HASSAN 1997). Estão entre os mais estudados, com vários artigos publicados relatando sua eficiência em controle biológico (GONÇALVES, 2003). Esses parasitoides têm sido amplamente utilizados, em relação aos insetos utilizados em programas de controle biológico, devido à facilidade de sua criação em hospedeiros alternativos, sua facilidade de multiplicação, além de sua agressividade no parasitismo de ovos de insetos-praga (HAJI et al., 1998).

Em algumas regiões no Brasil, o parasitismo de ovos de *A. gemmatalis* por *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera:Trichogrammatidae) é algumas vezes superior a 90% (ZACHRISSON, 1997). Seu potencial para o controle de *A.*

gemmatalis, é excelente e isso pôde ser observado devido ao fato de que cinco espécies de *Trichogramma* já foram coletadas parasitando esta praga (FOERSTER & AVANCI 1999, AVANCI 2004).

No entanto, diversos trabalhos mostram que, a despeito da aparente inespecificidade de *Trichogramma*, existem espécies ou mesmo linhagens que são mais adequadas para determinados hospedeiros, culturas e condições climáticas. Portanto, estudos que antecedam a liberação dos parasitoides devem ser realizados, para definição de espécies e/ou linhagens a serem liberadas, em função de seus parâmetros biológicos e comportamentais (BUENO, 2008). Assim, deve-se priorizar o emprego de parasitoides mais eficientes, melhor adaptados à cultura e/ou hospedeiro e a diferentes condições climáticas (HASSAN, 1997).

Portanto, este trabalho desenvolve estudos biológicos com diferentes linhagens de *T. pretiosum*, visando selecionar aquela com melhores características biológicas e maior potencial de controle, para utilização em programas de manejo integrado de *A. gemmatalis*, na cultura da soja.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES) em Alegre, Espírito Santo, em câmaras climatizadas a 25 ± 1 °C, $70 \pm 10\%$ UR e fotofase de 12 horas.

Criação e manutenção das linhagens de *Trichogramma pretiosum* e do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella*. Foram utilizadas as onze linhagens de *T. pretiosum* da coleção do NUDEMAFI, em que são mantidas com ovos do hospedeiro alternativo *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), criadas com dieta à base de farinha de trigo integral (60%) e de milho (37%) e levedura de cerveja (3%).

A criação de *A. kuehniella* foi realizada em caixas plásticas (30 x 25 x 10 cm), em cujo interior foram colocadas fitas de papelão corrugado (25 x 2 cm). A dieta, previamente homogeneizada, foi distribuída sobre essas fitas e os ovos de *A. kuehniella* colocados aleatoriamente sobre a dieta. Os adultos de *A. kuehniella* foram coletados, diariamente, com aspirador de pó adaptado e transferidos para tubos de PVC (150 mm de diâmetro por 25 cm de altura) com tiras de tela de náilon, dobradas em zig-zag no seu interior para oviposição.

Os adultos das linhagens de *T. pretiosum* foram mantidos em recipientes de vidro (3 x 9 cm) e alimentados, com gotículas de mel depositadas na parede interna dos mesmos. Ovos do hospedeiro alternativo foram colados com goma arábica a 5%, em cartelas de cartolina azul celeste (2,5 x 8 cm), inviabilizados por exposição a lâmpada germicida por 50 minutos e então oferecidos aos parasitoides para sua manutenção. Os frascos foram fechados com filme plástico de PVC para que não ocorresse a fuga dos adultos.

Criação e manutenção de *Anticarsia gemmatalis*. A criação estoque de *A. gemmatalis* foi mantida em sala climatizada a uma temperatura de 25 ± 1 °C. Ovos de *A. gemmatalis* foram obtidos da criação para o processo de seleção das linhagens de *T. pretiosum*. Os ovos foram acondicionados em potes plásticos de 1.100 mL com a tampa furada e vedada com tecido organza, para aumentar a aeração e alimentá-los com dieta artificial (Tabela 1).

Adultos foram criados em gaiolas de madeira (40 x 40 x 40 cm), com as laterais teladas e com tampa de vidro em salas climatizadas a 25 ± 2 °C e fotofase de 12h. Esses adultos foram alimentados com dois chumaços de algodão contidos em duas placas de Petri (15 x 1,5 cm) embebidos em solução nutritiva (mel 10,5 g, água destilada 1,05 L, cerveja 350 ml, sacarose 60 g, nipagin 1,05 g, ácido ascórbico 1,05 g) localizados no interior da gaiola (GREENE et al., 1976). As posturas foram coletadas em folhas de papel branco no interior das gaiolas, as quais foram recortadas e colocadas nos potes de criação com a dieta artificial.

Tabela 1 - Composição da dieta artificial de *Anticarsia gemmatalis* (GREENE et al., 1976)

Componente	Quantidade
Feijão	125 g
Levedo de cerveja	62,4 g
Gérmen de trigo	100 g
Poteína de soja	100 g
Caseína	50 g
Nipagin ®	5 g
Ácido sórbico	3 g
Ácido ascórbico	6 g
Formaldeído (40%)	6 ml
Solução Vitamínica (niacinamida, pantotenato de cálcio, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido fólico, biotina e vitamina B ₁₂)	10 ml
Ágar	35 g

Condução do experimento. As linhagens de *T. pretiosum* utilizadas no experimento estão descritas na Tabela 2. Foram individualizadas quinze fêmeas de cada uma das onze linhagens de *T. pretiosum*, com até 24 horas de idade, em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm) fechados com filme plástico de PVC e alimentadas com uma gotícula de mel puro na parede interna do tubo. Vinte ovos de *A. gemmatalis*, com no máximo 48 horas de desenvolvimento embrionário foram colados em cartolina azul celeste (2,5 x 8 cm), com auxílio de um pincel umedecido e oferecidos por fêmea do parasitoide. O parasitismo foi permitido por 24 horas, logo após, as fêmeas foram retiradas dos tubos de vidro e as cartelas com os ovos acondicionadas em sacos plásticos (4 x 23 cm).

Após a morte dos descendentes, avaliou-se o número de ovos parasitados; ovos com orifício; número de machos e fêmeas. Posteriormente, o número de ovos parasitados e a viabilidade foram expressos em porcentagem; o número total de parasitoides foi dividido pelo número de ovos com orifício, para se determinar o

número de parasitoides por ovo e a razão sexual foi determinada através do número de fêmeas em relação ao total de indivíduos na população.

O delineamento experimental para os parâmetros biológicos avaliados foi inteiramente casualizado, com 15 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott Knott ($P \leq 0,05$) utilizando o programa SAEG 5.0.

Tabela 2 – Linhagens de *Trichogramma pretiosum* utilizadas no experimento de seleção de linhagens, com seus respectivos locais de coleta

Espécie	Linhagem	Local de Coleta
<i>T. pretiosum</i>	Tp 1	EAFAs, Alegre ES
<i>T. pretiosum</i>	Tp 8	Afonso Cláudio, ES
<i>T. pretiosum</i>	Tp 9	Cristalina, GO
<i>T. pretiosum</i>	Tp 10	Cristalina, GO
<i>T. pretiosum</i>	Tp 11	Cristalina, GO
<i>T. pretiosum</i>	Tp 12	Teófilo Otoni, MG
<i>T. pretiosum</i>	Tp 13	Paraopeba, MG
<i>T. pretiosum</i>	Tp 14	Pedra Preta, MT
<i>T. pretiosum</i>	Tp 15	Jaciara, MT
<i>T. pretiosum</i>	Tp 16	-
<i>T. pretiosum</i>	Tp 17	Rio Verde, GO

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parasitismo. Houve diferença significativa entre as linhagens de *T. pretiosum* (Tabela 3). A linhagem de *T. pretiosum* Tp 12 (Tp – forma como se refere ao *T. pretiosum* no NUDEMAFI) foi mais agressiva ao hospedeiro, com 53,5 % de parasitismo. As demais linhagens apresentaram diferenças entre si; entretanto, as linhagens que obtiveram menor porcentagem de parasitismo foram Tp17, Tp16 e Tp8 com 8,9; 8,7 e 5,3%, respectivamente. O percentual de parasitismo pode ser o parâmetro de maior importância, visto que esse percentual é que efetivamente determina a eficiência do controle biológico no campo (BUENO, 2008). Diferenças no potencial de parasitismo entre espécies e/ou linhagens têm sido relatadas (PRATISSOLI et al., 2008) e podem estar relacionadas com a espécie ou linhagem do parasitoide e, principalmente, ao hospedeiro utilizado (PRATISSOLI et al., 2004b). Vianna (2009), nas mesmas condições experimentais, verificou que *T. pretiosum* parasitou 60% dos ovos de *A. gemmatalis*, o que reforça seu potencial no controle dessa praga. Para a seleção de linhagens de *T. pretiosum* em ovos de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), o percentual de parasitismo variou de 27,50 a 89,33, permitindo discriminar as melhores linhagens (BESERRA; DIAS; PARRA, 2003). A porcentagem de parasitismo de *T. pretiosum* foi de 53%, quando ovos de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) foram parasitados (MILANEZ, 2009).

Viabilidade. Apenas as linhagens Tp 13 e Tp 17 apresentaram as menores taxas de viabilidade. As demais, apresentaram viabilidade variando de 96 a 100%, não diferindo entre si (Tabela 3). Todos os resultados são satisfatórios, pois taxas superiores a 85% de viabilidade são consideradas ideais para produção massal de espécies de *Trichogramma* (NAVARRO, 1999). Dados semelhantes foram obtidos para *H. zea*, quando seus ovos foram parasitados por *T. pretiosum* com 91,6% de viabilidade (PRATISSOLI & OLIVEIRA, 1999). Gonçalves et al., (2003) avaliaram a qualidade de *T. pretiosum* criadas em ovos de *Sitotroga cerealella* Oliver (Lepidoptera: Gelechiidae) e observaram níveis superiores a 89% de viabilidade. Bueno (2008) encontrou valores de viabilidade de 81,73 a 100%, quando testou

diferentes linhagens de *T. pretiosum* em ovos de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae).

Tabela 3 - Parâmetros biológicos de *Trichogramma pretiosum* criados em ovos de *Anticarsia gemmatalis*. Temp.: $25 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$; UR: $70 \pm 10\%$ e fotofase :12h.

