



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EVERTON RICARDI LOZANO DA SILVA

EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki* E *Trichogramma pretiosum* Riley (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

EVERTON RICARDI LOZANO DA SILVA

EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki* e *Trichogramma pretiosum* Riley (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves

Co-Orientador: Prof. Dr. Flávio Moscardi

Londrina
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Dois Vizinhos***

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586e Silva, Everton Ricardi Lozano da.

Efeito de produtos alternativos sobre *Bacillus thuringiensis*
subesp. *kurstaki* e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera:
Trichogrammatidae) / Everton Ricardi Lozano da Silva – Londrina,
[s.n], 2010.

117 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Prof. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves, Dr.

Co-orientador: Prof. Flávio Moscardi, Dr.

Tese (Doutorado) – UEL. Londrina, 2010.

1. Bactérias entomopatogênicas. 2. Controle alternativo.
3. Compatibilidade. 4. Parasitóide de ovos. 5. Controle associado.
I. Neves, Pedro Manuel Oliveira Janeiro, orient. II. Universidade Estadual
de Londrina, III. Título

CDD: 632.7

CDU: 595.7

EVERTON RICARDI LOZANO DA SILVA

**EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki* E *Trichogramma pretiosum* Riley
(HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Moscardi – UEL/EMBRAPA

Profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes
Trindade Vilas-Bôas – UEL

Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves –
UNIOESTE

Profa. Dra. Vanda Pietrowski – UNIOESTE

Dra. Ana Maria Meneguim – IAPAR

Prof. Dr. Amarildo Pasini – UEL

Dr. Daniel Sosa-Gómez – EMBRAPA

Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves
Orientador
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 14 de junho de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, os culpados de tudo e as
pessoas que mais amo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me concedeu a benção da vida e força durante toda minha caminhada.

Ao Prof. Dr. Pedro Neves, pela orientação e paciência durante todo esse processo, além do incentivo e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Flávio Moscardi pela co-orientação e todo o apoio despendido desde o início.

Ao Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves, pela amizade, orientação, dedicação e apoio incondicional ao longo de todo o processo da minha formação superior.

À Prof^a Dr^a Gislayne Fernandes Lemes Vilas-Bôas do Laboratório de Bioinseticidas do CCB por todo apoio e dedicação na execução dos experimentos de eletroforese.

À Prof^a Dr^a Célia Guadalupe e ao técnico Osvaldo Capello do Laboratório de Microscopia Eletrônica por todo apoio na execução dos experimentos de microscopia.

À Dr^a Rose Monnerat pelo fornecimento de materiais para os experimentos.

À Dr^a Vanda Pietrowski pelo auxílio na elaboração do projeto com *Trichogramma* e pelo fornecimento dos materiais para a execução dos experimentos.

À Embrapa Soja e ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pelo apoio estrutural disponibilizado.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná *Campus* Dois Vizinhos pelas instalações e apoio na finalização do processo.

Aos Professores do curso de Pós-graduação em Agronomia da UEL, pelos ensinamentos recebidos.

Aos meus pais Itamar e Ivanda e aos meus irmãos Wellington e Danielly, pelo apoio, incentivo e compreensão.

À amiga do curso de Pós-graduação em Agronomia, Michele Potrich por todos os momentos de estudo e trabalho compartilhados e pela agradável convivência.

Aos companheiros do laboratório de Biotecnologia Elis, Ana, Diego e Nicole, especialmente a Jéssica, Leonardo e Andréia pela amizade, companheirismo e auxílio fundamental na condução dos experimentos.

À colega Paola Dalcanal pela ajuda fundamental na finalização da elaboração da tese.

A todas as demais pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e, que não foram aqui mencionadas.

“O homem que venceu na vida é aquele que viveu bem, riu muitas vezes e amou muito, que conquistou o respeito dos homens inteligentes e o amor das crianças, que preencheu um lugar e cumpriu uma missão, que deixou o mundo melhor do que encontrou, que procurou o melhor nos outros e deu o melhor de si.”

R.L Stevenson

SILVA, Everton Ricardi Lozano da. **Efeito de produtos alternativos sobre *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* e *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2010. 118f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Assim como os produtos alternativos (PA), *Bacillus thuringiensis* e *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) são estratégias importantes para a proteção de plantas em sistemas alternativos de produção. Embora os PA sejam mais seguros que os produtos fitossanitários convencionais, há poucas informações sobre as interações de PA e agentes de controle biológico. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de PA sobre esporos e cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, linhagem S-1905 (Btk-S1905) e parâmetros biológicos de *T. pretiosum* em condições de laboratório. Foram utilizados os produtos Pironin, Biogermex, Ecolife[®], Extrato de Crisântemo, Planta Clean, Mattam Plus, Natural Neem, Supermagro, Calda Sulfocálcica e Bion[®] nas concentrações recomendadas pelos fabricantes. O efeito sobre esporos foi avaliado nas aplicações conjunta e separada. Na aplicação conjunta as misturas Btk-S1905 + PA + água destilada esterilizada (ADE) foram incubadas (150 rpm, 30 ± 2°C, 2 h) e inoculadas em ágar nutriente (AN) em placas de Petri. Na aplicação separada os PA foram espalhados na superfície do meio AN em placas de Petri e, em seguida, inoculou-se o patógeno. Em ambas as aplicações as placas inoculadas foram incubadas (30° C ± 2° C, 16 h), quantificando-se as unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Para os cristais, após incubação, a mistura Btk-S1905 + PA + ADE foi adicionada à dieta artificial para *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), avaliando-se a mortalidade após 12, 24, 48 e 72 h. As análises dos efeitos dos PA sobre os cristais também foram feitas por Microscopia Eletrônica de Varredura e Eletroforese. Para avaliar o efeito sobre *T. pretiosum*, os PA foram pulverizados em ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) no pré e pós-parasitismo e, em diferentes fases do desenvolvimento de *T. pretiosum* no hospedeiro, sendo avaliados o número de ovos parasitados, o percentual de emergidos, a razão sexual, o ciclo ovo-adulto e a longevidade. Para Btk-S1905 verificou-se que Biogermex, Calda Sulfocálcica e Ecolife[®] reduziram as UFC/mL, nas aplicações conjunta e separada, e óleo de nim, na conjunta. Biogermex, Bion[®], Planta Clean e óleo de nim foram antagônicos à ação das toxinas, entretanto, nenhum produto degradou as proteínas do cristal. O efeito dos demais produtos foi aditivo à ação das toxinas e, exceto Calda Sulfocálcica, também não reduziram a formação de UFC/mL. Para *T. pretiosum* verificou-se que no pré-parasitismo, a maioria dos produtos causou repelência à oviposição, sendo que apenas Calda Sulfocálcica e Extrato de Crisântemo reduziram o número de ovos parasitados. Nenhum dos PA reduziu a porcentagem de emergência e alterou a razão sexual. Por outro lado, alguns produtos alteraram o ciclo ovo-adulto e a longevidade dos adultos, no pré e pós-parasitismo, com valores inferiores a um dia.

Palavras-chave: Bactérias entomopatogênicas. Controle alternativo. Compatibilidade. Parasitóides de ovos. Controle associado.

SILVA, Everton Ricardi Lozano da. **Effect of alternative products on *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 2010. 118p. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Such as alternative products (AP), *Bacillus thuringiensis* and *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) are important strategies for pests control on alternative production systems. Although AP are safer than the conventional phytosanitary products, there are few information about interactions of AP and biological control agents. In this context, the objective of the present research was to evaluate the effect of AP on spores and crystals of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, Isolate S1905 (Btk-S1905) and biological parameters of *T. pretiosum* under laboratory conditions. The tested products were Pironin, Biogermex, Ecolife®, Chrysanthemum Extract, Planta Clean, Mattam Plus, Natural Neem, Super Magro, Calda Sulfocálcica and Bion® in concentrations recommended by the producer. The effect were evaluated in the combined and single application. In the combined application the mixtures Btk-S1905 + AP + sterile distilled water (SDW) were incubated (150 rpm, 30 ± 2° C, 2 h), and inoculated in nutrient agar (NA) in Petri dishes. In the single application the AP were spread in the NA medium surface in Petri dishes, and then the pathogen was inoculated. In both application the inoculated Petri dishes were incubated (30° ± 2° C, 16 h) before colony forming units (CFU)/mL quantification. For the crystals, after incubation the mixture Btk-S1905 + AP + SDW was incubated (150 rpm, 30 ± 2 °C, 2 h) and added to the surface of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) artificial diet, with mortality being evaluated after 12, 24, 48 and 72 h. Analyses of the effects on the Bt crystals were also conducted by scanning electron microscopy and electrophoresis. For to evaluate the effect on *T. pretiosum* the AP were applied over eggs of the alternative host *Anagasta kuehniella* (Zeller) before and after parasitism and in different development phases of the parasitoid, being evaluated the number of parasitized eggs, emergence percentage, sexy ratio, egg-adult cycle and adult longevity. For the Btk-S1905 Biogermex, Calda Sulfocálcica and Ecolife®, CFU/mL was reduced in combined and single application and, neem oil in combined. Biogermex, Bion®, Planta Clean and neem oil were antagonistic to the toxins, however, none of the products degraded the crystal proteins. The effect of the remaining products were additive to the toxins, and, except for Calda Sulfocálcica, they also did not affected the CFU/mL formation. For *T. pretiosum* it was observed that the majority of the products were repellent to parasitoid oviposition. Only Calda Sulfocálcica and Chrysanthemum Extract reduced the number of parasitized eggs, when applied before parasitism. None of the AP affected parasitoid emergence and sexual rate. On the other hand, some products altered the cycle egg-adult and adult longevity in both application strategies, with values being lower than one day.

Keywords: Entomopathogenic bacteria. Alternative control. Compatibility. Parasitoids eggs. Associated control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1** – Microscopia Eletrônica de Varredura da mistura de esporos e cristais da linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h). 1- Testemunha; 2- Pironin; 3- Biogermex; 4- Ecolife[®]; 5- Extrato de Crisântemo; 6- Planta Clean. EP: esporo; CB: cristal bipiramidal; CC: cristal cubóide; CE: cristal esférico.71
- Figura 3.2** – Microscopia Eletrônica de Varredura da mistura de esporos e cristais de da linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h). 1- Testemunha; 2- Mattam Plus; 3- Supermagro; 4- Calda Sulfocálcica; 5- Bion[®]. EP: esporo; CB: cristal bipiramidal; CC: cristal cubóide; CE: cristal esférico.72
- Figura 3.3** – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) de proteínas da linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h): 1 – Marcador molecular, 2- *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-1, 3- Testemunha (água), 4- Biogermex, 5- Bion[®], 6- Calda Sulfocálcica, 7- Extrato de Crisântemo, 8- Ecolife[®]73
- Figura 3.4** – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) de proteínas da linhagem *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h): 1 – Marcador molecular, 2- *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-1, 3- Testemunha (água), 4- Matam Plus, 5- Natural Neem, 6- Planta Clean, 7- Pironin, 8- Supermagro.74

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Produtos alternativos e concentrações utilizados nos experimentos.....	53
Tabela 3.2 – Número médio (\pm EP) de UFC/mL da linhagem <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>Kurstaki</i> S1905, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e produtos alternativos, nas CR, e pH inicial e final, inoculação em meio de cultura AN em placas de Petri e incubação em câmara climatizada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 18 h).	61
Tabela 3.3 – Número médio (\pm EP) de UFC/mL de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> linhagem S1905, após inoculação em meio ágar nutriente adicionado de produtos alternativos, nas CR, na superfície do meio de cultura AN em placas de Petri e incubação em câmara climatizada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 18 h).	62
Tabela 3.4 – Porcentagem média (\pm EP) da mortalidade de lagartas <i>A. gemmatalis</i> por <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> linhagem S1905 nos tempos 12, 24, 48 e 72 h e total observada, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e produtos alternativos, nas CR, em diferentes concentrações e pH inicial e final.....	67
Tabela 4.1 – Produtos alternativos e concentrações utilizados nos experimentos.....	87
Tabela 4.2 – Preferência de parasitismo (\pm EP) de <i>T. pretiosum</i> em ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, ou água destilada esterilizada pré parasitismo. Teste com livre chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$; fotofase: 14 h.	93

Tabela 4.3 – Número de ovos (\pm EP) de <i>A. kuehniella</i> parasitados por <i>T. pretiosum</i> quando tratados com produtos alternativos, nas CR, ou água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem livre chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$; fotofase: 14 h.	96
Tabela 4.4 – Porcentagem média (\pm EP) de adultos de <i>T. pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	98
Tabela 4.5 – Razão sexual (\pm EP) de <i>T. pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	100
Tabela 4.6 – Ciclo ovo-adulto em dias (\pm EP) de fêmeas e machos de <i>T. pretiosum</i> criados em ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada no pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	102
Tabela 4.7 – Longevidade em dias (\pm EP) de adultos (fêmeas e machos) de <i>T. pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	104
Tabela 4.8 – Porcentagem (\pm EP) de adultos de <i>T. pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes etapas do desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	106

Tabela 4.9 – Razão sexual (\pm EP) de adultos de <i>T. pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes etapas do desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	108
Tabela 4.10 – Ciclo ovo-adulto em dias (\pm EP) de fêmeas e machos de <i>T. pretiosum</i> em ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes etapas do desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	109
Tabela 4.11 – Longevidade (\pm EP) de adultos (fêmeas e machos) de <i>T. pretiosum</i> emergidos de ovos de <i>A. kuehniella</i> tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes fases de desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.	111

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 SISTEMAS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO.....	18
2.2 PRODUTOS ALTERNATIVOS	19
2.2.1 Nim <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	19
2.2.2 Crisântemo <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> Trev.	20
2.2.3 Pironin	21
2.2.4 Calda Sulfocálcica.....	22
2.2.5 Supermagro.....	23
2.2.6 Biogermex	23
2.2.7 Ecolife®	23
2.2.8 Planta Clean.....	24
2.2.9 Bion®	24
2.3 O GÊNERO <i>TRICHOGRAMMA</i>	24
2.4 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> BERLINER	27
2.4.1 Modo de Ação e Patogenicidade de <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
2.4.2 Utilização de <i>Bacillus thuringiensis</i> no Controle de Pragas.....	29
2.5 Produtos Alternativos e o Controle Biológico	31
REFERÊNCIAS	37
3 ARTIGO A – EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE <i>Bacillus thuringiensis</i> SUBESP. <i>Kurstaki</i>	48
3.1 RESUMO	48
ABSTRACT.....	49
3.2 INTRODUÇÃO	50
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.3.1 Efeito dos Produtos Alternativos sobre a Viabilidade de Esporos de <i>Bacillus thuringiensis</i> Subesp. <i>kurstaki</i>	52

3.3.1.1	Aplicação conjunta: produtos alternativos misturados com água destilada esterilizada e <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	54
3.3.1.2	Aplicação separada: produtos alternativos e esporos de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> , aplicados na superfície do meio de cultura.....	54
3.3.2	Efeito dos Produtos Alternativos sobre os Cristais de <i>B. thuringiensis</i> Subesp. <i>kurstaki</i>	55
3.3.2.1	Efeito da toxicidade sobre <i>A. gemmatalis</i>	55
3.3.2.2	Morfologia e integridade dos cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	58
3.3.2.3	Integridade dos cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) desnaturante.....	59
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.4.1	Efeito dos Produtos Alternativos sobre a Viabilidade de Esporos de <i>B. thuringiensis</i> Subesp. <i>kurstaki</i>	60
3.4.1.1	Aplicação conjunta: produtos alternativos misturados com água destilada esterilizada e <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	60
3.4.1.2	Aplicação separada: produtos alternativos e esporos de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> , aplicados na superfície do meio de cultura.....	61
3.4.2	Efeito dos Produtos Alternativos sobre os Cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i>	65
3.4.2.1	Efeito da toxicidade sobre <i>A. gemmatalis</i>	65
3.4.2.2	Morfologia e integridade dos cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).....	70
3.4.2.3	Integridade dos cristais de <i>B. thuringiensis</i> subesp. <i>kurstaki</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	73
3.5	CONCLUSÃO.....	77
3.6	REFERÊNCIAS.....	77
4	ARTIGO B – EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE <i>Trichogramma pretiosum</i> Riley (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)	883
4.1	RESUMO.....	883

ABSTRACT.....	84
4.2 INTRODUÇÃO	85
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	86
4.3.1 Efeito dos Produtos Alternativos sobre Parâmetros Biológicos de <i>Trichogramma pretiosum</i>	88
4.3.1.1 Obtenção dos ovos e adultos de <i>T. pretiosum</i>	88
4.3.1.2 Preparação dos bioensaios e pulverização dos produtos alternativos	88
4.3.1.3 Teste com livre chance de escolha	88
4.3.1.4 Teste sem chance de escolha – pré-parasitismo	89
4.3.1.5 Teste sem chance de escolha - pós-parasitismo	89
4.3.1.6 Efeito dos produtos alternativos sobre o desenvolvimento de <i>T.</i> <i>pretiosum</i>	90
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
4.4.1 Teste com Livre Chance de Escolha.....	91
4.4.2 Teste sem Chance de Escolha – Pré e Pós-Parasitismo	94
4.4.3 Efeito dos Produtos Alternativos sobre o Desenvolvimento de <i>Trichogramma pretiosum</i>	105
4.5 CONCLUSÃO	114
4.6 REFERÊNCIAS.....	114
5 CONCLUSÕES GERAIS	118

1 INTRODUÇÃO

O modelo de agricultura convencional desenvolveu-se amplamente a partir da década de 1950, alicerçado em avanços científicos e inovações tecnológicas com vistas ao aumento da produção e do lucro. No entanto, a gestão inadequada dessas tecnologias, com destaque aos produtos fitossanitários, tem impactado os recursos naturais e processos biológicos, de forma que é cada vez mais necessária a intervenção humana nos agroecossistemas, tornando-os, muitas vezes, insustentáveis ecológica e economicamente.

A intensa utilização dos produtos fitossanitários sintéticos tem causado a seleção de populações de pragas resistentes, eliminação de inimigos naturais, contaminação de alimentos, do solo e da água, além de intoxicação direta do homem (GALLO et al., 2002; GLIESSMAN, 2005). Como consequência é cada vez mais frequente a preocupação geral por alimentos mais “limpos” e saudáveis, assim como a busca da sociedade científica por novas tecnologias que garantam a sustentabilidade agrícola. Tal sustentabilidade, segundo Gliessman (2005) é viabilizada por meio de práticas agrícolas alternativas orientadas por conhecimentos de processos ecológicos em consonância ao contexto social.

No que se refere ao manejo de pragas e doenças, entre as práticas alternativas empregadas destacam-se a utilização de produtos alternativos como extratos vegetais, óleos essenciais, caldas fertiprotetoras, compostos para estabelecimento do equilíbrio nutricional das plantas, além do uso de agentes de controle biológico (PENTEADO, 2007).

Entre os agentes de controle biológico, a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, disponível como produto formulado, tem sido amplamente utilizada no controle de lagartas em várias culturas, como tomate, algodão, citros, mandioca, soja, trigo, milho (GALLO et al., 2002), especialmente, nos sistemas alternativos de produção (PENTEADO, 2007). Da mesma forma, parasitóides do gênero *Trichogramma* têm sido utilizados em programas de controle biológico de pragas em culturas como milho, cana-de-açúcar, tomate, arroz, algodão, soja, beterraba, maçã, ameixa, hortaliças e florestas, devido à facilidade de sua criação em hospedeiros alternativos e eficácia de controle (ZUCHI; MONTEIRO, 1997; GALLO et al., 2002).

A utilização de agentes de controle biológico ocorre em conjunto com produtos alternativos, sendo que há situações em que se faz necessária a utilização de dois ou mais agentes de controle, como na cultura do tomate. Segundo Haji (1997; 2002), o controle da traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* Meyrick, 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae) pode ser feito com liberações semanais do parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) intercalada com aplicações do inseticida biológico a base de *B. thuringiensis*.

É importante salientar que embora sejam mais seguros que os produtos convencionais, os produtos alternativos também podem agir sobre esses agentes de controle, interferindo no seu modo de ação ou então apresentar efeitos secundários. Entretanto, as informações acerca do efeito de produtos alternativos sobre agentes de controle biológico são escassas e em sua maioria desenvolvidos com extratos vegetais, sendo, portanto, necessários estudos para avaliar o efeito de diferentes produtos alternativos sobre *B. thuringiensis* e parâmetros biológicos de *T. pretiosum* visando à obtenção de informações para utilização desses produtos em associação com os referidos agentes de controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMAS ALTERNATIVOS DE PRODUÇÃO

Diante do atual cenário das práticas agrícolas convencionais, estima-se que estas comprometam a produtividade ecológica futura, uma vez que recursos agrícolas, como solo, água e diversidade genética são explorados e degradados, além da alteração de processos ecológicos e das condições sociais que são enfraquecidas (GLIESSMAN, 2005). Dessa forma, se faz cada vez mais urgente e necessária a busca da sustentabilidade agrícola, por meio de práticas alternativas, orientadas pelo conhecimento de processos ecológicos em consonância ao contexto social (PRIMAVESI, 1994; GLIESSMAN, 2005).

São várias as denominações para as práticas de agricultura que diferem da prática convencional, entre as quais se citam a Biodinâmica, Biológica, Ecológica, Natural e Orgânica (PASCHOAL, 1994). Embora possuam várias denominações, todas essas práticas são sustentadas pela ideologia de agricultura agroecológica, que é apoiada em conceitos e princípios ecológicos, no desenho e no manejo de agroecossistemas, valorizando o conhecimento local e empírico dos agricultores, bem como a socialização desses conhecimentos, na busca de uma agricultura ambientalmente consistente, altamente produtiva e economicamente viável, agregando-se o conhecimento e a metodologia produzidos pela agricultura convencional (ALTIERI, 2002; GLIESSMAN, 2005).

De maneira geral, os sistemas alternativos de produção visam à preservação e ampliação da biodiversidade, que permite o restabelecimento de inúmeras interações entre o solo, as plantas e os animais, resultando em efeitos benéficos para o agroecossistema (SAMINÉZ et al, 2008).

Entretanto, a busca por estratégias ecológicas nos sistemas de produção requer um processo de transição que envolve várias etapas que permitam conciliar as necessidades de manter a propriedade agrícola rentável ao mesmo tempo em que se aumenta o equilíbrio ecológico (FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2008). Durante esse processo e até mesmo após o estabelecimento definitivo do equilíbrio biológico, as culturas estão suscetíveis ao ataque de pragas e doenças,

sendo, portanto, necessária a intervenção com a utilização de produtos naturais, chamados de alternativos, produtos biológicos (PENTEADO, 2007; FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2008) e ou agentes de controle biológico.

Os produtos alternativos podem ser divididos em duas classes: os fertiprotetores e os protetores. Os primeiros são produtos que fornecem nutrientes às plantas, como os biofertilizantes líquidos, caldas (sulfocálcica, viçosa e bordalesa), urina de vaca, leites etc., influenciando positivamente no processo metabólico das mesmas, além de contribuírem para o controle de pragas e doenças. Já os protetores agem diretamente no controle dos fitoparasitas, como os extratos vegetais, os feromônios etc. (FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2008).

Diferentemente dos produtos alternativos, o controle biológico, segundo Parra (1997), é um fenômeno natural que consiste na regulação de plantas e animais por inimigos naturais, constituindo-se nos agentes de mortalidade biótica. Num conceito mais amplo van den Bosch; Messenger; Gutierrez, (1982) definem o controle biológico como um fenômeno dinâmico que sofre influência de fatores climáticos, da disponibilidade de alimentos e da competição, assim como aspectos dependentes e independentes da densidade.

2.2 PRODUTOS ALTERNATIVOS

Existem vários produtos alternativos utilizados nos sistemas de produção alternativa, entre os quais se citam os extratos e óleo de nim, *Azadirachta indica* A. Juss., extrato de crisântemo *Chrysanthemum cinerariaefolium* Trev., Pironin, Calda Sulfocálcica, Supermagro, Matam Plus, Biogermex, Ecolife[®], Planta Clean e Bion[®].

2.2.1 Nim *Azadirachta indica* A. Juss.

O nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) é uma árvore da família Meliaceae cujas folhas e frutos possuem substâncias inseticidas, sendo a

azadiractina o terpenóide mais eficiente no controle de pragas, agindo como repelente, fagodeterrente, regulador de crescimento e inseticida. Contudo, é importante salientar que o seu modo de ação pode variar de acordo com a ordem do inseto, sendo eficaz, principalmente contra lepidópteros, enquanto que representantes das ordens Coleoptera, Hemiptera e Orthoptera são menos sensíveis a azadiractina (MARTINEZ, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Os compostos bioativos de nim são utilizados na forma de pós, extratos aquosos, óleos e pasta e formulações ricas em azadiractina (SAXENA, 1989). Produtos à base de Nim têm sido aplicados em culturas, por meio de polvilhamento do pó de sementes e folhas, para controle de pragas como lagartas e mediante pulverização de extratos aquosos ou de soluções de óleo emulsionável para controle de insetos e outras pragas foliares (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Os efeitos de produtos à base de nim são bem conhecidos no controle de insetos, porém, podem também agir negativamente sobre outros organismos como nematóides, moluscos, crustáceos, vírus de plantas e fungos. Entretanto, a planta também contém compostos que podem produzir um acréscimo na produção de certas espécies benéficas à agricultura, como minhocas, aranhas, abelhas, joaninhas e vespas parasitas (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

2.2.2 Crisântemo *Chrysanthemum cinerariaefolium* Trev.

O crisântemo *C. cinerariaefolium*, pertence a família Asteraceae, é uma erva perene, ereta, com cerca de 40 cm de altura, provavelmente originária do Irã e cultivada no Brasil. Suas flores possuem piretrinas I e II, cinerinas I e II e jasmolinas I e II e óleo essencial, que conferem ação inseticida, além de outros constituintes como piretol, ácido piretrotóxico, peiretrosina, flavonóides, sesamina e várias lactonas sesquiterpênicas que não apresentam atividade inseticida (BRUNETON, 1995; WAGNER, 1997).

As piretrinas apresentam atividade inseticida contra moscas, pulgões, tripes, mosquitos, mosca branca, cigarrinhas, lagartas, cochonilhas, besouros, piolho e ácaros (BUSS; PARKBROWN, 2002; KATRINA; ANTONIO, 2004).

O piretro é altamente biodegradável, resultando em subprodutos não tóxicos, evitando exposição demasiada aos insetos e conseqüentemente contribuindo para a baixa resistência às pragas (BRECHELT, 2004), além da toxicidade aos vertebrados ser baixa ou nula (BRUNETON, 1995).

2.2.3 Pironin

Pironin é utilizado como inseticida natural, sendo composto por nim (folhas, torta de sementes e óleo); rotenona (timbó); piretro (natural) e extrato pirolenhoso (eucalipto), agindo como repelente, inibidor de alimentação, além de causar desbalanço hormonal e reprodutivo, podendo também reduzir a fertilidade de machos e fêmeas (ALMEIDA- informação verbal)¹.

