

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**VIRULÊNCIA DE THYRINTEINA ARNOBIA VIRUS (TaV) E DE
Bacillus thuringiensis À *Thyrinteina arnobia* (LEPIDOPTERA:
GEOMETRIDAE): EFEITO DA TEMPERATURA NO
DESENVOLVIMENTO DAS LAGARTAS E DO pH DA
CALDA DE PULVERIZAÇÃO**

YELITZA COROMOTO COLMENAREZ

Dissertação apresentada à faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP- Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU- SP

Fevereiro – 2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**VIRULÊNCIA DE THYRINTEINA ARNOBIA VIRUS (TaV) E DE
Bacillus thuringiensis À *Thyrinteina arnobia* (LEPIDOPTERA:
GEOMETRIDAE): EFEITO DA TEMPERATURA NO
DESENVOLVIMENTO DAS LAGARTAS E DO pH DA
CALDA DE PULVERIZAÇÃO**

YELITZA COROMOTO COLMENAREZ

Engenheira Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

Dissertação apresentada à faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP- Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU- SP
Fevereiro-2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VIRULÊNCIA DE THYRINTEINA ARNOBIA VIRUS (TaV) E
DE *Bacillus thuringiensis* À *Thyrnteina arnobia*
(LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE): EFEITO DA
TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DAS
LAGARTAS E DO pH DA CALDA DE PULVERIZAÇÃO.

AUTOR: YELITZA COROMOTO COLMENAREZ

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN

Aprovada pela Comissão Examinadora:

PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN

PROF. DR. CARLOS GILBERTO GAETANO

PROF. DR. PEDRO MANUEL OLIVEIRA JANEIRO NEVES

Data de realização ____/____/____

A minha mãe Glória
Colmenarez,

por sua dedicação, seu amor e
por ser sempre meu motivo de
inspiração e modelo para ser
cada dia melhor.

Aos meus irmãos Yenni, Yuli,
Yohanni e ao meu sobrinho
Orlandito.

OFEREÇO

A DEUS, AGRADEÇO

Em memória de meu avô Juan e
de Meu tio Antônio, os quais
sempre torceram pelo meu
sucesso.

A toda minha família

DEDICO

O homem não pode descobrir novos horizontes a menos que tenha a coragem de perder de vista a beira do mar.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken (FCA/UNESP – Botucatu), pela amizade e orientação no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Raetano (FCA/UNESP – Botucatu), pela amizade e toda sua disposição de ajuda durante a execução desta pesquisa.

A Prof^ª. Silvia Renata Siciliano Wilcken pela ajuda prestada e pela sua amizade.

A este país maravilhoso que me acolheu, me apaixonou, me fez gostar do futebol e a todas as pessoas que conheci que me brindaram sua amizade e ajuda.

Ao meus amigos Brodzinski e Czepczynski pela ajuda e amizade duradoura.

Ao prof. Celso Antonio Zanin (FCA/UNESP – Botucatu) e a sua esposa Nené , pelos ânimos, amizade que sempre me brindaram.

Aos meus amigos Rosa Honorato (Rosita), Toninha (Antônia Serafín), Vitória, Luis Elias Munita , Aldenise Moreira, pela ajuda e amizade sincera.

Aos técnicos do laboratório do Departamento de Produção Vegetal da UNESP, Botucatu, em especial a Nivaldo Lúcio da Costa, por toda a sua ajuda e amizade.

À todas aquelas pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMO..... | 1 |
| SUMARY..... | 3 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 5 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 8 |
| 2.1 <i>Thyrinteina arnobia</i> | 8 |
| 2.2 Controle de <i>Thyrinteina arnobia</i> | 9 |
| 2.3 Bacterias entomopotogênicas..... | 10 |
| 2.3.1 Controle Microbiano utilizando B.t..... | 11 |
| 2.3.2 Modo de ação de <i>B. thuringiensis</i> | 13 |
| 2.4 Vírus entomopatogênicos..... | 14 |
| 2.4.1 Modo de ação do vírus entomopatogênico (TaV)..... | 16 |
| 2.4.2 Controle Microbiano com vírus entomopatogênicos..... | 17 |
| 2.5 Influência da temperatura e do pH da calda a vírus e B.t..... | 20 |
| 2.5.1 Vírus..... | 20 |
| 2.5.1.1 Temperatura..... | 20 |
| 2.5.1.2 pH..... | 21 |
| 2.5.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> | 22 |
| 2.5.2.1 Temperatura..... | 22 |
| 2.5.2.2 pH..... | 23 |
| 3 MATERIAL E METODOS..... | 25 |
| 3.1 Criação e Manutenção..... | 25 |
| 3.2 Purificação do vírus..... | 26 |
| 3.3 Multiplicação do vírus..... | 27 |
| 3.4 Avaliação da Temperatura de desenvolvimento na virulência do TaV e <i>Bacillus thuringiensis</i> | 28 |
| 3.5 Avaliação do pH da água de pulverização na virulência do TaV e <i>Bacillus thuringiensis</i> | 29 |
| 3.6 Análise estatística..... | 31 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 32 |
| 4.1 | Efeito da Temperatura de desenvolvimento sobre o TaV e <i>B. thuringiensis</i> | 32 |
| 4.1.1 | Em lagartas de 3º instar de <i>T. arnobia</i> | 32 |
| 4.1.2 | Em lagartas de 5º instar de <i>T. arnobia</i> | 38 |
| 4.2 | Efeito do pH da calda de pulverização sobre o TaV e <i>B. thuringiensis</i> | 45 |
| 4.2.1 | Em lagartas de 3º instar de <i>T. arnobia</i> | 45 |
| 4.2.2 | Em lagartas de 5º instar de <i>T. arnobia</i> | 52 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 59 |
| 6 | BIBLIOGRAFIA..... | 60 |

RESUMO

Este estudo teve por objetivo avaliar a eficiência do *Thyrinteina arnobia* vírus (TaV) e de *Bacillus thuringiensis* quando submetidos a diferentes condições de pH e temperatura no controle da lagarta parda *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Foram testadas 4 temperaturas (18, 22, 26 e 30° C) e 4 pHs diferentes (5, 6, 7 e 8). Os ovos de *Thyrinteina arnobia* foram provenientes de uma criação em dieta artificial, mantida em laboratório. Os entomopatógenos foram aplicados em folhas de *Eucalyptus grandis*, para posterior oferecimento à lagartas do 3º. e 5º. instares. O ensaio de pH foi conduzido em sala climatizada (temperatura: 25 ± 1°C ; UR: 70 ± 10 % e fotofase de 13 horas), enquanto que os ensaios de temperatura os tratamentos foram conduzidos em câmaras de BOD e fotofase de 13 horas. Os experimentos foram instalados no delineamento experimental inteiramente casualizado e a distribuição dos tratamentos em esquema fatorial 4x3, com 10 repetições de 5 lagartas cada uma, sendo avaliadas 150 lagartas para cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t (LSD) ao nível de 5 % de probabilidade. A variável avaliada foi a mortalidade acumulada das lagartas. As observações foram feitas diariamente porém, para a análise estatística consideraram-se as avaliações realizadas aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias. Os dados foram corrigidos utilizando-se a raiz quadrada de x + 1. No experimento sobre a influência da temperatura, foi verificado que quanto maior a temperatura, maior a mortalidade causadas pelo TaV e pelo *B. thuringiensis*, tanto para lagartas de 3º. instar quanto para lagartas de 5º. instar de *T. arnobia*. As temperaturas mais

favoráveis para a expressão da ação de ambos os patógenos foi 26 e 30°C. No experimento sobre o efeito do pH da calda de pulverização sobre os entomopatógenos, constatou-se que o pH 7,0 é o mais adequado para a ação do *B. thuringiensis*, tanto nas lagartas do 3º. instar quanto para as lagartas do 5º. instar de *T. arnobia*. Entretanto, a ação do TaV sobre lagartas de *T. arnobia* não foi afetada pelos diferentes pHs de calda de pulverização. Nos diferentes experimentos realizados as lagartas do terceiro instar foram mais suscetíveis, apresentando uma mortalidade maior do que a apresentada nas lagartas do 5º. instar. Tanto para as diferentes temperaturas quanto para os diferentes pHs, o *B. thuringiensis* foi o responsável pela maior mortalidade, para as duas idades de lagartas de *T. arnobia*.

VIRULENCE OF THYRINTEINA ARNOBIA VIRUS (TaV) AND *Bacillus thuringiensis* to *Thyrntaina arnobia* (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE): EFFECT OF THE TEMPERATURE IN THE LARVAS GROWTH AND THE pH of the spraying suspension. Botucatu, 2002. 70f. Dissertation (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: YELITZA COROMOTO COLMENAREZ

Adviser: CARLOS FREDERICO WILCKEN

SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the efficiency of *Thyrntaina arnobia* virus (TaV) and *Bacillus thuringiensis* when exposed to different conditions of pH and temperature to the eucalyptus brown looper control *Thyrntaina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). It was evaluated at 4 different temperatures (18, 22, 26 and 30°C) and 4 different pHs (5, 6, 7 and 8). *T. arnobia* larvae were reared in an artificial diet and maintained in the laboratory. The entomopathogens were applied to *Eucalyptus grandis* leaves, and these were offered to larvae at the 3^d and 5th instars. The pH assay was conducted in a controlled conditions (temperature of $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; RH: $70 \pm 10\%$ and photophase of 13 hours). The temperature assays were conducted at a controlled temperatures, in a BOD room with photophase of 13 hours. The experiments were installed in the following factorial analysis 4x3, with a experimental design completely randomized, with 10 replications with 5 larvae each one. The data obtained were submitted to ANOVA and means compared by t test (LSD) ($P \leq 0.05$). The variable evaluated was the accumulative larvae death. The observations were made daily, but for the statistical analysis only the evaluations in 4, 6, 8, 10 and 15 days were considered. The temperature experiment showed that higher temperature caused higher mortality to both 3^d and 5th instars of *T. arnobia* larvae. The more favorable temperatures were 26°C and 30°C for the expression of both pathogens. The results of suspension pH experiment showed that pH 7,0 was the most adequated for the *B. thuringiensis* action for both instars of *T. arnobia*. However, the TaV action in *T. arnobia* larvae was not affected for the different pHs evaluated. In different experiments carried out, 3rd instar larvae were more susceptible

than to 5^h instar. Also for the different temperatures and of different pHs, *B. thuringiensis* was the responsible for higher mortality for both larvae stages, in comparison to TaV. The implications of these results in eucalyptus brown looper control in the field are discussed in the text.