<i>T. pretiosum</i> Linhagens	Parasitismo (%)	Viabilidade (%)	Razão Sexual	Indivíduos por ovo
1	49,1 \pm 1,53 B	97,9 \pm 1,42 A	0,96 \pm 0,02 A	1,84 \pm 0,11 A
8	5,3 \pm 0,14 E	99,7 \pm 0,11 A	0,98 \pm 0,01 A	1,22 \pm 0,09 B
9	17,9 \pm 1,03 D	100 \pm 0,00 A	1,00 \pm 0,00 A	1,54 \pm 0,12 A
10	21,5 \pm 1,57 C	98,9 \pm 0,76 A	1,00 \pm 0,00 A	1,74 \pm 0,13 A
11	48,2 \pm 1,39 B	100 \pm 0,00 A	0,90 \pm 0,02 B	1,70 \pm 0,05 A
12	53,5 \pm 2,12 A	96,0 \pm 1,60 A	0,90 \pm 0,02 B	1,40 \pm 0,04 B
13	24,6 \pm 2,15 C	92,1 \pm 3,23 B	1,00 \pm 0,00 A	0,95 \pm 0,06 C
14	24,7 \pm 1,30 C	98,5 \pm 1,33 A	1,00 \pm 0,00 A	2,04 \pm 0,14 A
15	22,1 \pm 1,14 C	99,9 \pm 0,05 A	1,00 \pm 0,00 A	1,88 \pm 0,18 A
16	8,7 \pm 0,92 E	97,2 \pm 1,15 A	0,98 \pm 0,01 A	0,87 \pm 0,14 C
17	8,9 \pm 1,37 E	89,1 \pm 3,66 B	0,98 \pm 0,01 A	0,94 \pm 0,08 C

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Razão Sexual. As linhagens Tp1, Tp14, Tp13, Tp15, Tp10, Tp9, Tp17, Tp16 e Tp8 apresentaram razão sexual de 0,96 a 1,0, sem diferenças significativas entre si. As linhagens Tp12 e Tp11 apresentaram os menores valores com 0,90 para cada. A razão sexual ideal deve ser superior a 0,5, para criação massal de espécies de *Trichogramma* que representa a emergência de, pelo menos, um indivíduo fêmea por macho emergido (NAVA et al., 2007; DIAS et al., 2008). Em programas de controle biológico, quanto maior o número de fêmeas maior o potencial de controle (WAKEIL et al., 2008). Com relação ao parasitismo natural em ovos de *A. gemmatalis* por *T. pretiosum*, experimentos em campo mostraram uma razão sexual de 0,69 (MARION, FOERSTER, CAÑETE, 2005)

Indivíduos por ovo. Houve diferença significativa para o número de indivíduos por ovo, sendo que as linhagens 14, 15, 1, 10, 11 e 9 não diferiram entre si, apresentando os maiores valores, que variaram de 1,54 a 2,04. As linhagens 13, 17

e 16, não diferiram significativamente entre si e apresentaram os menores valores, que variaram de 0,87 a 0,95. Estudos mostram que é desejável a emergência de menor número de parasitoides por ovo, pois maior quantidade de nutrientes estará disponível para o seu desenvolvimento, gerando indivíduos mais fortes e competitivos. O aumento no número de adultos por ovo pode reduzir a eficiência de controle, com uma menor quantidade de ovos parasitados por fêmea do parasitoide que, ao invés de usar sua capacidade de parasitismo em diferentes ovos do hospedeiro, acaba por parasitar repetitivamente o mesmo ovo (BESERRA 2003). O desenvolvimento de um grande número de *Trichogramma* em um único ovo do hospedeiro resulta em indivíduos de menor tamanho e de baixa qualidade, devido à competição intraespecífica (SUZUKI et al., 1984). Vianna (2009) encontrou de 1,53 a 2,29 adultos de diferentes linhagens de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. gemmatalis*. Milanez (2009) encontrou de 1,5 a 2,4 adultos de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *T. ni*. Valores inferiores foram encontrados para emergência de adultos de *T. pretiosum* de ovos de *P. includens* (BUENO, 2008)

A fecundidade de *Trichogramma* pode está ligada ao seu tamanho, e este irá depender do número de parasitoides por ovo e do tamanho do hospedeiro (VINSON 1997). Elevadas taxas de parasitismo observadas em trabalho realizado por Marion et al. (2005) mostraram que *T. pretiosum* pode ter um impacto significativo no controle biológico de *A. gemmatalis*, considerada uma das espécies mais promissoras em programas de criação massal para o controle biológico dessa praga.

A linhagem Tp12 apresentou melhor desempenho em ovos de *A. gemmatalis*; porém, as outras linhagens que também se demonstraram satisfatórias em certos parâmetros analisados não podem ser desprezadas. Este trabalho mostra a importância em se avaliar linhagens de espécies de *Trichogramma* devido às variações que estas apresentam entre si.

3.4 CONCLUSÃO

A linhagem Tp12 foi a mais promissora para o controle de *A. gemmatalis*.

3.5 LITERATURA CITADA

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** 25: 479-483. 2003.

BUENO, R.C.O. de F. **Bases biológicas para utilização de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para controle de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja.** 2008. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

DIAS, N.S.; PARRA, J.R.P.; LIMA, T.C.C. Seleção de hospedeiro alternativo para três espécies de tricogramatídeos neotropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** v.43, p.1467-1473, 2008.

GONÇALVES, J.R., A.M. HOLTZ, D. PRATISSOLI & R.N.C. GUEDES. Avaliação da qualidade de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Acta Scientiarum Agronomy.** 25: 485-489. 2003.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-488, 1976.

HAJI, F.N.D.; JIMENEZ VELASQUEZ, J.; BLEICHER, E.; ALENCAR, J.A.; HAJI, A.T.; DINIZ, R.S. **Tecnologia de produção massal de *Trichogramma* spp.** Petrolina: EMBRAPA CPATSA, 24 p. 1998.

HASSAN, S.A. Seleção de espécies de *Trichogramma* para o uso em programas de controle biológico. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. eds. **Trichogramma e o Controle Biológico Aplicado.** Piracicaba: FEALQ, p. 183- 205. 1997.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado.** Londrina: Embrapa Soja. 70p. (Circular Técnica/EMBRAPA Soja, n. 30). 2000.

MARION, R.F.A.; FOERSTER, L.A.; CAÑETE, C.L. Natural parasitism in eggs of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) by *Trichogramma* spp. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** 49(1): 148-151, 2005.

MILANEZ, A.M. **Caracterização de parâmetros biológicos e seleção de espécies e /ou linhagens de *Trichogramma* WEST. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) visando o Manejo Fitossanitário de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).** 2009. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009.

MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Soybean IPM in Brazil, with emphasis on biological control tactics. In: **World soybean research conference VI.** Chicago, Illinois, USA. 331 - 339. 1999.

NAVA, D.E.; TAKAHASHI, K.M.; PARRA, J.R.P. Linhagens de *Trichogramma* e *Trichogrammatoidea* para o controle de *Stenoma catenifer*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.9-16, 2007.

NAVARRO R. & MARCANO, R. Preferência de *Trichogramma pretiosum* Riley y *T. atopovirilia* Oatman y Platner por huevos de *Helicoverpa zea* (Boddie) de diferentes edades. **Bol. Entomol.** Venez. 14: 87-93. 1999.

PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; SILVEIRA NETO, S. Biological control of pests through egg parasitoids of the genera *Trichogramma* and/or *Trichogrammatoidea*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 153-160, 1987.

PRATISSOLI, D.; OLIVEIRA, H. N. Influência da idade do ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie) no parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 891-896, 1999.

PRATISSOLI, D.; OLIVEIRA, H.N.; GONÇALVES, J.R.; ZANUNCIO, J.C.; HOLTZ, A.M. Changes in biological characteristics of *Trichogramma pretiosum* (Hym.: Trichogrammatidae) reared on eggs of *Anagasta kuehniella* (Lep.: Pyralidae) for 23 generations. **Biocontrol Science and Technology**, v.14, p.313-319, 2004b.

PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R.A.; HOLTZ, A.M.; DALVI, L.P.; SILVA, A.F.; SILVA, L.N. Selection of *Trichogramma* species for controlling the diamondback moth. **Horticultura Brasileira**, v.26, p.259-261, 2008.

ROCHA, M. M. de; VELLO, N.A.; MAIA, M.C.C.; LOPES, A.C.A. de. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.6, n.3, p.617 – 625, 2002.

SUZUKI, Y.; H. TSUJI & M. SASAKAWA. 1984. Sex allocation and effects of superparasitism on secondary sex ratios in the gregarious parasitoid, *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Animal Behaviour**. 32: 478-484.

VIANNA, U.R. **Interação de técnicas para o manejo fitossanitário de *Anticarsia gemmatalis* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. 2009. Tese (Doutorado em Entomologia) – Programa de Pós-graduação em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa. 2009.

VINSON, S.B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitoides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. ***Trichogramma e o controle biológico aplicado***. Piracicaba: FEALQ, cap. 4, p. 67-120. 1997.

WAKEIL, N.E.; FARGHALY, H.T.; RAGAB, Z.A. Efficacy of inundative releases of *Trichogramma evanescens* in controlling *Lobesia botrana* in vineyards in Egypt. **Journal of Pesticide Science**, v.81, p.49–55, 2008.

ZACHRISSON, B.S.A. **Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, para o controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818, na cultura da soja**. Ph.D. thesis, Piracicaba, ESALQ, Universidade de São Paulo, 106p. 1997.

4 PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) PARA *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

O plantio da cultura da soja aumentou significativamente a partir de 1970, quando migrou do Sul do Brasil e expandiu para as demais regiões do país. Entretanto, os insetos-praga são uns dos fatores que limitam a produção e a expansão da soja no Brasil. Entre eles, destaca-se *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), que é considerada a principal praga desta cultura, pois causa grandes danos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa para reduzir o impacto ocasionado pela adoção do uso intensivo de produtos químicos nas lavouras. Dentre os principais agentes de controle biológico, destaca-se a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, considerada uma boa opção, já que é específica e não prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente. Dessa forma, este trabalho avalia isolados de *B. thuringiensis*, obtidos do banco de entomopatógenos do laboratório NUDEMAFI e a formulação comercial Dipel®, visando sua utilização em programas de manejo de *A. gemmatalis*, analisa a suscetibilidade e a toxicidade desses isolados através de estimativas da CL_{50} dos isolados. Foram utilizados vinte e três isolados de Bt. Dentre eles, cinco isolados 80, 997, 716, 633 e 1054, além do Dipel®, ocasionaram mortalidade superior a 90%, os demais isolados proporcionaram mortalidade inferior a 78%. A CL_{50} para lagartas de *A. gemmatalis* variou conforme o isolado utilizado de 8×10^7 a $1,9 \times 10^8$; portanto, não foi possível selecionar um isolado mais virulento, uma vez que estatisticamente houve a sobreposição dos intervalos de confiança.

PALAVRAS-CHAVE: Controle biológico, bactéria entomopatogênica, Soja.