A rotenona é um composto inseticida presente em plantas Leguminosae do gênero *Lonchocarpus* na América do Sul, tais como *L. utilis* (Smith) e *L. urucu* Killip & Smith, popularmente conhecidas como timbó (BUSS; PARK-BROWN, 2002; KATHRINA; ANTONIO, 2004). Esse composto age como inibidor enzimático, interrompendo o metabolismo energético nas mitocôndrias e, conseqüentemente reduzindo as taxas respiratória e cardíaca (KATHRINA; ANTONIO, 2004). É moderadamente tóxico para os mamíferos e nos insetos causa os sintomas incluem a rápida parada de alimentação, perda das funções locomotoras, paralisia e a morte ocorrem em algumas horas ou poucos dias.

A rotenona apresenta amplo espectro de ação por contato e ingestão, mas decompõem-se mais ou menos em uma semana pela ação da luz e calor. Não é tóxica para as abelhas e moscas predadoras de pulgões (Syrphidae), mas é tóxica para peixes, joaninhas e ácaros predadores, e em geral não é fitotóxica. É usada contra besouros que se alimentam de folhas e frutos, tais como *Leptinotarsa decemlineata* (besouro do Colorado) e as vaquinhas *Diabrotica sp.* e *Acalymma sp.*, mas também tem atividade inseticida contra lagartas, tripes, piolho, mosquitos, pulgões, ácaros, carrapato, pulgas, moscas e formiga lava-pé (BUSS; PARK-BROWN, 2002; KATHRINA; ANTONIO, 2004).

¹ Leandro de Almeida. leandro.biofarm@hotmail.com. BIOFARM COMÉRCIO DE PRODUTOS ORGÂNICOS LTDA. Rua Voluntários de São Paulo, 3553. São José do Rio Preto – SP

O extrato pirolenhoso ou vinagre de madeira é um líquido obtido por meio da condensação da fumaça produzida durante o processo de carbonização da madeira, gerado através da pirólise da madeira, é um concentrado com mais de 100 substâncias químicas, boa parte delas com participação ativa e natural nos processos de crescimento e de defesa imunológica das plantas e da microfauna a elas associadas.

Após a filtragem e decantação é composto de 80% a 90% de água e 10% a 20% de compostos orgânicos, sendo o principal o ácido acético. Pode ser aplicado isoladamente ou misturado com outros extratos, controlando os insetos quando diluído de 300 a 600 vezes (MAEKAWA *apud* ALVES, 2007).

2.2.4 Calda Sulfocálcica

A Calda Sulfocálcica é resultante de uma reação corretamente balanceada entre o cálcio e o enxofre, dissolvidos em água e submetidos à fervura, constituindo uma mistura de polissulfetos de cálcio, cuja presença é essencial para o desempenho agrônômico (PRIMAVESI, 1994; PENTEADO, 2007). Esta calda age como fitoestimulante e fitoprotetor que apresenta ampla ação fungicida, inseticida e acaricida. No período do inverno é recomendada para a limpeza do tronco e ramos com o objetivo de eliminar fungos de revestimento e controlar cochonilhas e doenças como a rubelose e gomose. No verão recomenda-se reduzir as dosagens e os períodos de intervalo de aplicação (PENTEADO, 2007).

Além da ação contra as pragas e doenças, também é benéfica para as plantas, pois afeta de forma indireta o teor de nitrogênio, uma vez que o enxofre atua no aproveitamento do nitrogênio pela planta (MALAVOLTA, 1994). A Calda Sulfocálcica se insere de forma distinta em relação aos defensivos agrícolas convencionais, pois não tem efeito tóxico sobre a planta, já que os seus componentes são minerais químicos que participam dos processos metabólicos das plantas (PENTEADO, 2007).

2.2.5 Supermagro

Supermagro é um biofertilizante, enriquecido com sais minerais e metabólitos como enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos, resultante do metabolismo de microrganismos, que além de ação nutritiva, apresenta também ação inseticida, repelente, acaricida, fungistática e bacteriostática (GALLO et al., 2002; PENTEADO 2007), sendo que a sua composição, assim como para os demais biofertilizantes líquidos pode variar de acordo com a forma e o tempo de preparo, o que justificaria a diferença nos resultados.

2.2.6 Biogermex

Biogermex é um composto orgânico complexo, constituído por bioflavonóides cítricos (vitamina P), fitoalexinas cítricas, ácido ascórbico (vitamina C), ácido cítrico, polipeptídeos cítricos, ácido palmítico, ácidos graxos diversos, açúcares, glicerídeos e tocoferóis. Atua na indução de resistência de plantas contra o ataque de fungos, bactérias, bem como "germicida" , provocando a ruptura de membranas celulares de fungos e bactérias (BIOGERMEX).

2.2.7 Ecolife[®]

O Ecolife[®] é um produto que atua na indução de resistência de plantas, melhorando o vigor e a resistência às doenças. É composto por bioflavonóides cítricos (vitamina P), fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico (vitamina C). Os ácidos orgânicos (ascórbico, cítrico e láctico) e os bioflavonóides conferem ao Ecolife[®] uma ação antioxidante que juntamente peptídeos atuam como microbiostáticos, auxiliando no equilíbrio da flora microbiana vegetal (BOLETIN TÉCNICO).

2.2.8 Planta Clean

Planta Clean é um produto composto de extratos vegetais, ácidos graxos e sais minerais da família dos carbonatos, desenvolvido para a aplicação nos mais variados tipos de cultura, apresentando efeito fungicida e inseticida (PRETTO – informação verbal)²

2.2.9 Bion[®]

O Bion é um produto cujo princípio ativo é um análogo do ácido salicílico (benzothiadiazole – BTH) agindo como eficiente indutor de resistência sistêmica em plantas (MORAES, 1998). Entretanto, tem apresentado efeito negativo contra muitos patógenos de plantas (PEREZ et al., 2003; ZHU et al., 2004), sendo à sua ação direta sobre microrganismos, ainda desconhecida.

2.3 O GÊNERO *Trichogramma*

A família Trichogrammatidae possui distribuição cosmopolita, compreendendo, exclusivamente, insetos parasitóides de ovos, com destaque ao gênero *Trichogramma* que ataca inúmeros insetos da ordem Lepidoptera, sendo o tomate a olerícola com o maior número de espécies parasitadas por *Trichogramma* (PINTO, 1997).

Este gênero tem sido amplamente utilizado em programas de controle biológico de pragas devido à facilidade de sua criação em hospedeiros alternativos (PARRA, 1997) além de sua agressividade no parasitismo de ovos de insetos praga (BOTELHO, 1997). Cerca de 18 espécies de *Trichogramma* vêm sendo criadas massalmente, em cerca de 23 países, para liberações inundativas

² Fernando Pretto. fernando@ecoplanet.agr.br. xx 48-3244-8778. www.ecoplanet.agr.br

visando ao controle de pragas das culturas do milho, cana-de-açúcar, tomate, arroz, algodão, soja, beterraba, maçã, ameixa, hortaliças e de reflorestamentos, dentre outras (HAJI et al., 2002).

Os representantes do gênero *Trichogramma* possuem desenvolvimento holometabólico com duração média do ciclo em torno de 10 dias à temperatura de 25°C (GALLO et al., 2002). A oviposição ocorre no interior dos ovos do hospedeiro, local onde completam todo o desenvolvimento (ZUCHI; MONTEIRO, 1997). Cerca de quatro dias após o parasitismo ocorre o escurecimento do ovo hospedeiro em consequência da deposição de sais de urato, evidenciando a presença do parasitóide (CÔNSOLI; ROSSI; PARRA; 1999).

O comportamento de oviposição do parasitóide está relacionado, primeiramente, pela preferência em relação ao habitat e, posteriormente, por fatores relacionados ao hospedeiro, como localização, reconhecimento, aceitação e local adequado para a oviposição (VINSON, 1997; FATOUROS et al., 2005).

Fatouros et al., (2008) sugerem que a localização do hospedeiro está relacionada à produção de substâncias químicas voláteis liberadas pelo hospedeiro (caimônios) ou pelas plantas em que os hospedeiros se encontram, as quais são percebidas a longas distâncias pelo olfato, e nas proximidades por estímulos visuais e gustativos. Lobdell; Yong; Hoffmann (2005) também destacam que a coloração do ovo do hospedeiro também influencia na aceitação deste pelo parasitóide.

Uma vez encontrado o hospedeiro, a aceitação esta condicionada a qualidade deste, uma vez que a fêmea de *Trichogramma* examina-o com a utilização das antenas, podendo ou não prosseguir com a oviposição. Em caso de aceitação perfura o córion com o ovipositor, colocando um ou mais ovos de acordo com o tamanho e ou a disponibilidade de nutrientes. Entretanto, a fêmea pode rejeitar totalmente o hospedeiro e buscar um que seja mais adequado (HASSAN, 1997). Tal fato ocorre devido aos estimulantes de oviposição reconhecidos no interior do hospedeiro, que são detectados por estruturas sensilares presentes no ovipositor como aminoácidos, peptídeos, proteínas e sais inorgânicos (VINSON, 1997).

A qualidade do hospedeiro também pode determinar a razão sexual, uma vez que a fêmea pode selecionar o sexo antes da oviposição ou colocar no hospedeiro um ovo macho e outro fêmea que competirão entre si. É importante salientar que os ovos que originarão fêmeas são mais exigentes quanto ao seu

desenvolvimento, sendo, portanto, preferencialmente colocados em hospedeiros grandes e com boa quantidade de nutrientes, ao passo que os ovos que originarão machos são colocados em hospedeiros de menor qualidade. Além disso, o desenvolvimento do parasitóide pode ser acelerado ou retardado, dependendo da qualidade do hospedeiro e da temperatura (VINSON, 1997).

Uma das espécies mais utilizadas em programas de controle no Brasil é *Trichogramma pretiosum* Riley 1879. Este é um endoparasitóide primário de ovos de insetos, sendo uma espécie amplamente distribuída, encontrando-se associada a 26 espécies de hospedeiros (ZUCHI; MONTEIRO, 1997).

No Brasil, a espécie *T. pretiosum* tem sido utilizada em liberações inundativas em cultivos de tomateiro para o controle da traça-do-tomateiro *T. absoluta*, das brocas pequena e grande, *Neoleucinodes elegantalis* Guenée, 1854 (Lepidoptera: Crambidae) e *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae), respectivamente, bem como para a lagarta das folhas do tomateiro, *Manduca diffissa* Butler, 1871 (Lepidoptera: Sphingidae), importantes pragas dessa cultura (HAJI, 1997; HAJI et al., 2002).

As liberações inundativas de *Trichogramma* podem ser afetadas por diversos fatores, como linhagens utilizadas, densidade do hospedeiro, número de parasitóides liberados, o comportamento destes (BOTELHO, 1997), a arquitetura da planta, as condições climáticas no momento da liberação, a fase de desenvolvimento dos organismos liberados, o número de pontos de liberação, as técnicas utilizadas para a liberação, bem como o intervalo das liberações (PINTO; PARRA, 2002).

Contudo, um dos maiores entraves na utilização desse e de outros parasitóides no controle de pragas do tomateiro é a quantidade de produtos químicos utilizados para o controle de doenças e insetos-praga, bem como a ação tóxica destes produtos sobre o parasitóide (MOURA; CARVALHO; RIGITANO, 2005), sendo que o mesmo pode ocorrer na utilização de produtos alternativos.

Os produtos fitossanitários podem interferir no processo de localização do hospedeiro, uma vez que estímulos táteis e olfativos são fatores importantes neste processo (VINSON, 1997) além de poder afetar parâmetros biológicos como fecundidade, longevidade, taxa de desenvolvimento, e razão sexual, devido aos efeitos subletais e ou residuais (FOERSTER, 2002).

Nesse sentido, vários trabalhos de seletividade de produtos fitossanitários à *T. pretiosum* foram desenvolvidos, com destaque aos produtos fitossanitários sintéticos, enquanto que para os produtos fitossanitários alternativos tais informações são escassas.

2.4 *Bacillus thuringiensis* BERLINER

O gênero *Bacillus* é constituído por bactérias com células em forma de bastonete, sendo que a maioria tem a capacidade de produzir esporo de resistência (HABIB; ANDRADE, 1998). *B. thuringiensis* pertence à família *Bacillaceae*, é gram-positiva, aeróbia ou facultativamente anaeróbia (HABIB; ANDRADE, 1998; BOBROWSKI; PASQUALI; BODANESE-ZANETTINI, 2003), crescendo na faixa de 10 e 45°C, com temperatura ideal de 30°C (HABIB; ANDRADE, 1998). Tem ampla distribuição ecológica, sendo encontrada em todas as partes do mundo e em diversos substratos como solo, água, grãos armazenados, superfície de plantas e insetos mortos (SCHNEPF et al., 1998). Porém, as exigências nutricionais de vitaminas e ácidos sugerem que a forma vegetativa só se reproduz no interior do corpo de insetos hospedeiros (MONNERAT; PRAÇA, 2006).

Em condições específicas, geralmente desfavoráveis, desenvolve um esporo de resistência e, paralelamente produz corpos de inclusão cristalinos formados por um ou mais polipeptídeos denominados δ -endotoxinas ou proteínas Cry (ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002), sendo liberadas juntamente com os esporos no momento da lise celular, correspondendo à cerca de 20% a 30% do peso seco da célula (LAMBERT; PEFEROEN, 1992; ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002).

Os cristais protéicos são compostos por duas famílias de proteínas denominadas Cry e Cyt, sendo a primeira tóxica para Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e nematóides, enquanto as proteínas Cyt têm atividade hemolítica, sendo ambas as toxinas altamente específicas aos insetos e inócuas aos vertebrados e plantas, além de completamente biodegradáveis (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). A classificação das proteínas Cry baseia-se na similaridade das seqüências de aminoácidos (CRICKMORE et al., 1998), sendo que, atualmente

estão descritos mais de 340 diferentes genes *cry* e as proteínas agrupadas em 55 classes (CRICKMORE, 2008).

No caso de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, na maioria das linhagens ocorre a produção somente das δ - endotoxinas, com massa molecular de cerca de 130 kDa. No entanto, os cristais podem variar em tamanho, forma e número, de acordo com a linhagem (HABIB; ANDRADE, 1998). Na linhagem HD-1, o corpo de inclusão é constituído por cinco tipos de polipeptídeos diferentes, sendo que três são codificados por genes *cry* 1 e dois por genes *cry* 2 (GILL; COWLES; PIETRANTONIO, 1992).

Tal especificidade aos insetos e inocuidade aos organismos não-alvo têm impulsionado o desenvolvimento de muitos bioinseticidas formulados e, atualmente, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com resistência aos insetos (BERLITZ; GIOVENARDI; FIUZA, 2006).

2.4.1 Modo de Ação e Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis*

O modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* é explicado por dois modelos diferentes, um dependente da formação de poros e outro da transdução de sinal. Em ambos os modelos os passos de ingestão e solubilização das proteínas e clivagem por proteases são iguais (BRAVO; SOBERON, 2008).

Após ingestão dos cristais pelos insetos, estes são solubilizados em condições específicas de pH alcalino liberando as δ -endotoxinas ou pró-toxinas, que são ativadas por proteases intestinais. As toxinas ativadas atravessam a membrana peritrófica e se ligam aos receptores específicos presentes nas microvilosidades das células epiteliais do mesêntero, desencadeando a formação de poros na membrana celular, com conseqüente desequilíbrio iônico entre o citoplasma e o meio externo à célula. Ocorre então a lise e extravasamento do conteúdo celular, propiciando um meio adequado para a germinação dos esporos, e morte dos insetos por septicemia (GILL, 1995; DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; FIUZA, 2003; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; BRAVO; SOBERÓN, 2008).

O segundo modelo sugere que após a ligação das toxinas ativadas ao receptor específico nas microvilosidades ocorre uma reação em cascata

envolvendo a estimulação de uma proteína G e adelicito ciclase (cAMP) resultado na ativação de uma proteína (Quinase A), a qual induz a apoptose (BRAVO; SOBERÓN, 2008).

Além das toxinas do cristal, é importante salientar que a parede do esporo possui proteínas tóxicas que participam e contribuem no processo infeccioso, contudo, devido à pequena quantidade em relação às proteínas do cristal, sua ação é mascarada (HABIB; ANDRADE, 1998). A resistência e potencial patogenicidade dos esporos os tornam indispensáveis para a maioria dos bioinseticidas comercializados à base de *B. thuringiensis*, com o intuito de aumentar a ação tóxica do bioinseticida como um todo.

Como a patogenicidade está diretamente relacionada a determinadas características do hospedeiro como o pH intestinal, complexo enzimático, receptores moleculares e estirpe, verificam-se diferenças na suscetibilidade dos insetos em relação ao patógeno.

Um dos fatores preponderantes para o desenvolvimento de novos bioinseticidas é a descoberta de estirpes com maior atividade e melhor adaptadas às condições ambientais onde esses produtos serão utilizados (DIAS, 1992). Com esse intuito, vários trabalhos têm sido desenvolvidos com referência a seleção de estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas às diversas ordens de insetos como para Diptera, Lepidoptera e Coleoptera (PRAÇA et al., 2004); para lepidópteros (MEDEIROS et al., 2005; MONNERAT et al., 2007); para *Sitophilus oryzae* (L., 1763) (Coleoptera: Curculinidae) (SILVA, 2008), além da seleção das estirpes S608, S1905, BR 37 e BR 45, respectivamente patogênicas a *Spodoptera frugiperda* (Smith), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera eridanea* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) (SANTOS et al., 2009).

2.4.2 Utilização de *Bacillus thuringiensis* no Controle de Pragas

B. thuringiensis é utilizado desde 1938 para o controle de pragas agrícolas e insetos vetores de doenças, porém, difundiu-se amplamente a partir da década de 90. Nesse período, destacou-se como ingrediente ativo mais utilizado comercialmente nos bioinseticidas, com um crescimento significativo em torno de 10

a 25% ao ano (NEWTON et al. apud NARDO; CAPALBO, 1998), com a comercialização correspondendo de 80% (MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 1998) até 90 a 95% (VALADARES-INGLIS; SHILER; DE SOUZA, 1998) do mercado mundial de bioinseticidas, no final de 1990.

As bactérias entomopatogênicas são potenciais agentes reguladores de populações de pragas nas principais culturas de importância agrícola, tais como: algodão, citros, mandioca, soja, trigo, milho etc.. (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 2003), sendo que vários insetos praga das ordens Diptera, Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera tem se mostrado suscetíveis ao *B. thuringiensis* (FIUZA, 2003; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

O continente americano lidera o mercado mundial de bioinseticida à base de *B. thuringiensis* com 50% do montante em circulação (CANNON, 1993), sendo que deste total, a América Latina é responsável por cerca de 8 a 10% (TAMEZ-GUERRA et al. 2001).

Dentre os vários produtos comerciais à base de Bt, o produto Dipel (*Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-1) é o mais comercializado mundialmente, sendo muito eficaz contra 170 espécies de insetos-praga da ordem Lepidoptera e pouco tóxico para coleópteros, ácaros, dípteros e hemípteros (GLARE; O'CALLAGHAN apud por POLANCZYK, 2004).

Na América do Norte, com exceção do México, *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* é amplamente utilizado no controle de lagartas desfolhadoras de florestas (CANNON, 1993), sendo que nos Estado Unidos entre 1980 e 1995, cerca de dois milhões de ha de florestas foram tratados para o controle *Lymantria dispar*, com erradicação da praga em alguns casos (GLARE; O'CALLAGHAN apud POLANCZYK, 2004).

Na Austrália, a referida linhagem é empregada no controle de pragas nas culturas do algodão, frutíferas, fumo, ornamentais entre outras (GLARE; O'CALLAGHAN; van FRANKENHUYZEN apud POLANCZYK, 2004), enquanto que na China é aplicado em cerca de um milhão de ha para o controle de pragas de hortaliças, grandes culturas e florestas (SALAMA; MORRIS apud POLANCZYK, 2004), com destaque ao controle da traça – das - crucíferas *Plutella xylostella* (CANNON, 1993).

Em Cuba e no México, a utilização de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* é feita nas culturas de banana, fumo, citros, hortaliças, milho, algodão e

pastagens, e por serem os únicos países da América Latina que possuem produto formulado próprio, apresentam vantagem competitiva em relação aos produtos químicos (TAMEZ-GUERRA et al. 2001). Ainda de acordo com o autor, no Brasil, embora *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* seja utilizado em cerca de 150.000 ha para o controle de aproximadamente de 30 pragas, a área tratada corresponde somente à terça parte da área tratada no México.

O sucesso do *B. thuringiensis* no controle de pragas pode ser atribuído a uma série de fatores que conferem vantagens como seletividade tanto dos esporos quanto das proteínas do cristal, não sendo tóxicos para mamíferos nem prejudiciais para predadores e insetos-não-alvo (LÜTHY; CORDIER; FISCHER, 1982; ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002). Também não apresentam fitotoxicidade, permitindo a sua utilização em qualquer época, inclusive próximo às colheitas, o que é importante no caso das hortaliças (LÜTHY; CORDIER; FISCHER, 1982). Além disso, Arantes; Vilas-Bôas; Vilas-Bôas, (2002) ressaltam como vantagem, as técnicas de produção em fermentadores, baixo custo de produção, utilização dos mesmos equipamentos utilizados para a aplicação de produtos químicos e reduzida seleção de insetos resistentes.

No mercado, atualmente, se encontram disponíveis cerca de 60 produtos a base de *B. thuringiensis* registrados para o controle de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, sendo a maioria para lepidópteros (CERON, apud RAMOS, 2009).

Um dos produtos mais recentes registrado no Brasil foi o produto Ponto. Final[®] desenvolvido em parceria entre a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF e a empresa Bthek Biotecnologia e lançado em 2008 no mercado nacional, como resultado de vários estudos de seleção de isolados à *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera. eridania* e *Spodoptera frugiperda* (BRASIL-EMBRAPA, 2008).

2.5 PRODUTOS ALTERNATIVOS E O CONTROLE BIOLÓGICO

A associação de agentes de controle biológico com outras estratégias empregadas na manutenção dos sistemas alternativos de produção, com

destaque a utilização de produtos alternativos, é promissora para o controle de pragas e doenças e, conseqüentemente à sustentabilidade dos agroecossistemas.

Dentre as estratégias de utilização dos agentes de controle biológico, a mais viável economicamente é aquela que visa à conservação destes em campo, quer seja por meio de técnicas de espaçamento adequado das plantas, escolha de variedades com porte e resistência favoráveis ao ambiente, ou a aplicação de produtos fitossanitários seletivos (ALVES; MOINO JR; ALMEIDA, 1998).

No que tange a seletividade de produtos é importante considerar tanto a seletividade ecológica quanto a fisiológica, sendo que a primeira objetiva minimizar a exposição do inimigo natural ao produto fitossanitário, enquanto a segunda visa à aplicação de produtos que sejam mais inócuos aos inimigos naturais (FOERSTER, 2002; DEGRANDE et al., 2002; PIKANÇO et al., 2003).

A utilização de produtos fitossanitários seletivos se faz necessária, principalmente, nas culturas onde a utilização de tais produtos seja indispensável, como em frutíferas de clima temperado, citros, café, algodão, soja, tomate, nas quais os danos causados pelos insetos sejam considerados pontos-chave no seu desenvolvimento (ALVES; MOINO JR; ALMEIDA, 1998), bem como nos casos em que ocorrem simultaneamente as presenças de insetos suscetíveis e não suscetíveis, espécies ou estágios de desenvolvimento diferentes (ALVES; PINTO, 2003).

De acordo com Alves; Moino Jr; Almeida, (1998), no caso dos entomopatógenos, os produtos fitossanitários podem atuar inibindo o crescimento vegetativo e a esporulação dos microrganismos, além de causar mutações genéticas e, conseqüente diminuição da virulência à determinada praga. Além disso, no caso das bactérias entomopatogênicas a sua ação pode ser estimulada, reprimida ou permanecer inalterada mediante aplicação de produtos fitossanitários (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 2003).

Os estudos referentes ao efeito de produtos fitossanitários em agentes de controle biológico, em sua maioria estão relacionados à seletividade fisiológica, e são realizados com produtos fitossanitários sintéticos. Com relação às bactérias, destacam-se os trabalhos de Dougherty; Reichelderfer; Faust (1971); Chen et al. (1974); Silva et al. (2006; 2008) com esporos de *B. thuringiensis* em condições de laboratório e Jimenez; Acosta; Fernandes (1989); Hardman; Gaul

(1990); Salerno; Dias; Sagardoy (1999); Chung et al. (2001) com estudos de campo e semi campo.

Por sua vez, para parasitóides têm-se estudos avaliando-se o efeito de inseticidas em casa de vegetação (CARVALHO; PARRA; BAPTISTA, 1999), inseticidas (MANZONI, et al., 2006a) e fungicidas (MANZONI et al., 2006b) em laboratório, inseticidas para o controle de *T. absoluta* em campo (CASTELO BRANCO et al., 2003), além de avaliações com herbicidas (GIOLLO et al., 2005), entre outros.

Assim como os sistemas convencionais, os sistemas alternativos de produção estão suscetíveis à ocorrência de pragas e doenças e, conseqüentemente a necessidade de intervenções com produtos alternativos como medida terapêutica em substituição aos produtos fitossanitários sintéticos. Estes devem ser de baixo custo, não afetar a saúde do homem, além de apresentar seletividade aos insetos benéficos (PENTEADO, 2007).

Embora sejam mais seguros que os que os produtos fitossanitários sintético, os produtos alternativos, com destaque aos inseticidas naturais, causam efeitos diferenciados sobre os inimigos naturais, o que demanda informações específicas para cada formulação, inimigo natural e sistema de produção (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004).

O uso de extratos de plantas apresenta uma alternativa que pode contribuir para a redução da concentração e o número de aplicações dos produtos sintéticos, minimizando os problemas aos organismos benéficos e ao meio ambiente como um todo (MACHADO; SILVA; OLIVEIRA, 2007). Dentre os extratos de plantas, destacam-se aqueles preparados a partir de plantas da família Meliaceae, como a santa-bárbara (*Melia azedarach*) e, principalmente, o nim (*Azadirachta indica*) (GALLO et al., 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Em trabalho referente ao efeito de extratos de planta sobre parasitóides, Gonçalves-Gervásio; Vendramim (2004) avaliaram o efeito de extratos de *Azadirachta indica* e *Trichilia pallida* sobre ovos de *T. pretiosum* e verificaram ação repelente para *A. indica* com redução no número de ovos parasitados, além de afetar o desenvolvimento do parasitóide, enquanto os extratos de *T. pallida* foram inócuos. Da mesma forma, diversos produtos alternativos foram avaliados sobre *T. pretiosum* e, verificou-se redução do parasitismo com produtos a base de enxofre,

além da Calda Sulfocálcica ter afetado a proporção macho/fêmea com aumento no número de machos (GRISA, 2005).