Keywords: Biological control, bioinsecticide, entomopathogens, eucalyptus brown looper, forest pest control, environmental factors

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor florestal continua em expansão, sendo o eucalipto a principal espécie florestal cultivada no país. As florestas plantadas com eucalipto atingiram 2.965.880 ha. em 1999 e o setor base florestal exportou US \$ 3,5 bilhões, sendo que a celulose é o produto de base florestal que representa a participação mais expressiva no mercado mundial com 5,2% dos negócios internacionais (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2001).

A crescente implantação de florestas de *Eucalyptus* e *Pinus* tem trazido uma série de problemas ao equilíbrio biológico (Oda & Berti Filho, 1978). Por outro lado, estas florestas são cultivadas de forma intensiva, ou seja, tornando-as mais suscetíveis ao ataque de pragas (Wilcken, 1991). As pragas de maior importância econômica nas florestas de eucalipto são as formigas cortadeiras e as lagartas desfolhadoras (Berti Filho, 1974; Peres Filho, 1989).

A lagarta parda *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) é considerada o principal lepidóptero desfolhador das florestas brasileiras (Anjos et al., 1987).

Existem diversos métodos de controle da lagarta parda, entre os quais estão o controle físico, mecânico, químico e biológico (Anjos et al., 1987). O controle químico é um dos mais usados, mas essa prática é complexa devido, principalmente, à grande extensão dos plantios e à altura das árvores (Wilcken, 1996).

O controle biológico consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica (Zanuncio et al., 1993). Dentro desse contexto se insere o controle microbiano, que consiste na utilização racional de patógenos visando à manutenção da população de pragas em níveis não prejudiciais (Alves, 1998). O controle microbiano tem grande importância dentro do controle biológico, através dos microrganismos entomopatogênicos, que atacam insetos-praga de importância econômica, como no caso de *T. arnobia*.

Dentre os entomopatógenos utilizados no controle de pragas agrícolas e florestais destacam-se os vírus e as bactérias. No caso dos vírus, a importância está na sua grande especificidade aos invertebrados e na eficiência no controle de insetos.

A virulência de *Bacillus thuringiensis* sobre lepidópteros têm sido muito estudada. Embora ocorra um grande número de lepidópteros suscetíveis a *B. thuringiensis*, no Brasil, são poucas as espécies cujo nível de suscetibilidade foi determinado (Alves, 1998).

No Brasil, vem-se desenvolvendo trabalhos com bioinseticidas virais há mais de 20 anos. Entretanto, para pragas florestais só há relatos de ocorrência de viroses no campo sem um estudo mais aprofundado. Desde o início da década de 80 vem sendo utilizado, no Brasil, um vírus de poliedrose nuclear (VPN) para o controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* (AgNPV), sendo que atualmente a área tratada com o patógeno está próxima de 1.000.000 de ha (Moscardi & Sosa-Gomez, 1992).

Na UNESP, Departamento de Produção Vegetal, campus de Botucatu está-se trabalhando com bioinseticida viral para o controle da *T. arnobia*. Nascimento (2001), trabalhou na caracterização de um novo vírus isolado de *Thyrintina arnobia*, ao qual chamou TaV, e a sua virulência foi avaliada neste trabalho.

O sucesso da utilização de qualquer estratégia de controle depende de fatores bióticos e abióticos que influenciam o sistema entomopatógeno-hospedeiro-planta, cujo conhecimento torna-se fundamental antes da implementação de uso desses patógenos em campo (Alves, 1986). Diversos são os fatores que podem determinar a eficiência ou não de um agente microbiano no controle de pragas. O efeito do pH da calda de pulverização e as diferentes temperaturas em campo tem sido considerados como uns dos possíveis fatores que afetam a virulência dos entomopatógenos e tem sido objeto de investigação por estudiosos de controle microbiano de insetos.

Conhecendo-se a importância de determinar novos e eficientes programas de Controle Biológico, assim como a eficiência no campo desenvolveu-se este estudo com os objetivos de avaliar a influência da temperatura e o pH da calda de pulverização sobre eficiência de controle de TaV e *Bacillus thuringiensis* à lagartas de *T. arnobia*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Thyriniteina arnobia*

A espécie *Thyriniteina arnobia* ocorre desde a América Central até o norte da Argentina (Rindge, 1961). No Brasil, a praga foi registrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso de Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Pernambuco, Maranhão e Amazonas (Berti Filho, 1974; 1981; Anjos et al., 1987 e Barros et al., 1993).

Thyriniteina arnobia, conhecida como lagarta parda (Anjos et al., 1987), é considerada como a principal espécie dentre os lepidópteros desfolhadores do eucalipto no Brasil (Berti Filho, 1974; Anjos et al., 1987), tendo atacado um total aproximado de 485.000 ha de florestas, entre 1949 a 1989 (Peres Filho, 1989). Entretanto, atualmente a área total atacada é maior, pois não são considerados os recentes surtos que estão ocorrendo no estado de São Paulo desde 1989 (Wilcken, 1996).

A relação de plantas hospedeiras para *T. arnobia* no Brasil é bastante estudada para as espécies de eucalipto, sendo os estudos com hospedeiros nativos escassos (Lemos, 1996). Como hospedeiros exóticos no Brasil, são citadas as espécies de *Eucalyptus citriodora*, *E. cloeziana*, *E. grandis*, *E. resinifera*, *E. rostrata*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. urophylla* (Zanuncio et al., 1993).

A praga é de efeito arrasador, principalmente em plantações novas (Barbiellini, 1950). As lagartas de *T. arnobia* atacam desde plantios com 6 meses até 6,5

anos de idade, além de rebrotas (Macedo et al., 1975). Entretanto, o ataque pode ocorrer desde plantios novos, com um mês de idade até florestas com 23 anos de idade (Wilcken, 1996), concordando com os relatos de Anjos et al., (1987).

Com relação aos danos e prejuízos, um ataque de *T. arnobia* causa perda média de volume de madeira de 40,4 % ou 25,6 m³/ha para 100 % de desfolha e 13,2 % ou 8,3 m³/ha para árvores com 50 % de desfolha, considerando povoamentos de *Eucalyptus saligna* com 2,5 a 3,5 anos de idade (Oda & Berti Filho, 1978).

Segundo Berti Filho (1974) cada fêmea coloca em média 752,8 ovos. O período embrionário é de 10 dias e apresenta uma viabilidade média de 94,7 %. Esse autor verificou ainda que as lagartas apresentam 6 instares. No caso dos adultos, a longevidade média é de 3,4 dias para os machos e de 7 a 10 dias para as fêmeas. O ciclo de vida dessa praga de ovo a adulto é, em média, de 53,1 dias para as fêmeas e de 49,5 dias para os machos.

2.2 Controle de *T. arnobia*

Os efeitos adversos ao homem e meio ambiente decorrentes ao emprego de inseticidas químicos têm levado a busca contínua de alternativas, visando a implementação de programas de manejo integrado de pragas (MIP), nos quais os entomopatógenos têm papel importante, por sua ocorrência natural ou sua utilização como inseticidas biológicos (Alves, 1986; Tanada & Kaya, 1993).

Existem também insetos predadores que podem exercer o controle da praga. As espécies *Alcaeorrhynchus grandis* (Hemiptera: Pentatomidae) como predadora de lagartas, e *Apateticus* sp. (Hemiptera: Pentatomidae) predadora de lagartas, pupas e adultos de *T. arnobia* (Berti Filho, 1974).

Segundo Gallo et al. (1988), além do controle biológico de *Thyrinteina arnobia* com parasitóides, inseticidas biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner têm sido usados com sucesso, sendo os vírus específicos também eficientes.

O método de controle mais empregado para se controlar as áreas com surtos de *aé* a aplicação de *B. thuringiensis*. Vários estudos já foram realizados testando-se diferentes formulações deste entomopatógeno (Anjos et al., 1987).

É importante ressaltar que alguns patógenos são específicos, como é o caso dos vírus, alguns fungos e protozoários. Outros, porém, não apresentam grande

especificidade, mas são altamente patogênicos para determinadas espécies, como ocorre com bactérias, fungos em geral e nematóides. Assim mesmo, quando aplicados em doses elevadas ainda conseguem evitar desequilíbrios biológicos de importância no agroecossistema, por não afetarem parasitos, predadores e polinizadores (Alves, 1986).

2.3 Bactérias entomopatogênicas

São conhecidas centenas de espécies de bactérias associadas a insetos, no entanto são poucas aquelas que possuem características que permitem o seu uso no controle de insetos prejudiciais. As espécies entomopatogênicas de maior importância concentram-se nas famílias Enterobacteriaceae e Bacillaceae, além de alguns gêneros da família Pseudomonadaceae (Habib & Andrade, 1998).

Quanto aos critérios de classificação das bactérias realizado por Falcón (1971), acredita-se que sejam os mais viáveis do ponto de vista da patologia de insetos, agrupando as bactérias entomopatogênicas em apenas duas categorias: esporulantes e não-esporulantes.

St Julian et al. (1973) e Angus (1974), tratando dessas categorias mencionadas, salientam a inadequação das bactérias não-esporulantes para o uso no controle de insetos, devido à sua alta sensibilidade às radiações e às condições climáticas, dificultando o manuseio, armazenamento e formulação, além de grande parte ser considerada patogênica para vertebrados. Por outro lado, os mesmos autores enfatizam as qualidades altamente promissoras da família Bacillaceae.

O crescente interesse pela utilização de bactérias entomopatogênicas para o controle de populações de insetos prejudiciais levou o homem a pesquisar mais profundamente as bactérias esporulantes. A sua característica de persistência, tem sido considerada como um pré-requisito para que um agente possa ser produzido em escala comercial (Habib & Andrade, 1998).

Embora sejam poucas espécies de bactérias com alta capacidade de invadir a parede intestinal ou de se multiplicar na luz do intestino, várias são as espécies consideradas potenciais, ou seja, com a capacidade de se multiplicar na hemolinfa, causando septicemias fatais (Habib & Andrade, 1998).