4 PATOGENICITY AND VIRULENCE OF *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) TO *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT

Soybean planting has increased significantly since 1970, when soybean culture migrated from the South of Brazil and expanded to the other regions of the country. The insect pests are one of the factors that restrict the production and expansion of soybean in Brazil. Among these *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) is detached, this is considered to be the most important pest on soybean, because it causes big damage to the crop, which goes from defoliation to the complete destruction of the plant. The use of biological control agents is an alternative to reduce the impact caused by the adoption of the intensive use of chemical products on the crops. Among the most important biological control agents the bacterium *Bacillus thuringiensis* is detached, and it is considered to be a good option, since it is specific and it is not harmful to human health and to the environment. This way, this work evaluates *B. thuringiensis* isolates obtained from the entomopathogens bank from the laboratory NUDEMAFI and the commercial formulation Dipel®, aiming their use on *A. gemmatalis* management programs, analyzing susceptibility and toxicity of these isolates through the isolates CL_{50} estimations. Twenty three Bt isolates were used. Among these, five isolates 80, 997, 716, 633 e 1054, and Dipel® caused mortality over 90%, the other isolates promoted mortality below 78%. The CL_{50} for *A. gemmatalis* varied according the used isolate from 8×10^7 to $1,9 \times 10^8$, it was not possible to select the most virulent isolate due to the confidence intervals sobrepositions.

KEY WORDS: Biological control, entomopathogen bacterium, Soybean.

4.1 INTRODUÇÃO

Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas desfolhadoras da cultura da soja (PANIZZI & CORRÊA-FERREIRA, 1997). Ocorre desde o Sul de Goiás e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul (PANIZZI et al., 1977). Altas infestações desse inseto em lavouras de soja podem comprometer a produção em função do nível de infestação e do estágio fenológico da cultura (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

O uso dos inseticidas químicos, além de ser prejudicial ao meio ambiente e ao homem, é de alto custo para o agricultor. Além disso, o uso contínuo dos mesmos ingredientes ativos resulta no surgimento de populações de *A. gemmatalis* resistentes, o que tem levado à continuidade de trabalhos com objetivo de testar novos produtos e/ou formulações, visando o controle destas pragas (BONADIMAN, 2008).

O controle biológico de pragas, que utiliza microorganismos é uma alternativa ao uso de inseticidas químicos. Na busca de novas alternativas, visando à redução ou substituição desses inseticidas, os entomopatógenos possuem excelente potencial para serem empregados como método de controle que tem o objetivo de minimizar o impacto das pragas sobre a produção agrícola. (POLANCZYK et al., 2005).

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) (Bt), destaca-se no cenário mundial desde 1938, quando o primeiro produto formulado com esse patógeno foi lançado na França (POLANCZYK, 2004).

O modo de ação desse microrganismo está relacionado à solubilização das proteínas Cry no intestino dos insetos suscetíveis. Esse processo resulta na liberação de fragmentos tóxicos, que se ligam a receptores específicos na membrana do epitélio intestinal, levando à formação de poros e ao desequilíbrio osmótico da célula. O inseto morre por inanição ou por septicemia (FIUZA, 2004).

Além da patogenicidade e virulência desse patógeno contra insetos-praga, outros aspectos como os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes, embora difíceis de detectar, certamente ocorrem e representam um importante parâmetro, que auxilia na avaliação de sua atividade tóxica (POLANCZYK, 2004).

Essa bactéria entomopatogênica pode ser considerada como o agente biológico de maior potencial para o controle de insetos-praga florestais, agrícolas e vetores de doenças, devido à especificidade das δ -endotoxinas aos insetos e invertebrados alvo, fazendo deste agente um componente chave em estratégias de manejo integrado de pragas e controle de vetores de doenças (SCHNEPF et al., 1998).

Dessa forma, este trabalho seleciona isolados de Bt com elevada atividade tóxica contra *A. gemmatalis*, para utilização em programas de manejo integrado do inseto na cultura da soja.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os testes de patogenicidade, a estimativa da CL₅₀ e a criação de *A. gemmatalis* foram realizados no Laboratório de Entomologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES) em Alegre, Espírito Santo.

Criação do hospedeiro. As lagartas foram obtidas da criação estoque no NUDEMAFI. Ovos de *A. gemmatalis* foram acondicionados em potes plásticos de 1,1 L com a tampa furada e vedada com tecido organza para aumentar a aeração. As lagartas foram alimentadas com dieta artificial constituída por 125g de feijão, 62,4g de levedo de cerveja, 100g de gérmen de trigo, 100g de proteína de soja, 50g de caseína, 35g de ágar, 5g de nipagin, 6g de ácido ascórbico, 3g de ácido sórbico, 6 mL de formol a 40% e 10 ml de solução vitamínica (niacinamida, pantotenato de cálcio, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido fólico, biotina e vitamina B₁₂) (GREENE et al., 1976).

Adultos foram criados em gaiolas de madeira (40 x 40 x 40 cm) com as laterais teladas e com tampa de vidro em salas climatizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 12h. Esses adultos foram alimentados com dois chumaços de algodão contidos em duas placas de Petri (15 x 1,5 cm), embebidos em solução nutritiva (mel 10,5 g, água destilada 1,05 L, cerveja 350 ml, sacarose 60 g, nipagin 1,05 g, ácido ascórbico 1,05

g), localizados no interior da gaiola (GREENE et al., 1976). As posturas foram coletadas em folhas de papel branco no interior das gaiolas, as quais foram recortadas e colocadas nos potes de criação com a dieta artificial.

Obtenção dos isolados. Foram utilizados vinte e três isolados de *B. thuringiensis* escolhidos ao acaso, no banco de entomopatógenos do NUDEMAFI, e a formulação comercial Dipel® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*). Os isolados desta coleção foram estocados na forma de fitas de papel filtro, impregnados com uma suspensão de esporos, mantidos a 4 °C. Os isolados de Bt utilizados foram coletados em solos de diferentes locais do Brasil (Tabela 1).

Os isolados foram multiplicados em meio de cultura BHI (“Brain Heart Infusion” ou Infusão de Cérebro e Coração - Biobrás) a 28 °C, sob agitação orbital a 180 rpm por 72 h, para um crescimento padrão dos mesmos. Após a lise bacteriana, a mistura contendo esporos, cristais e células vegetativas foram transferidas para tubos de Falcon, com 5 mL de água destilada e esterilizada, e foram submetidas a 3 centrifugações consecutivas de 5.000 rpm por 20 min. Após a última centrifugação, o material foi resuspenso em água destilada esterilizada e utilizado no experimento. Em seguida, uma alíquota de 1 mL da suspensão foi diluída 100 vezes em água destilada, e a concentração de esporos determinada por meio de leitura em câmara de Neubauer, conforme método descrito em Alves & Moraes (1998). O *B. thuringiensis* var. *kurstaki* foi obtido de formulação comercial e utilizado conforme recomendações do fabricante.

Tabela 1 – Isolados de *Bacillus thuringiensis* e seus respectivos locais de coleta

Isolados de Bt	Local de Coleta
R251	-
R239	-
937H2	Uberaba - MG
101	-
287	-
814B	Ervália - MG
105	-
SP13	-
R238	-
1005	Uberaba - MG
879C	-
1034F	Sacramento - MG
1054	Coqueiral - MG
633	Ervália - MG
997	Uberaba - MG
716	Indefinido
80	-
8326H	-
858H	Patos de Minas - MG
277L	-
100	-
SP5	-
5244	-

Testes de patogenicidade. Os bioensaios foram realizados, espalhando-se 150 µl da suspensão de Bt contendo 3×10^8 esporos/mL de cada um dos 23 isolados em potes descartáveis, contendo dieta artificial previamente distribuída. Após a absorção e evaporação do excesso de água, 10 lagartas de primeiro instar de *A. gemmatilis*, foram acondicionadas nos potes descartáveis que continham a dieta, com 10 repetições. Para o controle foi aplicado água destilada e esterilizada na superfície da dieta.

Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e 14 h de fotofase, sendo avaliada a mortalidade diariamente, durante sete dias. O critério de mortalidade usado para as lagartas foi o de estar imóvel e escurecida ou que não conseguisse se locomover a uma distância igual a do seu corpo. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAEF 5.0. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (1925).

Testes para estimativa da CL₅₀. Biosensaio para estimar os valores de CL₅₀ foram realizados apenas com os isolados de Bt, que causaram mortalidade acima de 90% nos testes de patogenicidade. Esses ensaios foram conduzidos com a mesma metodologia e condições descritas acima. A amplitude das concentrações testadas foi pré-estabelecida em ensaio preliminar em valores que atendessem às exigências da análise de Probit (5 a 95% de mortalidade). Para cada isolado, foram testadas seis concentrações espaçadas logaritmicamente 1×10^7 , $6,8 \times 10^7$, $1,26 \times 10^8$, $1,84 \times 10^8$, $2,4^2 \times 10^8$ e 3×10^8 esporos/mL e controle (água destilada e autoclavada), com 10 lagartas, distribuídas em 10 repetições para cada concentração. Os bioensaios de estimativa da CL₅₀ foram avaliados a cada 24 h, até o sétimo dia após a aplicação. A concentração letal (CL₅₀) foi calculada pela análise de Probit, utilizando o programa Polo-PC (LEORA SOFTWARE, 1987).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bioensaios de patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis*.

A patogenicidade dos isolados de *B. thuringiensis* e o produto comercial Dipel apresentaram resultados significativos, em que os isolados 716, 633, 80, 1054, 997 e o Dipel proporcionaram mortalidade superior a 90%. Os demais isolados apresentaram percentuais abaixo de 78%, não sendo promissores para o controle de *A. gemmatalis* (Tabela 2). Resultados de superioridade ou semelhança de estirpes contra lepidópteros com o padrão Dipel, já haviam sido relatados por Souza et al. (1999).

Barreto (2005) mostrou que entre 341 isolados da bactéria avaliados em *A. gemmatalis*, apenas 10 mostraram ação entomocida para esta. Em outro estudo, entre nove isolados testados contra lagartas de *A. gemmatalis*, quatro apresentaram mortalidade igual ou superior que o padrão Dipel (BOBROWSKI, 2001). De 41 isolados de Bt, 44% dos isolados produziram taxa de mortalidade em *A. gemmatalis* maior que 70% (BERÓN, 2006). Da Silva et. al (2004) mostraram que três isolados testados causaram mortalidade de 100% em lagartas de *A. gemmatalis*.

Tabela 2 – Mortalidade corrigida (%) (\pm EP) de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas em dieta artificial, contendo suspensão de diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*, a $25 \pm 1,0$ °C, U.R. $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h

Isolado	Mortalidade
Dipel	97,94 \pm 2,1 a
716	95,88 \pm 2,7 a
633	95,88 \pm 3,1 a
80	95,88 \pm 4,1 a
1054	93,88 \pm 6,1 a
997	92,80 \pm 3,5 a
466	77,56 \pm 2,0 b
676	77,34 \pm 2,1 b
537	74,75 \pm 2,7 b
1028	68,38 \pm 3,2 b
984	61,24 \pm 5,2 c
238	57,77 \pm 2,8 c
273	57,76 \pm 4,2 c
167	54,67 \pm 2,8 c
725	49,00 \pm 3,4 d
101	48,00 \pm 4,4 d
100	47,44 \pm 3,9 d
478	46,00 \pm 3,4 d
816	45,00 \pm 3,4 d
287	44,00 \pm 3,1 d
467	41,00 \pm 3,1 d
531	12,66 \pm 2,6 e
105	4,85 \pm 3,3 e
637	1,92 \pm 1,9 e
Testemunha	0,00 \pm 0,0 e

Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

Os resultados obtidos nos testes de patogenicidade salientam a necessidade de realizações dos mesmos, para que se possa determinar os isolados que sejam eficientes no controle do inseto em questão. A variação na eficiência dos isolados testados neste estudo, pode ser explicada 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, sendo que, este último mostra uma maior complexidade funcional e é, geralmente, determinante no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (PEYRONNET et al., 1997).