Já o produto comercial a base de nim (NIM-I-GO Agrydine S.A.) em diferentes concentrações reduziu o parasitismo de *T. pretiosum* e, embora não tenha apresentado efeito ovicida, verificou-se redução da longevidade das fêmeas em até 50%, na maior concentração (400mL/20L de calda) (OLIVEIRA; PRATISSOLI; BUENO, 2003).

Em avaliação de extratos vegetais e óleo mineral emulsionável sobre *T. pretiosum* verificou-se que o produto Planta Clean, óleo mineral Assist[®], extrato de arruda e de crisântemo aplicados antes do parasitismo afetaram o percentual de ovos parasitados e de emergência. Por sua vez, na aplicação dos produtos após o parasitismo apenas Planta Clean e o óleo mineral Assist[®] afetaram significativamente tais parâmetros (KRAEMER, 2007).

Em estudos com extratos de Asteraceae sobre ovos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e os parasitóides *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae) e *T. pretiosum*, verificou-se que os extratos de *Lychnophora ericoides* e *Villosa trichogonia* afetaram ovos de um dia de idade de *S. frugiperda* e *Lilacina lepidaploa* afetaram ovos com dois dias de idade. Os extratos de *Eremanthus elaeagnus* e *L. ericoides* foram mais seletivos para *T. pretiosum* e *T. remus* (TAVARES et al., 2009).

Além dos extratos tem-se a utilização das caldas fertiprotetoras que variam em sua composição, como a Calda Sulfocálcica, constituída por polissulfetos de cálcio e, empregada como acaricida, inseticida, fungicida e repelente, além de possuir ação ovicida e larvicida. Outras caldas como a bordalesa e viçosa, com função de controlar doenças e aumentar a resistência da planta às pragas, são derivados da mistura do sulfato de cobre e óxido de cálcio ou cal virgem e, no caso da calda viçosa, mais alguns micronutrientes são adicionados (GALLO et al., 2002).

Outro grupo de produtos alternativos utilizados são os biofertilizantes, que além de ação nutritiva, podem atuar como inseticida e repelente de insetos, podendo também possuir atividade acaricida, fungistática e bacteriostática (MEDEIROS; WANDERLEY; WANDERLEY, 2003; PENTEADO, 2007).

Em relação aos produtos alternativos estudados em conjunto com fungos entomopatogênicos Hirose et al. (2001) avaliaram o efeito de óleo de nim e

os biofertilizantes E.M. -4, Supermagro e Multibion sobre a germinação, crescimento vegetativo e conidiogênese dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. Para *B. bassiana*, Supermagro e E.M. -4 foram considerados compatíveis sendo que MultibionT apresentou-se moderadamente tóxico e, o óleo de nim, tóxico. Para *M. anisopliae*, Multibion apresentou alta toxicidade, enquanto Supermagro, E.M. -4 e óleo de nim foram moderadamente tóxicos.

Três concentrações de extratos de folhas e sementes de nim além de óleo emulsionável foram avaliados sobre o crescimento vegetativo, produção e viabilidade de conídios de *B. bassiana*. O óleo de nim inibiu o crescimento vegetativo e reduziu a produção e viabilidade dos conídios, enquanto o extrato de sementes reduziu o crescimento e produção de conídios, mas não afetou a viabilidade dos mesmos. O extrato de folhas, na maior concentração testada, embora tenha afetado o fungo, foi considerado compatível com o mesmo (DEPIERI; MARTINEZ; MENEZES, 2005).

Com relação às bactérias entomopatogênicas, Krischik; Barbosa; Reichelderfer (1988) avaliaram o efeito do alcalóide nicotina e do flavonóide rutina, em diferentes concentrações, sobre o crescimento vegetativo e toxicidade do *B. thuringiensis* e verificaram que os dois compostos afetaram diferentemente o crescimento da bactéria, sendo que a nicotina, nas concentrações mais altas inibiu totalmente a formação de colônias e, afetaram a toxicidade de *B. thuringiensis* para lagartas de *Manduca sexta*, enquanto o mesmo não foi observado para a rutina em nenhuma das concentrações testadas.

Ainda, em avaliação de produtos alternativos em diferentes concentrações sobre *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* verificou-se que o efeito sobre os esporos variou conforme o produto, o substrato de incubação e as concentrações utilizadas. Além disso, a Calda Bordalesa, nas três concentrações, apresentou efeito negativo sobre os cristais (MARTINELLO, 2009).

Da mesma forma, em estudos com diferentes concentrações de extratos vegetais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alho (*Allium sativum*), arruda (*Ruta graveolens*), capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), cúrcuma (*Curcuma* sp.) e eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) sobre Btk, verificou-se que os resultados variaram conforme o substrato de incubação da bactéria com os extratos, bem como as concentrações dos extratos. Não houve efeito negativo sobre a formação de UFC/mL, exceto para extrato de alho incubado com Bt em água destilada

esterilizada, que estimulou a formação de UFC/mL. Além disso, nenhum tratamento apresentou efeito negativo sobre a toxicidade dos cristais, sendo que os tratamentos cúrcuma + Btk, 10% e 20%, no tempo de 48 horas, apresentaram efeito aditivo (SILVA et al.) (Em fase de elaboração)³.

³ Artigo em fase de revisão para submissão à publicação

REFERÊNCIAS

ALTIERI, M.A., SILVA, E.N., NICHOLLS, C.I. **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 226p.

ALVES, L.F.A.; PINTO, F.G.S. Interações entre agroquímicos e bactérias entomopatogênicas. In: 8º SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro, 2003. p. 41.

ALVES, M.; CAZETTA, J.O.; NUNES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.L.; COLOMBI, C.A. Ação de diferentes preparações de extrato pirolenhoso sobre *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, SP, v. 29, n. 2, p.382-385, agosto 2007.

ALVES, S.B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.

ARANTES, O.M.N.; VILAS-BÔAS, L.A.; VILAS-BÔAS, G.T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L.C.; BARROS, N.M; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**, Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p.271-291.

BERLITZ, D.L.; GIOVENARDI, M.; FIUZA, L.M. Toxicology effects of δ -endotoxins and β -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Wistar* rats. **Neotropical Biology and Conservation**, v.1, n.1, p. 35-38, may - august 2006.

BIOGERMEX. **Informações científicas sobre a ação de alguns componentes de biomassa cítrica**. Disponível em: <http://www.biogermex.com.br/index.htm>. Acessado em 20 de fevereiro de 2010.

BOLETIN TÉCNICO. Boletim Técnico Ecolife®. Disponível em: http://www.quinabra.com.br/boletinstec/boletim_digital_ecolife.pdf. Acessado em 23 de março de 2010.

BOBROWSKI, V. L.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.843-850, set./out. 2003.

BOTELHO, P.S.M. Eficiência de *Trichogramma* em campo. In: PARRA, J.R.P; ZUCCHI, R.A. (ed.) **Trichogramma e o Controle Biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1997, p.303-318.

BRASIL-EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. '**Ponto Final**' nos danos causados por lagartas às culturas no Brasil. Disponível em: <http://www.cenargen.com.br> Acessado em: 20 de outubro de 2008.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, jan. 2007.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n.10, p. 573-579, ago. 2008.

BRECHT, A. **Manejo Ecológico de Pragas e Doenças**, 2004. Disponível em www.rap-al.org. Acessado em 20 de outubro de 2009.

BRUNETON, J. Pharmacognosy, Phytochemistry. **Medical Plants**. Paris=TEC & DOC. Part 3 – Terpenoids and steroids – pyrethrins – pyrethrum, 1995.

BUSS, E.A.; PARK-BROWN, S. G. **Natural products for insect pest management**. Gainesville: UF/IFAS, 2002. Disponível em: [HTTP://edis.ifas.ufl.edu/IN197](http://edis.ifas.ufl.edu/IN197). Consultado em 28,mar. 2010.

CANNON, R.J.C. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis* – Based Pesticides. **Pesticide Science**, v.37, n.4, p.331-335, mar. 1993.

CÔNSOLI, F.L.; ROSSI, M.M.; PARRA, J.R.P Developmental time and characteristics of the immature stages of *Trichogramma galloi* an *T. pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.43, n.3 p. 271-275, 1999.

CARVALHO, G.A.; PARRA, J.R.P.; BAPTISTA, G.C. AÇÃO RESIDUAL DE ALGUNS INSETICIDAS PULVERIZADOS EM PLANTAS DE TOMATEIRO SOBRE DUAS LINHAGENS DE *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) EM CASA-DE-VEGETAÇÃO. **Ciênc. e agrotec.**, Lavras, v.23, n.4, p.770-775, out./dez., 1999.

CASTELO BRANCO, M.; PONTES, L.A.; AMARAL, P.S.T.; MESQUITA FILHO, M.V. Inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e broca-grande e seu impacto sobre *Trichogramma pretiosum*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 652-654, out.-dez., 2003.

CHEN, K.; FUNKE, B.R.; SCHULZ, J.T.; CARLSON, R.B.; PROSHOLD, F.I. Effects of Certain Organophosphate and Carbamate Inseticidas on *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.67, n.4, p.471-473, ago. 1974.

CHUNG, Y.K.; LAM-PHUA, E.G.; CHUA, Y.T.; YATIMAN, R. Evaluation of biological and chemical insecticide mixture against *Aedes aegypti* larvae and adults by thermal fogging in Singapore. **Medical and Veterinary Entomology**, v.15, p.321-327, 2001.

CRICKMORE, N. Disponível em:
<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt>. Acesso em 10 abr. 2008.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.807-813, set. 1998.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet**, v.17, n.1, p. 93-99, 2001.

DEGRANDE, P.E.; REIS, P.R. CARVALHO, G.A.; BELARMINO, L.C. Metodologia para avaliar o impacto de pesticidas sobre inimigos naturais In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p.95-103.

DEPIERI, R.A.; MARTINEZ, S.S.; MENEZES JR., A.O. Compatibility of the Fungus *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromycetes) with Extracts of Neem Seeds and Leaves and the Emulsible Oil. **Neotropical Entomology**, Vacaria, v.32, n.4, p. 601-606, 2005.

DIAS, J.M.C.S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 27, p. 59-76, 1992.

DOUGHERTY, E.M.; REICHELDERFER, C.F.; FAUST, R.M. Sensitivity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to Various Inseticidas and Herbicides. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.17, n.2, p.292-293, 1971.

FATOUROS, N.E.; DICKE, M.; MUMM, R.; MEINERS, T.; HILKER, M. Foraging behavior of egg parasitoids exploiting chemical information. **Behavioral Ecology**, v. 19, p.677-689, 2008.

FATOUROS, N.E.; KISS, B.G.; KALKERS, L.A.; GABORENA, R.S.; DICKE, M.; HILJER, M. Oviposition induced plants cues: do they arrest *Trichogramma* wasps during host location? **The Netherlands Entomological Society**, v. 115, p. 207-215, 2005.

FERNANDES, M.C.A.; LEITE, E.C.B.; MOREIRA, V.C.; **Defensivos Alternativos**. Niterói: Programa Rio Rural, 2008.

FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos: diversidade, especificidade e impacto ambiental. In: 8º Simpósio de Controle Biológico, São Pedro, 2003. **Resumos**. São Pedro, SP, 2003. p.47.

FOERSTER, L.M. Seletividade de Inseticidas a Predadores e Parasitóides. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p.95-103.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, C.G.; 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**, v.10. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GILL, S.S. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, n.1, p. 69-74, jan./fev., 1995.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Reviews Entomology**, v. 37, p.615-636, 1992.

GIOLO, F.P.; GRÜTZMACHER, A.D.; MANZONI, C.G.; FACHINELLO, J.C.; NÖRNBERG, S.D.; STEFANELLO JR., G.J. Seletividade de Agrotóxicos indicados na Produção Integrada de Pêssego a *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 222-225, ago. 2005.

GLIESSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**, 3ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de Extratos de Meliáceas Sobre o Parasitóide de Ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n.5, p. 607-612, 2004.

GRISA, Simone. **Interferência de produtos utilizados na agricultura agroecológica sobre o parasitismo de *Trichogramma pretiosum*, Riley.** 2005. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

HABIB, M.E.M; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES S.B.(Ed.) **Controle Microbiano de Insetos.** 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.p. 383-427.

HAJI, F.N.P. Controle da traça do tomateiro com *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (ed.) ***Trichogramma e o Controle Biológico.*** Piracicaba: FEALQ, 1997, p. 319-324.

HAJI, F.N.P.; PREZZOTI, L.; CARNEIRO, J.S.; ALENCAR, J.A. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores.** São Paulo: Manole, 2002, p.447-491.

HARDMAM, J.M.; GAUL, S. O. Mixtures of *Bacillus thuringiensis* and Pyrethroids Control Winter Moth (Lepidoptera: Geometridae) In Orchards Without Causing Outbreaks of Mites. **Journal of Economic Entomology**, v.83, n.3, p.920-936, jun., 1990.

HASSAN, S.A. Métodos padronizados para testes de seletividade, com ênfase em *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (ed.) ***Trichogramma e o Controle Biológico.*** Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 207-234.

HIROSE, E.; NEVES, P. M. O. J.; ZEQUI, J. A. C.; MARTINS, L. H.; PERALTA, C. H.; MOINO JR, A. Effect of biofertilizers and Neem Oil on the Entomopatogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.44, n.4, p.419-423, dez. 2001.

JIMENEZ, J.; ACOSTA, N. FERNANDEZ, R. Efecto de insecticidas y fungicidas sobre la actividade biologica de preparaciones de *Bacillus thuringiensis*. **Protección de Plantas**, v.12 n.1, p.45 –59, 1989.

KATHRINA, G.A.; ANTONIO, L.O.J. Controle biológico de insectos mediante extractos botânicos. In: CABRALL, M.; GUARAHAY, F. (Ed). **Control biológico de plagas agrícolas**. Managua: CATIE (Série Técnica. Manual Técnico/CATIE, 53), p. 137-160, 2004.

KRAEMER, Beatriz. **Interferência de extratos vegetais e óleo mineral emulsionável sobre o parasitismo de *Trichogramma pretiosum***. 2007. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

KRISCHIK, V.A.; BARBOSA, P.; REICHELDERFER, A.F. Three Trophic Level Interactions: Allelochemicals, *Manduca sexta* (L.), and *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 17, n. 3, p. 476-482, 1988.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise os *Bacillus thuringiensis*: facts and mysteries about successful biopesticide. **BioScience**, v.42, n.2, p.112-122, 1992.

LOBDELL, C.E.; YONG, T-H.; HOFFMANN, M.P. Host color preferences and short-range searching behavior of the egg parasitoid *Trichogramma ostrinae*, **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 116, p.127–134, 2005.

LÜTHY, P.; CORDIER, J.L.; FISCHER, H.M. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. In: KURSTAKI, E. (Ed) **Microbial Viral Pesticides**, New York: MARCEL DEKKER, 1982. p.35-74.

MACHADO, L.A; SILVA, V.B.; OLIVEIRA, M.M. Uso de extratos vegetais em pragas de horticultura. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 20, 2007, São Paulo. **Palestras...** São Paulo: v.69, n.2, p.103-106, jul./dez. 2007.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos**. São Paulo: ProduQuímica, 1994.

MANZONI, C.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; HÄRTER, W.R.; MÜLLER, C. Seletividade de agrotóxicos usados na produção integrada de maçã para adultos de *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.10, p.1461-1467, out. 2006b.

MANZONI, C.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; LIMA, C.A.B.; NÖRNBERG, S.D.; MÜLLER, C.; HÄRTER, W.R. Susceptibilidade de Adultos de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) a Fungicidas Utilizados no Controle de Doenças da Macieira. **Neotropical Entomology**. Londrina, v.35, n.2, p.223-230, mar-apr. 2006a.

MARTINELLO, L. **Efeito in vitro de produtos fitossanitários alternativos sobre esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* Berlener, 1915**. 2009. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.

MARTINEZ, S.S. (Ed.) **O nim *Azadirachta indica* - natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2002.

MEDEIROS, M.B.; WANDERLEY, P.A.; WANDERLEY, M.J.A. Biofertilizantes Líquidos: processo trofobiótico para proteção de plantas em cultivos orgânicos **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.31, p.38-44 jul.-dez. 2003.

MEDEIROS, P.T.; FERREIRA, M.N.; MARTINS, E.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; DIAS, J.M.C.; MONNERAT, R.S. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, nov. 2005.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T.; MARTINS, E.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; COLIN, B. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Aticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R. G; PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* In: OLIVEIRA-FILHO, E.C.; MONNERAT, R.G. **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, Inimigos naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas**. Planaltina, DF, Embrapa Cerrados, 352p, 2006.

MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F.; ARRUDA, R.O.M Produção de bactérias entomopatogênicas In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, Piracicaba: FEALQ, 1998. p.815-843.

MORAES, M.G. Mecanismos de resistência sistêmica adquirida em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, n. 6, p. 261-284, 1998.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v 24, n.1, p. 139-48, 2005.

MOURA, A.P.; CARVALHO, G.A.; RIGITANO, R.L.O. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura do tomateiro a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.3, p.203-210, mar. 2005.

NARDO, E.A.B.; CAPALBO, D.M.F. Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed) **Controle Biológico**, Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 231-260.

OLIVEIRA, R.C.; PRATISSOLI, D.; BUENO, A.F. EFEITO DE *Azadirachta indica* (Nim) SOBRE O PARASITISMO DE *Trichogramma pretiosum* (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) EM OVOS DE *Anagasta kuehniella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). **Rev. Ecosystema**, vol. 28, n.1,2, jan. – dez, 2003.

PASCHOAL, A.D. **Produção orgânica de alimentos: agricultura sustentável para os séculos XX e XXI**. Piracicaba: Adilson D. Paschoal, 191p., 1994.

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para a produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (ed.) **Trichogramma e o Controle Biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 121-150.

PENTEADO, S.R. **DEFENSIVOS ALTERNATIVOS E NATURAIS** 3.ed. Livros Via Orgânica: Campinas, SP, 2007.

PEREZ, L.; RODRIGUEZ, M.E.; RODRIGUEZ, F.; ROSON, C. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyanoi* f.sp tabacina. **Crop Protection**, v. 22, p. 405-413, 2003.

PICANÇO, M.C.; de MOURA, M.F.; MIRANDA, M.M.M.; GONTIJO, L.M.; FERNANDES, F.L. Seletividade de inseticidas a *Doru luteipes* (Scudder, 1876) (Dermaptera: Forficulidae e *Cotesia* sp. (Hymenoptera: Braconidae) inimigos naturais de *Ascia monuste orseis* (Godart, 1818) (Lepdoptera in sic: Pieridae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p.183-188, mar./abr., 2003.

PINTO, A.S.; PARRA, J.R.P.P. Liberação de inimigos naturais In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p.95-103.

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**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 325-342.

POLANCZYK, R.A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2004. Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

PRAÇA, L.M.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; SOUZA DIAS, D.G.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, jan. 2004.

PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico de pragas e doenças: técnicas alternativas para a produção agropecuária e defesa do meio ambiente**. São Paulo: Nobel, 1994.

RAMOS, Felipe Rosa. **Avaliação a campo de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* tóxica a Lepidoptera e seu possível efeito adverso sobre organismos não-alvo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília Brasília, DF.

SALERNO, C.; DIAS, S.; SAGARDOY, M. Efecto de pesticidas sobre cepas de *Bacillus thuringiensis* bajo condiciones controladas. **Rev. Argentina de Microbiologia**, v.31, p. 58-64, 1999.

SAMINÉZ, T.C.O.; DIAS, R.P.; NOBRE, F.G.A.; MATTAR, R.G.H.; GONÇALVES, J.R.A. Princípios norteadores da produção orgânica de hortaliças. **Circular Técnica 67 EMBRAPA HORTALIÇAS/MAPA**. Brasília, DF, 2008.

SANTOS, K.B.; NEVES, P.; MENEGUIN, A.M. SANTOS, R.B.; SANTOS, W.J.; VILLAS BOAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.B; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50; p. 157–163, 2009.

SAXENA, R.C. Inseticides from Neem. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Eds) **Inseticides of plant origin**. Washington: ACS, p. 110-129, 1989.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N. VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbil. Mol. Bio. Rev.**, v.62, p. 775-806, 1998.

SILVA, E.R.L; ALVES, L.F.A.; SANTOS, J.; POTRICH, M.; SENE, L. Técnicas para avaliação do efeito *in vitro* de herbicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 59-67, 2008.

SILVA, E.R.L; ALVES, L.F.A.; SENE, L.; SANTOS, J.C.; BONINI, A.K.; POTRICH, M.; NEVES, P.M.O.J. Técnicas para avaliação do efeito “in vitro” de fungicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 429-437, 2006.

SILVA, Najara da. **Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Sitophilus oryzae* L. 1763**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, SP.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Importância das interações entre agroquímicos e entomopatógenos em programas de MIP. In: 8º SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, São Pedro, 2003. **Anais...** São Pedro, SP, 2003. p. 59.

TAMEZ-GUERRA, P. GALÁN-WONG, L.J.; MEDRANO-ROLDÁN, H.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; RODRÍGUEZ-PADILHA, C.; GÓMEZ-FLORES, R.A.; TAMEZ-GUERRA, R.S. Bioinseticidas: su empleo, producción y comercialización em México. **Ciência UANL**, v.4, n.2, p. 143-152.

TAVARES, W.S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; ASSIS JÚNIOR, S.L.; FREITAS, S.S.; ZANÚNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 384–388, jul., 2009.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W. ; DE SOUZA, M.T. Engenharia genética de microrganismo agentes de controle biológico. In: MELO, I.S. ; AZEVEDO, J.L. (Eds) **Controle Biológico**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998, p. 201-230.

van den BOSCH, R.; MESSENGER, P.S.; GUTIERREZ, A.P. An introduction to biological control, New York: Plenum Press, 1982, 247p.

VINSON, S.B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitóides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.(ed.) **Trichogramma e o Controle Biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 67 a 119.

ZHU, Y.J; QIU, X.; MOORE, P.H.; BORTH, W.; HU, J.; FERREIRA, S.; ALBERT, H.H. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, p. 237-248, 2004.

ZUCCHI, R.A.; MONTEIRO, R.C. O gênero *Trichogramma* na América do Sul. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (ed.) **Trichogramma e o Controle Biológico**. Piracicaba: FEALQ, 1997, p.41-66.

WAGNER, H. Pharmaceutical and economic uses of the Compositae. In: HEYWOOD, V.H.; HARBONE, J.B.; TURNER, B.L. (Eds). **The biology and chemistry of the Compositae**. London: Academic Press, v.1, p. 412-433, 1997.

3 ARTIGO A: EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *Kurstaki*

3.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de produtos alternativos (PA) sobre esporos e cristais da linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *Kurstaki* S-1905 (Btk-S1905). Foram utilizados os produtos Pironin, Biogermex, Ecolife[®], Extrato de Crisântemo, Planta Clean, Mattam Plus, Natural Neem, Supermagro, Calda Sulfocálcica e Bion[®] nas concentrações recomendadas pelos fabricantes. O efeito sobre os esporos foi avaliado simulando-se a aplicação conjunta e separada dos PA e da bactéria. Na aplicação conjunta, as misturas de Btk-S1905 + PA + água destilada esterilizada (ADE) foram incubadas (150 rpm, 30 ± 2°C, 2 h) e inoculadas em ágar nutriente (AN) em placas de Petri e, na aplicação separada os PA foram espalhados na superfície do meio AN em placas de Petri e, em seguida, inoculou-se o patógeno. As placas inoculadas, em ambas as aplicações, foram incubadas (30° C ± 2° C, 16 h), e as unidades formadoras de colônias (UFC) /mL quantificadas. Para os cristais, após incubação da mistura Btk-S1905 + PA + ADE esta foi adicionada à dieta artificial para *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), avaliando-se a mortalidade após 12, 24, 48 e 72 h. Também foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura e de eletroforese em gel (SDS-PAGE). Verificou-se que Biogermex, Calda Sulfocálcica e Ecolife[®] reduziram as UFC/mL, nas aplicações conjunta e separada e, óleo de nim, na conjunta. Biogermex, Bion[®], Planta Clean e óleo de nim foram antagônicos à ação das toxinas, entretanto, nenhum produto degradou as proteínas do cristal. O efeito dos demais produtos foi aditivo à ação das toxinas e, exceto Calda Sulfocálcica, também não reduziram a formação de UFC/mL.

Palavras chave: Bactérias entomopatogênicas. Controle alternativo. Compatibilidade

EFFECT OF ALTERNATIVE PRODUCTS on *Bacillus thuringiensis* SUBESP. *kurstaki*

ABSTRACT

The objective of the present research was to evaluate the effect of alternative products (AP) on spores and crystals of *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, Isolate S1905 (Btk-S1905). The tested products were Pironin, Biogermex, Ecolife[®], Chrysanthemum Extract, Planta Clean, Mattam Plus, Natural Neem, Super Magro, Calda Sulfocálcica and Bion[®] in concentrations recommended by the producer. The effect over the spores was evaluated in the combined and single AP and bacteria application. In the combined application, the mixtures Btk-S1905 + AP + sterile distilled water (SDW) were incubated (150 rpm, 30 ± 2° C, 2 h), and inoculated in nutrient agar (NA) in Petri dishes. In the single application, the AP were spread in the NA medium surface in Petri dishes, and then the pathogen was inoculated. In both applications the inoculated Petri dishes were incubated (30° ± 2° C, 16 h) and the colony forming units (CFU)/mL quantified. For the crystals, the mixture Btk-S1905 + AP + SDW was incubated (150 rpm, 30 ± 2 °C, 2 h) and added to the surface of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) artificial diet, and its mortality was evaluated after 12, 24, 48 and 72 h. Scanning electron microscopy and gel electrophoresis analysis were conducted with the *B. thuringiensis* crystals. Biogermex, Calda Sulfocálcica and Ecolife[®] reduced the CFU/mL formation, in combined and single application and, neem oil in combined. Biogermex, Bion, Planta Clean and neem oil were antagonistic to the toxins, however none of the products degraded the crystal proteins. The effect of the remaining products were additive to the toxins, and, except for Calda Sulfocálcica, they also did not affected the CFU/mL formation.

Keywords: Entomopathogenic bacteria. Alternative control. Interaction. Compatibility

3.2 INTRODUÇÃO

Os produtos alternativos e *Bacillus thuringiensis* são estratégias importantes utilizadas em sistemas alternativos de produção no controle de pragas e doenças. Os produtos alternativos são divididos em duas classes: os fertiprotetores e os protetores. Os primeiros são produtos que fornecem nutrientes às plantas, como os biofertilizantes líquidos, caldas (sulfocálcica, viçosa e bordalesa), urina de vaca, leites etc., influenciando positivamente no processo metabólico das mesmas, além de contribuírem para o controle de pragas e doenças, Já os protetores agem diretamente no controle dos fitoparasitas, como os extratos vegetais, óleos essenciais, feromônios etc. (FERNANDES; LEITE; MOREIRA, 2008).