Ainda existem aquelas espécies de bactérias, embora poucas, que se caracterizam por alta virulência, alta capacidade invasora e produção de toxinas, causando

facilmente toxemias em insetos. A família Bacillaceae encontra-se dentro deste grupo de bactérias esporulantes e tem sido amplamente estudada. Envolve dois gêneros de grande importância, *Bacillus* e *Clostridium* (Habib & Andrade, 1998).

2.3.1 Controle microbiano utilizando *Bacillus thuringiensis*

Nos anos 90 os inseticidas microbianos, principalmente a base de bactérias, tiveram sua importância reconhecida no mercado mundial, devido às exigências ecológicas e ambientais da sociedade. Produtos a base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ocupam um enorme espaço para combater pragas agrícolas e florestais (Watkinson, 1994).

As espécies do gênero *Bacillus* são apresentadas células em forma de bastonete, às vezes em cadeia, sendo a maioria capaz de produzir endósporo. São, em geral aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas, podem se desenvolver em substratos variáveis, devido ao amplo complexo enzimático produzido pelas células. Apesar da significativa variação entre as diferentes espécies desse gênero, várias características, como a formação de esporos e a produção de toxinas e enzimas, levaram os patógenos pertencentes a ele a um lugar privilegiado entre os agentes altamente promissores no controle de insetos prejudiciais (Habib & Andrade, 1998).

As variedades de *B. thuringiensis* produzem algumas toxinas já caracterizadas, além de substâncias de ação tóxica pouco definida para muitos insetos. As toxinas que se seguem são as mais importantes: δ -endotoxinas (toxinas do cristal), β -exotoxina, endósporo, δ -exotoxina, entre outras (Habib & Andrade, 1998).

Quanto às interações de *B. thuringiensis* com seus insetos hospedeiros, a δ -endotoxina e thuringiensina representam os fatores mais importantes no quadro patológico causado por esse bacilo (Habib & Andrade, 1998).

A suscetibilidade e a virulência podem ser expressas através de vários indicadores, tais como dose letal mediana (DL_{50}), tempo letal mediano (TL_{50}), entre outros. Os indicadores “efetivos” seriam aqueles que dependem do surgimento de um determinado efeito ou sintoma, e não necessariamente da morte. No caso de *B. thuringiensis*, pode-se supor simplesmente que os insetos de pH intestinal alcalino serão suscetíveis à bacteriose (Habib & Andrade, 1998).

Entretanto, a virulência deve variar de acordo com as características do inseto estudado, tais como o grau de alcalinidade intestinal e a presença ou não de agentes redutores. Da mesma forma, a suscetibilidade do inseto deve variar de acordo com o serótipo usado e até dentro de mesmo serótipo, de acordo com a linhagem e o tipo de fermentação e formulação (Habib & Andrade, 1998).

Bacillus thuringiensis subsp. *kurstaki* é amplamente usada no Canadá para o controle de insetos desfolhadores das florestas, em particular de *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lep.: Tortricidae) (Morris et al., 1986), e pode ser tão efetivo quanto os inseticidas químicos (Carrow, 1983).

Berti Filho & Macedo (1973) verificaram, pela primeira vez, a ação deletéria de *B. thuringiensis* em lagartas de importância florestal no Brasil. Lagartas de *T. arnobia* trazidas do campo para o laboratório foram alimentadas com folhas de eucalipto previamente pulverizadas com suspensão contendo *B. thuringiensis* e, após seis dias, todas morreram. Mais tarde, Macedo et al., (1975) relatou o uso de *B. thuringiensis* em dois surtos de *T. arnobia* no estado de São Paulo, em 1973, com bons resultados.

Gallo et al. (1988) resumem as experiências com *B. thuringiensis*, afirmando que os produtos comerciais com este ingrediente ativo têm sido usados com sucesso no controle de diversas lagartas de eucalipto, incluindo *T. arnobia*.

Há registro de eficiência desta bactéria para *T. arnobia*, *Sarsina violascens*, *Eupseudosoma involuta* e *Euselasia apisaon*. Esta bactéria apresenta eficiência comparada a dos produtos químicos para controle destes insetos. A 1ª aplicação em larga escala de *B. thuringiensis* foi realizada em uma área de mais de 300.000 hectares de eucalipto em Minas Gerais, para controle de *T. arnobia* (Zanuncio et al., 1993).

2.3.2 Modo de ação de *Bacillus thuringiensis*

Quanto às interações de *B. thuringiensis* com seus hospedeiros, a δ - endotoxina e thuringiensina representam os fatores mais importantes no quadro patológico causado por esse bacilo.

O cristal protéico como um todo não possui efeito tóxico quando injetado diretamente na hemolinfa de insetos, pois simplesmente é uma pró-toxina, tendo então uma relação direta entre a virulência e o modo de dissolução do cristal, seja esta enzimática ou não enzimática. A sua dissolução em meio alcalino (acima de pH 8), em tampões alcalinos

redutores, ou em solução de enzimas proteolíticas, resulta em moléculas de tamanhos variáveis, das quais algumas são tóxicas para insetos, sendo as d-endotoxinas algumas dessas moléculas que participam na formação do cristal. Por tanto, a dissolução desse cristal é sempre necessária para a liberação e atuação das d-endotoxinas (Fast & Martin, 1980).

A atividade inseticida da d-endotoxina de *B. thuringiensis* em Lepidoptera depende da ativação (solubilização e digestão) da protoxina que representa o cristal protéico no intestino médio dos insetos, sendo importante que os insetos apresentem um pH intestinal alcalino (Faust et al., 1967; Cooksey, 1971; Huber & Lüthy, 1981). O pH intestinal de larvas de Lepidoptera geralmente é alto (Waterhouse, 1949; Berenbaum, 1980) e excede um pH= 10 em várias espécies (Heimpel, 1956). O pH alcalino promove a dissolução do cristal e é ótimo para as proteases que hidrolisam a protoxina em sua forma ativa (Fast, 1981; Tojo & Aizawa, 1983).

Como as características das proteases e as condições da sua atuação variam de uma espécie de inseto para outra, em função do hábito alimentar, condições físico- químicas na luz intestinal, etc., acredita-se que o grau de hidrólise do cristal também pode ser variável de um inseto para o outro. Nos lepidópteros as proteínas do cristal, são solubilizadas pelas proteases do suco intestinal do inseto e possivelmente por enzimas do próprio *Bacillus*, originando a toxina que se liga aos receptores glicoprotéicos localizados nas células estriadas epiteliais, responsáveis pela absorção no intestino médio dos insetos. As toxinas nas células epiteliais levam então a um desequilíbrio osmótico que acaba resultando na parada alimentar e posterior paralisia alimentar (Habib & Andrade, 1998).

Lecadet & De Donder (1967), citados por Alves (1998) constataram que as proteases semipurificadas e isoladas do suco intestinal de lagartas de *Pieris brassicae* foram capazes de dissolver o cristal protéico de *B. thuringiensis*, confirmando assim o papel da ação enzimática na dissolução do cristal. Os mesmos autores constataram que as toxinas obtidas através da hidrólise enzimática foram fatais quando injetadas na cavidade do corpo, enquanto o material dissolvido apenas em meio alcalino (não enzimático) não teve o mesmo efeito fatal.

Essas informações significam que as proteases, independentemente de sua origem, seriam, entre outros fatores, responsáveis pela determinação do nível de suscetibilidade do inseto tratado. A hidrólise do cristal no intestino médio de uma larva suscetível a *B. thuringiensis* resulta na liberação das toxinas ativas, que por sua vez atuam

diretamente no epitélio intestinal ou passam para a cavidade do corpo e afetam os demais órgãos e sistemas além do intestino (Habib & Andrade, 1998).

2.4 Vírus entomopatogênicos

Os vírus são entidades não celulares, cujo genoma é ácido nucléico. Cada RNA ou DNA faz sua replicação dentro das células e usa o conteúdo intracelular de materiais precursores e material para orientar a síntese de partículas especializadas (vírions). A descrição dos vírus era baseada somente nos sintomas, originando vários nomes descritivos de etiologia das doenças (Benz, 1987).

Os vírus são agentes entomopatogênicos que se caracterizam pela ação específica, embora tenha sido verificada certa atividade patogênica de vírus de uma espécie sobre inseto de outra espécie (Moscardi, 1986)

Os vírus de insetos e ácaros atualmente conhecidos estão representados por mais de vinte grupos (Tanada & Kaya, 1993). Entretanto, quando é considerada sua utilização no controle de pragas, o grupo dos baculovírus tem sido o mais estudado e empregado para tal fim.

Os vírus são patógenos com um tempo letal maior do que *B. thuringiensis* no controle das pragas. Alguns estudos têm mostrado que alguns podem ser carregadores de genes para produção de toxinas. O baculovírus (vírus de granuloses (VGs), e VPNs) tem potencial particular para o controle microbiano. Esses vírus são relativamente específicos ao hospedeiro e são encontrados em muitas pragas de importância econômica, principalmente lepidopteros. Eles geralmente requerem de 2 a 8 dias, ou mais, para causar a morte no hospedeiro. Sua persistência em solos é medida em anos (Thompson et al., 1981), mas na superfície foliar são inativados em dias ou em algumas horas (Podgwaite, 1985). São transmitidos horizontalmente por contaminação ambiental ou por ingestão, mas também é conhecida a transmissão mecânica por insetos vetores (Vinson & Iwantsch, 1980).

Alguns VPNs e VGs tem sido utilizados de forma inoculativa para o controle de pragas florestais (Podgwaite, 1985). Essas introduções têm suprimido parcialmente as populações de pragas. Presume-se que, em solos contaminados com vírus, a persistência no solo faz com que os corpos de inclusão viral (PIBs) persistam até a

população da praga retornar, com isso a população do vírus aumenta rapidamente (Fuxa & Tanada, 1987).

Recentemente fez-se a caracterização de um novo vírus isolado de *T. arnobia* (Nascimento et al., 2000) e estudou-se a sua patogenicidade. Por ser o primeiro registro de vírus isométrico infectando *T. arnobia*, o vírus foi citado como Thyrinteina arnobia vírus (TaV). O TaV apresenta partículas de 30 nm e partículas de 15 nm em diâmetro, que sugere a existência de um vírus satélite com peso molecular aproximado de 500 pb. Segundo Nascimento (2001), as partículas isométricas de 30 nm de diâmetro, encontradas nas suspensões de vírus e nos tecidos do intestino de lagartas, representam o TaV, e sugerem que este vírus pode pertencer à família Picornaviridae, juntamente com outros vírus descritos para outras espécies de insetos.