Com relação à especificidade, algumas toxinas de Bt podem ligar-se ao(s) receptor(es) sem, no entanto, esta ligação ser suficiente para causar a morte do inseto (POLANCZYK, 2004). Embora a afinidade pelos receptores seja o principal

fator que determine o nível de suscetibilidade de uma espécie para as toxinas Cry, foi observado que para *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) a ativação da protoxina pelas proteases é o principal fator determinante para eficiência do patógeno. As enzimas digestivas da população de insetos resistentes são capazes de degradar as toxinas de tal modo que diminui significativamente a quantidade de toxina ativa no lúmen do intestino médio, em um determinado momento, reduzindo a toxicidade (FORCADA et al., 1996).

Estimativa da Concentração Letal Média (CL₅₀). A concentração letal requerida para ocasionar a mortalidade de 50% da população de *A. gemmatalis* variou de $8,1 \times 10^7$ a $1,9 \times 10^8$ esporos/mL de *B. thuringiensis*. Com relação ao Dipel, a concentração de $8,0 \times 10^7$ esporos/mL foi necessária para ocasionar a morte de 50% das lagartas de *A. gemmatalis*. De acordo com o intervalo de confiança, houve resposta semelhante entre os isolados 80, 633, 997, 1054 e o Dipel. O isolado 716 diferiu dos isolados 633 e 80, sendo que não houve diferença entre este e os isolados 997, 1054 e Dipel; portanto, não foi possível selecionar um isolado mais virulento dentro do grupo (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados de inclinação das curvas de concentração-mortalidade, concentração letal (CL₅₀), número de graus de liberdade (GL) e teste qui-quadrado (χ^2) dos isolados de *B. thuringiensis* em lagartas de *A. gemmatalis*

Isolado	n ¹	Inclinação ± EPM ²	CL ₅₀ (esporos/ml) (IC95%) ³	GL	χ^2
80	500	1,53 ± 0,165	$8,1 \times 10^7$ ($4,9 \times 10^7$ - $1,2 \times 10^8$)	3	4,52
633	500	1,41 ± 0,161	$9,4 \times 10^7$ ($7,5 \times 10^7$ - $1,1 \times 10^8$)	3	2,87
716	400	0,863 ± 0,157	$1,9 \times 10^8$ ($1,3 \times 10^8$ - $3,6 \times 10^8$)	2	0,64
997	500	3,35 ± 0,303	$1,2 \times 10^8$ ($1,0 \times 10^8$ - $1,3 \times 10^8$)	3	2,64
1054	500	1,03 ± 0,140	$1,2 \times 10^8$ ($9,3 \times 10^7$ - $1,7 \times 10^8$)	3	0,64
Dipel	400	1,76 ± 0,198	$8,0 \times 10^7$ ($2,3 \times 10^7$ - $1,5 \times 10^8$)	2	3,73

¹n: Número de insetos usados no teste; ²EPM: Erro-padrão da média; ³IC95%: Intervalo de confiança das CL₅₀ a 95% de probabilidade.

Silva et al. (2004) estimaram a CL_{50} de três isolados de Bt (S701, S764, S1265) e do formulado Dipel® para lagartas de *A. gemmatalis* e encontraram que o isolado mais efetivo (S1265) apresentou CL_{50} de $4,08 \times 10^5$ esporos/mL, enquanto foi necessário $1,8 \times 10^6$ esporos/ml de Dipel®, para ocasionar a mortalidade 50% da população de *A. gemmatalis*.

A mortalidade dos insetos variou conforme isolado e concentração utilizada, o que sugere a realização de estudos para que se determine doses diferenciadas do isolado para o controle da praga. Ignoffo et al. (1977) constataram que lagartas de *A. gemmatalis* foram 12 vezes mais suscetíveis à bactéria em relação às lagartas de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera:Noctuidae). A diferença de suscetibilidade tem sido constatada em diversos trabalhos (ABBAS ALI & YOUNG, 1993).

4.4 CONCLUSÃO

Entre vinte e três isolados testados, cinco (80, 633, 716, 997, 1054) causaram mortalidade superior a 90% em *A. gemmatalis*, não sendo diferentes quanto à virulência.

4.5 LITERATURA CITADA

ABBAS ALI & S.Y. YOUNG. *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* activity against larvae of *Helicoverpa zea* and *Heliiothis virescens* (Lepidoptara: Noctuidae) on cotton. **Journal of Economic Entomology**. 86: 1064 – 1068. 1993.

ABBOT, W.S. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Invertebrate Pathology**. 18: 265-267. 1925.

BARRETO, M.R. **Prospecção e caracterização de Genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja**. 2005. Tese (doutorado em Biologia). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 14. 2005.

BERÓN, C.M.; SALERNO, G.L. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. **BioControl**, 2006.

BONADIMAN R., **Pontas de pulverização e volumes de calda no controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) na cultura da soja *Glycine max***. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), 2008.

BOBROWSKI, V.A.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; FIUZA, L.M. Detection of *Cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, 32:105-109, 2001.

DA SILVA, S.M.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.; FRAGOSO, R.R.; QUEZADO, M.T.; NETO, O.B.O.; AGUIAR, J.B.; DE SÁ, M.F.G.; BRAVO, A.; MONNERAT, R.G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**. 128, 102–107, 2004.

FIUZA, L.M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento** 32: 84-89. 2004.

FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GARCERÁ, M.D. Differences in the midgut proteolytic activity on two *Heliiothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to

Bacillus thuringiensis toxins. **Archives on Insect Biochemistry and Physiology**, v.32, n.2, p.257-272, 1996.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-488, 1976.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja. 70p. (Circular Técnica/EMBRAPA Soja, n. 30). 2000.

IGNOFFO, C.M.; D.L. HOSTETTER; R.E. PINNELL & C. GARCIA. Relative susceptibility of six soybean caterpillars to a standard preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. **Journal of Economic Entomology**. 70: 60 – 63. 1977.

LEORA SOFTWARE. POLO-PC: An user`s guide to Probit or Logit analysis. **LeOra Software**, Berkely, 1987.

PANIZZI, A.R.; CORRÊA, B.S.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. de; NEWMAN, G.G.; TURNIPSEED, S.G. **Insetos da soja no Brasil**. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 20p. 1977.

PANIZZI, A.R. & B.S. CORRÊA-FERREIRA. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**. 1: 71-88. 1997

PEYRONNET, O.; VACHON, V.; BROUSSEAU, R. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Massachusetts, v. 63, n. 5, p. 1679-1684, 1997.

POLANCZYK, R.A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. Tese (Doutorado em Entomologia) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado de Pragas y Agroecologia**, Turrialba, v. 74, p. 24-33, 2005.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. AND DEAN D. H.; *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p. 775–806. 1998.

SOUZA, M.T. de; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v.23, p.43-49, 1999.

5 INTERAÇÃO *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) E *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO

A fim de estudar o efeito da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) sobre fêmeas adultas de *Trichogramma pretiosum* no controle de *Anticarsia gemmatalis*, foram realizados dois experimentos, em que no primeiro foram utilizados cinco isolados de Bt 80, 633, 716, 997, 1054 e o produto comercial Dipel®, misturados ao alimento fornecido para o parasitoide e o segundo consistiu na imersão de cartelas contendo ovos de *A. gemmatalis* nesses mesmos isolados de Bt e Dipel®. Para o primeiro experimento, as suspensões dos isolados e o Dipel® foram misturados em gotícula de mel (proporção 1:1), como fonte de alimento e mel puro como testemunha, em seguida, foram oferecidas simultaneamente cartelas com ovos do hospedeiro para o parasitismo. Para o segundo experimento, cartelas com ovos de *A. gemmatalis* foram mergulhadas nas suspensões e no Dipel®, sendo que a testemunha consistiu em cartela de ovos mergulhada em água destilada e em seguida oferecidas para o parasitismo. Foram utilizadas 15 repetições por tratamento para cada experimento. Os experimentos foram mantidos em câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Foram avaliados os parasitismos diário, total e acumulado, além da sobrevivência dos parasitoides. No primeiro experimento, os tratamentos com os isolados 633 e 1054 favoreceram o parasitismo. Porém, no segundo experimento foi observado que os tratamentos com os isolados 716 e 1054 causaram redução na capacidade de parasitismo do *T. pretiosum* Tp12. Dessa forma, o trabalho mostra que Bt fornecido via alimento para adultos de *T. pretiosum* afeta o parasitismo da espécie de forma positiva, no entanto, quando as cartelas de ovos foram mergulhadas nos isolados 716 e 1054, o parasitismo sofreu uma queda, o que mostra a necessidade de realização de trabalhos para que se possa determinar quais possíveis combinações de isolados de Bt podem ser aplicados em conjunto com o *T. pretiosum*, em programas de manejo fitossanitário.

PALAVRAS-CHAVE: Inimigos naturais, *Bacillus thuringiensis*, lagarta-da-soja.

5 INTERACTION *Bacillus thuringiensis* (Eubacteriales: Bacillaceae) AND *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) ON *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) BIOLOGICAL CONTROL

ABSTRACT

With the objective of studying the effect of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) on adults females of *Trichogramma pretiosum* on *Anticarsia gemmatalis* control, two experiments were carried out, where on the first one five isolates of Bt were used 80, 633, 716, 997, 1054 and the commercial product Dipel® mixed to the food offered to the parasitoid and the second one consisted of *A. gemmatalis* egg cards immersion in the same isolates of Bt and Dipel®. For the first experiment the isolates suspensions and Dipel® were mixed in a honey droplet (1:1), as food source and pure honey as the control and then, cards with the host eggs were simultaneously offered for the parasitism. For the second experiment cards with *A. gemmatalis* eggs were immersed in the suspensions and in Dipel®, and the control consisted of egg cards immersed in distilled water and then offered to the parasitism. Fifteen replications were used per treatment for each experiment. The experiments were kept in acclimatized chamber with $25 \pm 1^\circ\text{C}$, Relative Humidity of $70 \pm 10\%$ and photophase of 14h. Daily, total and accumulated parasitisms were evaluated, beyond the parasitoids survival and the total number of parasitized eggs. On the first experiment the treatments 633 and 1054 affected the parasitoids parasitism positively. However, on the second experiment, it was observed that the treatments with the isolates 716 and 1054 caused a reduction on the parasitism capacity of *T. pretiosum* 12. This way the work shows that Bt offered to the adults of *T. pretiosum* with food affects the species parasitism positively, however, when the egg cards were immersed in the isolates 716 and 1054, the parasitism suffered a drop what shows the necessity of experiments realization so that it can be determined which are the possible Bt isolates combinations that may be applied together with *T. pretiosum* on fitossanitary management programs.