B. thuringiensis é utilizada como bioinseticida nas principais culturas de importância agrícola como algodão, citros, mandioca, soja, trigo, milho etc.. (SOSA-GÓMEZ; MOSCARDI, 2003) para o controle vários insetos praga das ordens Diptera, Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera (FIUZA, 2003; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Os produtos alternativos e os entomopatógenos podem ser utilizados isolados ou em associação, porém, após contato com substâncias fitossanitárias a ação dos entomopatógenos pode ser estimulada, reprimida ou permanecer inalterada (SOZA-GÓMEZ; MOSCARDI, 2003), além disso, pode inibir o crescimento e reprodução e ou causar mutações (ALVES; MOINO JR.; ALMEIDA, 1998). Nesse contexto, faz-se necessária a utilização de produtos fitossanitários seletivos, principalmente nas culturas em que ocorrem simultaneamente as presenças de insetos suscetíveis e não suscetíveis, além de espécies ou estágios de desenvolvimento diferentes (ALVES; PINTO, 2003).

Em estudo com bactérias não esporulantes foi verificado que o extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresentou efeito negativo sobre *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, em diferentes tempos e concentrações (GENENA et al., 2008), enquanto que extrato de arruda (*Ruta graveolens*) inibiu o crescimento de diversas bactérias, inclusive do gênero *Bacillus* (PEREIRA et al., 2006; MENDES et al., 2008).

Já em relação às bactérias entomopatogências, Krischik; Barbosa; Reichelderfer (1988) observaram que o alcalóide nicotina e o flavonóide rutina, em

diferentes concentrações, afetaram o crescimento vegetativo e que altas concentrações de nicotina afetaram a toxicidade de *B. thuringiensis*.

Da mesma forma, em estudo com diversos produtos alternativos, em diferentes concentrações, sobre *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, verificou-se que quando incubados com água destilada esterilizada houve redução significativa da formação de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL para a maioria dos produtos. Porém, para os cristais, não foi observado efeito negativo (MARTINELLO, 2009).

Também, o efeito de extratos vegetais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), alho (*Allium sativum*), arruda (*Ruta graveolens*), capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), cúrcuma (*Curcuma* sp.) e eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), nas concentrações de 5%, 10% e 20% foi avaliado sobre Btk. Verificou-se que o efeito variou conforme o substrato de incubação da bactéria (água e caldo nutriente) com os extratos, bem como as concentrações destes (SILVA et al) (Em fase de elaboração)⁴.

Como verificado, a maioria dos estudos referentes ao efeito de produtos alternativos sobre bactérias são com extratos vegetais, além de poucas informações sobre bactérias entomopatogênicas. Assim, considerando-se que são necessários estudos referentes ao efeito desses produtos sobre bactérias entomopatogênicas, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar o efeito de produtos alternativos sobre esporos e cristais da linhagem *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905) em condições de laboratório, de forma a contribuir com o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle de insetos praga.

⁴ Artigo em fase de revisão para submissão à publicação.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Efeito dos Produtos Alternativos sobre a Viabilidade de Esporos de *Bacillus thuringiensis* Subesp. *kurstaki*

A linhagem *B. thuringiensis* subesp. *Kurstaki* S1905 (Btk S1905) foi fornecida na forma liofilizada pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Os produtos alternativos (PA), bem como sua classificação de uso estão listados na Tabela 3.1. Tais produtos foram obtidos em casas especializadas em insumos para sistemas alternativos de produção, sendo avaliados nas concentrações recomendadas (CR) pelos fabricantes.

O efeito dos PA sobre os esporos foi avaliado em duas situações distintas: aplicação conjunta e separada.

Tabela 3.1 – Produtos alternativos e concentrações utilizados nos experimentos.

Produto	Uso	Composição	Conc. (mL 100 ⁻¹)
Biogermex	IR e BIO	Bioflavonóides cítricos (vitamina P), fitoalexinas cítricas, ácido ascórbico (vitamina C), ácido cítrico, polipeptídeos cítricos, ácido palmítico, ácidos graxos diversos, açúcares, glicerídeos e tocoferóis.	200 mL
Bion [®]	IR	acibenzolar-S-metil (ASM)	5g
Calda Sulfocálcica	INS e FUN	Enxofre e cal virgem	800 mL
Ecolife [®]	IR e BIO	Bioflavanóides, fitoalexinas, ácidos ascórbico, láctico e cítrico.	750 mL
Extrato de Crisântemo	INS	Piretrinas e jasmolinas	1000 mL
Matan Plus	INS	Enxofre e nitrogênio	1000 mL
Natural Neem	INS	Óleo emulsificado de sementes, extraído a frio.	500 mL
Planta Clean	FUN	Extratos vegetais, ácidos graxos e sais minerais.	2500 mL
Pironin	INS	Neem (folhas, tortas de sementes e óleo); piretro natural; extrato pirolenhoso de <i>Eucalyptus</i> sp.	600 mL
Supermagro	BIO	Ácido bórico, cloreto de cálcio, molibdato de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato ferroso, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco.	400 mL

Conc.= concentração

IR= Indutor de resistência; INS= inseticida; FUN= fungicida; BIO= Biofertilizante.

3.3.1.1 Aplicação conjunta: produtos alternativos misturados com água destilada esterilizada e *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Foi preparada uma suspensão de Btk S1905 na concentração de $2,3 \times 10^{19}$ esporos/mL, pesando-se 5 mg do material liofilizado e acrescentando-se 50 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, a partir da suspensão original, foram realizadas diluições sucessivas em água destilada esterilizada e, preparada uma suspensão na concentração de $2,3 \times 10^6$ esporos/mL em frascos Erlenmeyer com 50 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 300 μ L dessa suspensão foram adicionadas em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada esterilizada, juntamente com os PA nas concentrações recomendadas. Para cada PA avaliado (tratamento) foram preparados cinco frascos Erlenmeyer, sendo cada um considerado uma repetição. Os frascos foram incubados em agitador horizontal à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm por 2 h. Previamente à incubação e ao término desta, foi mensurado o pH. A partir de cada frasco, a mistura foi inoculada em três placas-de-Petri em cinco pontos de 5 μ L/ponto na superfície do meio de cultura ágar nutriente (AN) (ALVES; MORAES, 1998). As placas permaneceram abertas em câmara de fluxo laminar por 5 minutos para evaporação do excesso de água e, em seguida foram fechadas e acondicionadas em câmara climatizada à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 18 h, sendo posteriormente quantificadas as UFC/mL por ponto.

Como controle do experimento, a suspensão de esporos foi adicionada e incubada apenas em água destilada esterilizada.

3.3.1.2 Aplicação separada: produtos alternativos e esporos de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, aplicados na superfície do meio de cultura

O mesmo procedimento descrito no item 3.3.1.1 foi adotado para a preparação da suspensão de esporos. Paralelamente, as caldas dos PA foram preparadas em frascos Erlenmeyer (repetições) contendo 50 mL de água destilada esterilizada, sendo cinco repetições por tratamento. Alíquotas de 100 μ L de cada

repetição foram aplicadas na superfície do meio ágar nutriente (AN) em três placas-de-Petri e espalhadas com alça de Drygalski. As placas foram deixadas abertas por 5 minutos na câmara de fluxo laminar para a evaporação do excesso de água, sendo em seguida inoculada a suspensão bacteriana, conforme descrito no item 3.3.1.1 As placas foram acondicionadas em câmara climatizada à temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 h e, após esse período quantificou-se as UFC/mL em cada ponto.

Como controle do experimento, foi espalhado sobre o meio de cultura apenas água destilada esterilizada e, em seguida inoculada a suspensão da bactéria.

Em ambos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas com a respectiva testemunha pelo teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2007).

3.3.2 Efeito dos Produtos Alternativos sobre os Cristais de *B. thuringiensis* Subesp. *kurstaki*

O efeito dos PA sobre os cristais foi avaliado *in vivo* por meio de bioensaios com lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e, para a verificação de possíveis alterações morfológicas e/ ou degradação de proteínas foram, respectivamente, realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura e eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.

3.3.2.1 Efeito da toxicidade sobre *A. gemmatalis*

Para a realização dos bioensaios foram utilizadas lagartas, provenientes da criação de laboratório, em recipientes contendo dieta artificial, mantidas em câmara climatizada à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: 70 % \pm 10 % e fotofase 14 h até as lagartas atingirem o 2^o ínstar.

A concentração de Btk S1905 utilizada no bioensaio foi calculada, determinando-se a concentração letal (CL_{50}) para *A. gemmatalis*. Como padrão foi utilizado *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-1, obtido de amostra purificada do banco de entomopatógenos da Embrapa Soja, Londrina, PR. Foram pesados 0,02 g das amostras liofilizadas, sendo cada uma diluída em 20 mL de água destilada esterilizada (1000 $\mu\text{g/mL}$). A partir dessa suspensão foram preparadas seis diluições, de forma a propiciar concentrações de: 24, 32, 41, 53, 69, 90 $\mu\text{g/mL}$.

Foi preparada a dieta artificial para *A. gemmatalis* (GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976) modificada por Hoffmann-Campo; Oliveira, Moscardi (1985), livre de anticontaminante e após solidificação, com o auxílio de uma espátula foram cortados cubos de aproximadamente 1,5 cm de lado. Estes foram imersos por 5 segundos nas diferentes suspensões e, após secagem, foram colocados em recipientes com capacidade para 50 mL. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 20 repetições (recipientes) por concentração (tratamento), sendo que cada repetição recebeu três lagartas de *A. gemmatalis* de segundo ínstar. Como controle, os cubos de dieta foram imersos em água destilada esterilizada. Em seguida, os recipientes foram fechados e acondicionados em câmara climatizada à temperatura de $26 \pm 2^\circ \text{C}$, UR: $70 \% \pm 10 \%$ e fotofase 14 h. Após 48 h, as lagartas foram transferidas para recipientes contendo dieta artificial sem a bactéria e avaliadas diariamente até o sexto dia.

Os dados foram analisados pelo programa Micro Probit 3.0 (THOMAS; SPARK, 1987), para a determinação das CL_{50} .

Em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada esterilizada, a partir do liofilizado foram preparadas suspensões da linhagem bacteriana estudada, na concentração equivalente à CL_{50} estimada anteriormente. Em seguida, foram adicionados os PA nas CR, sendo os frascos com as misturas incubados em agitador horizontal à temperatura de $30 \pm 2^\circ \text{C}$, 150 rpm por 2 h e, previamente à incubação e ao término desta foi mensurado o pH.

À partir de cada frasco (repetição), alíquotas de 150 μL da mistura foram adicionadas na superfície de cubos de 1,5 cm de dieta artificial para *A. gemmatalis* livre de anticontaminantes. Foram preparados nove cubos por repetição, distribuídos equitativamente em três placas de Petri, que permaneceram abertas em câmara de fluxo laminar por 5 min para evaporação do excesso de água e absorção

dos esporos e cristais pela dieta e, em seguida cada placa recebeu 25 lagartas de segundo ínstar de *A. gemmatalis*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições por tratamento, totalizando 75 lagartas por repetição. Para testemunha, foram preparados lotes idênticos de lagartas que receberam, separadamente na dieta, os PA na CR e suspensão de Btk-S1905. Também foi preparada uma testemunha absoluta, sendo aplicada água destilada esterilizada sobre a dieta artificial. As placas foram acondicionadas em câmara climatizada à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: $70 \pm 10\%$ e 14 h de fotofase, sendo as avaliações realizadas nos períodos de 12, 24, 48 e 72 h após a aplicação dos tratamentos, quantificando-se o número de lagartas mortas. A confirmação da mortalidade das lagartas foi feita observando-se os sinais e sintomas, conforme Habib; Andrade (1998).

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas com a respectiva testemunha pelo teste de Tukey, ambos a 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2007).

A interação provocada pelo efeito dos produtos sobre os cristais foi classificada em sinergismo, antagonismo e aditivismo, conforme Benz (1971). De acordo com o autor, sinergismo refere-se a um sistema com dois componentes efetivos que em conjunto produzem um efeito maior que a soma algébrica dos efeitos independentes. É considerado efeito aditivo quando os dois componentes atuando em conjunto produzem um leve incremento no seu efeito, em relação à atuação dos componentes individuais, porém insuficiente para ser considerado sinergismo. Por sua vez, o efeito antagônico ocorre quando a interação dos elementos produz um efeito menor do que suas atuações individuais.

As interações de sinergismo, antagonismo e aditivismo foram calculadas utilizando-se qui-quadrado: $\chi^2 = (MO - ME)^2 / ME$, sendo MO: mortalidade observada; ME: mortalidade esperada. A fórmula da ME: $ME = M_1 + M_2(1 - M_1)$, onde M_1 : mortalidade provocada pelo entomopatógeno sozinho; M_2 : mortalidade provocada pelo inseticida sozinho. Assim, se o χ^2 calculado for menor que o valor tabelado (3,84 para 1 grau de liberdade, $P < 0.05$) o efeito é aditivo. Caso χ^2 calculado seja maior que o valor tabelado (3,84) a interação pode ser sinérgica ou antagônica. Dessa forma, se a diferença de $M_{12} - ME$ (onde M_{12} é a mortalidade da

combinação do entomopatígeno e produto fitossanitário) for positiva, o efeito é de sinergismo e quando negativa, antagonismo (BENZ, 1971; JARAMILLO et al., 2005).

3.3.2.2 Morfologia e integridade dos cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Foram pesados 5 mg da amostra liofilizada de Btk S1905 e diluídos em 50 mL de água destilada esterilizada juntamente com os PA, nas CR, em frascos Erlenmeyer, resultando numa mistura com uma concentração aproximada de $2,3 \times 10^{19}$ esporos/mL. Os frascos foram incubados em agitador horizontal à temperatura de $30 \pm 2^\circ \text{C}$, 150 rpm, por 2 h. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL de cada mistura para a preparação para MEV, sendo o restante das misturas armazenadas em frascos de vidro âmbar, em freezer à -10°C . As alíquotas da mistura foram adicionadas em tubos de microcentrífuga sendo, em seguida, centrifugadas por 5 min. a 10.000 rpm por três vezes, para o enxágüe. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram fixados com uma solução de Paraformaldeído 2%, Glutaraldeído 2% e Tampão Fosfato (PO_4 0,1 M) por 4 h. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão fosfato por três vezes de 15 minutos cada, sendo fixadas novamente em Tetróxido de Ósmio 1% (OsO_4) por 2 h. Posteriormente, foi realizada uma segunda lavagem em tampão fosfato por três vezes de 15 min cada.

Com o auxílio do microscópio estereoscópico as amostras foram fixadas com historesina em lamínulas de vidro e, em seguida desidratadas numa sequência alcoólica (álcool 70%: 3×15 min, álcool 80%: 3×15 min, álcool 90%: 4×10 min, álcool 100%: 4×10 min) e com CO_2 em Ponto Crítico. Posteriormente, as amostras foram fixadas nos *stubs* com prata e recobertas com ouro por 3 min. pelo processo de *Sputtering* em metalizador BAL-TEC modelo SCD – 050 e observadas em alto vácuo e intensidade do feixe de elétrons de 20 kV em Microscópio Eletrônico de Varredura, sendo as imagens registradas através de fotomicrografia digital.

3.3.2.3 Integridade dos cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) desnaturante

Amostras das suspensões preparadas no item 3.3.2.2 foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), visando avaliar a presença de proteínas Cry. Para tanto, os cristais foram solubilizados e as proteínas extraídas de acordo com a metodologia proposta por Lecadet et al. (1991).

Assim, foram transferidos 1,5 mL das culturas bacterianas para tubos de microcentrífuga de 2 mL previamente autoclavados. Estes foram centrifugados a 12.800 rpm por 20 min, sendo os sobrenadantes resultantes da centrifugação descartados e, os sedimentos lavados com 1,5 mL de NaCl a 0,5 M por 20 min. Após o descarte do NaCl 0,5 M, as paredes do tubo foram secas com papel filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF (fluoreto de fenilmetil sufonil) a 1 mM e centrifugados a 12.800 rpm por 20 min. Após descarte do PMFS 1 mM, os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL de PMSF 1mM e armazenados a -20° C. As suspensões esporos-cristais e PA foram analisadas por SDS-PAGE a 10%, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Para tal, foram utilizadas 15 µL das preparações de esporos-cristais para a realização da eletroforese, sob voltagem constante de 25 mA, por 3 h. Como controles dos experimentos, Btk-S1905 foi incubado com água destilada esterilizada nas mesmas condições realizadas para a incubação com os PA. Além disso, a estirpe *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* (HD-1) foi utilizada como padrão.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Efeito dos Produtos Alternativos sobre a Viabilidade de Esporos de *B. thuringiensis* Subesp. *kurstaki*

3.4.1.1 Aplicação conjunta: produtos alternativos misturados com água destilada esterilizada e *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*

Verificou-se que os resultados variaram conforme os produtos, sendo que Biogermex, Ecolife[®], óleo de nim e Calda Sulfocálcica reduziram significativamente a formação de UFC/mL em, respectivamente, 99,8%, 100%, 33,1% e 75,6%. Por outro lado, Planta Clean, Supermagro e Bion[®] provocaram aumento significativo do número de UFC/mL, com médias de 12,8%, 40,6% e 37%, respectivamente, enquanto que os demais produtos não diferiram da testemunha (Tabela 3.2).

Estudo com diferentes concentrações de produtos alternativos sobre esporos de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* obtidos do produto comercial Dipel PM[®], resultados semelhantes foram observados para Biogermex, Ecolife[®], óleo de nim e a Calda Bordalesa (MARTINELLO, 2009). De acordo com o autor, independentemente da concentração, estes produtos reduziram significativamente a formação de UFC/mL com inibição total nos tratamentos com a concentração recomendada. Ainda, com relação ao produto Pironin, observou redução significativa (29,4%), diferentemente dos resultados obtidos neste estudo (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Número médio (\pm EP) de UFC/mL da linhagem *B. thuringiensis* subesp. *Kurstaki* S1905, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e produtos alternativos, nas CR, e pH inicial e final, inoculação em meio de cultura AN em placas de Petri e incubação em câmara climatizada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 18 h).

Tratamento	Média UFC/mL ($\times 10^5$)	UFC Rel. Test (%) ¹	pH	
			0h	2h
Testemunha	349,8 \pm 5,84a	-	7,35	5,88
Pironim	336,5 \pm 5,04a	-3,8	3,53	3,52
Biogermex	0,8 \pm 0,80b	-99,8	3,83	3,75
Ecolife [®]	0,0 \pm 0,00b	-100,0	3,28	3,22
CV (%) =	5,09			
Testemunha	369,6 \pm 9,44b	-	7,35	5,88
Extrato de Crisântemo	389,5 \pm 8,47ab	+5,4	9,05	9,01
Planta Clean	416,8 \pm 6,37a	+12,8	9,58	9,64
Mattam Plus	373,3 \pm 12,42b	+1,0	5,57	5,62
CV (%) =	5,44			
Testemunha	340,8 \pm 43,14b	-	7,35	5,88
Natural Neem	227,9 \pm 14,10c	-33,1	6,63	6,58
Supermagro	479,2 \pm 17,68a	+40,6	4,96	4,98
Calda Sulfocálcica	83,1 \pm 15,10d	-75,6	10,26	9,41
Bion [®]	466,8 \pm 12,92a	+37,0	6,20	6,40
CV (%) =	16,46			

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

¹ Fórmula: $\frac{\text{Média UFC/mL Test} - \text{Média UFC/mL Test x 100}}{\text{Média UFC/mL Test}} - 100$, sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução em relação à testemunha.

3.4.1.2 Aplicação separada: produtos alternativos e esporos de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, aplicados na superfície do meio de cultura

Quando os produtos e Btk-S1905 foram aplicados separadamente, verificou-se efeito negativo na formação de UFC/mL para Bion[®], Biogermex, Ecolife[®]

e Calda Sulfocálcica, com redução significativa de 19,99%, 35,46%, 100% e 100%, respectivamente, enquanto que para os demais produtos não verificou-se diferença significativa (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Número médio (\pm EP) de UFC/mL de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* linhagem S1905, após inoculação em meio ágar nutriente adicionado de produtos alternativos, nas CR, na superfície do meio de cultura AN em placas de Petri e incubação em câmara climatizada ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 18 h).

Tratamento	Média UFC/mL ($\times 10^5$)	UFC Rel. Test (%) ¹
Testemunha	508,7 \pm 5,86a	-
Pironim	521,5 \pm 7,35a	+2,52
Biogermex	328,3 \pm 24,73b	-35,46
Ecolife [®]	0,0 \pm 0,00c	-100,0
CV (%) =	8,71	
Testemunha	394,8 \pm 14,11a	-
Extrato de Crisântemo	496,8 \pm 50,12a	+25,84
Planta Clean	459,7 \pm 66,55a	+16,44
Mattam Plus	419,5 \pm 10,51a	+6,26
CV (%) =	21,50	
Testemunha	848,3 \pm 28,30ab	-
Natural Neem	929,9 \pm 29,09a	+9,62
Supermagro	788,5 \pm 39,35b	-7,05
Calda Sulfocálcica	0,0 \pm 0,00d	-100,0
Bion [®]	678,7 \pm 16,94c	-19,99
CV (%) =	8,70	

Médias (\pm EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

¹ Fórmula: $\frac{\text{Média UFC/mL Trat}}{\text{Média UFC/mL Test}} \times 100 - 100$, sendo os valores positivos para aumento de UFC/mL e negativos para redução em relação à testemunha.

Os efeitos negativos podem estar relacionados a variação do pH, uma vez que para os produtos que apresentaram pH ácido como Biogermex, e Ecolife[®] verificou-se redução total das UFC/mL, enquanto que para extrato de

crisântemo e Planta Clean (pH básico), houve aumento das UFC/mL, exceto para Calda Sulfocálcica (Tabela 3.2). Resultados semelhantes relacionados ao pH foram observados com diferentes concentrações de Biogermex e Ecolife® sobre *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, com redução significativa de UFC/mL em todas as concentrações (MARTINELLO, 2009).

Resultados divergentes têm sido verificado em trabalhos referentes ao efeito do pH na germinação de esporos. Em estudo sobre a germinação de esporos de Bt em solo com diferentes pH, verificou-se que quanto maior a acidez do solo, maior a redução da germinação, sendo que em pH abaixo de 5 a germinação foi cessada (PETRAS; CASIDA JR, 1985). Por outro lado, em testes *in vitro*, para avaliar a ação de componentes do fluido intestinal em *Manduca sexta*, isolados e em conjunto sobre a germinação dos esporos de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*, verificou-se que o pH alcalino foi o único componente que excluído do processo, cessou a germinação dos esporos (WILSON; BENOIT, 1993). Os autores sugerem que tal efeito esteja relacionado à presença de proteínas na parede celular do esporo, similares as proteínas do cristal e, portanto solubilizadas em pH alcalino, desencadeando a germinação.

Entretanto, estudos mais recentes indicam que há três processos diferentes envolvidos no processo de germinação, sendo estes a presença de receptores específicos na membrana interna do esporo, a presença de canais de íons e a ação de enzimas líticas na degradação do córtex celular. Assim, a germinação pode ser desencadeada em presença de substâncias denominadas germinantes como aminoácidos, açúcares e nucleosídeos, que se ligam aos receptores específicos, bem como em resposta a outros agentes chamados de não germinantes como sais, altas pressões e íons Ca^{+2} (SETLOW, 2003).

Nesse contexto, infere-se que os resultados negativos obtidos para Calda Sulfocálcica, Biogermex e Ecolife®, em ambas as técnicas, além do pH estão relacionados à composição destes produtos e, conseqüentemente ao seu modo de ação.

A Calda Sulfocálcica é composta por uma mistura de polissulfetos de cálcio. Os sulfetos são moléculas reativas e com afinidade de ligação a outras moléculas, porém quando em contato com a água ocorre a formação de hidróxido de cálcio, substância calcificante e, tanto os sulfetos quanto o hidróxido podem inativar

os esporos (GUTIERREZ – informação verbal)⁵. Isto pode ser reforçado pelos resultados observados com a Calda Bordalesa, constituída por polissulfetos de cobre, que independentemente da concentração e substrato de incubação, reduziram a formação de UFC/mL em Btk (MARTINELLO, 2009), além de estudos com altas concentrações de sulfatos de enxofre que afetaram *B. thuringiensis* (HASSEN et al, 1998).

Por sua vez, Ecolife[®] é um produto composto por bioflavonóides, fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico (BOLETIN TÉCNICO), com composição semelhante a do Biogermex. Já o nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) possui várias substâncias inseticidas, com destaque azadiractina, terpenóide mais eficiente no controle de pragas, (MARTINEZ, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Os flavonóides são derivados de compostos fenólicos e, assim como os terpenóides, são moléculas resultantes do metabolismo secundário das plantas, que em muitos casos atuam como mecanismo de defesa contra insetos e microrganismos (DIXON; DEY; LAMB, 1983; COWAN, 1999). Segundo Tsuchiya et al. (1996) os flavonóides têm capacidade de se ligar com proteínas extracelulares e paredes celulares de bactérias, inativando-as, podendo também romper membranas.

Diante do exposto, é importante salientar que a redução de UFC/mL observada para Biogermex, Ecolife[®] e óleo de nim, pode estar relacionada ao impedimento do processo de germinação e ou à ação dos referidos metabólitos sobre a membrana bacteriana logo após a germinação, destruindo-a. Tal efeito sobre as células pode ser reforçado nos resultados negativos obtidos com Ecolife[®] sobre células de *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*, bactérias fitopatogênicas Gram negativas, sendo que o halo de inibição foi proporcional ao aumento da concentração do produto (MOTOYAMA et al., 2003). É importante salientar que devido a estrutura mais complexa e menos permeável da parede celular das bactérias Gram negativas, estas são mais resistentes aos compostos ativos, comparadas às Gram positivas (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004), o que evidencia o potencial bactericida do Ecolife[®].

Com relação ao Bion[®], este é um produto análogo ao ácido salicílico utilizado como indutor de resistência sistêmica em plantas que, no entanto, tem

⁵ Profa Dra Amanda Gutierrez – Laboratório de Química – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus Dois Vizinhos*.

apresentado efeito negativo contra muitos fitopatógenos (PEREZ et al., 2003; ZHU et al., 2004), como para fungos, *in vitro*, (LaMONDIA, 2009) e em campo (PATRICIO et al., 2007), para bactérias em campo (PATRICIO et al., 2007) e *in vitro* (ABO-ELYOUSR; EL-HENDAWY, 2008). Entretanto, não há na literatura, trabalhos que abordam o efeito de Bion[®] sobre bactérias entomopatogênicas, sendo este o primeiro estudo, no qual se verificou efeitos significativos inversos para as duas técnicas avaliadas, com aumento de UFC/mL na aplicação conjunta e, redução na aplicação separada (Tabela 3.2 e 3.3).