Partículas de 26 a 0 nm, semelhantes às encontradas em preparações purificadas do TaV, foram encontradas com frequência no epitélio do intestino de lagartas infectadas, mas não em lagartas sadias. As partículas foram também notadas no lúmen do intestino, junto as microvilosidades, e no citoplasma das células epiteliais do intestino, geralmente formando agregados paracristalinos (Nascimento, 2001).

2.4.1 Modo de ação do vírus entomopatogênico TaV

Os vírus penetram por via oral, pela ingestão dos poliedros, que contém os vírions. Assim, sua inoculação deve ser feita sobre o alimento do hospedeiro, seja ele natural (folha ou outra parte da planta) ou artificial (dieta artificial) (Moscardi, 1998).

Alves (1986), descreve que, em condições alcalinas ($\text{pH} > 7,5$) do mesêntero, os poliedros são dissolvidos, liberando os vírions, que em contato com as microvilosidades intestinais, liberam os capsídeos nas células epiteliais do intestino. Nessas células ocorre a “infecção primária”, caracterizada por multiplicação, sendo que as partículas recém formadas podem atingir outros tecidos suscetíveis do hospedeiro, onde ocorrerá a produção de grande quantidade de nucleocapsídeos e, posteriormente, a formação de cristais. Esta grande produção de cristais caracteriza a “infecção secundária”, provocando o rompimento da parede celular. Durante a infecção secundária ocorre a disseminação dos vírus, onde os insetos liberam grandes quantidades de poliedros através

dos líquidos regurgitados e dos excrementos pastosos, que representam importantes fontes de inóculo para outros insetos que vivem no mesmo habitat. Outra fonte de inóculo é o inseto morto, em estado de podridão, importante para a manutenção das epizootias. Moscardi (1986) cita o processo, desde a infecção até a morte da lagarta, dura em média de 6 a 7 dias.

Rueckert (1996), assinala que, para os vírus da família Picornaviridae, a replicação ocorre no complexo associado com a membrana citoplasmática. O início da infecção ocorre com a ligação do vírion ao receptor específico, encaixado na unidade da membrana plasmática. A RNA transferase desencadeia o processo de transcrição do RNA viral no genoma da célula hospedeira. O RNA viral liberado passa atuar junto ao ribossomo, induzindo a formação da RNA transferase.

Nascimento (2001) descreve, que aparentemente, a infecção pelo TaV se limita ao epitélio do intestino, embora mais exames devam ser requeridos para confirmar este fato. A presença dos corpos multivesiculares (CMV's) representa uma característica marcante da infecção pelo TaV, e as vesículas em seus interiores podem representar o sítio de replicação do RNA viral.

2.4.2 Controle microbiano utilizando vírus entomopatogênicos

Uma das primeiras tentativas de utilização de vírus para o controle de insetos ocorreu em 1942, com a introdução de um vírus de poliedrose nuclear (VPN) em populações de *Lymantria monacha* (Lepidoptera: Lymantriidae) em florestas de *Pinus* na Alemanha (Huber, 1986).

Outro exemplo de utilização de vírus no controle de praga florestal é o VPN de *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lasiocampidae), praga de coníferas na América do Norte. Este vírus foi registrado em 1976 nos EUA, com o nome comercial de TM Biocontrole, no Canadá com o nome de Virtuss (Moscardi, 1998).

A infecção poliedral de um vírus de poliedrose nuclear na lagarta desfolhadora *Hyblaea puerea* (Cram) (Lepidoptera: Hyblaeidae) em florestas de *Pinus*, foi reportada por Beeson (1961) e por Sarma (1993), citados por Ahmed (1995) e encontraram que o vírus é altamente específico a seu hospedeiro.

Smirnoff et al. (1977) citam que larvas mortas de *Glena bisulca* Ringe (Lepidoptera: Geometridae), um sério desfolhador de *Cupressus lusitanica*, foram

coletadas na Colômbia durante o inverno de 1975, estando infectadas com um vírus de granulose.

Cunningham (1990) menciona que larvas de himenópteros desfolhadores de florestas, principalmente do gênero *Neodiprion*, incluindo *N. sertifer*, *N. lecontei* e *N. suanei* (Hymenoptera: Diprionidae) tem sido controladas através de vírus na América do Norte e na Europa. O VPN de *N. sertifer* é o mais utilizado, tendo sido registrado nos Estados Unidos em 1983 com a marca “Neocheck”. Um isolado do vírus foi produzido na Finlândia pela empresa Kemira OY, que até 1982 comercializou o VPN na região dos países escandinavos, para aproximadamente 9.000 ha de florestas. Na Inglaterra este VPN foi registrado como o nome de “Virox”.

O himenóptero *Neodiprion lecontei* é encontrado somente na América do Norte e tem como característica comum em relação à praga do pinheiro europeu (*N. sertifer*), o hábito gregário de suas larvas. *N. lecontei* é a principal praga das plantações de pinheiro vermelho, em Ontário e Quebec. Um extenso programa foi criado para o desenvolvimento do VPN da praga no Canadá em 1976 e aplicações aéreas foram conduzidas entre 1976 e 1980, realizando-se testes de impacto ambiental (Cunningham, 1995).

O VPN de *Neodiprion sertifer* tem sido testado e utilizado em mais países do que outros baculovírus, e nos últimos 40 anos, pulverizações aéreas e terrestres têm sido conduzidas no Canadá, EUA, Alemanha, Reino Unido, Finlândia, Suécia, Noruega, Rússia, Áustria, Polônia, Iugoslávia e Itália (Cunningham, 1995).

Em 1978, o Serviço Florestal Americano obteve o registro do VPN de *L. dispar*, através da Agência de proteção Ambiental (EPA), com o nome de “Gypchek”. Nessa ocasião, 11.000 ha de florestas foram tratados entre os anos de 1978 e 1993. O produto é utilizado no Canadá, Europa e Estados Unidos (Reuveni, 1995).

Moscardi (1998) cita que o “Gypchek” está sendo produzido por empresas privadas mediante convênio com o Serviço Florestal Americano. Este bioinseticida foi aplicado em aproximadamente 3.880 ha de florestas nos EUA e no Canadá, entre 1976 e 1982 (Huber, 1986). Preparações comerciais desse VPN estão sendo utilizadas na China e na antiga União Soviética, onde foram aplicadas em 53.000 ha, em 1978.

Nas últimas três décadas, muitos estudos sobre vírus patogênicos a insetos têm sido desenvolvidos, na esperança de utilizá-los no controle de insetos-pragas.

Um vírus de poliedrose nuclear, usado no controle de *Anticarsia gemmatalis* em soja, é um exemplo bem-sucedido desses esforços (Alves, 1998)

Em 1983, uma formulação do VPN de *N. lecontei*, denominada Lecontvirus, foi registrada no Canadá. Este vírus foi produzido em campo, através de aplicações em florestas de pinheiro altamente infestadas pelo inseto; as larvas moribundas foram coletadas e congeladas para posterior, moagem, liofilização e formulação (Reuveni 1995; Cunningham, 1990).

Cunningham (1995) relata que, entre 1971 e 1983, em florestas de *Pinus* do Canadá, as lagartas dos ponteiros *Choristoneura fumiferana*, *C. occidentalis* e *C. pinus* foram controladas através da aplicação de VG.

No Brasil, Alves (1986) cita a ocorrência de algumas viroses em pragas de florestas, com destaque para o VPN e para o VG (vírus de granulose) de *T. arnobia*, ocorrendo em condições de campo e de laboratório.

Num trabalho realizado por Nascimento et al. (2000) através de observações de lagartas mortas de *T. arnobia*, em microscópio eletrônico, encontraram a presença de um vírus isométrico morfologicamente similar a outros vírus pertencem a família Picornaviridae. Foi feita a purificação das partículas do vírus, para uso posterior da suspensão e avaliar a suscetibilidade de diferentes instares larvais a infecção do vírus. Os autores concluíram que todos os instares larvais foram suscetíveis ao vírus e morreram entre 7 a 9 dias após da inoculação.

Cunningham (1995) relata que, no Canadá, o primeiro surto sério de *L. dispar* ocorreu em Ontário no ano de 1981. Em 1992, 63 ha foram pulverizados com “Gypchek” proveniente do Serviço Florestal do Canadá, através do Serviço Florestal Americano. As pulverizações foram realizadas quando as larvas estavam se alimentando ativamente, sendo que o intervalo entre duas aplicações foi de 3 a 5 dias. O uso de VPN é preferido ecologicamente em áreas sensíveis, onde *B. thuringiensis* pode ter um impacto em lepidópteros não alvos.

A produção de vírus entomopatogênicos vem evoluindo a partir da década dos 60, graças a avanços em outras áreas da ciência, como a criação de insetos em dietas artificiais e a cultura de células de insetos (Moscardi, 1998).

Para produção inicial do vírus em larga escala este pode ser obtido de insetos infectados a campo ou em laboratórios especializados. Outro aspecto de importância na produção é a idade e o tamanho do hospedeiro. A máxima conversão de

células em partículas virais é obtida quando são usados insetos que se apresentam bem desenvolvidos. Quando a quantidade de biomassa disponível para o vírus é maior (Moscardi, 1998). O mesmo autor recomendou para a produção de *B. anticarsia* a utilização do hospedeiro entre o quarto e o quinto ínstar, quando se obtém maior quantidade de inóculo.

Em diferentes experimentos tem-se demonstrado que a inoculação inundativa tem controlado *Oryctes rhinocerus* (Entwise, 1986, citado por Fuxa, 1987), *Trichoplusia ni*, *Pieris rapae*, *Orgyia pseudotsugata* e *Malacosoma disstria* (Ignoffo, 1985). O tempo de geração dos vírus quando aplicado em inoculação inundativa é rápido. Por exemplo, três gerações de VPN de *O. pseudotsugata* podem ser produzidas durante uma geração do inseto hospedeiro (Harper, 1987, citado por Fuxa, 1987).