KEY WORDS: Natural enemies, *Bacillus thuringiensis*, velvetbean caterpillar.

5.1 INTRODUÇÃO

É comum em programas de Manejo de pragas a interação de dois ou mais agentes de controle biológico. A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae) (Bt) foi inicialmente caracterizada como um patógeno de insetos, e sua atividade inseticida é atribuída aos cristais paraesporais que formam durante a fase estacionária de seu ciclo de desenvolvimento. Esta observação levou ao desenvolvimento de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* para o controle de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (SCHNEPF et al., 1998).

Isolados de Bt e/ou bioinseticidas à base desta bactéria têm ação patogênica contra mais de 1.000 espécies de insetos, destacando-se os lepidópteros, com 572 espécies suscetíveis (POLANCZYK & ALVES, 2003). Sua alta especificidade e seletividade favorecem a preservação do meio ambiente, sendo uma grande vantagem para o agricultor, por outro lado, sua baixa persistência em campo é um dos principais obstáculos à sua utilização em larga escala (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Apesar dos produtos à base de Bt favorecerem a preservação do meio ambiente, generalizações, nesses aspectos são difíceis, devido ao grande número de isolados existentes (mais de 60.000) e cada caso deve ser analisado separadamente (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Atualmente, com relação a parasitoides, o gênero *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é o mais estudado e utilizado em todo o mundo, pela sua eficiência, facilidade de criação em laboratório e ao fato de que diversas de suas espécies já foram coletadas em mais de 200 hospedeiros, pertencentes a mais de 70 famílias e oito Ordens de insetos (HASSAN, 1993). Com relação ao Brasil, sua importância é relevante devido ao potencial de controle de pragas em diversas culturas (PINTO, 1997).

Embora os efeitos prejudiciais dos bioinseticidas à base de Bt, sobre os inimigos naturais sejam mínimos e/ou significativamente menores que os dos agrotóxicos, esses não podem ser desprezados e estudos são necessários em regiões onde

essas táticas são empregadas em conjunto ou têm potencial de uso (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito de diferentes isolados de Bt sobre *T. pretiosum* no controle de *A. gemmatalis*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES) em Alegre, Espírito Santo.

Criação do parasitoide. A linhagem *Trichogramma pretiosum* Tp12 foi selecionada em estudo prévio para avaliar o efeito de *B. thuringiensis* (capítulo 1). A população foi mantida no NUDEMAFI, nas seguintes condições ($25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, UR de $65 \pm 5\%$ e fotofase de 14h). A criação de *T. pretiosum* Tp12 foi realizada em ovos do hospedeiro *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) colados com goma arábica 10% em retângulos de cartolina azul celeste de 8,0 x 2,0 cm e inviabilizados por exposição à lâmpada germicida (PARRA, 1997).

A criação de *A. kuehniella* foi realizada em caixas plásticas (30 x 25 x 10 cm), em cujo interior foram colocadas fitas de papelão corrugado (25 x 2 cm). A dieta, previamente homogeneizada, foi distribuída sobre essas fitas e os ovos de *A. kuehniella* colocados aleatoriamente na dieta. Os adultos do inseto foram coletados, diariamente, com aspirador de pó adaptado e transferidos para tubos de PVC (150 mm de diâmetro por 25 cm de altura) com tiras de tela de náilon, dobradas em zig-zag no seu interior para oviposição.

Criação de *Anticarsia gemmatalis*. Os adultos foram criados em gaiolas de madeira (40 x 40 x 40 cm), com as laterais teladas e com tampa de vidro em salas climatizadas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 12h. Esses adultos foram alimentados com dois chumaços de algodão contidos em duas placas de Petri (15 x 1,5 cm), embebidos

em solução nutritiva (mel 10,5 g, água destilada 1,05 L, cerveja 350 ml, sacarose 60 g, nipagin 1,05 g, ácido ascórbico 1,05 g), localizados no interior da gaiola (GREENE et al., 1976). As posturas foram coletadas em folhas de papel branco no interior das gaiolas.

Estas foram recortadas e colocadas em potes de 1.100 mL, com a tampa furada e vedada com tecido organza para aumentar a aeração, foram alimentadas com dieta artificial constituída por 125 g de feijão, 62,4 g de levedo de cerveja, 100 g de gérmen de trigo, 100 g de proteína de soja, 50 g de caseína, 35 g de ágar, 5 g de nipagin, 6 g de ácido ascórbico, 3 g de ácido sórbico, 6 mL de formol a 40% e 10 ml de solução vitamínica (niacinamida, pantotenato de cálcio, tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido fólico, biotina e vitamina B₁₂) (GREENE et al., 1976).

Obtenção dos isolados de *Bacillus thuringiensis*. Foram utilizados cinco isolados de *B. thuringiensis* 80, 997, 663, 716 e 1054, além da formulação comercial Dipel® (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*). Os isolados foram obtidos do banco de entomopatógenos do NUDEMAFI. A seleção destes foi realizada através de bioensaios de patogenicidade e virulência para *A. gemmatilis* realizados em estudo prévio (capítulo 2). Os isolados da coleção foram estocados na forma de fitas de papel filtro impregnados com uma suspensão de esporos e mantidos a 4 °C.

Os isolados foram multiplicados em meio de cultura BHI (“Brain Heart Infusion” ou Infusão de Cérebro e Coração - Biobrás) a 28 °C, sob agitação orbital a 180 rpm por 72 h para um crescimento padrão dos mesmos. Após a lise bacteriana, a mistura contendo esporos, cristais e células vegetativas foi transferida para tubos de Falcon com 5 mL de água destilada e esterilizada e foi submetida a 3 centrifugações consecutivas de 5.000 rpm por 20 min. Após a última centrifugação, o material foi resuspenso em água destilada esterilizada e utilizado no experimento.

Em seguida, uma alíquota de 1 mL da suspensão de 3×10^8 esporos/ mL foi diluída 100 vezes em água destilada, e a concentração de esporos determinada por meio de leitura em câmara de Neubauer, conforme método descrito em Alves & Moraes (1998). O *Bt kurstaki* foi obtido de formulação comercial e utilizado conforme recomendações do fabricante.

Condução dos experimentos. Foram realizados dois experimentos que serão descritos a seguir.

Experimento 1. Foram individualizadas 15 fêmeas recém-emergidas do parasitoide (15 repetições), em tubos de Duran, contendo uma gotícula de mel inoculado com diferentes isolados de Bt em suas paredes (proporção 1:1mL). A cada 24 horas, foi oferecida para cada fêmea, uma cartela de cartolina azul celeste (2,5 x 0,5cm) contendo 20 ovos do hospedeiro colados com goma arábica a 10%. Os tubos foram posteriormente fechados com filme plástico de PVC. Para a testemunha foi fornecida gotícula de mel sem Bt.

Experimento 2. Foram individualizadas 15 fêmeas recém-emergidas do parasitoide (15 repetições), em tubos de Duran, contendo uma gotícula de mel em suas paredes para alimentação do inimigo natural. A cada 24 horas, foi oferecida para cada fêmea, uma cartela azul celeste (2,5 x 0,5cm) contendo 20 ovos do hospedeiro colados com goma arábica a 10%. Esta cartela foi imersa em suspensão contendo a CL_{50} de cada um dos isolados e do Dipel e seca em capela de fluxo para retirar o excesso de água. Os tubos foram posteriormente fechados com filme plástico de PVC. Para a testemunha, foi fornecida cartela com ovos do hospedeiro mergulhadas em água destilada.

Os experimentos foram mantidos em câmaras climatizadas reguladas a temperaturas de 25 ± 1 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, até a emergência dos descendentes, quando foram avaliados os parasitismos diário, acumulado e total e a longevidade dos indivíduos.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo os resultados, submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, no caso do parasitismo total. Foi utilizado o programa computacional Sigma Plot, para confecção dos gráficos de parasitismo diário e acumulado. A sobrevivência foi comparada pelo método de distribuição de Weibull (SGRILLO, 1982).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O parasitismo diário de *T. pretiosum* em ovos de *A. gemmatalis* sofreu alterações devido à presença de Bt no alimento. O ritmo do parasitismo, no primeiro dia, oscilou de 4,6 a 7,4 ovos parasitados por fêmea de *T. pretiosum*. Esse foi o maior número de ovos parasitados, que correspondeu ao tratamento com o isolado 80 (7,4 ovos parasitados), e o menor foi o da testemunha e Dipel (4,6). (Dados não mostrados). Houve maior concentração de postura nos primeiros dias. A partir do terceiro dia, ocorreu queda no parasitismo com algumas oscilações ao decorrer do período (Figura 1). A queda do parasitismo em *T. pretiosum* é uma característica dessa espécie, pois esse parasitoide concentra as posturas nos primeiros dias de vida (PRATISSOLI, 1995).

O parasitismo, não foi afetado pela interação de *B. thuringiensis*, com o parasitoide apresentando número total de ovos, que oscilou entre 39 e 56 ovos parasitados. Para os isolados 633 e 1054, foi observado aumento no número total de ovos parasitados, com 56 e 54, respectivamente (Figura 2). A presença da bactéria no trato digestivo de insetos adultos não implicou no desenvolvimento da doença, pois são necessários receptores para que ocorra 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). É possível que o aumento do número de ovos parasitados seja uma resposta da fêmea para garantir a sobrevivência da prole, uma vez que a ingestão da toxina embora não seja letal para a fêmea, tenha causado algum processo fisiológico que desencadeou o comportamento expresso pelo aumento do parasitismo. Bezerrides et al. (2004) observaram que um alcaloide, obtido quando as lagartas de *Utetheisia ornatrix* (Lepidoptera: Arctiidae) se alimentaram de plantas, está presente no inseto adulto e também nos ovos que a fêmea oviposita. Esse alcaloide serve de proteção contra o parasitismo de *Trichogramma ostrinae* Pang et Chen. (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Porém, a fêmea do parasitoide ao perceber a presença do alcaloide aumenta a taxa de parasitismo para garantir a sobrevivência da prole, vencendo o mecanismo de defesa do inseto.

No entanto, o maior parasitismo observado nesses dois isolados levou um período maior para ser alcançado, pois foi necessário um período de 13 dias para a fêmea

submetida ao isolado 633 alcançar 80% de parasitismo e de 10 dias para o isolado 1054. Para os demais isolados, esse valor foi alcançado em 9 dias pela testemunha, em 8 dias pelos isolados 80 e 997, 10 dias pelo isolado 716 e pelo produto comercial Dipel (Figura 1).