Os produtos Supermagro e Planta Clean aumentaram a formação de UFC/mL na aplicação conjunta e não diferiram da testemunha na aplicação separada (Tabela 3.2 e 3.3). Para Supermagro, os resultados discordam dos obtidos por Martinello (2009) em estudo semelhante com bioinseticida formulado, no qual se verificou redução significativa nas médias de UFC/mL em diferentes concentrações.

Os resultados obtidos neste estudo podem estar relacionados às técnicas utilizadas, sendo que na aplicação separada assim que o esporo germina a célula entra em contato direto com os produtos, que podem agir sobre a membrana. A variação de resultados de acordo com a técnica utilizada foi discutida em estudos referentes ao efeito de fungicidas (SILVA et al., 2006) e herbicidas (SILVA et al., 2008) sobre Btk. De acordo com os autores os resultados variaram conforme a concentração, técnica, tempo de contato e fase/estágio de desenvolvimento do patógeno, sendo que a técnica em meio líquido é a que mais expõe o patógeno ao máximo contato com produto.

3.4.2 Efeito dos Produtos Alternativos sobre os Cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*

3.4.2.1 Efeito da toxicidade sobre *A. gemmatilis*

Os valores de CL₅₀ (IC-95%) para a linhagem Btk S1905 e Btk HD-1 foram de 35 (31-39) µg/mL, (slope 3,02 ± 0,39) e 31 (22-37) µg/mL, (slope 2,80 ± 0,68), respectivamente, não havendo diferença significativa entre as estirpes.

No ensaio *in vivo* verificou-se que o efeito de Bion[®], Planta Clean, Ecolife[®] e óleo de nim foi antagônico a ação das toxinas dos cristais, com respectivas médias de mortalidade de 12,1%, 18,4, 23,7% e 18,9%, comparadas ao BtK-S1905 e os produtos, isoladamente. Os valores de pH para os referidos produtos variaram de ácido 2,90 (Ecolife[®] + BtK-S1905) a alcalino 9,77 (Planta Clean + BtK-S1905) (Tabela 3.4).

Estes resultados discordam dos observados por Martinello (2009) que não verificou efeito de Ecolife[®] e óleo de nim sobre a ação das toxinas dos cristais de Btk obtidos do bioinseticida Dipel PM[®]. No entanto, essa divergência pode estar relacionada ao fato de que neste estudo utilizou-se a bactéria purificada, além de uma concentração menor (CL_{50}) para os testes de toxicidade.

Os demais produtos apresentaram efeito aditivo sobre a toxicidade das proteínas dos cristais, sendo que o extrato de Crisântemo e Pironin, isolados, foram os produtos que causaram maior mortalidade com respectivas médias de 74,8% e 61,0%, diferindo significativamente do tratamento Btk-S1905 com percentual de mortalidade de 51,3%. Ainda, quando os cristais e os produtos foram misturados, verificou-se aumento na mortalidade, com respectivas médias de 89,6% e 88,0% para extrato de crisântemo e Pironin (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Porcentagem média (\pm EP) da mortalidade de lagartas *A. gemmatalis* por *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* linhagem S1905 nos tempos 12, 24, 48 e 72 h e total observada, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h) com água destilada esterilizada e produtos alternativos, nas CR, em diferentes concentrações e pH inicial e final.

TRAT	Tempo				% mortalidade			Interação	pH	
	12h	24h	48h	72h	Observada ^(a)	Esperada ^(b)	X ² ^(c)		0h	2h
Test Água	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00Ac	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00c	—	—	—	8,20	6,93
Test EC	6,6 \pm 1,13Ba	10,6 \pm 0,99Bab	40,5 \pm 5,89Aa	17,2 \pm 2,12Ba	74,8 \pm 2,35a	—	—	—	9,27	9,05
Test Btk	1,6 \pm 1,59Cab	3,1 \pm 1,55Cbc	32,8 \pm 11,66Aa	13,7 \pm 2,75Ba	51,3 \pm 10,06b	—	—	—	7,38	7,42
EC + Btk	8,1 \pm 1,91Ba	12,9 \pm 2,16Ba	47,5 \pm 2,69Aa	20,7 \pm 4,07Ba	89,6 \pm 6,31a	87,72	0,2	Aditivismo	9,15	8,99
CV 1 (%) =	15,02	CV 2 (%) =	26,34	CV 3 (%) =	10,68					
Test Água	0,0 \pm 0,00Aa	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00Ac	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00b	—	—	—	8,20	6,93
Test CS	2,5 \pm 1,28Aa	4,0 \pm 2,23Aab	13,3 \pm 1,12Aab	9,4 \pm 2,85Aa	29,3 \pm 5,60a	—	—	—	10,80	9,15
Test Btk	1,6 \pm 1,59Ca	3,1 \pm 1,55BCab	32,8 \pm 11,66Aa	13,7 \pm 2,75ABa	51,3 \pm 10,06a	—	—	—	7,38	7,42
CS + Btk	2,6 \pm 2,56Ba	8,2 \pm 2,22ABa	6,6 \pm 3,51ABbc	18,47,04Aa	35,7 \pm 5,88a	65,36	3,66	Aditivismo	10,87	9,28
CV 1 (%) =	47,94	CV 2 (%) =	41,03	CV 3 (%) =	18,51					
Test Água	0,0 \pm 0,00Aa	0,0 \pm 0,00Aa	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00b	—	—	—	8,20	6,93
Test Bion	0,0 \pm 0,00Aa	0,0 \pm 0,00Aa	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00Ab	0,0 \pm 0,00b	—	—	—	8,82	6,67
Test Btk	1,6 \pm 1,59Ca	3,1 \pm 1,55Ca	32,8 \pm 11,66Aa	13,7 \pm 2,75Ba	51,3 \pm 10,06a	—	—	—	7,38	7,42
Bion + Btk	0,0 \pm 0,00Ba	0,0 \pm 0,00Ba	4,5 \pm 2,62ABb	7,6 \pm 4,01Aa	12,1 \pm 6,60b	51,78	5,51	Antagonismo	8,20	6,65
CV 1 (%) =	63,11	CV 2 (%) =	50,43	CV 3 (%) =	42,42					

Tabela 3.4 Continuação...

Test Água	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ac	0,0±0,00Ab	0,0±0,00b	—	—	—	8,20	6,93
Test BG	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ac	0,0±0,00Ab	0,0±0,00b	—	—	—	3,58	3,57
Test Btk	1,6±1,59Ba	3,1±1,55Ba	32,8±11,66Aa	13,7±2,75Ba	51,3±10,06 ^a	—	—	—	7,38	7,42
BG + Btk	0,0±0,00Ba	0,0±0,00Ba	9,7±5,50Ab	7,9±4,20ABab	35,3±15,22 ^a	51,78	2,28	Aditivismo	3,67	3,89
CV 1 (%) =	54,73	CV 2 (%) =	58,45	CV 3 (%) =	37,47					
Test Água	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Ab	0,0±0,00b	—	—	—	8,20	6,93
Test MP	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Ab	0,0±0,00b	—	—	—	7,23	7,56
Test Btk	1,6±1,59Ca	3,1±1,55Ca	32,8±11,66Aa	13,7±2,75Ba	51,3±10,06 ^a	—	—	—	7,38	7,42
MP + Btk	0,0±0,00Ca	3,8±1,91Ca	42,2±8,72Aa	18,8±2,23Ba	64,8±9,25 ^a	51,78	1,81	Aditivismo	7,31	7,66
CV 1 (%) =	42,35	CV 2 (%) =	36,27	CV 3 (%) =	19,10					
Test Água	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ac	0,0±0,00Ab	0,0±0,00b	—	—	—	8,20	6,93
Test SM	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ac	0,0±0,00Ab	0,0±0,00b	—	—	—	4,90	4,76
Test Btk	1,6±1,59Ca	3,1±1,55Ca	32,8±11,66Ba	13,7±2,75Aa	51,3±10,06 ^a	—	—	—	7,38	7,42
SM + Btk	0,0±0,00Ca	0,0±0,00Ca	12,6±3,51Bb	26,2±3,57Aa	38,8±0,13 ^a	51,78	1,80	Aditivismo	4,93	4,93
CV 1 (%) =	34,25	CV 2 (%) =	40,55	CV 3 (%) =	16,74					
Test Água	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Ab	0,0±0,00c	—	—	—	8,20	6,93
Test ECO	0,0±0,00Aa	1,5±1,52Aa	1,5±1,52Ab	0,0±0,00Ab	3,0±3,00bc	—	—	—	2,90	2,85
Test Btk	1,6±1,59Ca	3,1±1,55BCa	32,8±11,66Aa	13,7±2,75ABa	51,3±10,06 ^a	—	—	—	7,38	7,42
ECO + Bt	4,9±3,05ABa	0,0±0,00Ba	5,1±3,04ABb	13,6±8,92Aa	23,7±9,41ab	52,76	4,0	Antagonismo	2,92	2,90
CV 1 (%) =	52,62	CV 2 (%) =	64,04	CV 3 (%) =	38,93					

Tabela 3.4 Continuação...

Test Água	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ac	0,0±0,00Ab	0,0±0,00c	—	—	—	8,20	6,93
Test PI	48,7±9,02Aa	2,5±1,26BCa	9,8±4,31Bb	0,0±0,00Cb	61,0±9,20ab	—	—	—	3,33	3,24
Test Btk	1,6±1,59Bb	3,1±1,55Ba	32,8±11,66Aa	13,7±2,75Aa	51,3±10,06b	—	—	—	7,38	7,42
PI + Btk	60,4±6,28Aa	6,5±1,56Ba	11,1±3,65Bb	10,1±3,50Ba	88,0±6,42 ^a	81,0	0,7	Aditivismo	3,34	3,32
CV 1 (%) =	20,40	CV 2 (%) =	34,06	CV 3 (%) =	13,62					
Test Água	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Ab	0,0±0,00c	—	—	—	8,20	6,93
Test PC	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Aa	1,3±1,28Ab	0,0±0,00Ab	1,3±1,27c	—	—	—	10,00	9,88
Test Btk	1,6±1,59Cab	3,1±1,55BCa	32,8±11,66Aa	13,7±2,75ABa	51,3±10,06 ^a	—	—	—	7,38	7,42
PC + Btk	12,5±9,19Aa	0,0±0,00Ba	1,2±1,19ABb	4,7±0,80ABab	18,4±8,45b	51,92	4,65	Antagonismo	9,65	9,77
CV 1 (%) =	60,79	CV 2 (%) =	56,58	CV 3 (%) =	34,02					
Test Água	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Aa	0,0±0,00Ab	0,0±0,00Ab	0,0±0,00b	—	—	—	8,20	6,93
Test NE	10,6±6,44Aa	0,0±0,00Aa	6,6±4,16Ab	0,0±0,00Ab	17,2±8,68ab	—	—	—	7,01	7,19
Test Btk	1,6±1,59Ca	3,1±1,55BCa	32,8±11,66Aa	13,7±2,75ABa	51,3±10,06 ^a	—	—	—	7,38	7,42
NE + Btk	7,1±2,96Aa	0,0±0,00Aa	4,4±2,51Ab	7,4±3,86Aab	18,9±8,93ab	59,55	5,26	Antagonismo	6,65	6,76
CV 1 (%) =	53,99	CV 2 (%) =	57,63	CV 3 (%) =	44,13					

Médias (±EP) seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

^(a) Porcentagem total de lagartas mortas ao longo de 72 horas.

^(b) mortalidade esperada (ME) foi calculada pela fórmula $ME = M1 + M2(1 - M1)$ sendo M1= mortalidade do entomopatógeno sozinho; M2= mortalidade do produto fitossanitário sozinho.

^(c) $\chi^2 = \frac{(MO - ME)^2}{ME}$, sendo χ^2 (tabelado) = 3,84, grau de liberdade = 1, P ≤ 0,05; MO= mortalidade observada; ME= mortalidade esperada;

CV 1 = Tratamento; CV 2 = Tempo; CV 3 = Mortalidade Total.

Legenda: Test= testemunha; Btk= *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*; EC= Extrato de Crisântemo; CS= Calda Sulfocálcica; BI=Bion[®]; BG= Biogermex; MP= Mattam Plus; SM= Supermagro; ECO= Ecolife[®]; PI= Pironin; PC= Planta Clean; NE= Natural Neem

3.4.2.2 Morfologia e integridade dos cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Não foi identificada nenhuma alteração morfológica nos cristais em nenhum dos tratamentos analisados, evidenciando que nestas condições os produtos alternativos não causaram quebra, nem degradação das proteínas do cristal (Figura 3.1 e 3.2).

Foram observados cristais bipiramidais, cubóides e esféricos, corroborando Medeiros et al. (2005), sendo os cristais bipiramidais estão relacionados a presença de proteínas do tipo Cry 1, ativas contra insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera, e os cristais cubóides são associados a proteína Cry 2, efetiva contra a ordem Diptera e Lepidoptera (HOFTE; WHITELEY, 1989; SILVA et al., 2004). Esses diferentes tipos morfológicos podem fornecer informações importantes a respeito da atividade entomopatogênica das estirpes para as diferentes ordens de insetos quando analisados em conjunto com a caracterização bioquímica e molecular (HABIB; ANDRADE, 1998; WHO, 1999).

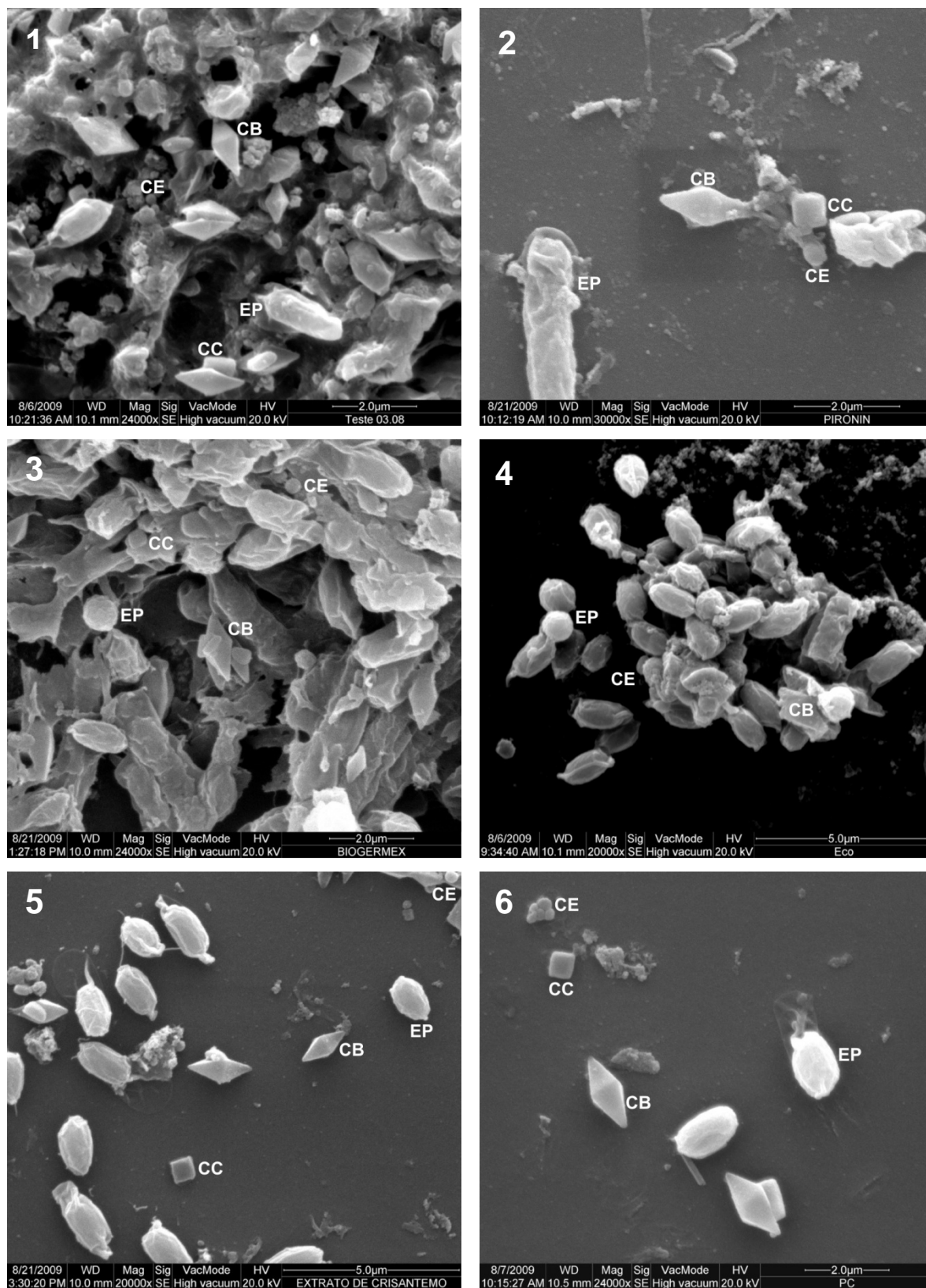


Figura 3.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura da mistura de esporos e cristais da linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h). 1- Testemunha; 2- Pironin; 3- Biogermex; 4- Ecolife®; 5- Extrato de Crisântemo; 6- Planta Clean. EP: esporo; CB: cristal bipiramidal; CC: cristal cubóide; CE: cristal esférico.

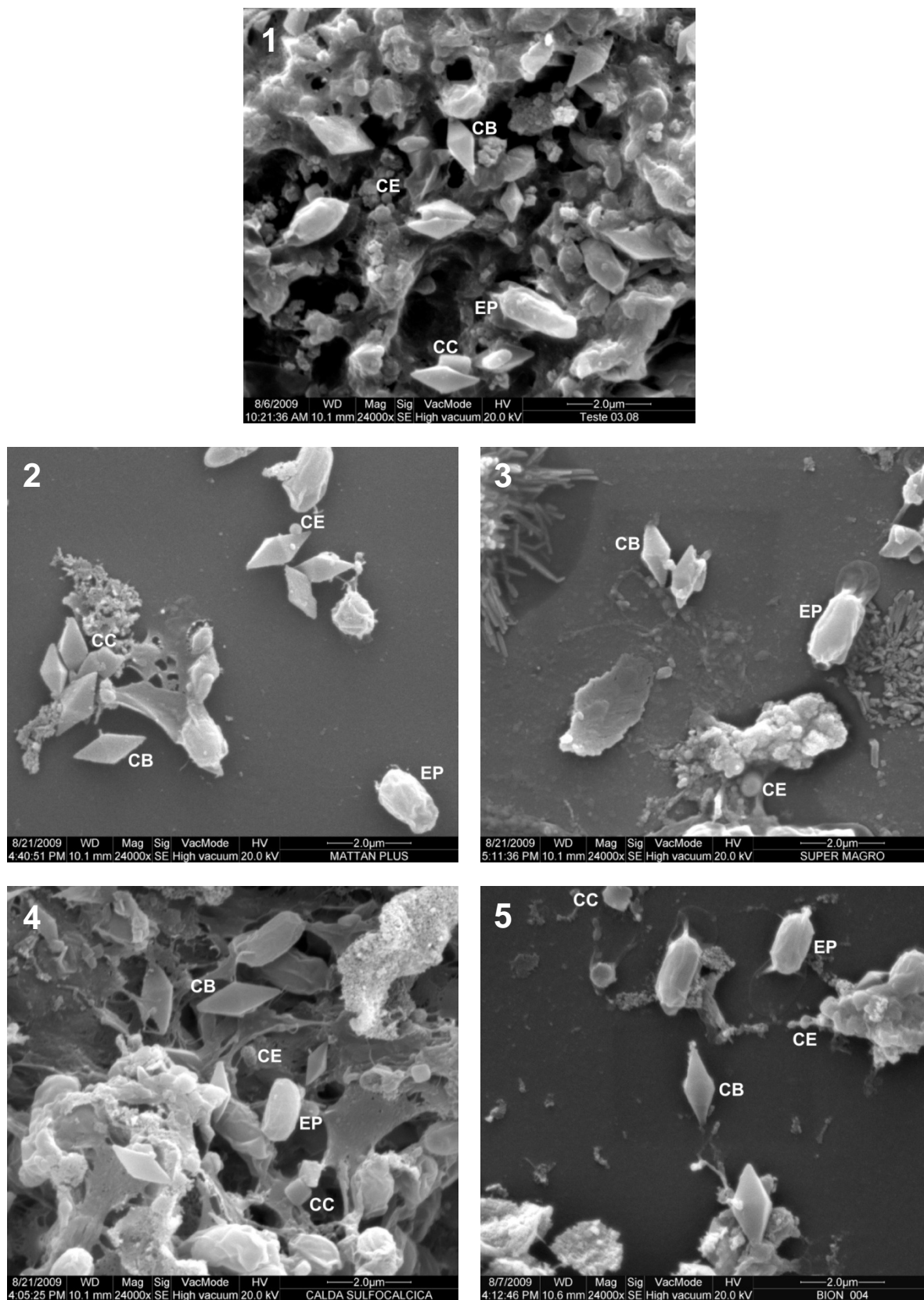


Figura 3.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura da mistura de esporos e cristais de da linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h). 1- Testemunha; 2- Mattam Plus; 3- Supermagro; 4- Calda Sulfofalcica; 5- Bion®. EP: esporo; CB: cristal bipiramidal; CC: cristal cubóide; CE: cristal esférico.

3.4.2.3 Integridade dos cristais de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A avaliação em eletroforese não identificou degradação de proteínas com fragmentos de peso molecular acima de 10 kDa para nenhum dos tratamentos, confirmando os resultados obtidos nas análises em MEV (Figura 3.3 e 3.4).

A solubilização das proteínas do cristal pode ocorrer em meio com pH alcalino acima de 8 (HABIB; ANDRADE, 1998), o que seria esperado para Calda Sulfocálcica e Planta Clean. No entanto, os resultados obtidos neste estudo indicam que o pH, isoladamente, não solubiliza os cristais da linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905.

As proteínas encontradas nos tratamentos analisados apresentaram dois polipeptídeos principais de aproximadamente 130 e 65 kDa (Figura 3.3 e 3.4), sendo que o perfil de 130 kDa é considerado padrão característico de estirpes ativas contra lepidópteros e coleópteros e o perfil de 65 kDa é característico de estirpes ativas contra lepidópteros e dípteros (MONNERAT; BRAVO, 2000).

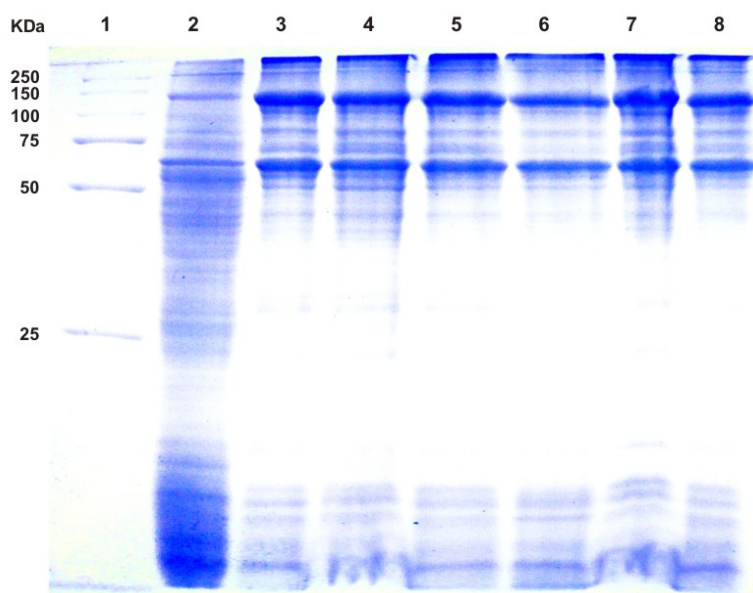


Figura 3.3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnatante (SDS-PAGE) de proteínas da linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h): 1 – Marcador molecular, 2- *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-1, 3- Testemunha (água), 4- Biogermex, 5- Bion[®], 6- Calda Sulfocálcica, 7- Extrato de Crisântemo, 8- Ecolife[®].

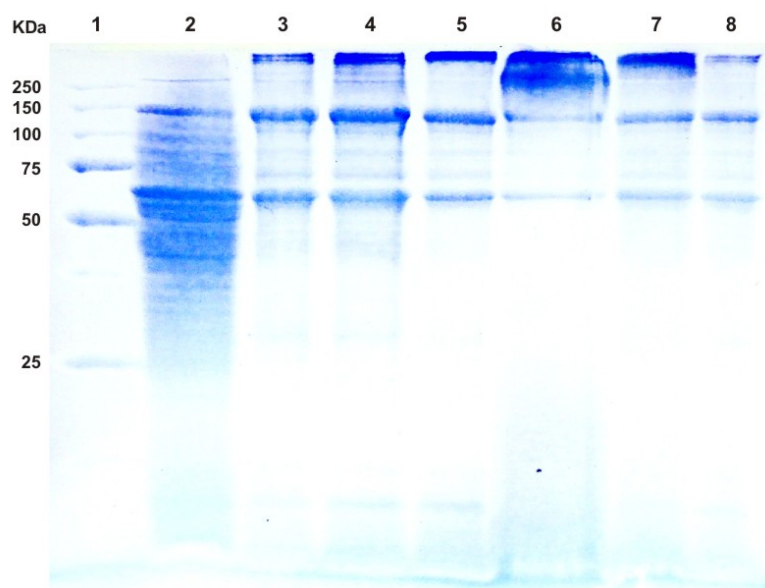


Figura 3.4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) de proteínas da linhagem *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 e produtos alternativos, nas CR, após incubação ($30 \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm, 2 h): 1 – Marcador molecular, 2- *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* HD-1, 3- Testemunha (água), 4- Matam Plus, 5- Natural Neem, 6- Planta Clean, 7- Pironin, 8- Supermagro.

Vários fatores podem afetar a atividade inseticida de *B. thuringiensis*, tais como a estrutura e funcionamento do intestino, a diversidade da toxina, a estrutura e o processo de solubilização da proteína, a interação entre as toxinas (GILL, 1995), bem como a estrutura e processo de germinação dos esporos (LIU et al., 1998).

Diante do exposto e, de acordo com os resultados obtidos referentes aos efeitos antagônicos, a atividade das proteínas do cristal verificados para Ecolife[®], Planta Clean, óleo de nim e Bion[®] estão relacionados aos compostos constituintes desses produtos agindo no processo de solubilização da proteína no intestino do inseto e ou aos receptores específicos localizados na membrana intestinal destes. Isto porque isoladamente, estes produtos não tiveram efeito significativo sobre os insetos, além das análises de MEV e eletroforese terem refutado a possibilidade de alterações na proteína do cristal.

No caso do Ecolife[®], além de outros compostos, possuem os bioflavonóides (BOLETIN TÉCNICO) enquanto o nim possui, dentre outras substâncias, o terpenóide azadiractina (MARTINEZ, 2002; MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). Já o Planta Clean é um produto constituído de extratos vegetais, ácidos graxos e sais minerais da família dos carbonatos, certificado para

uso orgânico apresentou efeito fungicida e inseticida (PRETTO – informação verbal)⁶, enquanto Bion[®] é um produto, cujo princípio ativo é análogo ao ácido salicílico, atuando como indutor de resistência sistêmica em plantas que, no entanto, tem apresentado efeito negativo contra muitos patógenos de plantas (PEREZ et al., 2003; ZHU et al., 2004), sendo à sua ação direta sobre microrganismos, ainda desconhecida.