Novas estratégias têm sido investigadas frequentemente para os vírus. A auto-disseminação tem sido usada para distribuir o vírus dentro da população do hospedeiro (Gard & Falcon, 1978).

A determinação da dosagem de vírus entomopatogênicos tem sido discutida por vários autores (Pinnock, 1975; Evans, 1981; Ignoffo & Couch, 1981; Moscardi, 1986; Jaques, 1990), com base na população do hospedeiro e na produtividade.

2.5 Influência da temperatura de desenvolvimento e do pH da calda a vírus e *B. thuringiensis*

2.5.1 Vírus

2.5.1.1 Temperatura

A temperatura pode influenciar a eficiência de vírus em campo de várias formas: a) aumentando o tempo letal do vírus em condições de temperaturas médias mais amenas; b) inibição do processo infeccioso tanto em temperaturas elevadas como em baixas, com o grau de influência variando com o sistema vírus-hospedeiro-planta envolvido (Jaques, 1977, Benz, 1987). Tanto o VG de *Pieris rapae*, a 36°C, como o VPN de *Trichoplusia ni* a 39°C, tiveram sua multiplicação inibida nesses hospedeiros (Tanada, 1963). O mesmo foi observado com o VPN de *Heliothis* spp. (Ignoffo & Couch, 1981). McLeod et al.(1977) observaram que um aumento da temperatura de 15 para 30°C não

resultou em efeitos substanciais na atividade do VPN de *H. zea*, mas houve redução significativa na mortalidade do inseto quando a temperatura aumentou para 45°C. Johnson et al. (1982) mostraram que a temperatura ótima para o desenvolvimento do AgNPV da lagarta-da-soja (*A. Gemmatalis*) foi de 30°C. Entretanto, houve inibição da eficiência tanto a 10°C como a 40°C. No Brasil, em regiões de temperatura média mais baixa, tem sido observado um aumento do TL₅₀ desse vírus, além de evidências de menor mortalidade da lagarta-da-soja (Moscardi, s.d.). Este fato reforça a necessidade de procurar isolados regionais para serem utilizados em áreas com características ecológicas especiais (Moscardi, 1998).

Devido à íntima relação fisiológica entre vírus e as células do hospedeiro, torna-se difícil distinguir o efeito da temperatura sobre as células do inseto daquele provocado sobre o vírus (Benz, 1987). Segundo Tanada (1963), a inibição viral em temperaturas baixas ou elevadas pode estar relacionada ao efeito sobre a taxa de alimentação do inseto ou sobre o mecanismo de infecção do vírus no hospedeiro, bem como um aumento da imunidade celular e humoral, em resposta a taxas metabólicas altas ou baixas do inseto. Apesar das evidências quanto ao efeito da temperatura sobre os vírus entomopatogênicos, esse aspecto necessita ser mais bem estudado, principalmente em condições de campo.

A eficiência de vírus em campo pode ser afetada significativamente pelo substrato onde esses agentes são depositados, variando em função da planta hospedeira e sua arquitetura, do local de deposição do patógeno e das substâncias antimicrobianas presentes nos vegetais (Moscardi, 1998).

2.5.1.2. pH

Revisando a literatura sobre as características físico-químicas das águas do Estado de São Paulo, encontrou-se que os níveis de pH variam entre os níveis ácido e alcalino. Em 52 reservatórios artificiais de água em todo o Estado de São Paulo, Tundisi (1981) verificou que o pH variava de 5,49 a 7,93.

A maioria dos estudos onde avalia-se a influência das diferentes faixas do pH em produtos destinados ao controle de pragas, têm sido feitos em insecticidas e muito poucos em bioinsecticidas, não entanto tem sido avaliada a influência deste fator na eficiência deles. Por exemplo informações quanto à ação do pH sobre a estabilidade de

defensivos agrícolas foram encontradas, como a de Reeves (1983), afirmando que águas com altos níveis de pH podem provocar hidrólise alcalina dos produtos e que os inseticidas são mais suscetíveis a esta hidrólise do que os fungicidas, herbicidas e reguladores de crescimento.

No final dos anos 80, após frequentes insucesso no controle do ácaro da leprose com a utilização de produtos até então tidos como eficientes, começou-se a especular sobre a possibilidade de o pH das caldas utilizadas nas aplicações estar interferindo, de forma negativa, na ação desses produtos (Almeida, 1990).

Igualmente acredita-se que o pH pode influir na eficiência dos bioinseticidas, já que podem afetar a estrutura celular tanto dos vírus quanto das células.

Alguns trabalhos têm demonstrado que substâncias presentes em vegetais podem contribuir para a perda de atividade de vírus. Andrews & Sikorowski (1973) observaram que o VPN de *Heliothis* spp. foi desativado durante a noite, devido ao orvalho formado sobre as folhas de algodão, que resultava numa suspensão alcalina (pH 9,6 a 10,1). Esse fator pode estar relacionado com a menor persistência da atividade do VPN de *Heliothis* em folhas de algodão do que em folhas de soja e tomate (Young & Yearian, 1974). Esses efeitos adversos devem ser cuidadosamente analisados no desenvolvimento de vírus como inseticida microbiano.

2.5.2 *Bacillus thuringiensis*

2.5.2.1 Temperatura

Quando se usa *B. thuringiensis*, com a finalidade de controle de larvas de lepidópteros o sucesso é determinado por um conjunto de fatores ecológicos, fisiológicos e moleculares. A determinação de uma dose eficaz, através da ingestão de folhas ou outras estruturas pulverizadas é o primeiro passo. As delta-endotoxinas são convertidas pelas proteases do intestino em toxinas ativadas as quais destroem as células epiteliais do mesêntero. A destruição de células do mesêntero é seguida pela multiplicação de células bacterianas. (Heimpel & Angus, 1959). Muitos desses processos são dependentes da temperatura e ainda não é bem compreendido como a temperatura influi na ação de *B. thuringiensis*. São muitos os trabalhos que vêm sendo realizados com a finalidade de

avaliar a influência das diferentes condições ambientais sobre a virulência de *B. thuringiensis*.

Frankenhuyzen (1990), em um estudo feito para avaliar o efeito da temperatura de *B. thuringiensis*, no controle de *Choristoneura fumiferana*, determinou que a temperatura teve efeito na progressão da mortalidade e que o pico da mortalidade ocorreu rapidamente com o incremento na temperatura de 13 a 25°C.

Em experimentos prévios com a lagarta dos ponteiros do abeto, *Choristoneura fumiferana*. (Lepidoptera: Tortricidae), Frankenhuyzen (1994), examinou como a temperatura afetou a determinação de uma dose eficaz de *B. thuringiensis* e a expressão dessa dose. Concluiu que a temperatura não teve influência na mortalidade acumulada das larvas foi exposta ao patógeno, tanto em dieta artificial como em acículas pulverizadas. Porém, a temperatura teve um pronunciado efeito na progressão da mortalidade. Observou-se que o tempo requerido para alcançar 50% da mortalidade decresceu de poucas semanas a 3°C a poucos dias a 25°C. Foi discutido que o aumento do crescimento das células bacterianas na temperatura mais alta poderia ser responsável pela morte mais rápida e se determinou que os esporos têm um papel relevante na toxicidade de *B. thuringiensis* no controle de *C. fumiferana*, por mostrar que a progressão na mortalidade está diretamente correlacionada com a proliferação de células bacterianas em larvas infestadas em várias temperaturas.

2.5.2.2. pH

Poucos estudos tem sido feitos visando avaliar a influência do pH na atividade das d-endotoxinas. A toxicidade da protoxina é relativamente estável em pH entre 2-3 a 11-12, fora desta faixa de pH a inativação é rápida e irreversível (Angus, 1956; Nishiitsutsuji-Uwo et al., 1977). Com a faixa de estabilidade, contudo, tem sido difícil avaliar a importância do pH para a atividade da toxina por obrigações experimentais imposta por ambos sistemas *in vivo* e *in vitro*. Em bioensaios geralmente passados alguns dias, permitem um pequeno controle sob o pH das soluções da toxina seguido pela ingestão. Em bioensaios *in vitro* normalmente restringem o pH a uma limitada faixa perto da neutralidade devido aos requerimentos das células. A faixa ótima do pH para linhas de células de Lepidoptera é de 6,0 a 7,0 (Sohi, 1980). A acidificação da suspensão da toxina por alguns preceitos prévios aos ensaios *in vitro* poderiam atuar sobre as propriedades

citotóxicas das moléculas da toxina. De fato, Johnson (1981) e Yunovitz et al. (1987) indicaram que tal tratamento pode reduzir a toxicidade.

In vitro, a ativação da toxina é feita em pH alcalino e adicionando enzimas proteolíticas (Cooksey, 1971; Huber and Lüthy, 1981; Fast, 1981). O uso do suspensões líquidas de células para ensaios, ativando a toxina *in vitro* precisa da neutralização do pH da solução de toxinas para prevenir que a alcalinidade rompa as células.

Gringorten et al. (1992), num estudo feito para avaliar a supressão da atividade da δ -endotoxina de *B. thuringiensis* por efeito da redução do pH, observaram que reduzindo a alcalinidade do pH de 10,5 a 8, na preparação da enzima ativada de δ -endotoxina de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, suprimiu-se a sua toxicidade. Determinaram que possivelmente o efeito está relacionado à protonação dos resíduos de tirosinas quando o pH é reduzido ou uma alteração total na cadeia molecular causada geralmente pela alta alcalinidade do meio intestinal dos insetos é importante não somente por a solubilização e digestão da proteína cristal de *B. thuringiensis*, se não pela completa expressão da atividade da toxina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu.

3.1 Criação e Manutenção

Os ovos de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) foram obtidos de uma criação em dieta artificial, conduzida no laboratório de Entomologia do Departamento de Produção Vegetal da FCA/UNESP, Campus de Botucatu.

Nessa criação, adultos de *T. arnobia* foram mantidos no interior de tubos de PVC de 20,0 cm de altura e 10,0 cm de diâmetro, forrados com papel jornal e tampados nas extremidades com placas de Petri de vidro de 20 cm de diâmetro. As posturas foram desinfectadas para evitar contaminação por microrganismos patogênicos (Wilcken et al., 1992). Após a desinfecção, foram colocadas em copos plásticos, sendo mantidas em condições controladas (temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 13 horas).