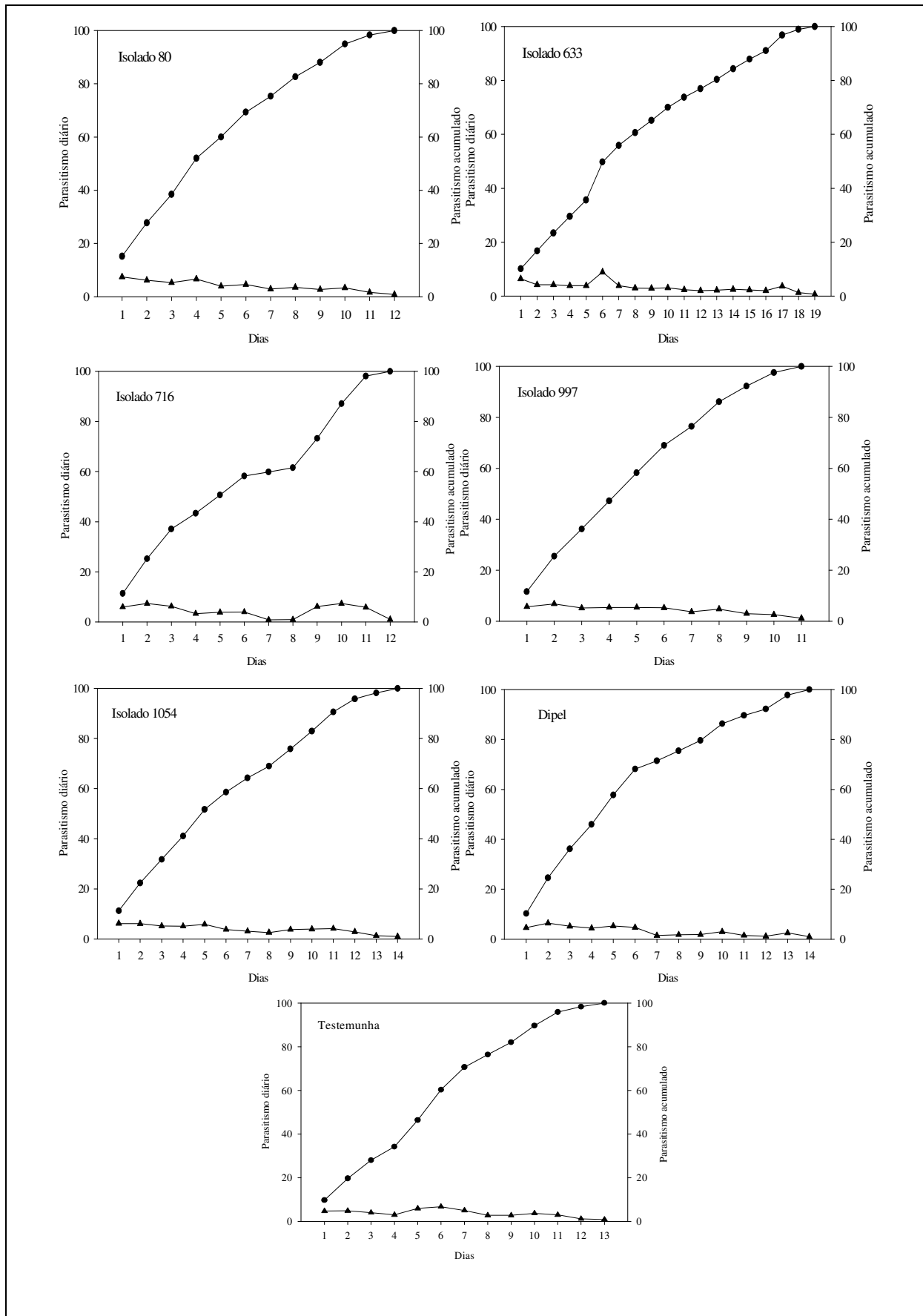


Figura 1 – Parasitismo diário e acumulado de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) alimentados com mel inoculado com diferentes isolados de Bt e Dipel.

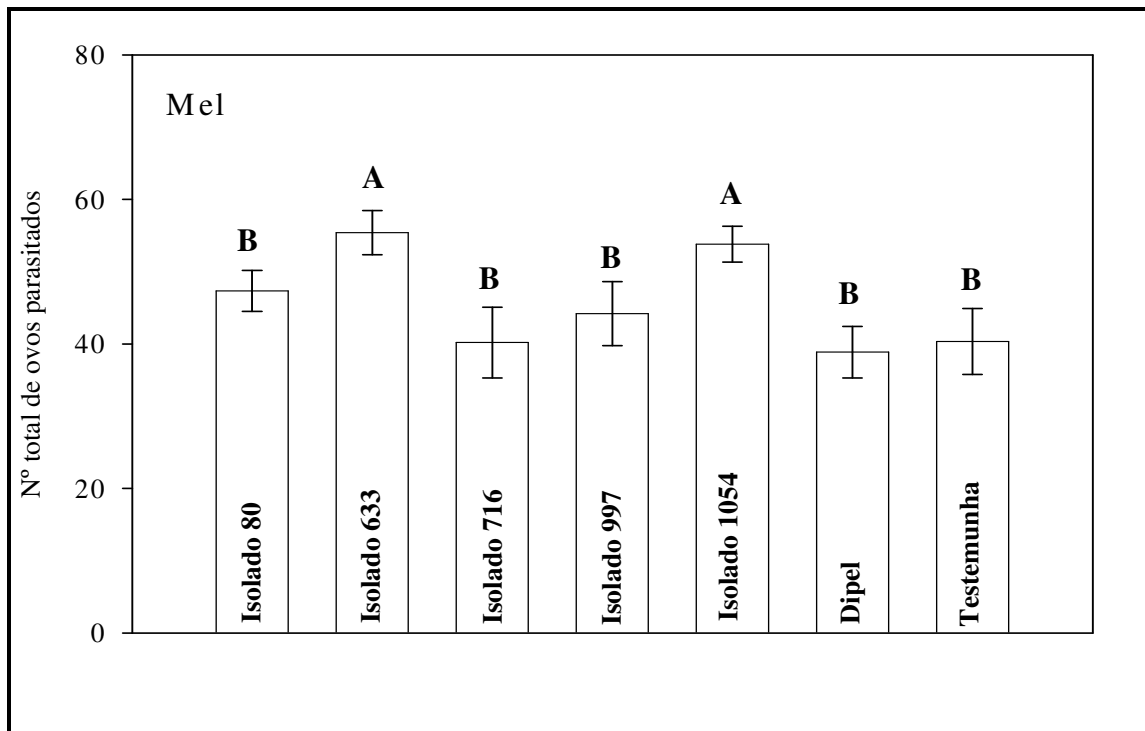


Figura 2- Número total de ovos de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae) parasitados por *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) alimentado com mel e *Bacillus thuringiensis*. 25±1 °C, UR 70±10% fotofase 14h.

Ao contrário dos dados observados neste trabalho, Wang et al. (2007), mostraram que o parasitismo de ovos de *Ostrinia furnacalis* Guenee (Crambidae: Pyraustinae) não foi afetado pela interação de *B. thuringiensis* fornecido no alimento com o parasitoide *T. ostrinae*. Polanczyk et al. (2006) mostraram que o parasitismo de *T. pretiosum* e *T. pratissolii* Querino & Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos de *A. kuehniella* também não sofreu alterações devido a presença de Bt no alimento. Esses resultados indicam que o comportamento de aumento de parasitismo pode ser característico da linhagem *T. pretiosum* Tp12, na interação com alguns isolados de Bt.

A caracterização molecular dos isolados 663 e 1054 será crucial para a melhor compreensão dos dados obtidos neste trabalho. A identificação das toxinas presentes nos isolados tornará possível o estudo dos receptores presentes no epitélio intestinal de *A. gemmatalis*. A histopatologia do intestino médio desse inseto também fornecerá indícios sobre o processo fisiológico que causou a alteração no comportamento do parasitoide.

Pela distribuição de Weibull, a longevidade dos parasitoides em todos os tratamentos, neste experimento, mostrou a mesma tendência, pois a mortalidade seguiu uma distribuição normal não sendo observada queda acentuada (Figura 3). Os valores variaram de 11 a 19 dias, com maior valor para o isolado 633 e menor valor para o isolado 997.

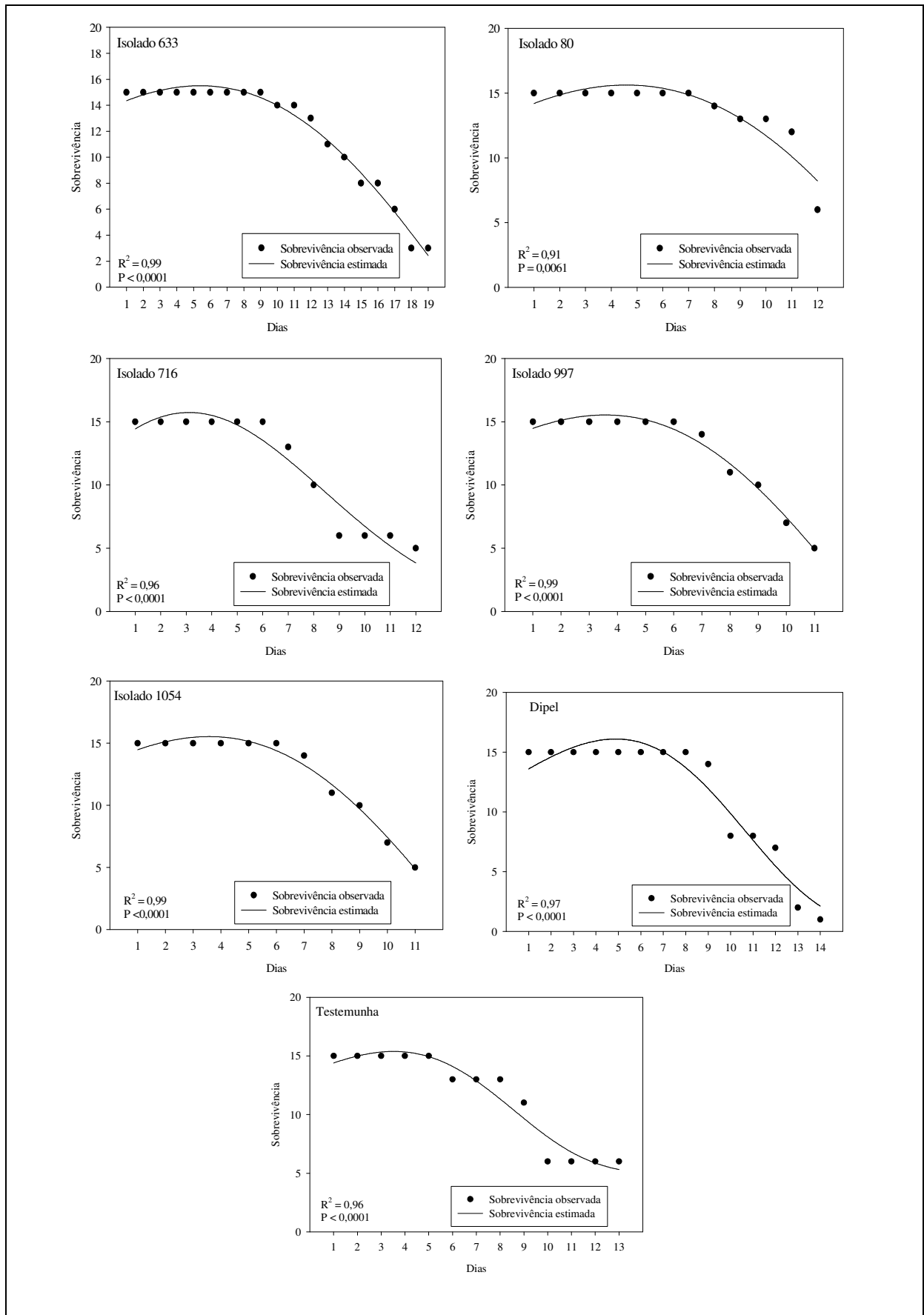


Figura 3 – Sobrevivência de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) alimentado com mel e diferentes isolados de Bt e Dipel®.