Como já mencionado, os flavonóides, taninos e terpenóides são resultantes do metabolismo secundário das plantas (COWAN, 1999), com capacidade de se ligarem com proteínas extracelulares e paredes celulares de bactérias, inativando-as (TSUCHIYA et al., 1996).

O efeito de taninos sobre a toxicidade de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* foi avaliado sobre larvas de *Aedes aegypti* e verificou-se que na mistura de ambos, sem incubação prévia, houve redução na mortalidade larval com CL₅₀ de 233,0 ng/mL enquanto que para a testemunha a CL₅₀ foi de 44,6 ng/mL. Entretanto, quando a mistura foi incubada por 48 horas, obtiveram-se respectivos valores de CL₅₀ de 140,6 ng/mL e 46,6 ng/mL (LORD; UNDEEN, 1990). De acordo com os autores a ligação dos taninos às enzimas proteolíticas presentes no intestino e nas proteínas do cristal pode ter impedido a solubilização destes, justificando o maior valor de CL₅₀ na avaliação sem incubação. Porém, o menor valor de CL₅₀ verificado após o processo de incubação, provavelmente se deva a pequenas quantidades de proteínas que podem ter sido liberadas do cristal, ligando-se aos taninos na solução e, conseqüentemente diminuindo a ação destes sobre a toxina do cristal.

Além disso, outros fatores podem estar relacionados à redução na mortalidade larval em misturas de *B. thuringiensis* com outros compostos, como a presença de matéria particulada (IGNOFO et al., 1981; LORD; UNDEM, 1990), solutos como ácido fosfórico e ácido cítrico que podem agir como extressores nos insetos, reduzindo a ingestão de alimento e conseqüentemente a ingestão de toxinas (LORD; UNDEM, 1990) além de cátions, fatores fisicoquímicos e bioquímicos como pH, força iônica e divalentes (TRAM et al., 2001), temperatura (VACHON; SCHWARTZ; LAPRADE, 2006) e a flora bacteriana do inseto (BRODERICK; RAFFA; AHNDELSMAN, 2006).

⁶ Fernando Pretto. fernando@ecoplanet.agr.br. xx 48-3244-8778. www.ecoplanet.agr.br

Neste estudo, não foi evidenciado o efeito do pH sobre as proteínas do cristal e, conseqüentemente à mortalidade observada nos tratamentos que apresentaram efeito antagônico, nos quais os valores variaram de ácido 2,90 (Ecolife[®]+ Btk S1905) a alcalino 9,77 (Planta Clean+ Btk S1905) (Tabela 3.4).

Resultados semelhantes foram obtidos em estudo sobre o efeito da variação do pH e do cloro sobre os bioinseticidas bacterianos Dipel SC e Thuricide 32B, verificando-se que não houve diferença significativa na mortalidade para os dois bioinseticidas, em diferentes tempos, independente da presença ou não do cloro (NEISESS, 1980).

Com relação ao efeito do pH no intestino do inseto, em estudo, *in vitro*, com duas proteínas de *B. thuringiensis* em células das microviliosidades intestinais de *Manduca sexta*, verificou-se diferença na atividade das proteínas de acordo com variação do pH, sendo que para a proteína Cry1Ca a maior eficiência na formação de poros foi em pH 6,5; 7,5 e 8,5 enquanto a proteína Cry1Ac foi em pH 9,5 ou 10,5 (TRAM et al., 2001). Além disso, a formação de poros na membrana intestinal de larvas de *Manduca sexta* esta relacionada à temperatura do meio, uma vez que com a redução de temperatura houve diminuição na formação de poros (VACHON; SCHWARTZ; LAPRADE, 2006).

Ainda, em avaliação dos efeitos de sais inorgânicos sobre *B. thuringiensis*, verificou-se que sódio e carbonato de cálcio aumentaram a mortalidade de larvas, podendo estar relacionado à natureza alcalina destes sais, o que aumenta a solubilização das proteínas do cristal (EL-MOURSY; SHARABY; AWAD, 1993).

É importante salientar que a utilização de produtos alternativos em associação com a linhagem *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 é uma estratégia viável, entretanto para a obtenção e otimização dos resultados devem-se considerar os efeitos sobre esporos e cristais. Isto porque, os esporos também tem ação na entomopatogenicidade da bactéria, uma vez que na parede celular são encontradas proteínas semelhantes às do cristal, conferindo-lhes toxicidade. Além disso, desempenham papel fundamental nos insetos nos quais a suscetibilidade esta relacionada à morte por septicemia (HABIB; ANDRADE, 1998).

A associação de produtos constituídos por metabólitos secundários pode ser uma estratégia fundamental para o manejo da resistência dos insetos a *B. thuringiensis*, pois de acordo com Gill (1995) o intestino dos insetos desempenha um

papel importante na detoxificação dos metabólitos secundários, sendo que as toxinas da bactéria podem afetar a detoxificação destes compostos e, conseqüentemente aumentar a suscetibilidade.

Dessa forma, embora as avaliações em laboratório exponham o patógeno à condições extremas de contato com os produtos, recomenda-se a realização de estudos à campo com os produtos que apresentaram efeito tóxico aos esporos e cristais, para a confirmação dos resultados obtidos *in vitro*.

3.5 CONCLUSÃO

A associação de Biogermex, Calda Sulfocálcia, Ecolife[®], Planta Clean e óleo de nim com a linhagem *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S1905 pode comprometer o entomopatógeno uma vez que Biogermex, Calda Sulfocálcia, Ecolife[®] reduziram a formação de UFC/mL tanto na aplicação conjunta quanto na separada e, Ecolife[®], Bion[®], Planta Clean e óleo de nim foram antagônicos à toxicidade do cristal.

Os produtos Matam Plus, Supermagro, Pironin e Extrato de Crisântemo podem ser utilizados na aplicação conjunta com Btk-S1905, pois não afetaram negativamente a formação de UFC/mL e apresentaram efeito aditivo à toxicidade das proteínas do cristal.

3.6 REFERÊNCIAS

ABO-ELYOURS, K.A.M.; EL-HENDAWY, H.H. Integration of *Pseudomonas fluorescens* and acibenzolar-S-methyl to control bacterial spot disease of tomato **Crop Protection**, v. 27, p.1118–1124, jan. 2008.

ALVES, L.F.A.; PINTO, F.G.S. Interações entre agroquímicos e bactérias entomopatogênicas. In. 8^o SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2003, São Pedro. **Anais...** São Pedro, 2003. p. 41.

ALVES, S.B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J.E.M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 217-238.

ALVES, S.B.; MORAES, S.A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-797.

BENZ, G. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.), **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. p. 327-356.

BOLETIN TÉCNICO. Boletim Técnico Ecolife®. Disponível em: http://www.quinabra.com.br/boletinstec/boletim_digital_ecolife.pdf. Acessado em 23 de março de 2010.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, p. 423-435, jan. 2007.

BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **PNAS**, v. 103, n.41, p. 15196-15199, 2006.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, oct., 1999.

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Adv. Enzymol**, v.55, p. 1-69, 1983.

EL-MOURSAY, A.A.; SHARABY, A.; AWAD, H.H Some Chemical Additives to increase the activity spectrum of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel 2X) against the rice moth *Corcyra cephalonica*. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, v.6, n.2, p.149-154, 1993.

FERNANDES, M.C.A.; LEITE, E.C.B.; MOREIRA, V.C.; **Defensivos Alternativos**. Niterói: Programa Rio Rural, 2008

FERREIRA, D.F. 2007. Sistema Sisvar para análises estatísticas. <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/softwares.htm>> Acessado em 02 de jun., 2009.

FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos: diversidade, especificidade e impacto ambiental. In: 8º Simpósio de Controle Biológico, São Pedro, 2003. **Resumos**. São Pedro, SP, 2003. p.47.

GENENA, A. K.; HENSE, H.; SMÂNIA JR., A. SOUZA, S.M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composite.on, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciênc. e Tec.de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 463-469, 2008.

GILL, S.S. Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, v. 90, n.1, p. 69-74, jan./fev., 1995.

GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v.69, n.4, p.487-497, 1976.

HABIB, M.E.M; C.F.S. ANDRADE. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES S.B.(Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.p. 383-427.

HASSEN, A.; SAID, N.; CHERIF, M.; BOUDABOUS, A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource technology**, Amsterdan, v.64, n.1, p. 7-15, 1998.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa da Soja, Londrina, **Documentos 10**, 21p. 1985.

HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v.53, n.2, p. 242-255, 1989.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C.; KROHA, M.J.; FUKUDA, T.; COUCH, T.L. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. **Mosq. News**, p. 41, p.85-93, 1981.

JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER.; GAIGL, A.; TOBÓN, R.; ZIMMERMANN, G. Effect of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) starin CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froechner (Hemiptera: Cydnidae). **Biological Control**, v. 34, p. 12-20, 2005.

KRISCHIK, V.A.; BARBOSA, P.; REICHELDERFER, A.F. Three Trophic Level Interactions: Allelochemicals, *Manduca sexta* (L.), and *Bacillus thuringiensis* var.

kurstaki Berliner. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 17, n. 3, p. 476-482, 1988.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LaMONDIA, J.A. Efficacy of fungicides and a systemic acquired resistance activator (acibenzolar-S-methyl) against tobacco blue mould. **Crop Protection**, v. 28, p.72-76, 2009.

LECADET, M. M.; CHAUFaux, J.; RIBIER, J.E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, 1991.

LIU, Y.B.; TABASHNIR, R.E.; MOAR, W.J.; SMITH, R.A. Synergism between *Bacillus thuringiensis* Spores and Toxins against Resistant and Susceptible Diamond Moths (*Plutella xylostella*). **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.4, p. 1385-1389, 1998

LORD, J.C. ; UNDEEN, A.H. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Toxin by Dissolved Tannins. **Entomological Society of America**, v.19, n.5, p. 1547-1551, 1990.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Estrutura e função celular, In: MADIGAN, M.T (Ed) **Microbiologia**. 10.ed. São Paulo:Prentice Hall, 2004, p 52-94.

MARTINELLO, L. **Efeito in vitro de produtos fitossanitários alternativos sobre esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner, 1915**. 2009. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel.

MARTINEZ, S.S. (Ed.) **O nim *Azadirachta indica* - natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2002.

MEDEIROS, P.T.; FERREIRA, M.N.; MARTINS, E.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; DIAS, J.M.C.; MONNERAT, R.S. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, nov. 2005.

MENDES, Z.F.; LIMA, E.R.; FRANCO, E.S.; OLIVEIRA, R.A.; ALEIXO, G.A.S.; MONTEIRO, V.L.; MOTA, R.C.; COELHO, M.C.O.C. Avaliação da atividade antimicrobiana da tintura e pomada de *Ruta graveolens* (Arruda) sobre bactérias

isoladas de feridas cutâneas em cães. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 2, p. 32-36, 2008.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resitência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds) **Controle Biológico**, Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, v.3, 2000.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v 24, n.1, p. 139-48, 2005.

MOTOYAMA, M.M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; FIORE, A.C.G ; SCARPIM, C.A. Efeito antimicrobiano de extrato cítrico sobre *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis*. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 509-512, 2003.

NEISESS, J. Effect of pH and Chlorine Concentration on Activity of *Bacillus thuringiensis* Tank Mixes. **Jounal Econ. Entomol.**, v. 73, n.7, p. 186-188, 1980.

PEREIRA, M.S.V.; RODRIGUES, O.G.; FEIJO, F.M.C.; ATHAYDER, A.N.C.; LIMA, E.Q.; SOUSA, M.R.Q. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, Patos, v. 2, p. 37-44, 2006.

PEREZ, L.; RODRIGUEZ, M.E.; RODRIGUEZ, F.; ROSON, C. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of sistemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyanoi* f.sp tabacina. **Crop Protection**, v. 22, p. 405-413, 2003.

PETRAS, S.F.; CASIDA, JR., L.E. Survival of *Bacillus thuringiensis* Spores in soil. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.50, n.6, p. 1496-1501, 1985.

SETLOW, P. Spore Germination. **Current Opinion in Microbiology**. v. 6, p. 550–556, 2003.

SILVA, E.R.L; ALVES, L.F.A.; SANTOS, J.; POTRICH, M.; SENE, L. Técnicas para avaliação do efeito *in vitro* de herbicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 1, p. 59-67, 2008.

SILVA, E.R.L; ALVES, L.F.A.; SENE, L.; SANTOS, J.C.; BONINI, A.K.; POTRICH, M.; NEVES, P.M.O.J. Técnicas para avaliação do efeito “in vitro” de fungicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 429-437, 2006.

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. **J. Appl. Ent**, v.128, p. 102–107, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; MOSCARDI, F. Importância das interações entre agroquímicos e entomopatógenos em programas de MIP. In. 8º SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, São Pedro, 2003. **Anais...** São Pedro, SP, 2003. p. 59.

THOMAS, C.; SPARKS, A. Micro Probit 3.0 Analysis for the IBM PC and COMPATIBLES, 1987.

TRAN, L.B.; VACHON, V.; SCHWARTZ, J.L.; LAPRADE, R. Differential Effects of pH on the Pore-Forming Properties of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Toxins **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 67, n.10, p 4488–4494, oct. 2001.

TSUCHIYA, H., SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T. and LINUMA, M.. Comparative study on the antibacterial activity of hydrochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Ethnopharmacol**, v.50, p. 27–34, 1996.

VACHON, V.; SCHWARTZ, J.L ; LAPRADE, R. Influence of the biophysical and biochemical environment on the kinetics of pore formation by Cry toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 92, p. 160–165, 2006.

WHO, L. C. P. D. *Bacillus thuringiensis*. World Health Organization: Geneva, 1999.

WILSON, G.R. ; BENOIT, T.G. Alkaline pH Activates *Bacillus thuringiensis* Spores. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 62, p. 87-89, 1993.

ZHU, Y.J; QIU, X.; MOORE, P.H.; BORTH, W.; HU, J.; FERREIRA, S.; ALBERT, H.H. Systemic acquired resistance induced by BTH in papaya. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, p. 237-248, 2004.

4 ARTIGO B: EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS SOBRE *Trichogramma pretiosum* Riley (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

4.1 RESUMO

A utilização de produtos alternativos (PA) e *Trichogramma pretiosum* pode ser uma estratégia viável no manejo de pragas e doenças. No entanto, tais produtos podem afetar parâmetros biológicos destes insetos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de PA sobre parâmetros biológicos de *T. pretiosum* em condições de laboratório. Foram utilizados os produtos Pironin, Biogermex, Ecolife[®], Extrato de crisântemo, Planta Clean, Mattam Plus, Natural Neem, Supermagro, Calda Sulfocálcica e Bion[®], nas concentrações recomendadas pelos fabricantes. Para tal, os PA foram pulverizados sobre ovos de *Anagasta kuehniella* (Zeller) no pré e pós-parasitismo e, em diferentes fases do desenvolvimento de *T. pretiosum* no hospedeiro, sendo avaliado o número de ovos parasitados, percentual de emergidos, razão sexual, ciclo ovo-adulto e longevidade. Verificou-se que no pré-parasitismo a maioria dos produtos causou repelência à oviposição e, apenas Calda Sulfocálcica e Extrato de Crisântemo reduziram o número de ovos parasitados. Nenhum dos PA reduziu a porcentagem de emergência e alterou a razão sexual. Por outro lado, alguns produtos alteraram o ciclo ovo-adulto e a longevidade dos adultos, no pré e pós-parasitismo, com valores inferiores a um dia.

Palavras-chave: Controle alternativo. Parasitóides de ovos. Controle biológico. Controle associado. Agricultura alternativa.

EFFECT OF ALTERNATIVE PRODUCTS ON *Trichogramma pretiosum* Riley, (HYMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE)

ABSTRACT

Alternative products (AP) are used with biological control agents, and thus there may be variable responses of *Trichogramma pretiosum* to the utilization of AP. In this context, the objective of the present research was to evaluate the effect of AP on biological parameters of *T. pretiosum* under laboratory conditions. The following products Pironin, Biogermex, Ecolife[®], Chrysanthemum Extract, Planta Clean, Mattam Plus, Natural Neem, Supermagro, Calda Sulfocálcica e Bion[®] were tested using in the recommended concentration. To this end, the AP were applied on eggs of the alternative host *Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) before and after parasitism and in different development phases of the parasitoid, being evaluated the number of parasitized eggs, emergence percentage, sexy ratio, egg-adult cycle and longevity. It was observed that the majority of the products were repellent to parasitoid oviposition. Only Calda Sulfocálcica and Chrysanthemum Extract reduced the number of parasitized eggs, when applied before parasitism. None of the AP affected parasitoid emergence and sexual rate. On the other hand, some products altered the cycle egg-adult and adult longevity in both application strategies, with values being lower than one day.

Keywords: Alternative control. Parasitoids eggs. Biological control. Associated control. Alternative agriculture.

4.2 INTRODUÇÃO

Em virtude dos danos ambientais causados pelo uso intensivo, excessivo e inadequado de produtos fitossanitários sintéticos, os sistemas alternativos de produção ganham cada vez mais espaço, focando-se em estratégias como o controle biológico de pragas e doenças e a utilização de produtos fitossanitários alternativos. Além disso, é cada vez mais freqüente a preocupação geral por alimentos mais “limpos” e saudáveis e a busca pela sociedade científica por novas tecnologias que garantam a sustentabilidade agrícola.

Nesse contexto, destacam-se os sistemas alternativos de produção apoiados em princípios de proteção e preservação ambiental, com a oferta de alimentos de melhor qualidade em uma relação socialmente justa entre as pessoas envolvidas no processo produtivo (PRIMAVESI, 1994; GLEISSMAN, 2005).

A utilização de agentes de controle biológico ocorre conjuntamente com os produtos fitossanitários, e no caso dos sistemas alternativos de produção, aos produtos alternativos, como extratos vegetais, óleos essenciais, caldas fertiprotetoras, além de compostos para estabelecimento do equilíbrio nutricional das plantas (GALLO et al., 2002; PENTEADO, 2007).

Vários fatores podem afetar a utilização de *T. pretiosum*, sendo um dos principais a toxicidade dos produtos fitossanitários (MOURA; CARVALHO; RIGITANO, 2005). Estes podem interferir no processo de oviposição tanto na localização, quanto na qualidade do hospedeiro, como alterar coloração e textura dos ovos do hospedeiro (VINSON, 1997), além de repelir ou inibir o comportamento alimentar e reduzir a reprodução e longevidade (DESNEUX; DECOURTYE; DEUPUECH, 2007).

Alguns trabalhos referentes ao efeito de produtos alternativos sobre *T. pretiosum* têm sido realizados com extratos aquosos de nim (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004), com produtos comerciais à base de nim (OLIVEIRA; PRATISSOLI; BUENO, 2003; MORANDI FILHO et al., 2006; KRAEMER, 2007), caldas fertiprotetoras (GRISA, 2005) e com extratos de diversas asteráceas (TAVARES et al., 2009) sobre vários parâmetros biológicos desse parasitóide. Além disso, outros estudos foram desenvolvidos avaliando-se o efeito de *B. thuringiensis* sobre *T. pratissolli* (PRATISSOLI et al., 2006) e *T. pretiosum* (MORANDI FILHO et

al., 2006) e fungos sobre *T. pretiosum* (BROGLIO-MICHELETTI; SANTOS; PEREIRA-BARROS, 2006; POTRICH et al., 2009).

Entretanto, é importante salientar que o efeito dos produtos alternativos sobre organismos benéficos pode variar conforme o organismo, a cultura, dosagens, formas de aplicação, fatores climáticos entre outros, sendo, portanto necessários estudos mais específicos para cada cultura e organismos não alvo associados. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de PA sobre parâmetros biológicos de *T. pretiosum* em condições de laboratório.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os produtos alternativos (PA), bem como sua classificação de uso estão listados na Tabela 4.1. Tais produtos foram obtidos em casas especializadas em insumos para sistemas alternativos de produção, sendo avaliados nas concentrações recomendadas (CR) pelos fabricantes.

Tabela 4.1 – Produtos alternativos e concentrações utilizados nos experimentos.

Produto	Uso	Composição	Conc. (mL 100 ⁻¹)
Biogermex	IR e BIO	Bioflavonóides cítricos (vitamina P), fitoalexinas cítricas, ácido ascórbico (vitamina C), ácido cítrico, polipeptídeos cítricos, ácido palmítico, ácidos graxos diversos, açúcares, glicerídeos e tocoferóis.	200 mL
Bion [®]	IR	acibenzolar-S-metil (ASM)	5g
Calda Sulfocálcica	INS e FUN	Enxofre e cal virgem	800 mL
Ecolife [®]	IR e BIO	Bioflavanóides, fitoalexinas, ácidos ascórbico, láctico e cítrico.	750 mL
Extrato de Crisântemo	INS	Piretrinas e jasmolinas	1000 mL
Matan Plus	INS	Enxofre e nitrogênio	1000 mL
Natural Neem	INS	Óleo emulsificado de sementes, extraído a frio.	500 mL
Planta Clean	FUN	Extratos vegetais, ácidos graxos e sais minerais.	2500 mL
Pironin	INS	Neem (folhas, tortas de sementes e óleo); piretro natural; extrato pirolenhoso de <i>Eucalyptus</i> sp.	600 mL
Supermagro	BIO	Ácido bórico, cloreto de cálcio, molibdato de sódio, sulfato de cobalto, sulfato de cobre, sulfato ferroso, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco.	400 mL

Conc.= concentração

IR= Indutor de resistência; INS= inseticida; FUN= fungicida; BIO= Biofertilizante.

4.3.1 Efeito dos Produtos Alternativos sobre parâmetros biológicos de *Trichogramma pretiosum*

4.3.1.1 Obtenção dos ovos e adultos de *T. pretiosum*

Os ovos esterilizados de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) e o parasitóide *T. pretiosum*, linhagem L2, foram fornecidos pelo Laboratório de Controle Biológico do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *campus* Marechal Cândido Rondon, PR.

4.3.1.2 Preparação dos bioensaios e pulverização dos produtos alternativos

As caldas dos PA foram preparadas em frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de água destilada esterilizada, nas concentrações recomendadas. Paralelamente, foram preparadas cartelas de 5,0 × 1,0 cm, contendo aproximadamente 200 ovos de *A. kuehniella*, esterilizados e não parasitados. Para a pulverização as cartelas foram arranjadas em pares sobre a bancada e com o auxílio de um aerógrafo acoplado a uma bomba de pressão regulada a 1,2 kgf/cm² foram aplicados 200 µL das caldas.

4.3.1.3 Teste com livre chance de escolha

Cada tratamento constou da pulverização de 20 cartelas com água destilada esterilizada e 20 cartelas com as caldas dos PA. As cartelas foram acondicionadas em tubos de vidro (10 cm × 2,5 cm), juntamente com uma fêmea de *T. pretiosum* com 24 h de emergência. Cada tubo (repetição) recebeu uma cartela pulverizada com água destilada esterilizada e uma pulverizada com a calda do PA, totalizando 20 repetições para cada tratamento, conforme Gonçalves-Gervásio; Vendramim (2004). Os tubos foram vedados com filme de PVC e acondicionados em

câmara climatizada por 24 h à temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: $70 \pm 10\%$ e 14 h de fotofase, sendo as fêmeas retiradas em seguida. Para cada tratamento, foi avaliada a preferência de parasitismo entre as cartelas, quantificando-se o número de ovos parasitados, após 96 h.

Os dados foram analisados quanto à variância pelo teste t, não paramétrico, utilizando-se o programa estatístico Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2003).

4.3.1.4 Teste sem chance de escolha – pré-parasitismo

Foram preparadas 20 cartelas com ovos de *A. kuehniella*, esterilizados e não parasitados (repetições) e pulverizadas com as caldas dos PA. Em seguida, as cartelas foram individualizadas em tubos de vidro (10 cm × 2,5 cm), juntamente com uma fêmea de *T. pretiosum* com no máximo 24 h de emergência, sendo as condições de acondicionamento e período de oviposição os mesmos descritos no item 4.3.1.3.

Foram avaliados o número de ovos parasitados, o percentual de emergência, a razão sexual, a duração do ciclo ovo-adulto e a longevidade. Como controle foi pulverizado somente água destilada esterilizada.

4.3.1.5 Teste sem chance de escolha - pós-parasitismo

Fêmeas de *T. pretiosum* com no máximo 24 h de emergência foram individualizadas em tubos de vidro (10 cm × 2,5 cm) com cartelas contendo os ovos esterilizados de *A. kuehniella*, sendo os tubos acondicionados em câmara climatizada nas mesmas condições descritas no item 4.3.1.3. Em seguida as fêmeas foram retiradas e as cartelas pulverizadas com as caldas dos PA, sendo 20 cartelas (repetições) por tratamento. Como controle foi pulverizado somente água destilada esterilizada.

As cartelas foram novamente individualizadas e acondicionadas em câmara climatizada nas mesmas condições descritas no item 4.3.1.3.

Os parâmetros avaliados e análise dos dados foram os mesmos descritos no item 4.3.1.4.

Para ambos os itens 4.3.1.4 e 4.3.1.5 os dados foram analisados quanto a variância pelo teste Kruskal Wallis, não paramétrico e as médias comparadas entre si pelo teste Student-Newman-Keuls, utilizando-se o programa Bioestat 5.0[®] (AYRES et al., 2003).

Para a comparação das médias entre os bioensaios do pré e o pós-parasitismo foi utilizado o teste de Mann Whitney (teste U), não paramétrico utilizando-se o programa Bioestat 5.0[®] (AYRES et al., 2003).

4.3.1.6 Efeito dos produtos alternativos sobre o desenvolvimento de *T. pretiosum*

O mesmo procedimento descrito no item 3.1.1.5 foi utilizado, porém com as cartelas foram pulverizadas com as caldas dos PA nos tempos de 24, 72, 144 e 168 h após o parasitismo, correspondendo às fases de ovo-larva, pré-pupa, pupa e emergência do parasitóide (CÔNSOLI; PARRA; HASSAN, 1998), utilizando-se para cada tempo 20 cartelas. Para a testemunha, foi pulverizada somente água destilada esterilizada. Foram avaliados os mesmos parâmetros descritos no item 4.3.1.4.

Dentro de cada tempo, os dados foram analisados quanto à variância pelo teste Kruskal Wallis, não paramétrico e as médias comparadas entre si pelo teste Student-Newman-Keuls, utilizando-se o programa Bioestat 5.0[®] (AYRES et al., 2003).

Para a comparação das médias entre os tempos foi utilizado o teste de Mann Whitney (teste U) não paramétrico, utilizando-se o programa Bioestat 5.0[®] (AYRES et al., 2003).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Teste com Livre Chance de Escolha

A maioria dos PA não causou repelência na oviposição de *T. pretiosum*, exceto, Pironin, Supermagro e Ecolife[®] que não diferiram significativamente da testemunha (Tabela 4.2).