Após a eclosão, as lagartas, em número de 5, foram repassadas para tubos de fundo chato com 8,5 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, contendo dieta artificial proposta por Wilcken (1996).

As lagartas foram mantidas nessas condições até atingirem o 3º instar, quando foram individualizadas e repassadas para outro tubo, também contendo a mesma dieta artificial, até alcançarem o estágio de pupa.

Assim que atingiram o estágio de pupa, dentro dos tubos de dieta, essas foram retiradas com pinça, sendo colocadas em placa de Petri, onde foi adicionada uma solução de sulfato de cobre a 5 % quantidade suficiente para deixá-las submersas, ficando nessa situação por poucos segundos para sua desinfecção. Após isso, as pupas foram retiradas da placa e colocadas sobre uma folha de papel toalha, para a remoção do excesso da solução de sulfato de cobre. Após a secagem, as pupas foram repassadas aos tubos de PVC conforme descrito anteriormente.

3.2 Purificação do vírus

O vírus foi purificado com a finalidade de avaliar a presença das partículas virais nas lagartas infectadas que seriam usadas para o bioensaio, e ter a segurança de não apresentar a presença de nenhum outro patógeno agindo. Para a purificação do vírus foram maceradas lagartas mortas pelo patógeno e misturadas com solução tampão fosfato (KH_2PO_4 e Na_2HPO_4) 0,1 M, pH 7,1; 10 ml/g de tecido de lagarta, de acordo com a metodologia de purificação desenvolvida Nakashima et al. (1998); adaptada por Williamson von Wechmar (1992). A suspensão viral foi coada em gaze e em seguida filtrada em celite “diatomaceous earth” e centrifugada a 10.000 g (8.000 rpm, em centrífuga mod. Sorvall ss-4, rotor ss 34) por 20 minutos. O sobrenadante foi centrifugado em colchão de sacarose a 100.000 g (29.500 rpm, em centrífuga mod. Beckman L8-60M, rotor T30) por duas horas. O precipitado foi dissolvido em solução tampão fosfato, pH 7,1, e adicionado em gradiente de cloreto de cério (CsCl) a 34 % e centrifugado a 150.000 g (39.500 rpm, em centrífuga mod. Beckman L8-60M, rotor SW41) por 16 horas, conforme metodologias de Nascimento (2001), adaptada de Chao et al. (1983), Chao et al. (1986) e Nakashima et al. (1998). A banda formada no gradiente de cloreto de cério foi coletada e armazenada. Foi realizada diálise em solução tampão fosfato 0,1 M, diluído em 10 vezes, ou seja, 150 ml de tampão fosfato 0,1 M para 1350 ml de água destilada, a 4°C por 18 horas, com trocas da solução tampão cada 6 horas, utilizando-se membrana de celulose com uma porosidade de 25 Å. Em seguida, o vírus purificado concentrado foi coletado e armazenado em freezer a -20°C. Este procedimento foi utilizado para posterior

multiplicação do vírus, sendo infestadas lagartas de *T. arnobia* do quinto instar, sendo feitas observações diárias até o aparecimento da fase final de sintomas por contaminação pelo TaV. Essas lagartas contaminadas foram mantidas em refrigeração até sua utilização no teste.

3.3 Multiplicação do vírus

Lagartas de *T. arnobia* infectadas com vírus provenientes do estoque de lagartas coletadas nas áreas de *Eucalyptus grandis* nas regiões de Botucatu e Itatinga, SP (1995), e de Lençóis Paulista, SP (1996), foram coletadas durante surtos ocorridos nestas localidades, para experimentos realizados anteriormente avaliando e caracterizando o TaV, sendo levadas ao laboratório para armazenamento em freezer, a temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, objetivando-se a multiplicação do vírus.

Dez lagartas contaminadas de *T. arnobia*, de 4º e 5º instares, foram descongeladas e, em seguida, maceradas em pistilo e gral, adicionando-se gradativamente 20 mL de água esterilizada. A suspensão obtida foi filtrada, em papel-filtro, e após isso foram adicionados mais 80 mL de água esterilizada e 1 mL de espalhante adesivo “tween 20”.

Para a multiplicação do vírus lagartas de *T. arnobia* de 4º e 5º instares, provenientes da criação de estoque mantida em laboratório, em lotes de 100 insetos, foram transferidas de tubos de vidro contendo dieta artificial, para placas plásticas de 6 cm de diâmetro x 2 cm de altura.

Folhas de *E. grandis*, foram oferecidas às lagartas durante um período de 24 horas, sendo as folhas lavadas e desinfestadas com hipoclorito de sódio, nessa fase de adaptação ao novo alimento. No dia seguinte, folhas tratadas com a suspensão viral foram oferecidas às lagartas. A aplicação do vírus foi realizada com uma micropipeta, sendo pipetados 100 μl da suspensão viral em cada folha. Em seguida, o vírus foi espalhado sobre a superfície de cada folha com um pincel, sendo as mesmas deixadas secando ao ar livre, antes de serem oferecidas às lagartas. A troca de alimento foi realizada a cada dois dias, oferecendo-se novas folhas, não infectadas com o vírus.

3.4 Avaliação da temperatura de desenvolvimento na virulência do TaV e de *Bacillus thuringiensis*

A virulência do TaV e do *B. thuringiensis* foi avaliada sob quatro temperaturas em lagartas de 3^o e 5^o instar. As temperaturas testadas foram: 18, 22, 26 e 30°C. As lagartas foram mantidas em dieta artificial até aos ínstaes desejados, à temperatura de 25 ± 1°C e fotofase de 13 horas. 24 h antes do oferecimento das folhas tratadas, as lagartas foram retiradas da dieta e foram alimentadas com folhas de *Eucalyptus grandis* para que as lagartas se acostumassem com o novo alimento.

As lagartas de *T. arnobia* foram acondicionadas individualmente em placas plásticas de 6 cm de diâmetro e 2 cm de altura. Para cada lagarta foi oferecida uma folha de *E. grandis* tratada com o TaV e com *B. thuringiensis*. Posteriormente, foram levadas a uma câmara climatizada tipo BOD, onde foram submetidas às diferentes temperaturas.

A escolha de *E. grandis* como alimento deve-se aos resultados encontrados por Wilcken (1996), que verificou que *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. grandis* e *E. cloeziana* oferecem condições favoráveis para o desenvolvimento e reprodução de *T. arnobia*. Além disso, *E. grandis* é também a espécie de eucalipto mais plantada no Brasil.

No teste foram utilizadas lagartas jovens de *T. arnobia* (3^o instar) e lagartas mais desenvolvidas (5^o instar), tendo assim avaliações para 2 estágios de desenvolvimento da praga, avaliando-se qual dos estágios estudados é mais suscetível ao vírus. Cada tratamento foi composto por 50 lagartas de cada instar estudado, tendo-se um total de 600 lagartas para cada instar avaliado.

Para a diluição do produto a base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel PM), trabalhou-se com a dose equivalente de 500 g/ha do produto comercial (27,5 bilhões de esporos viáveis/g), sendo feita a pulverização nas folhas.

Para a pulverização tanto do TaV quanto de *B. thuringiensis* foi utilizado um pulverizador manual, Super 4, da Guarany, o qual tem uma pressão de trabalho de 690 k Pa (100 psi), capacidade de 5 L, uma vazão de 1,1 L/min (0,29 gal/min) e ponta de jato cônico contínuo e com um diâmetro de 1,2 mm (0,468") de diâmetro. Para realizar as pulverizações se delimitou uma área de 10 m².

O vírus TaV foi obtido de lagartas de *T. arnobia* previamente infectadas e mantidas no laboratório em freezer (-20°C), sendo pulverizado o vírus em sua forma impura (suspensão coada de lagartas mortas pelo vírus e maceradas em água).

As folhas utilizadas para serem pulverizadas para oferecer posteriormente as lagartas foram coletadas no arboreto da FCA/UNESP (Botucatu, SP). As folhas foram lavadas com água, para, posteriormente, serem pulverizadas com o TaV e *B. thuringiensis*.

A dose de TaV utilizada nos experimentos foi equivalente a 50 g de lagartas infectadas/ha, dose sugerida como eficiente no controle da praga por Orlato (2002). As lagartas foram diluídas em água esterilizada sendo também pulverizadas em folhas de *E. grandis*.

As avaliações foram feitas diariamente registrando-se o início dos sintomas de contaminação e a mortalidade das lagartas. Também avaliou-se o tempo transcorrido em cada uma das diferentes temperaturas, até a morte das lagartas ou até 20 dias de observação, que foi considerado como tempo máximo para o efeito dos patógenos.

3.5 Avaliação do pH da água de pulverização na virulência do TaV e de *Bacillus thuringiensis*

O efeito do pH da água de pulverização na virulência do TaV e do *B. thuringiensis* foi avaliado sobre lagartas de *T. arnobia*.

Os experimentos também foram realizados com lagartas de 2 estágios de desenvolvimento distintos, de 3^o e de 5^o ínstars. As lagartas de *T. arnobia* foram acondicionadas individualmente em placas plásticas de 6 cm de diâmetro e 2 cm de altura. O preparo, as doses e a aplicação de TaV e de *B. thuringiensis* foram as mesmas descritas no item anterior.

Para avaliar a influência do pH, foi utilizada a solução tampão de McIlvaine (Fosfato dissódico- ácido cítrico) tomando o método de preparação de ácido cítrico (0,1 M) e Na₂HPO₄ (0,1M). (Morita & Assumpção, 1998) (tabela 1).

Para fazer a solução de C₆H₈O₇ (0,1 M), dissolveu-se 21 g de ácido cítrico em água e completou-se até o volume de 1 litro. Já para o Na₂HPO₄ (0,1 M) (Fosfato

dissódico), dissolveu-se 17,814 g de Na_2HPO_4 em água e completou-se até o volume de 1 litro.

Dessas soluções, anteriormente preparadas, foram tomadas diferentes quantidades e foram misturadas até se atingir o pH desejado, trabalhando-se para cada aplicação de 2 L de calda a pulverizar, na área de 10 m².

Para medir o pH das diferentes caldas utilizou-se um medidor do potencial hidrogeniônico de bancada, da marca DIGIMED, modelo M20.