No experimento em que as cartelas de ovos foram mergulhadas em diferentes isolados de Bt e no Dipel, também ocorreram alterações, pois todos os tratamentos afetaram o parasitismo. O número total de ovos parasitados foi maior para a testemunha (67), e o menor número observado para o isolado 716 (26) (Figura 4). O parasitismo no primeiro dia variou de 3,3 a 7,0 ovos parasitados por fêmea de *T. pretiosum*. O maior número de ovos parasitados no primeiro dia foi observado para o isolado 997 (7,0) e o menor para o isolado 1054 (3,3). A testemunha apresentou 3,4 ovos parasitados no primeiro dia, o que demonstra que os tratamentos com os diferentes isolados de Bt e com Dipel apresentaram número de ovos parasitados no primeiro dia superior ao encontrado na testemunha, com exceção ao valor encontrado para o tratamento com o isolado 1054, que foi menor quando comparado com os tratamentos anteriormente mencionados (3,3 ovos parasitados no primeiro dia) (Dados não mostrados). Neste experimento, o índice de 80% de parasitismo acumulado foi alcançado em 8 a 10 dias (Figura 5).

Pratissoli e Parra (2001) atribuíram como causa da variação no parasitismo, o uso de diferentes espécies e/ou linhagens de *Trichogramma*, assim como o hospedeiro utilizado e condições climáticas. Outro fator que pode ter causado a baixa capacidade de parasitismo pode estar relacionado ao efeito de repelência causado pela aplicação prévia dos isolados de Bt. O processo de parasitismo consiste em uma série de estágios interconectados (VINSON, 1976). Uma vez que o hospedeiro é encontrado, ele poderá ser inspecionado para que se avalie sua identidade, condição e disponibilidade no que se refere ao local de oviposição. Baseado em dicas sensoriais adquiridas antes ou durante o contato, o parasitoide determina a aceitabilidade do hospedeiro. Antes de tentar ovipositar em um hospedeiro potencial, a fêmea de *Trichogramma* caminha para trás e para frente sobre o hospedeiro, enquanto o toca continuamente com sua antena. Se o hospedeiro for aceito o parasitoide assume uma postura de perfuração e começa a aprofundar o córion do hospedeiro com seu ovipositor. Se o hospedeiro é rejeitado o ovipositor é retirado antes da deposição no ovo do hospedeiro (WAJNBERG & HASSAN, 1994).

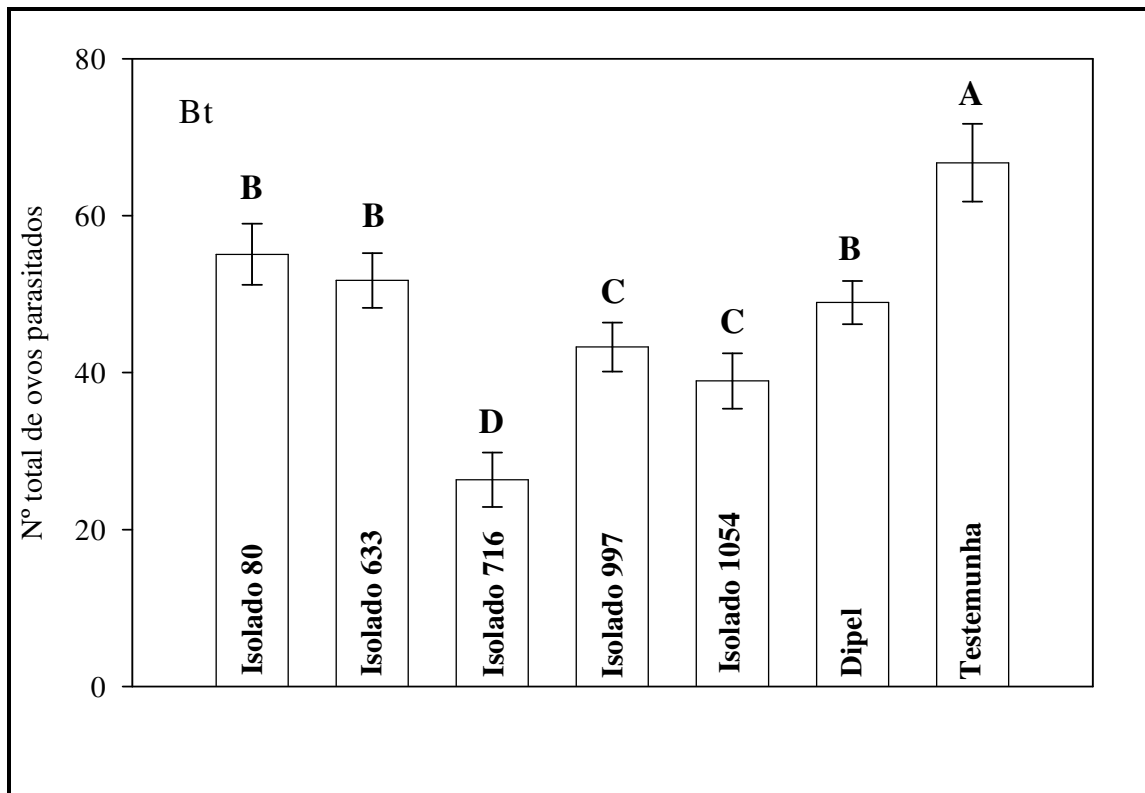


Figura 4 - Número total de ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) parasitados por *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) quando cartelas com ovos foram mergulhadas nos isolados de *Bacillus thuringiensis*, Dipel e em água deslilada. $25\pm 1^\circ\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ fotofase 14h.

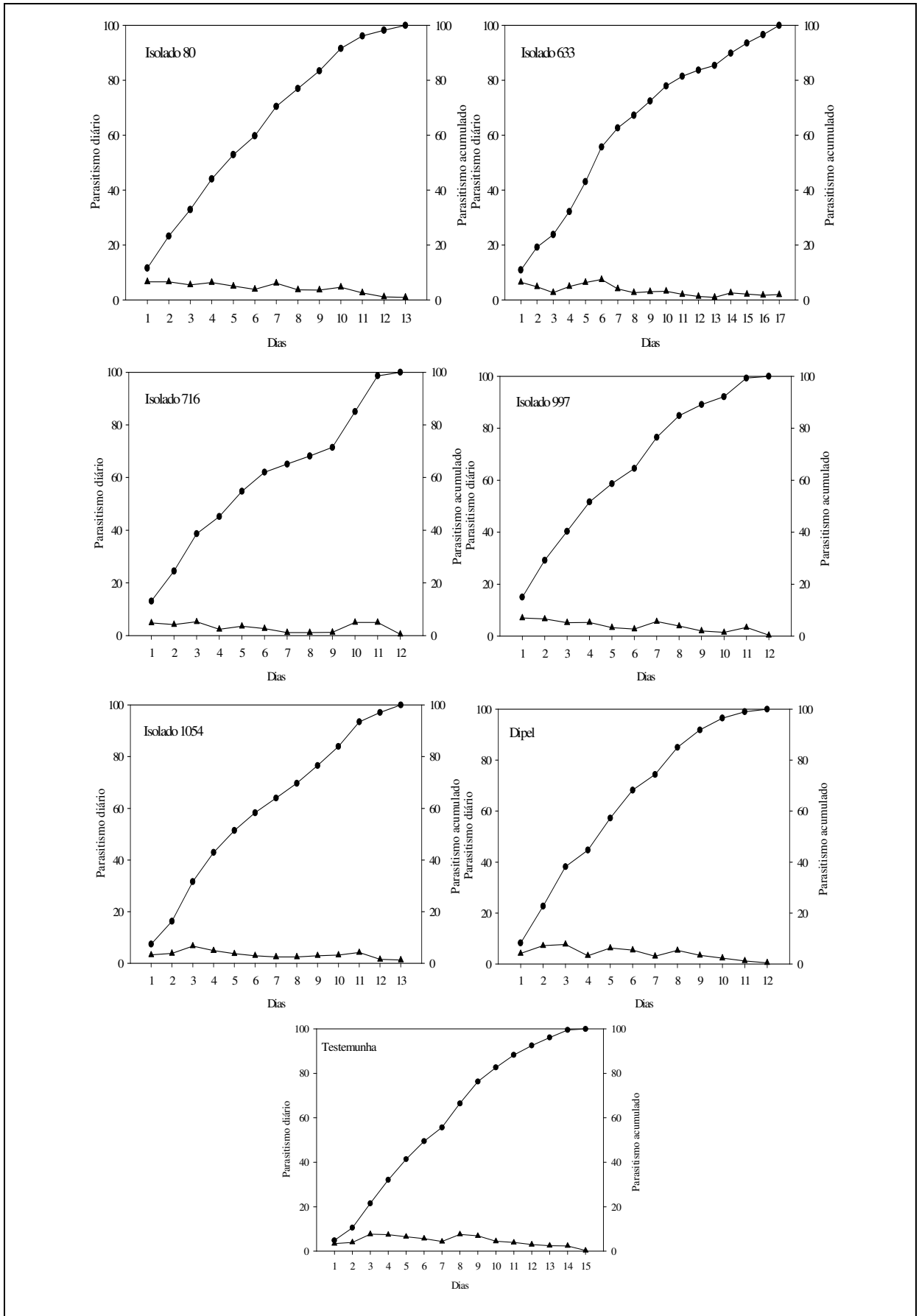


Figura 5 – Parasitismo diário e acumulado de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) cartela de ovos mergulhada em diferentes isolados de Bt e Dipel®.