Supermagro é um biofertilizante enriquecido com micronutrientes, sendo um dos fertilizantes foliares mais utilizados na cultura de hortaliças (PENTEADO, 2007). Os biofertilizantes possuem compostos bioativos resultantes da biodigestão de compostos orgânicos de origem animal e vegetal, como microrganismos, metabólitos e quelatos organominerais (MEDEIROS; WANDERLEY; WANDERLEY, 2003). Estes agem como promotores de crescimento nutricional e como elicitores na indução de resistência sistêmica da planta, podendo também proteger a planta contra o ataque de doenças, por antibiose, e contra o ataque de pragas por ação repelente, fagoterrente ou afetar o seu desenvolvimento e reprodução (MEDEIROS; WANDERLEY, 2003; PENTEADO, 2007).

Embora seja relatado o efeito repelente de biofertilizantes sobre pragas, o mesmo não foi observado neste estudo para *T. pretiosum*. Da mesma forma, em avaliações de campo não foi verificado efeito do Supermagro para broca pequena do fruto do tomateiro *Neuleucinodes elegantalis* em tomate (NUNES; LEAL, 2001) e o ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* em pimenta (VENZON et al., 2006).

Pironin é um inseticida natural, composto por nim, rotenona, piretro natural e extrato pirolenhoso de eucalipto, atuando na repelência, inanição alimentar, interferência no controle hormonal e sistema reprodutivo (ALMEIDA – informação verbal)⁷. Por sua vez, Ecolife[®] é um produto composto por bioflavonóides, fitoalexinas cítricas e ácido ascórbico, que é empregado como biofertilizante e indutor de resistência (BOLETIN TÉCNICO), com composição semelhante a do Biogermex, que apresentou repelência significativa (Tabela 4.2).

⁷ Leandro de Almeida. leandro.biofarm@hotmail.com. BIOFARMCOMÉRCIO DE PRODUTOS ORGÂNICOS LTDA. Rua Voluntários de São Paulo, 3553. São José do Rio Preto – SP

No caso do Ecolife[®] os resultados podem estar relacionados à formulação do produto, cujos componentes não apresentam efeito direto sobre *T. pretiosum*. Já para Supermagro e Pironin, embora tenham ação de repelência sobre os insetos, os resultados podem estar associados à concentração utilizada, que não foi suficiente para repelir *T. pretiosum* ou então ter causado alteração na sensibilidade olfativa do parasitóide na localização do hospedeiro, uma vez que os dois produtos possuem um forte odor, e na condição de avaliação não houve circulação de ar.

Sabe-se que para a localização e o reconhecimento do hospedeiro a curtas distâncias estão envolvidos estímulos visuais e olfativos (caïromônios) (VINSON, 1997), enquanto que a aceitação do hospedeiro está condicionada a estímulos visuais e gustativos (FATOUROS et al., 2005). Além disso, a possibilidade da alteração na sensibilidade olfativa pode ser reforçada pelo fato de no teste sem chance de escolha não ter havido redução significativa na oviposição em relação à testemunha (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 – Preferência de parasitismo (\pm EP) de *T. pretiosum* em ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, ou água destilada esterilizada pré parasitismo. Teste com livre chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$; fotofase: 14 h.

Tratamento	% de ovos parasitados	Tratamento	% de ovos parasitados
Testemunha	62,6 \pm 9,63a	Testemunha	84.8 \pm 7,25a
Pironin	37,4 \pm 9,63a	Planta Clean	15.2 \pm 7,25b
p	0, 2659	p	0, 0048
Testemunha	81,7 \pm 5,15a	Testemunha	90.2 \pm 5,30a
Extrato Crisântemo	18,3 \pm 5,15b	Mattam Plus	9.8 \pm 5,30b
p	0, 0007	p	0, 0010
Testemunha	78,2 \pm 8,74a	Testemunha	82.3 \pm 7,13a
Natural Neem	21,8 \pm 8,74b	Bion [®]	17.7 \pm 7,13b
p	0, 0231	p	0, 0084
Testemunha	70,6 \pm 12,20a	Testemunha	61,7 \pm 10,78a
Supermagro	29,4 \pm 12,20a	Ecolife [®]	38,3 \pm 10,78a
p	0, 3216	p	0, 3464
Testemunha	98,4 \pm 1,58a	Testemunha	79,8 \pm 7,44a
Calda Sulfocálcica	1,6 \pm 1,58b	Biogermex	20,2 \pm 7,44b
p	0, 0251	p	0, 0051

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t pareado ($p < 0,05$).

Da mesma forma, pode-se inferir que o efeito repelente observado para os demais produtos, exceto para Calda Sulfocálcica e extrato de Crisântemo, pode estar relacionado à sensibilidade olfativa, pois no teste sem chance de escolha o número de ovos parasitados não diferiu significativamente da testemunha (Tabela 4.3).

O efeito repelente de nim sobre *T. pretiosum* também foi verificado por Gonçalves-Gervásio; Vendramim (2004). No teste com chance de escolha os autores verificaram que o extrato aquoso de sementes de nim (10%) repeliu em 76,5% a oviposição, comparando-se com a testemunha - percentual semelhante ao observado neste estudo (Tabela 4.2).

A Calda Sulfocálcica foi o produto que causou a maior repelência a *T. pretiosum*, com 98,4% da oviposição ocorrendo nos ovos tratados somente com água (Tabela 4.2). Esta calda consiste de uma mistura de polissulfetos de cálcio, resultante de uma reação de auto-oxidação do enxofre na mistura com cálcio (GALLO et al., 2002). Os resultados observados podem estar relacionados à alteração ocasionada na coloração e provavelmente na textura dos ovos, uma vez que após a aplicação do produto, os ovos adquiriram coloração amarelo escuro com algumas regiões esbranquiçadas devido à precipitação do cálcio.

Tais características dos ovos podem ter interferido na identificação do hospedeiro pelo estímulo visual, pois de acordo com Lobdell; Yong; Hoffmann, (2005) a coloração do ovo é um dos fatores condicionantes da aceitação do hospedeiro. Os autores ainda salientam que a rejeição da oviposição em ovos de coloração escura esta relacionada a uma adaptação evolutiva, uma vez que ovos já parasitados ou mais velhos apresentam tal coloração.

4.4.2 Teste sem Chance de Escolha – Pré e Pós-Parasitismo

Quando as fêmeas de *T. pretiosum* foram confinadas com os ovos tratados com os PA (pré-parasitismo), verificou-se que somente o extrato de Crisântemo e a Calda Sulfocálcica reduziram significativamente o número de ovos parasitados em relação à testemunha. Por sua vez, no pós-parasitismo, nenhum tratamento diferiu da testemunha, indicando não haver efeito ovicida destes produtos, neste estudo, pois não impediram a formação da pupa (Tabela 4.3).

Para o extrato de Crisântemo, no pré-parasitismo, a redução no número de ovos parasitados, provavelmente, tenha ocorrido devido efeito repelente do inseticida, sem, no entanto, inviabilizar os ovos, uma vez que se verificou uma média de 16,2 ovos parasitados.

Entretanto, para Calda Sulfocálcica, a média de ovos parasitados foi de 0,7, indicando que a alteração no ovo hospedeiro pode ter impedido a oviposição de *T. pretiosum* (Tabela 4.3). Resultados semelhantes foram verificados por Grisa (2005) com produtos à base de enxofre, incluindo-se a Calda Sulfocálcica e, também por Kraemer (2007) com o extrato de Crisântemo, ambos avaliando apenas pré-

parasitismo. Além disso, Grisa (2005) verificou o efeito residual da Calda Sulfocálcica e enxofre elementar que causaram redução do parasitismo até 72 h após a aplicação.

O efeito do piretro natural sobre o parasitismo de *T. pretiosum* também foi observado por Morandi Filho et al. (2006), utilizando metodologia padronizada pela IOBC/WPRS (International Organization for Biological Control and Integrated of Noxious Animals/ West Palaearctic Regional Section), na qual os adultos do parasitóide entram em contato com resíduos em outra superfície e não na superfície dos ovos do hospedeiro. No referido estudo verificaram redução de 98,6% e 100% no parasitismo, para as respectivas dosagens de 250 mL e 500 mL/100L⁻¹, diferindo significativamente da testemunha.

Tabela 4.3 – Número de ovos (\pm EP) de *A. kuehniella* parasitados por *T. pretiosum* quando tratados com produtos alternativos, nas CR, ou água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem livre chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$; fotofase: 14 h.

Número de ovos parasitados			
Tratamentos	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	p
Testemunha	27,5 \pm 1,98Aa	26,8 \pm 2,57Aa	0, 8079
Pironin	18,9 \pm 2,86Ba	31,7 \pm 2,66Aa	0, 0006
Extrato de Crisântemo	16,2 \pm 2,36Bb	29,8 \pm 4,10Aa	0, 0016
Natural Neem	23,6 \pm 3,30Aa	24,6 \pm 2,10Aa	0, 6504
p	0, 0315	0, 0088	
Testemunha	23,6 \pm 0,93Aa	22,0 \pm 1,73Aa	0, 0728
Planta Clean	17,5 \pm 2,70Aa	20,7 \pm 2,40Aa	0, 8237
Mattam Plus	21,0 \pm 2,02Aa	22,0 \pm 1,59Aa	0, 5741
Bion [®]	22,5 \pm 2,00Aa	22,9 \pm 2,06Aa	0, 8441
p	0, 4258	0, 3995	
Testemunha	19,2 \pm 2,28Aa	20,8 \pm 3,09Aa	0, 5340
Ecolife [®]	17,6 \pm 2,16Ba	27,0 \pm 3,89Aa	0, 0253
Calda Sulfocálcica	0,7 \pm 0,36Bb	27,4 \pm 2,10Aa	0, 0001
p	0, 0001	0, 2018	
Testemunha	28,1 \pm 3,11Aa	27,5 \pm 2,55Aa	0, 7764
Supermagro	26,4 \pm 3,72Aa	29,9 \pm 3,79Aa	0, 9471
Biogermex	24,7 \pm 3,45Aa	28,2 \pm 2,24Aa	0, 5885
p	0, 8802	0, 1015	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney (teste U) ($p < 0,05$).

Com relação ao produto a base de nim, observou-se que não houve diferença significativa no número de ovos parasitados (Tabela 4.3) e no percentual de adultos emergidos (Tabela 4.4).

Tais resultados são semelhantes aos verificados por Oliveira; Pratisoli; Bueno, (2003) para o óleo de nim emulsionável em diferentes concentrações. Da mesma forma, não foi verificado redução no número de ovos

parasitados por *T. pretiosum*, no pré-parasitismo, para óleo de nim e extrato pirolenhoso (MORANDI FILHO et al., 2006). Por outro lado, em experimento com meliáceas, o tratamento com extrato aquoso de sementes de nim (10%) reduziu significativamente o número de ovos parasitados e a emergência de adultos, comparados às respectivas testemunhas (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004). Com referência ao poder residual de nim, observou-se que na segunda geração de adultos de *Trichogramma galloi* em ovos de *Diatraea saccharalis*, a capacidade de parasitismo dos adultos emergidos desses tratamentos foi totalmente reduzida, quando os ovos foram tratados com diferentes concentrações (0,33%, 0,53% e 1%) de óleo emulsionável de nim 24 h após o parasitismo (BROGLIO-MICHELETTI; SANTOS; PEREIRA-BARROS, 2006).

A variação observada nos resultados dos diferentes trabalhos com nim pode estar relacionada ao tipo de produto (extratos ou óleos emulsionáveis), às diferentes formulações e ou concentrações, evidenciando a necessidade de estudos específicos para cada cultura e praga, e conseqüentemente sobre os inimigos naturais a elas associados.

Com relação ao percentual de adultos emergidos nenhum PA afetou tal parâmetro biológico, tanto no pré quanto no pós-parasitismo (Tabela 4.4), comprovando que os referidos PA não possuem efeito ovicida.

Tabela 4.4 – Porcentagem média (\pm EP) de adultos de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	Percentual de emergência ¹		
	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	p
Testemunha	97,9 \pm 5,60Aa	97,9 \pm 5,45Aa	0, 9418
Pironin	81,9 \pm 10,41Aa	87,8 \pm 7,05Aa	0, 3661
Extrato de Crisântemo	95,7 \pm 14,34Aa	92,4 \pm 12,38Aa	0, 1827
Natural Neem	77,4 \pm 11,39Aa	92,3 \pm 6,81Aa	0, 7586
p	0, 1515	0, 1163	
Testemunha	92,1 \pm 7,74Aa	88,3 \pm 3,73Aa	0, 3949
Planta Clean	82,4 \pm 7,22Aa	80,9 \pm 5,12Aa	0, 5800
Mattam Plus	84,6 \pm 6,08Aa	87,6 \pm 5,67Aa	0, 7815
Bion [®]	88,9 \pm 3,90Aa	87,8 \pm 2,90Aa	0, 4478
p	0, 6671	0, 5500	
Testemunha	90,6 \pm 9,62Aa	83,3 \pm 10,09Aa	0, 1331
Ecolife [®]	71,7 \pm 8,48Aa	62,9 \pm 9,35Aa	0, 3681
Calda Sulfocálcica	83,3 \pm 18,44Aa	67,2 \pm 5,63Aa	0, 8769
p	0, 2450	0, 7584	
Testemunha	70,9 \pm 3,71Aa	76,3 \pm 2,62Aa	0, 3581
Supermagro	59,5 \pm 8,75Aa	57,3 \pm 7,10Aa	0, 4624
Biogermex	55,2 \pm 7,83Aa	68,8 \pm 6,96Aa	0, 1539
p	0, 4056	0, 0606	

¹Porcentagem média de emergência, obtida pela fórmula: $P_e = \frac{T_e}{T_o} \times 100$, onde P_e = Porcentagem de emergência, T_e = Total de emergidos, T_o = Total de ovos parasitados.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney (teste U) ($p < 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Os resultados sugerem que a ação dos PA ocorre sobre o comportamento das fêmeas de *T. pretiosum*, impedindo ou não a oviposição. Porém, uma vez ocorrida a oviposição (pré-parasitismo) ou os PA sendo aplicados no pós-parasitismo, o desenvolvimento do parasitóide não é afetado. Isto pode ser evidenciado no tratamento com Calda Sulfocálcica e extrato de crisântemo, cujas

médias de ovos parasitados foram respectivamente de 0,7 e 16,1, com respectivas emergências de 83,3% e 95,7% (Tabela 4.3).

Em estudo sobre o efeito de diferentes produtos sintéticos sobre *Trichogramma atopovirilla* também não foi verificado efeito ovicida do enxofre nas diferentes fases do desenvolvimento do parasitóide, com emergência superior a 90% (GIOLO et al., 2008). Da mesma forma, resultados semelhantes para a emergência de *T. pretiosum* foram observados por Kraemer (2007) para extratos de alho (*Allium sativum*), capim limão (*Cymbopogon citratus*), cúrcuma (*Curcuma longa*), crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*), Pironim e Planta Clean.

No que se refere à razão sexual, nenhum PA afetou significativamente este parâmetro dentro e entre os testes (pré e pós-parasitismo) (Tabela 4.5) discordando do observado por Grisa (2005) para Calda Sulfocálcica, comparada à testemunha.

A razão sexual pode ser determinada em função da qualidade do hospedeiro, uma vez que para o desenvolvimento das fêmeas são necessários ovos com mais recursos nutricionais. Assim, as fêmeas podem definir o sexo da progênie antes da oviposição, dependendo da qualidade do hospedeiro, ou ovipositar um macho e uma fêmea, que competirão entre si (VINSON, 1997).

Embora não sejam relatados estudos sobre o efeito de PA sobre a razão sexual de parasitóides, alguns trabalhos foram realizados com microrganismos entomopatogênicos. Nesse sentido, Pratissoli et al. (2006) avaliaram o inseticida à base de *B. thuringiensis* sobre *T. pratissolii* e verificaram razão sexual superior a 0,50. Da mesma forma obteve-se razão sexual de 0,81 para *T. atopovirilla* emergidos de ovos tratados com o fungo *Lecanicilium lecanii* (DALVI et al., 2007) e acima de 0,68 para ovos tratados com *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no pré e pós-parasitismo (POTRICH et al., 2009).

Tabela 4.5 – Razão sexual (\pm EP) de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	Razão sexual		
	Pré-parasitismo	Pós-parasitismo	p
Testemunha	0,64 \pm 0,02Aa	0,57 \pm 0,06Aa	0, 2300
Pironin	0,56 \pm 0,05Aa	0,55 \pm 0,06Aa	0, 7518
Extrato de Crisântemo	0,65 \pm 0,06Aa	0,67 \pm 0,09Aa	0, 5704
Natural Neem	0,59 \pm 0,05Aa	0,47 \pm 0,07Aa	0, 1625
p	0, 1501	0, 2411	
Testemunha	0,73 \pm 0,03Aa	0,64 \pm 0,04Aa	0, 2339
Planta Clean	0,61 \pm 0,06Aa	0,58 \pm 0,06Aa	0, 8345
Mattam Plus	0,65 \pm 0,05Aa	0,63 \pm 0,03Aa	0, 4794
Bion [®]	0,70 \pm 0,03Aa	0,62 \pm 0,04Aa	0, 1763
p	0, 4973	0, 9121	
Testemunha	0,64 \pm 0,06Aa	0,61 \pm 0,05Aa	0, 3238
Ecolife [®]	0,73 \pm 0,04Aa	0,65 \pm 0,05Aa	0, 2690
Calda Sulfocálcica	1,0 \pm 0,00a	0,79 \pm 0,14a	*
p	0, 0548	0, 2775	
Testemunha	0,61 \pm 0,04Aa	0,57 \pm 0,04Aa	0, 4615
Supermagro	0,64 \pm 0,05Aa	0,57 \pm 0,03Aa	0, 4070
Biogermex	0,64 \pm 0,06Aa	0,59 \pm 0,04Aa	0, 2248
p	0, 7221	0, 8300	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney (teste U) ($p < 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

* Não foi possível a análise estatística devido ao número insuficiente de repetições.

De acordo com Navarro (apud PRATISSOLI et al., 2006) a razão sexual mínima para *T. pretiosum* deve ser superior a 0,50, para a adequada manutenção da população em campo. Nesse sentido, os resultados são considerados satisfatórios para a maioria dos tratamentos, uma vez que a razão sexual variou de 0,55 (Pironin – pós-parasitismo) a 0,73 (Ecolife[®] - pré-parasitismo),

exceto para nim no pós-parasitismo (0,47) e Calda Sulfocálcica com valores de 1,00 e 0,79 no pré e pós- parasitismo respectivamente (Tabela 4.5).

Tanto a razão sexual elevada, quanto demasiadamente baixa poderiam ser prejudiciais para a manutenção da população em campo. No primeiro caso haveria o excesso de fêmeas que levaria ao aumento da reprodução por partenogênese (arrenótoca), aumentando o número de machos na população seguinte. Já a baixa razão sexual diminuiria o número de fêmeas, sendo que em ambos os casos haveria redução do parasitismo.

Excetuando-se os produtos Pironin, extrato de Crisântemo, Planta Clean, Mattam Plus e Calda Sulfocálcica, os demais não alteraram o ciclo ovo-adulto. Verificou-se redução do ciclo de machos e fêmeas emergidas de ovos tratados com Mattam Plus tanto no pré, como no pós-parasitismo, e no ciclo de machos com Calda Sulfocálcica, no pós-parasitismo, enquanto que houve aumento no ciclo para machos e fêmeas emergidos de ovos tratados com Pironin no pós-parasitismo (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Ciclo ovo-adulto em dias (\pm EP) de fêmeas e machos de *T. pretiosum* criados em ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada no pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	Ciclo ovo-adulto fêmeas			Ciclo ovo-adulto machos		
	Pré	Pós	P	Pré	Pós	p
Testemunha	7,5 \pm 0,59Aa	7,9 \pm 0,12Ab	0, 8792	7,8 \pm 0,51Aa	8,1 \pm 0,07Ab	0, 6441
Pironin	8,3 \pm 0,13Aa	8,6 \pm 0,11Aa	0, 1489	8,5 \pm 0,14Aa	8,6 \pm 0,10Aa	0, 4268
Extrato. de Crisântemo	8,2 \pm 0,09Aa	8,0 \pm 0,01Bb	0, 0015	8,4 \pm 0,14Aa	8,0 \pm 0,07Ab	0, 0500
Natural Neem	8,1 \pm 0,16Aa	7,9 \pm 0,10Ab	0, 7003	8,3 \pm 0,18Aa	8,0 \pm 0,11Ab	0, 2482
p	0, 1836	0, 0013		0, 4371	0, 0014	
Testemunha	8,0 \pm 0,12Aa	7,9 \pm 0,09Aa	0, 2875	7,9 \pm 0,08Aa	7,9 \pm 0,12Aa	0, 8065
Planta Clean	7,7 \pm 0,07Bab	8,1 \pm 0,11Aa	0, 0081	7,9 \pm 0,12Aa	8,1 \pm 0,13Aa	0, 1530
Mattam Plus	7,4 \pm 0,09Bb	7,8 \pm 0,12Aa	0, 0258	7,4 \pm 0,10Ab	7,4 \pm 0,20Ba	0, 0080
Bion [®]	7,9 \pm 0,10Aa	7,9 \pm 0,11Aa	0, 9699	7,9 \pm 0,09Aa	8,2 \pm 0,07Aa	0, 0963
p	0, 0045	0, 2952		0, 0072	0, 2456	
Testemunha	8,9 \pm 0,14Aa	8,7 \pm 0,09Aa	0, 2936	8,7 \pm 0,23Aa	8,7 \pm 0,15Aa	0, 4134
Ecolife [®]	8,8 \pm 0,28Aa	8,9 \pm 0,15Aa	0, 9097	9,3 \pm 0,23Aa	9,2 \pm 0,22Aa	0, 3913
Calda Sulfocálcica	9,5 \pm 0,5 ^a	8,8 \pm 0,13a	*	7,0 \pm 0,00b	8,7 \pm 0,13a	*
p	0, 4128	0, 7302		0, 0065	0, 3172	
Testemunha	8,0 \pm 0,12 Aab	7,9Aa \pm 0,09	0, 4705	7,9 \pm 0,10Aab	7,7 \pm 0,09Aa	0, 1237
Supermagro	7,9 \pm 0,07Ab	7,9 \pm 0,20Aa	0, 9292	7,7 \pm 0,08Ab	7,7 \pm 0,12Aa	0, 9616
Biogermex	8,2 \pm 0,11Aa	7,9 \pm 0,08Aa	0, 2697	8,3 \pm 0,17Aa	8,0 \pm 0,15Aa	0, 0922
p	0, 0106	0, 8751		0, 0106	0, 2107	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney (teste U) ($p < 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

* Não foi possível a análise estatística devido ao número insuficiente de repetições.

Essa variação no desenvolvimento pode estar relacionada ao comprometimento da qualidade do hospedeiro com a aplicação dos referidos PA. Pois segundo Vinson (1997), o desenvolvimento do parasitóide pode ser acelerado ou retardado, dependendo da qualidade do hospedeiro. Além disso, quando comparadas as duas estratégias de aplicação, para fêmeas, verificou-se aumento da duração do ciclo no pré-parasitismo, no tratamento extrato de Crisântemo e redução para Planta Clean e Mattam Plus e para machos, no pré-parasitismo, houve aumento no tratamento Mattam Plus (Tabela 4.6).

Embora tenha ocorrido essa variação significativa, os resultados demonstram alteração de apenas algumas horas no ciclo, o que provavelmente não comprometeria a manutenção da população em campo. Tal diferença pode estar relacionada ao tempo de seleção do ovo para o parasitismo em função da presença dos produtos.

Resultados semelhantes foram observados para o parâmetro longevidade, sendo que para maioria dos tratamentos, em ambas as estratégias de aplicação, não se verificou diferença significativa. Para fêmeas, houve redução da longevidade somente para extrato de Crisântemo, nim e Calda Sulfocálcica, no pré-parasitismo e, para machos, redução no pré-parasitismo com Calda Sulfocálcica (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 – Longevidade em dias (\pm EP) de adultos (fêmeas e machos) de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada pré e pós-parasitismo. Teste sem chance de escolha. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	Longevidade fêmea			Longevidade macho		
	Pré	Pós	p	Pré	Pós	p
Testemunha	1,4 \pm 0,10Aa	1,4 \pm 0,08Ab	0, 6242	1,6 \pm 0,16Aa	1,5 \pm 0,07Aa	0, 8590
Pironin	1,4 \pm 0,07Aa	1,4 \pm 0,11Ab	0, 4875	1,5 \pm 0,10Aa	1,4 \pm 0,07Ab	0, 6441
Extrato de Crisântemo	1,5 \pm 0,08Aa	1,6 \pm 0,04Bb	0, 0222	1,6 \pm 0,09Aa	1,6 \pm 0,06Aa	0, 6242
Natural Neem	1,6 \pm 0,06Ba	1,9 \pm 0,05Aa	0, 0081	1,5 \pm 0,08Aa	1,8 \pm 0,05Aa	0, 0041
p	0, 0950	0, 0015		0, 9065	0, 0005	
Testemunha	1,61 \pm 0,06Aa	1,54 \pm 0,08Aa	0, 4039	1,4 \pm 0,15Aa	1,6 \pm 0,09Aa	0, 3823
Planta Clean	1,73 \pm 0,06Aa	1,50 \pm 0,11Aa	0, 1309	1,7 \pm 0,08Aa	1,8 \pm 0,06Aa	0, 2100
Mattam Plus	1,49 \pm 0,10Aa	1,57 \pm 0,09Aa	0, 7324	1,5 \pm 0,12Aa	1,7 \pm 0,07Aa	0, 2751
Bion [®]	1,49 \pm 0,04Aa	1,50 \pm 0,09Aa	0, 8798	1,5 \pm 0,07Aa	1,7 \pm 0,05Aa	0, 0312
p	0, 0810	0, 9260		0, 7161	0, 5145	
Testemunha	1,9 \pm 0,08Aab	2,2 \pm 0,12Aa	0, 0587	2,5 \pm 0,13Aa	2,3 \pm 0,11Aa	0, 6304
Ecolife [®]	2,2 \pm 0,11Aa	2,0 \pm 0,11Aa	0, 0963	2,4 \pm 0,18Aa	2,0 \pm 0,15Aa	0, 1914
Calda Sulfocálcica	1,2 \pm 0,22Bb	2,2 \pm 0,05Aa	0, 0061	1,5 \pm 0,50Ba	2,1 \pm 0,14Aa	0, 2029
p	0, 0111	0, 0970		0, 2097	0, 2679	
Testemunha	1,9 \pm 0,06Ab	2,2 \pm 0,13Aa	0, 0890	2,0 \pm 0,09Aa	2,1 \pm 0,09Aa	0, 3643
Supermagro	1,7 \pm 0,08Ab	2,3 \pm 0,15Aa	0, 0034	2,2 \pm 0,07Aa	2,4 \pm 0,15Aa	0, 2207
Biogermex	2,2 \pm 0,06Aa	2,0 \pm 0,12Aa	0, 1736	2,3 \pm 0,09Aa	1,9 \pm 0,16Aa	0, 1208
p	0, 0003	0, 2938		0, 1107	0, 1587	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Mann Whitney (teste U) ($p < 0,05$).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

4.4.3 Efeito dos Produtos Alternativos sobre o Desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum*

Quando os produtos foram aplicados em diferentes fases do desenvolvimento de *T. pretiosum* não houve redução do percentual de emergência para a maioria dos PA, exceto para Planta Clean e Calda Sulfocálcica na fase de emergência, corroborando Kraemer (2007) para emergência de ovos tratados com Planta Clean. Esse efeito negativo no estágio de emergência pode ser atribuído a maior quantidade de resíduo, com efeito inseticida nesse tratamento. Contudo, é importante salientar que não houve diferença significativa entre as diferentes fases do desenvolvimento (Tabela 4.8).