Tabela 1. Doses para preparação das diferentes concentrações de pH

| pH | Na_2HPO_4 0,1 M (ml) | Ácido Cítrico 0,1 M (ml) |
|-----------|--|---------------------------------|
| 5,0 | 10,30 | 9,70 |
| 6,0 | 12,63 | 7,37 |
| 7,0 | 16,47 | 3,53 |
| 8,0 | 19,45 | 0,55 |

Foram preparadas 4,0 L de cada uma das soluções de pH conhecido (5,0; 6,0; 7,0 e 8,0), preparou-se 4 L, reservando-se 2,0 L para as diluições do vírus (TaV) e o mesmo volume para *B. thuringiensis*.

As folhas oferecidas às lagartas testemunhas também foram pulverizadas com cada uma das soluções de pHs testados e oferecidas posteriormente às lagartas, estando totalmente livres de entomopatógenos.

Os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada (temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: 70 ± 10 % e fotofase de 13 horas). Os dados foram coletados diariamente, avaliando-se o efeito da virulência do TaV e do *B. thuringiensis* submetidos as condições acima descritas.

As avaliações foram diárias, registrando-se a mortalidade das lagartas até um máximo de 20 dias de avaliação.

3.6 Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos no delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t (LSD) ao nível de 5% de probabilidade. A análise de variância foi efetuada no DIC em esquema fatorial 4x3, 4 temperaturas e 4 pH sendo avaliados e 3 tratamentos (lagartas testemunhas, lagartas infectadas com vírus e lagartas infectadas com *B. thuringiensis*), com 10 repetições de 5 lagartas cada uma, sendo 150 para cada tratamento, avaliando-se um total de 600 lagartas, para cada experimento. A variável avaliada foi a mortalidade total das lagartas, tendo-se uma mortalidade acumulada. As observações foram feitas diariamente, porém, para fazer a análise estatística consideraram-se os dias 4, 6, 8, 10 e 15, fazendo-se para cada dia uma avaliação individual para cada tratamento. Os dados foram transformados utilizando-se a raiz quadrada de $x + 1$. Para visualização dos resultados os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott, fazendo-se também uso da mortalidade corrida a qual é a diferença entre os dados das lagartas testemunhas e os tratamentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da temperatura de desenvolvimento sobre o TaV e *B. thuringiensis*

4.1.1. Em lagartas de 3^o. instar de *T. arnobia*

Aos 4 dias após a aplicação, iniciou-se o efeito letal dos entomopatógenos estudados para as lagartas de 3^o. instar, com diferenças significativas sendo observadas nas temperaturas de 26°C, para o *B. thuringiensis* e de 30°C para o *B. thuringiensis* e para o TaV. Nas temperaturas de 18 e 22°C não foi verificada diferença significativa das lagartas infectadas no quarto e sexto dia após a inoculação (tabela 2).

Aos 6 dias, observou-se um aumento da mortalidade em relação ao 4^o.dia, nas temperaturas de 26 e 30°C nos diferentes tratamentos.

Mortalidade significativa nas temperaturas mais baixas (18 e 22°C) só foi detectada a partir do 8^o. dia após o tratamento, para as lagartas de 3^o. instar infectadas com *B. thuringiensis* e no 15^o. dia para as lagartas tratadas com o TaV (tabela 2).

Por outro lado, as temperaturas mais altas sempre aceleraram o efeito dos patógenos, principalmente para o *B. thuringiensis*, que atingiu alta taxa de mortalidade (acima de 80 %) aos 6 dias (fig. 3). Para o TaV, verificou-se alta mortalidade aos 6 dias apenas quando as lagartas de *T. arnobia* foram mantidas à temperatura de 30°C (fig. 2).

O *B. thuringiensis* mostrou seu efeito letal a partir dos 4 dias após o tratamento, mesmo para lagartas de 3^o. instar. Estes resultados concordam com os obtidos por Wilcken et al. (1992), que verificaram uma mortalidade expressiva para lagartas de *T.*

arnobia, a partir dos 3 dias após aplicação, para a dose de 500 g/ha do produto comercial , à temperatura de 26,3°C.

Tabela 2: Mortalidade média acumulada de lagartas do 3º instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e *B. thuringiensis*, em diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 %; fotofase: 13h).

| | Temp. | TaV (% Mortalidade) | B.t. (% Mortalidade) | Testem. (% Mortalidade) | CV | DMS a 5% |
|----------------|-------|------------------------|-------------------------|----------------------------|--------|-------------|
| 4 dias | 18°C | 0,0 a A | 0,1 a AB | 0,0 a A | 10,48% | 0,24 |
| | 22°C | 0,0 a A | 0,0 a A | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,0 a A | 0,3 b B | 0,0 a A | | |
| | 30°C | 0,5 b B | 0,6 b C | 0,1 a A | | |
| 6 dias | 18°C | 0,1 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | 9,07% | 0,22 |
| | 22°C | 0,1 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,1 a A | 0,8 b B | 0,1 a A | | |
| | 30°C | 0,9 b B | 0,9 b B | 0,2 a A | | |
| 8 dias | 18°C | 0,1 ab A | 0,3 b A | 0,0 a A | 9,24% | 0,24 |
| | 22°C | 0,3 b A | 0,5 c A | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,3 b A | 0,9 c B | 0,1 a AB | | |
| | 30°C | 0,9 b B | 1,0 b B | 0,3 a B | | |
| 10 dias | 18°C | 0,1 a A | 0,4 b A | 0,0 a A | 8,74% | 0,23 |
| | 22°C | 0,6 b B | 0,9 c B | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,7 b B | 0,9 b B | 0,1 a AB | | |
| | 30°C | 1,0 b C | 1,0 b B | 0,3 a B | | |
| 15 dias | 18°C | 0,4 b A | 0,9 c A | 0,1 a A | 7,47% | 0,21 |
| | 22°C | 1,0 b B | 1,0 b A | 0,2 a AB | | |
| | 26°C | 0,9 b B | 1,0 b A | 0,3 a AB | | |
| | 30°C | 1,0 b B | 1,0 b A | 0,4 a B | | |

Obs: Médias seguidas por letras iguais [minúscula para entomopatógenos (linha) e maiúscula para pH (coluna)] não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados em raiz quadrada de $x + 1$.

Quanto ao TaV, verificou-se que apresenta uma mortalidade alta a partir dos 6 dias apenas na temperatura de 30°C, enquanto que na temperatura de 26°C, a mortalidade expressiva só foi observada entre o 10 e 15º. dias, concordando com os resultados obtidos por Orlando (2002), que determinou o tempo letal do TaV em lagartas de *T. arnobia* , em, aproximadamente, 13 dias, numa temperatura de 25 ± 1 .

Quando se observam os dados transformados em porcentagem de mortalidade, tem-se uma melhor visualização dos resultados (figuras 1 a 5).

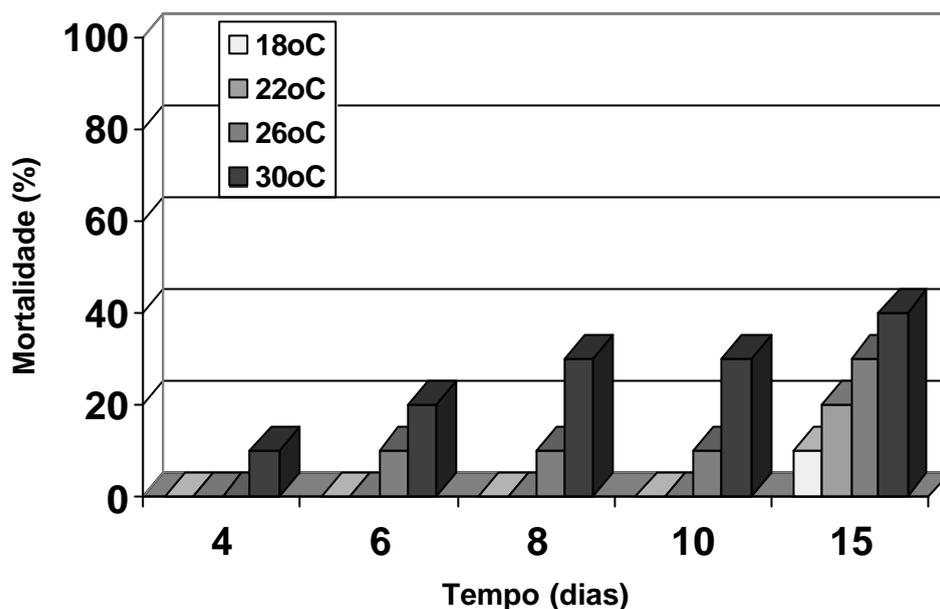


Figura 1. Mortalidade (%) média de lagartas 3^o instar de *T. arnobia* do tratamento testemunha e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR= 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Apesar de todo o cuidado nas avaliações, uma pequena mortalidade inicial ocorreu nas lagartas da testemunha, sendo mais expressiva naquelas mantidas à temperatura de 30°C, atingindo o máximo de 40 % de mortalidade aos 15 dias de avaliação (figura 1). A mortalidade nesta temperatura era prevista, pois *T. arnobia* tem como ótimo de desenvolvimento a temperatura de 25°C (Peres Filho, 1989), com temperaturas acima de 30°C sendo consideradas desfavoráveis ao inseto.

Quanto ao efeito da temperatura sobre o TaV, verificou-se que a temperatura de 30°C foi a mais adequada para causar uma alta mortalidade de lagartas de 3^o. instar, acima de 80 %, a partir dos 6 dias (figura 2).