Vários fatores afetam a aceitabilidade ao hospedeiro e a alocação da progênie. Dentre eles, pode-se citar os fatores visuais, *Trichogramma* pode detectar diferenças na intensidade da luz e no comprimento de onda. Os fatores físicos e químicos também podem ser citados. No primeiro, a espessura, dureza e a permeabilidade do córion, são sempre mencionadas como fatores que afetam a aceitação e a adequação ao hospedeiro.

Com relação aos fatores químicos, trabalhos mostram que substâncias químicas presentes na superfície do hospedeiro podem promover ou inibir a aceitação por espécies de *Trichogramma* (WAJNBERG & HASSAN, 1994). Gonçalves-Gervásio & Vendramim (2004) realizaram experimentos em que ovos de *A. kuehniella* foram mergulhados em extrato aquoso de sementes de Nim a 10% e observaram que houve repelência do hospedeiro pelo *T. pretiosum* que teve seu parasitismo afetado de forma significativa sobre ovos de *A. kuehniella*. Broglio-Micheletti et al. (2006) observaram que isolados de *Metarhizium anisopliae* Metchnikoff (Hypocreales: Clavicipitaceae) acarretaram uma diminuição de 13 a 33,2% no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) por *T. galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) quando estes foram mergulhados nos isolados. No mesmo trabalho, observaram que isolados de Nim impossibilitaram o parasitismo, pois este foi repelente a adultos de *T. galloi*.

A repelência de inseto predador a outro entomopatógeno foi relatada por Meyling & Pell (2006). Esses autores observaram que tanto machos como fêmeas de *Anthocoris nemorum* L. (Heteroptera: Anthocoridae) mostraram comportamento de repelência a folhas contendo conídios do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Hypocreales: Clavicipitaceae) e permaneceram pouco tempo sobre as folhas contaminadas o que prejudicou sua busca por presas.

A sobrevivência de *T. pretiosum* neste experimento apresentou valores que variaram de 12 a 17 dias. Para os isolados 716, 997 e Dipel® os valores foram menores (12 dias) e o maior valor foi observado para o isolado 633 (17 dias), embora sem diferença significativa (Figura 6)

Esses resultados mostram que Bt fornecido via alimento para adultos de *T. pretiosum* Tp12 favoreceu o parasitismo nos tratamentos 633 e 1054, o que ressalta a viabilidade da interação Bt e *Trichogramma* observada em trabalhos em campo

(HAJI et al., 2002). Os bons resultados, muitas vezes, são essenciais para o sucesso e a continuidade de programas de manejo fitossanitário. Com relação ao segundo experimento, as cartelas com ovos mergulhadas em alguns isolados de Bt e oferecidas em seguida ao parasitoide afetou sua capacidade de parasitismo negativamente.

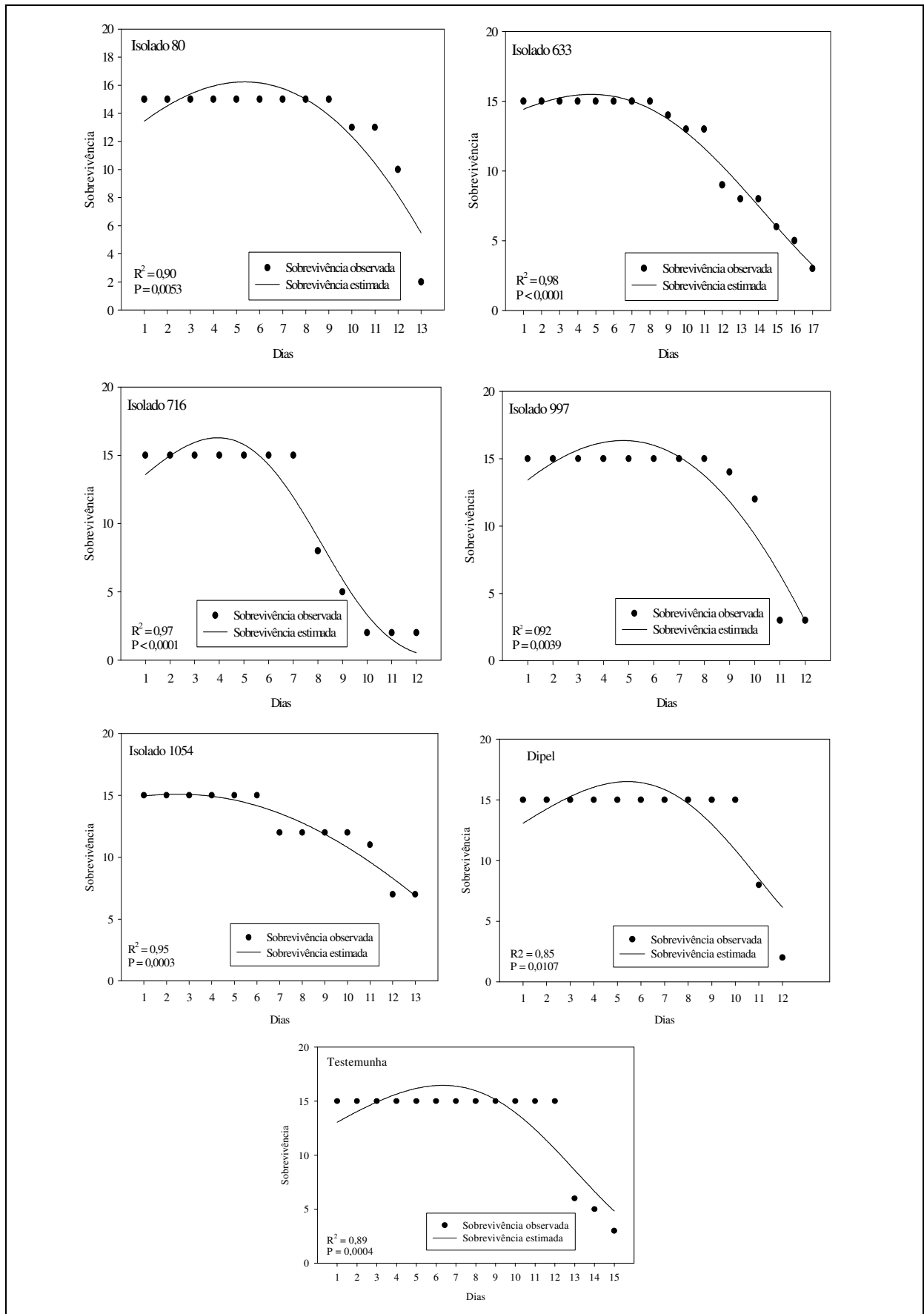


Figura 6 – Sobrevivência de *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) cartela mergulhada em isolados de Bt e Dipel®.

5.4 CONCLUSÃO

Os isolados de Bt testados e o produto comercial Dipel®, quando fornecidos via alimento não têm efeitos negativos; portanto, foi observado aumento do parasitismo com os isolados 663 e 1054.

Todos os tratamentos causaram redução no parasitismo de *T. pretiosum*, quando os ovos foram imersos em suspensão com Bt.

5.5 LITERATURA CITADA

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 765-777. 1998.

BEZZERIDES, A.; YONG, T.H., BEZZERIDES, J.; HUSSEINI, J.; LADAU, J.; EISNER, M.; EISNER, T. Plant-derived pyrrolizidine alkaloid protects eggs of a moth (*Utetheisa ornatrix*) against a parasitoid wasp (*Trichogramma ostrinia*) **PNAS** vol. 101 no. 24. 2004

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; DOS SANTOS, A.J.N.; PEREIRA-BARROS, J.L. Efeitos de herbicida, inseticidas químico, biológico e botânico sobre *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Magistra**. Cruz das Almas-BA. v.18, n. 1, p. 21-26. 2006.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety*. Chichester: John Wiley, 350 p. 2000.

GONÇALVES-GERVÁSIO, RITA de C.R; VENDRAMIM, J.D. Efeito de Extratos de Meliáceas Sobre o Parasitoide de Ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**. 2004.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-488, 1976.

HAJI, F.N.D.; PREZOTTI, L.; CARNEIRO, J.S.; ALENCAR, J.A. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro industrial. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CÔRREA FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, cap. 28, p. 477-494. 2002.

HASSAN, S. The mass rearing and utilization of *Trichogramma* to control lepidopterous pests: achievements and outlook. **Journal of Pest Science**. 37: 387-391. 1993.

MEYLING, N.V.; PELL, J.K.; EILENBERG, J. Dispersal of *Beauveria bassiana* by the activity of nettle insects. **Journal of invertebrate pathology**. p. 121-126. 2006.

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, p.121-150. 1997.

PINTO, J.D. Taxonomia de Trichogrammatidae (Hymenoptera) com ênfase nos gêneros que parasitam Lepidoptera. In PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, cap. 1, p. 13-39. 1997

POLANCZYK, R.A & ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**. 7:1-10. 2003.

POLANCZYK, R.A.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U.R.; OLIVEIRA, R.G. dos S.; ANDRADE, G.S. Interação entre inimigos naturais: *Trichogramma* e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Acta Scientiarum**, v.28, n.2, p.233-239, 2006.

PRATISSOLI, D. **Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, nas traças *Scrobipalpaloides absoluta* (Meyrick, 1917) e *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) em tomateiro**. 1995. Tese (Doutorado)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

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, p.277-282, 2001.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. AND DEAN D. H.; *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p. 775–806. 1998.

SGRILLO, R.B. A distribuição de Weibull como modelo de sobrevivência de insetos. **Ecossistema**, v.7,p.9-13, 1982.

VINSON, S. B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review of Entomology**. Palo Alto, v. 21, p. 109-133, 1976.

WAJNBERG, E.; HASSAN, S.A. Biological control with egg parasitoids. In: SCHMIDT, J.M. **Host Recognition and acceptance by Trichogramma**. p. 165-193. Cab International 1994.

WANG, Z.Y., WU, Y., K.L. HE & S.X. BAI. 2007. Effects of transgenic Bt maize pollen on longevity and fecundity of *Trichogramma ostriniae* in laboratory conditions. **Bull Insectol** 60: 49-55. 2007.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A linhagem de *Trichogramma pretiosum* Tp12 foi a mais promissora para o controle de *A. gemmatalis*.

Entre vinte e três isolados testados, cinco (80, 633, 716, 997, 1054) causaram mortalidade superior a 90% em *A. gemmatalis* e a estimativa da CL_{50} mostrou que os isolados apresentam virulência semelhante.

Os isolados de Bt testados e o produto comercial Dipel, quando fornecidos via alimento, não têm efeitos negativos e aumento do parasitismo foi observado com os isolados 663 e 1054.

Todos os tratamentos causaram redução no parasitismo quando os ovos foram imersos em suspensão com Bt.