Resultados diferentes foram obtidos com extrato de nim (10%), com redução de 70,1% no número de ovos escurecidos, no pós-parasitismo, evidenciando que o nim penetrou no ovo do hospedeiro, matando a larva do parasitóide (GONÇALVES-GERVÁSIO; VENDRAMIM, 2004). Além disso, os autores verificaram redução de 36,7 %, 39,7 % e 65 % na emergência dos ovos tratados com o extrato de nim, nos respectivos tempos de 24, 72 e 168 h.

Tabela 4.8 – Porcentagem (\pm EP) de adultos de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes etapas do desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	24 h (ovo-larva)	72 h (pré- pupa)	144 h (pupa)	168 h (emergência)	p
Testemunha	87,6 \pm 4,07Aa	92,4 \pm 2,58Aa	72,5 \pm 8,58Aa	91,6 \pm 3,79Aa	0,4567
Ecolife [®]	78,8 \pm 5,44Aa	89,9 \pm 7,79Aa	58,3 \pm 7,04Aa	85,1 \pm 4,30Aa	0,0527
Mattam Plus	72,9 \pm 6,87Aa	87,9 \pm 4,35Aa	83,9 \pm 6,03Aa	86,2 \pm 4,02Aa	0,3335
Bion [®]	95,4 \pm 2,57Aa	74,1 \pm 10,67ABa	70,1 \pm 6,59Ba	90,6 \pm 5,53Aa	0,0432
Biogermex	78,5 \pm 9,33Aa	90,6 \pm 5,70Aa	69,9 \pm 10,96Aa	95,3 \pm 3,38Aa	0,2765
Supermagro	74,4 \pm 13,01Aa	96,9 \pm 4,14Aa	75,6 \pm 9,06Aa	77,5 \pm 7,87Aa	0,1294
Natural Neem	64,8 \pm 7,29Aa	77,9 \pm 12,77Aa	57,0 \pm 14,72Aa	70,9 \pm 14,80Aa	0,4114
p	0,0781	0,6073	0,5227	0,2902	
Testemunha	91,7 \pm 4,54Aa	90,3 \pm 4,18Aa	88,9 \pm 6,56Aa	97,7 \pm 1,69Aa	0,4252
Planta Clean	96,9 \pm 6,49Aa	83,6 \pm 4,13Aa	93,2 \pm 3,62Aa	81,9 \pm 6,08Ab	0,2004
Calda Sulfocálcica	90,8 \pm 4,40Aa	95,0 \pm 6,02Aa	76,1 \pm 6,15Aa	80,8 \pm 7,80Ab	0,0668
Extrato de Crisântemo	92,2 \pm 4,09Aa	90,5 \pm 9,87Aa	77,3 \pm 8,48Aa	94,7 \pm 0,95Aab	0,4180
Pironin	87,1 \pm 5,29Aa	97,9 \pm 5,55Aa	84,8 \pm 8,39Aa	97,3 \pm 1,83Aa	0,3348
p	0,8725	0,4157	0,2457	0,0198	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

O efeito nos diferentes estágios imaturos pode variar conforme as propriedades dos produtos, como toxicidade, persistência, concentração utilizada além da espécie do parasitóide. Nesse sentido, em experimentos com inseticidas tem-se verificado grande variação nos resultados sobre estágios imaturos de parasitóides de ovos, com maior suscetibilidade no estágio de pupa para *Trissolcus basalís* e no estágio de larva para *T. pretiosum* (FOERSTER, 2002).

Ainda, com relação ao efeito de inseticidas reguladores de crescimento sobre as diferentes fases do desenvolvimento de *T. pretiosum*, clorfenapir, imidaclopride, acetamipride, tiaclopride e tiametoxam foram mais tóxicos nos estágios de pré-pupa e pupa (MOURA; CARVALHO; RIGITANO, 2005). Por outro lado, em estudo com outros grupos de inseticidas observou-se que a fase de pupa foi a mais tolerante aos 18 produtos testados (CARVALHO; PARRA; BAPTISTA, 2003).

Para os demais parâmetros, verificou-se que no geral, os PA não alteraram a razão sexual, ciclo ovo-adulto e longevidade nos ovos tratados em diferentes fases do desenvolvimento (Tabela 4.9; 4.10 e 4.11), exceto Planta Clean que reduziu a longevidade de fêmeas, quando aplicado no estágio de pupa (Tabela 4.11).

Tabela 4.9 – Razão sexual (\pm EP) de adultos de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes etapas do desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	24 h (ovo-larva)	72 h (pré-pupa)	144 h (pupa)	168 h (emrgência)	p
Testemunha	0,64 \pm 0,05Aab	0,56 \pm 0,08Aa	0,56 \pm 0,08Aa	0,59 \pm 0,07Aa	0, 5297
Ecolife [®]	0,76 \pm 0,04Aa	0,76 \pm 0,04Aa	0,69 \pm 0,07Aa	0,71 \pm 0,04Aa	0, 9475
Mattam Plus	0,55 \pm 0,06Aab	0,69 \pm 0,06Aa	0,56 \pm 0,12Aa	0,67 \pm 0,03Aa	0, 5704
Bion [®]	0,53 \pm 0,05Aab	0,61 \pm 0,08Aa	0,67 \pm 0,04Aa	0,71 \pm 0,04Aa	0, 1066
Biogermex	0,53 \pm 0,06Ab	0,59 \pm 0,08Aa	0,66 \pm 0,07Aa	0,63 \pm 0,10Aa	0, 6547
Supermagro	0,72 \pm 0,03Aab	0,64 \pm 0,04Aa	0,64 \pm 0,05Aa	0,60 \pm 0,07Aa	0, 2772
Natural Neem	0,57 \pm 0,05Aab	0,65 \pm 0,03Aa	0,60 \pm 0,10Aa	0,69 \pm 0,06Aa	0, 3978
p	0, 0081	0, 4778	0, 7566	0, 4937	
Testemunha	0,68 \pm 0,04Aa	0,65 \pm 0,05Aa	0,69 \pm 0,10Aa	0,63 \pm 0,04Aa	0, 5790
Planta Clean	0,69 \pm 0,05Aa	0,67 \pm 0,04Aa	0,59 \pm 0,07Aa	0,54 \pm 0,06Aa	0, 1567
Calda Sulfocálcica	0,67 \pm 0,03Aa	0,65 \pm 0,03Aa	0,66 \pm 0,07Aa	0,57 \pm 0,07Aa	0, 5810
Extrato.de Crisântemo	0,48 \pm 0,10Aa	0,62 \pm 0,08Aa	0,55 \pm 0,11Aa	0,52 \pm 0,09Aa	0, 7927
Pironin	0,55 \pm 0,08Aa	0,67 \pm 0,04Aa	0,43 \pm 0,10Aa	0,55 \pm 0,05Aa	0, 2093
p	0, 2335	0, 8840	0, 2014	0, 8710	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 4.10 – Ciclo ovo-adulto em dias (\pm EP) de fêmeas e machos de *T. pretiosum* em ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes etapas do desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	Ciclo ovo-adulto fêmeas				
	24 h (ovo-larva)	72 h (pré-pupa)	144 h (pupa)	168 h (emergência)	p
Testemunha	9,1 \pm 0,29Aa	8,5 \pm 0,07Aa	8,7 \pm 0,11Aa	8,5 \pm 0,24Aab	0, 1693
Ecolife [®]	9,0 \pm 0,32Aa	8,7 \pm 0,39Aa	8,0 \pm 0,13Aa	8,6 \pm 0,44Aa	0, 0626
Mattam Plus	8,8 \pm 0,21Aa	8,6 \pm 0,17Aa	8,6 \pm 0,26Aa	8,6 \pm 0,08Aa	0, 6280
Bion	8,2 \pm 0,30Aa	8,8 \pm 0,34Aa	8,3 \pm 0,31Aa	8,7 \pm 0,22Aa	0, 4335
Biogermex	7,9 \pm 0,31Aa	8,5 \pm 0,12Aa	8,7 \pm 0,12Aa	8,3 \pm 0,22Aab	0, 1899
Supermagro	8,7 \pm 0,16Aa	8,8 \pm 0,06Aa	8,6 \pm 0,13Aa	7,8 \pm 0,10Bb	0, 0095
Natural Neem	8,8 \pm 0,22Aa	8,4 \pm 0,13Aa	9,0 \pm 0,02Aa	8,3 \pm 0,19Aab	0, 1280
p	0, 1022	0, 6503	0, 0747	0, 0096	
Testemunha	7,7 \pm 0,35Aa	7,6 \pm 0,42Aa	7,9 \pm 0,33Aa	7,2 \pm 0,09Aa	0, 7044
Planta Clean	7,0 \pm 0,03Ca	7,1 \pm 0,05Ba	8,6 \pm 0,12Aa	8,5 \pm 0,77ABa	0, 0131
Calda Sulfocálcica	7,3 \pm 0,19Aa	7,2 \pm 0,11Aa	7,7 \pm 0,20Aa	8,3 \pm 0,52Aa	0, 1035
Extrato de Crisântemo	7,8 \pm 0,35Ba	7,2 \pm 0,04Ba	9,4 \pm 0,69Aa	7,9 \pm 0,52ABa	0, 0157
Pironin	7,9 \pm 0,59Aa	7,4 \pm 0,13Aa	7,8 \pm 0,11Aa	7,9 \pm 0,61Aa	0, 3992
p	0, 3290	0, 4026	0, 0954	0, 4783	

Tabela 4.10 Continuação

Tratamentos	Ciclo ovo-adulto machos				
	24 h (ovo-larva)	72 h (pré-pupa)	144 h (pupa)	168 h (emergência)	p
Testemunha	8,9 ± 0,12Aab	8,6 ± 0,22Aa	8,7 ± 0,18Aa	8,7 ± 0,08Aa	0,3982
Ecolife®	9,1 ± 0,25Aa	8,9 ± 0,39Aa	8,3 ± 0,35Aa	8,6 ± 0,25Aa	0,2976
Mattam Plus	8,8 ± 0,27Aab	8,8 ± 0,20Aa	8,5 ± 0,21Aa	8,6 ± 0,08Aa	0,4484
Bion	8,0 ± 0,26Ab	9,3 ± 0,47Aa	8,5 ± 0,56Aa	8,5 ± 0,19Aa	0,1914
Biogermex	8,5 ± 0,21Aab	8,3 ± 0,16Aa	9,1 ± 0,07Aa	8,5 ± 0,29Aa	0,1125
Supermagro	9,2 ± 0,20Aa	8,8 ± 0,07Aba	8,9 ± 0,20ABa	8,4 ± 0,22Ba	0,0404
Natural Neem	9,2 ± 0,13Aa	8,3 ± 0,10Ba	9,2 ± 0,15Aa	8,3 ± 0,19Ba	0,0239
p	0,0100	0,1454	0,0961	0,3509	
Testemunha	7,3 ± 0,12Aa	7,6 ± 0,33Aa	7,7 ± 0,25Aa	7,2 ± 0,06Aa	0,3687
Planta Clean	7,1 ± 0,05Ba	7,3 ± 0,14Ba	8,1 ± 0,19Aa	7,3 ± 0,18Ba	0,0193
Calda Sulfocálcica	7,4 ± 0,20Aa	7,3 ± 0,23Aa	7,9 ± 0,14Aa	8,1 ± 0,50Aa	0,1504
Extrato de Crisântemo	7,6 ± 0,17Aa	7,1 ± 0,07Ba	8,5 ± 0,62Aa	7,6 ± 0,13Aa	0,0122
Pironin	7,9 ± 0,44Aa	7,5 ± 0,18Aa	7,7 ± 0,26Aa	7,3 ± 0,15Aa	0,7203
p	0,0785	0,3284	0,7655	0,1720	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 4.11 – Longevidade (\pm EP) de adultos (fêmeas e machos) de *T. pretiosum* emergidos de ovos de *A. kuehniella* tratados com produtos alternativos, nas CR, e água destilada esterilizada em diferentes fases de desenvolvimento. Temp.: $26 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70\% \pm 10\%$ e fotofase: 14 h.

Tratamentos	Longevidade fêmeas				p
	24 h (ovo-larva)	72 h (pré-pupa)	144 h (pupa)	168 h (emergência)	
Testemunha	1,7 \pm 0,10Aa	1,4 \pm 0,08Abc	1,5 \pm 0,15Aa	1,6 \pm 0,12Aa	0, 0553
Ecolife®	1,7 \pm 0,27Aa	1,6 \pm 0,10Aab	1,3 \pm 0,12Aa	1,4 \pm 0,04Aa	0, 4166
Mattam Plus	1,5 \pm 0,05Aa	1,7 \pm 0,07Aa	1,5 \pm 0,05Aa	1,5 \pm 0,05Aa	0, 0680
Bion®	1,5 \pm 0,14Aa	1,6 \pm 0,10Aab	1,4 \pm 0,12Aa	1,4 \pm 0,08Aa	0, 4465
Biogermex	1,5 \pm 0,14Aba	1,3 \pm 0,10Bc	1,7 \pm 0,10Aa	1,6 \pm 0,04Aa	0, 0175
Supermagro	1,4 \pm 0,16Aa	1,5 \pm 0,09Aabc	1,8 \pm 0,12Aa	1,5 \pm 0,08Aa	0, 0871
Natural Neem	1,4 \pm 0,10Aa	1,3 \pm 0,08Abc	1,4 \pm 0,49Aa	1,6 \pm 0,05Aa	0, 1714
p	0, 6933	0, 0097	0, 1529	0, 2314	
Testemunha	2,1 \pm 0,03Aa	2,2 \pm 0,14Ab	2,3 \pm 0,21Aa	2,3 \pm 0,13Aa	0, 8870
Planta Clean	2,5 \pm 0,08Aa	2,7 \pm 0,11Aa	1,7 \pm 0,06Bb	2,5 \pm 0,23Aa	0, 0220
Calda Sulfocálcia®	2,2 \pm 0,10Aa	2,1 \pm 0,10Ab	2,3 \pm 0,19Aa	2,4 \pm 0,16Aa	0, 6191
Extrato de Crisântemo	2,2 \pm 0,32Aa	2,3 \pm 0,03Aab	2,2 \pm 0,09Aa	2,4 \pm 0,11Aa	0, 7933
Pironin	2,2 \pm 0,10Aa	2,0 \pm 0,04Ab	2,3 \pm 0,19Aa	2,6 \pm 0,05Aa	0, 0544
p	0, 3083	0, 0108	0, 0389	0, 4817	

Tabela 4.11 Continuação...

Tratamentos	Longevidade machos				p
	24 h (ovo-larva)	72 h (pré-pupa)	144 h (pupa)	168 h (emergência)	
Testemunha	1,5 ± 0,08Aa	1,5 ± 0,12Aa	1,3 ± 0,10Aa	1,7 ± 0,04Aa	0, 0994
Ecolife®	1,8 ± 0,09Aa	1,6 ± 0,11Aa	1,6 ± 0,16Aa	1,5 ± 0,10Aa	0, 8066
Mattam Plus	1,5 ± 0,11Aa	1,6 ± 0,06Aa	1,6 ± 0,01Aa	1,6 ± 0,07Aa	0, 2543
Bion®	1,8 ± 0,15Aa	1,7 ± 0,11Aa	1,7 ± 0,16Aa	1,6 ± 0,10Aa	0, 7179
Biogermex	1,7 ± 0,09Aa	1,4 ± 0,22Aa	1,9 ± 0,04Aa	1,7 ± 0,13Aa	0, 1090
Supermagro	1,4 ± 0,14Aa	1,3 ± 0,05Aa	1,7 ± 0,23Aa	1,7 ± 0,10Aa	0, 0799
Natural Neem	1,4 ± 0,08Aa	1,6 ± 0,11Aa	1,7 ± 0,12Aa	1,6 ± 0,24Aa	0, 6911
p	0, 2470	0, 0874	0, 1050	0, 7592	
Testemunha	2,5 ± 0,09Aa	2,6 ± 0,12Aa	2,7 ± 0,14Aa	2,3 ± 0,08Aa	0, 0766
Planta Clean	2,7 ± 0,13Aa	2,5 ± 0,15Aa	2,0 ± 0,13Ba	2,3 ± 0,15Aa	0, 0393
Calda Sulfocálcia®	2,4 ± 0,16Aa	2,4 ± 0,13Aa	2,3 ± 0,09Aa	2,3 ± 0,17Aa	0, 8449
Extrato de Crisântemo	2,1 ± 0,25Aa	2,7 ± 0,12Aa	2,3 ± 0,12Aa	2,3 ± 0,14Aa	0, 1212
Pironin	2,5 ± 0,11Aa	2,4 ± 0,09Aa	2,3 ± 0,20Aa	2,6 ± 0,12Aa	0, 4655
p	0, 1854	0, 2866	0, 0775	0, 5323	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Embora a maioria dos produtos alternativos tenha repellido a oviposição de *T. pretiosum* no teste com chance de escolha, apenas o extrato de Crisântemo e a Calda Sulfocálcica reduziram o número de ovos parasitados quando aplicados no pré-parasitismo, sem, no entanto, alterar o percentual de emergência e a razão sexual. Da mesma forma, no teste pós-parasitismo, nenhum dos produtos alterou a emergência e a razão sexual do parasitóide, evidenciando não haver efeito ovicida destes produtos.

Com relação aos demais parâmetros avaliados os produtos Pironin, extrato de Crisântemo, Planta Clean, Mattan Plus e Calda Sulfocálcica alteraram o ciclo ovo-adulto, porém, em apenas algumas horas, o que, provavelmente, não comprometeria a eficiência do parasitóide em campo.

Na avaliação dos produtos alternativos nas diferentes fases do desenvolvimento, apenas Planta Clean e a Calda Sulfocálcica reduziram o percentual de emergência no tempo de 168 h, sendo que os demais parâmetros não foram alterados exceto para Planta Clean que reduziu a longevidade de fêmeas no tempo de 144 h.

De maneira geral os produtos testados são compatíveis para a utilização conjunta com *T. pretiosum*, uma vez que nos testes de laboratório são exploradas condições extremas, e que provavelmente não ocorreria em campo. No entanto, é necessário considerar a adequação das estratégias de aplicação, conforme o produto.

No caso do extrato de Crisântemo e a Calda Sulfocálcica que reduziram o percentual de emergência no pré-parasitismo, recomenda-se a aplicação, no mínimo, 24 h após a liberação do parasitóide. Por outro lado, todos os produtos podem ser utilizados até 6 dias após a liberação do parasitóide sem causar efeitos negativos para o parasitóide.

Entretanto, é importante salientar que para maior eficiência de controle são necessário estudos em campo com super concentrações, a toxicidade sobre o adulto, além de avaliação sobre as possíveis implicações do efeito dos produtos na geração F1.

4.5 CONCLUSÃO

Apenas o extrato de Crisântemo e a Calda Sulfocálcica reduziram o número de ovos parasitados quando aplicados no pré-parasitismo. Os demais produtos não foram afetados por nenhum produto

4.6 REFERÊNCIAS

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 3.0. Aplicações Estatísticas nas áreas de Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília CNPq, 2003. 290p.

BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F.; SANTOS, A.J.N.; PEREIRA-BARROS, J.L. Ação de alguns Produtos Fitossanitários para Adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1051-1055, nov.-dez., 2006.

CARVALHO, G.A.; PARRA, J.R.P.; BAPTISTA, G.C.; Bioatividade de produtos fitossanitários utilizados na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) à *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) nas gerações F₁ e F₂. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.27, n.2, p. 261-270 mar.-abr., 2003.

CÔNSOLI, F.L., PARRA, J.R.P.; HASSAN, S.A. Side-effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae), a natural enemy of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). **J. Appl. Entomol.**, v.122, p. 43-47, 1998.

DALVI, L.P.; POLANCZIK, R.A.; PRATISSOLI, D.; MELO, R.L.; HOLTZ, A.M. Seletividade de *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare & W. Gams (Classe-Forma: Hyphomycetes) ao parasitóide *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1392-1395, set.-out., 2007.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropos. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 81–106, 2007.

FATOUROS, N.E.; KISS, B.G.; KALKERS, L.A.; GABORENA, R.S.; DICKE, M; HILJER, M. Oviposition induced plants cues: do they arrest *Trichogramma* wasps

during host location? **The Netherlands Entomological Society**, v. 115, p. 207-215, 2005.

FOERSTER, L.M. Seletividade de Inseticidas a Predadores e Parasitóides. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, (PAGS CAPIT).

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, C.G.; 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**, v.10. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GIOLO, F.P.; GRUTZMACHER, A.D.; MANZONIR, C.G.; NORNBORG, S.D.; HARTER, W.R.; CASTILHOS, R.V. Seletividade de produtos fitossanitários utilizados na cultura do pessegueiro nos estágios imaturos de *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner, 1983 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.5, p. 1220-1226, ago, 2008.

GLEISSMAN, S.R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável**, 3ª ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R.C.R.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de Extratos de Meliáceas Sobre o Parasitóide de Ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, vol. 33, n.5, p. 607-612, 2004.

GRISA, Simone. **Interferência de produtos utilizados na agricultura agroecológica sobre o parasitismo de *Trichogramma pretiosum*, Riley**. 2005. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

HAI, F.N.P.; PREZZOTI, L.; CARNEIRO, J.S.; ALENCAR, J.A. *Trichogramma pretiosum* para o controle de pragas no tomateiro. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002, p.477-491.

KRAEMER, Beatriz. **Interferência de extratos vegetais e óleo mineral emulsionável sobre o parasitismo de *Trichogramma pretiosum***. 2007. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

LOBDELL, C.E.; YONG, T-H.; HOFFMANN, M.P. Host color preferences and short-range searching behavior of the egg parasitoid *Trichogramma ostrinae*, **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 116, p.127–134, 2005.

MEDEIROS, M.B.; WANDERLEY, P.A.; WANDERLEY, M.J.A. Biofertilizantes Líquidos: processo trofobiótico para proteção de plantas em cultivos orgânicos. **Rev. Biotec. Ciência e Desenvolvimento**, n. 31, jul.-dez. 2003.

MORANDI FILHO, W.J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A.D.; GIOLO, F.P.; MANZONI, C.G. Ação de produtos naturais sobre a sobrevivência de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) e seletividade de inseticidas utilizados na produção orgânica de videira sobre *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1072-1078, jul-ago, 2006.

MOURA, A.P.; CARVALHO, G.A.; RIGITANO, R.L.O. Toxicidade de inseticidas utilizados na cultura do tomateiro a *Trichogramma pretiosum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.3, p. 203-210, mar. 2005.

NUNES, M.U.C.; LEAL, M.L.S. Efeitos da aplicação de biofertilizante e outros produtos químicos e biológicos, no controle da broca pequena do fruto e na produção do tomateiro tutorado em duas épocas de cultivo e dois sistemas de irrigação. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19 n. 01 p. 53-59, março 2001.

OLIVEIRA, R.C.; PRATISSOLI, D.; BUENO, A.F. EFEITO DE *Azaradica indica* (Nim) SOBRE O PARASITISMO DE *Trichogramma pretiosum* (HIMENOPTERA: TRICHOGRAMMATIDAE) EM OVOS DE *Anagasta kuehniella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE). **Rev. Ecosystema**, vol. 28, n.1,2, jan. – dez, 2003.

PENTEADO, S.R. **DEFENSIVOS ALTERNATIVOS E NATURAIS** . Ed. Livros Via Orgânica: Campinas, SP, 3ª ed, 2007

POTRICH, M; ALVES, L.F.A.; HAAS, J.; SILVA, E.R.L.; DAROS, A.; PIETROWSKI, V.; NEVES, P.M.O.J. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.38, n.6, nov.-dez. 2009.

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, mar-abr, 2006.

PRIMAVESI, A. **Manejo ecológico de pragas e doenças: técnicas alternativas para a produção agropecuária e defesa do meio ambiente.** São Paulo: Nobel, 1994.

TALAMINI, V.; STADNIK, M.J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, Marciel J.; TALAMINI, Viviane. (Org.). **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas.** Florianópolis, v. 1, p. 45-62, 2004.

TAVARES, W.S.; CRUZ, I.; PETACCI, F.; ASSIS JÚNIOR, S.L.; FREITAS, S.S.; ZANÚNCIO, J.C. ; SERRÃO, J.E. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 384–388, jul., 2009.

VENZON, M.; ROSADO M.C.; PINTO, C.M.F.; DUARTE, V.S.; EUZÉBIO DE, PALLINI, A. Potencial de defensivos alternativos para o controle do ácaro branco em pimenta “Malagueta”. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p. 224-227, abr.-jun., 2006.

VINSON, S.B. Comportamento de seleção hospedeira de parasitóides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.(Ed.) **Trichogramma e o Controle Biológico.** Piracicaba: FEALQ, 1997. p.67-120.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo possibilitou identificar que os produtos alternativos apresentam efeitos diferenciados sobre a linhagem de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* S-1905 e *T. pretiosum*. Para a bactéria os resultados variaram de acordo com a técnica utilizada, sendo que os produtos Matam Plus, Supermagro, Pironin e extrato de Crisântemo não afetam negativamente a formação de UFC/mL e apresentaram efeito aditivo à toxicidade das proteínas do cristal. Por outro lado, Biogermex, Calda Sulfocálcica, Ecolife[®] e Planta Clean são antagônicos à toxicidade das proteínas do cristal, sendo, portanto não recomendada a utilização conjunta com Btk S1905. E, embora a maioria dos produtos sejam repelentes a oviposição de *T. pretiosum* apenas o extrato de Crisântemo e a Calda Sulfocálcica reduziram o número de ovos parasitados no pré-parasitismo, ao passo que os demais parâmetros não foram afetados.

A Calda Sulfocálcica foi o único produto apresentou efeito negativo sobre esporos e cristais de Btk S1905 e *T. pretiosum* e, portanto não indicada a sua utilização em sistemas de cultivo que empregam os dois agentes de controle.