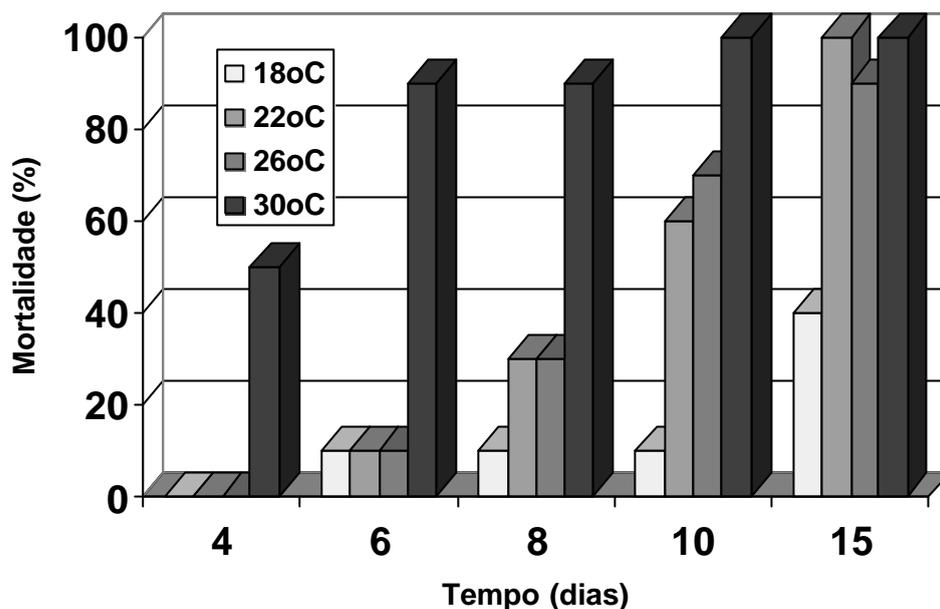


Figura 2. Mortalidade (%) média de lagartas 3^o instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Entretanto, quando se corrigiu a mortalidade, descontando-se a mortalidade natural ou devido ao manuseio das lagartas, verificou-se que a mortalidade máxima atingiu 80%, na maior temperatura, aos 10 dias e que foi menor no 15^o. dia de avaliação, sendo comparável à mortalidade nas temperaturas de 22 e 26°C (figura 3).

No geral, observou-se que a temperatura de 30°C foi a que mais acelerou o efeito letal do TaV, demonstrando que o período mais adequado de sua utilização no campo, provavelmente, seria nos meses mais quentes, de outubro a fevereiro, para a região de Itatinga, SP, onde se concentraram os surtos desta praga no estado de São Paulo (Wilcken, 1996). Além disso, o TaV é mais promissor nas regiões florestais de temperatura média mais elevada, como nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte do Brasil.

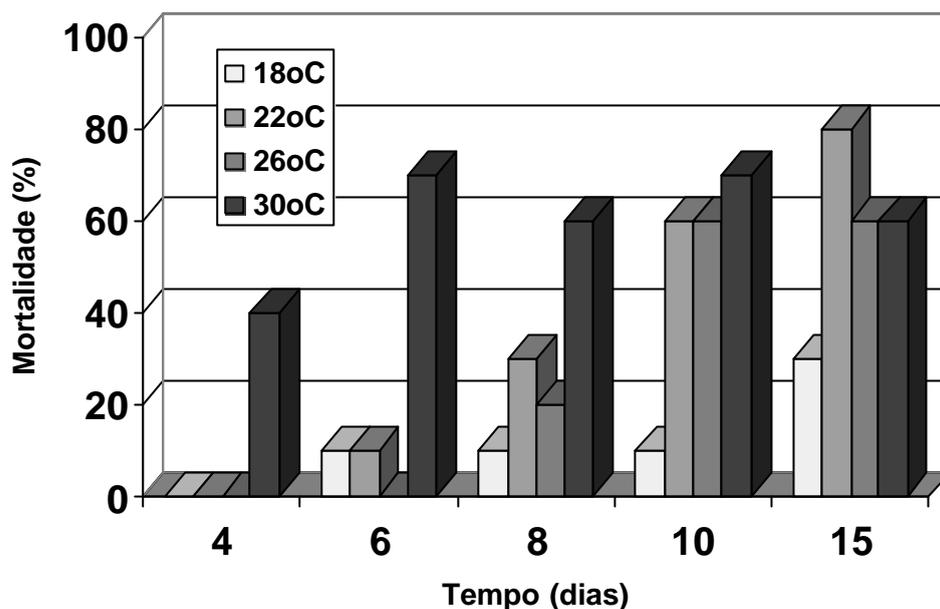


Figura 3. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas ♂ instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Outro ponto importante é que, para multiplicação e, conseqüentemente, maior produção de partículas de vírus, o ideal é manter as lagartas infectadas em temperaturas acima de 26°C, com evidente rapidez na produção do TaV.

Com relação ao *B. thuringiensis*, verificou-se inicialmente que as temperaturas de 26 e 30°C foram as que causaram maiores mortalidades, apesar de que, no 15.º dia, a mortalidade foi alta (acimade 80%), independente da temperatura (tabela 2, figura 4).

Novamente, foi observado que a maior temperatura aumentou a virulência mas, considerando a mortalidade corrigida, verificou-se que a temperatura de 26°C produziu efeitos comparáveis aos obtidos à 30°C, a partir dos 6 dias. Além disso, mesmo a temperatura de 22°C proporcionou alta mortalidade, após 10 dias da aplicação (figura 5).

A temperatura de 18°C foi limitante para a ação do *B. thuringiensis*, retardando sobremaneira o processo infectivo e, conseqüentemente, a morte das lagartas.

Assim, nos meses de menor temperatura do ano (de abril a agosto) , período onde ocorrem os principais surtos de *T. arnobia* na região Sudeste (Anjos et al., 1987; Peres Filho, 1989) , o *B. thuringiensis* seria o entomopatógeno mais adequado para utilização no campo, em relação ao TaV.

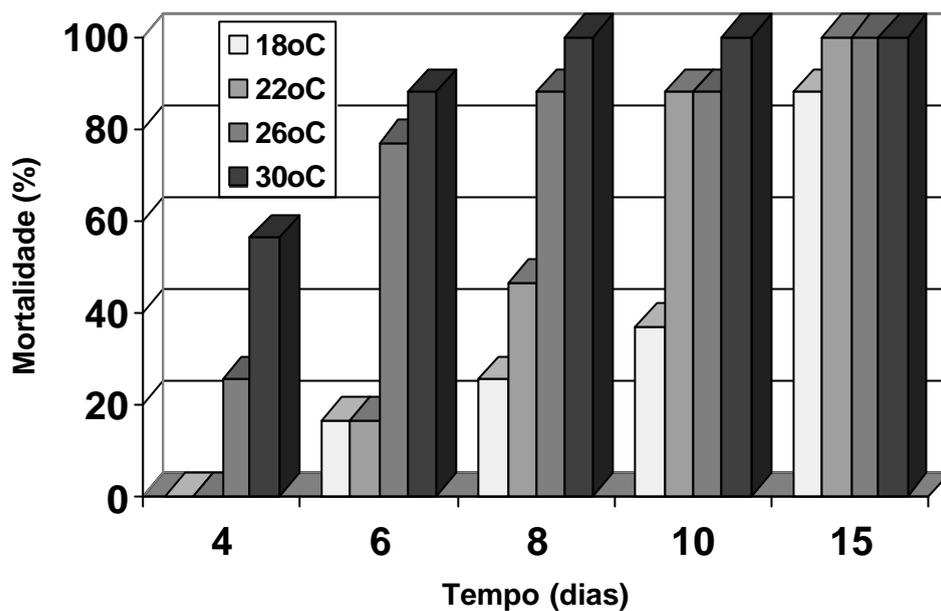


Figura 4. Mortalidade (%) média de lagartas 3^a instar de *T. arnobia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

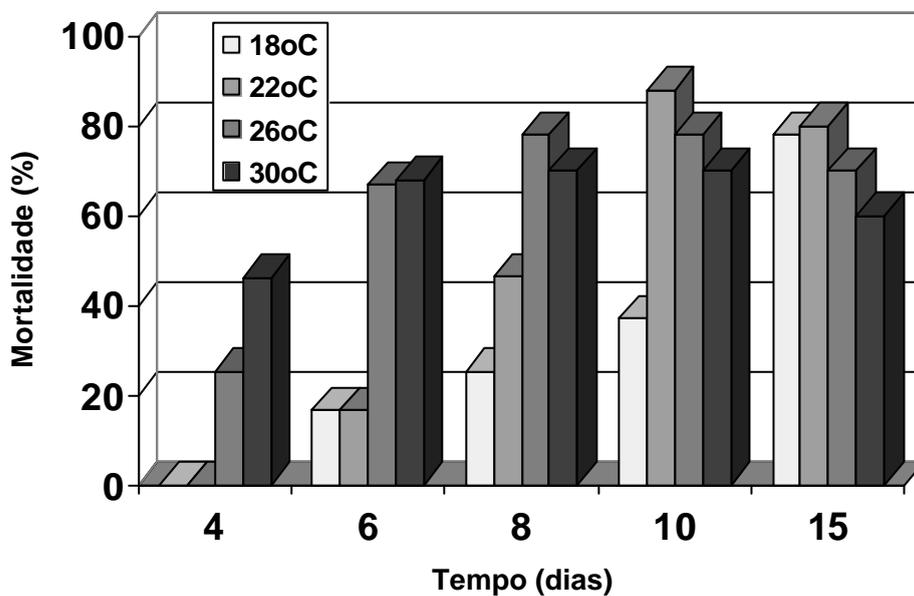


Figura 5. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas 3^a instar de *T. arnobia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

4.1.2. Em lagartas de 5^o. instar de *T. arnobia*

Para as lagartas de 5^o. instar, observou-se que o *B. thuringiensis* teve, novamente, um efeito mais rápido, com mortalidades de lagartas a partir dos 4 dias, na temperatura de 26°C (tabela 3).

No 6^o. dia, a mortalidade das lagartas de 5^o. instar infectadas com *B. thuringiensis* foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos, em todas as temperaturas testadas. Quanto ao TaV, apenas a 30°C foi verificada mortalidade comparável ao *B. thuringiensis*, sendo semelhante ao que ocorreu com as lagartas de 3^o instar.

Aos 8 dias, a mortalidade ocasionada pelo *B. thuringiensis* se intensificou em nas temperaturas de 22, 26 e 30°C.

Nas demais avaliações (10 e 15 dias) observa-se que *B. thuringiensis* apresenta maior virulência.

Com relação ao *B. thuringiensis*, foi verificada maior mortalidade aos 6 dias para as lagartas de 5^o. instar em relação às de 3^o. instar. Isto pode estar relacionado, provavelmente, ao maior consumo foliar, uma vez que lagartas maiores ingerem maior quantidade de folha e mais rapidamente, enquanto que lagartas menores o fazem mais lentamente e em menor quantidade, o que refletiria em menor ingestão de esporos e cristais. Entretanto, a mortalidade final acumulada foi a mesma para ambos os estádios estudados.

Tabela 3: Mortalidade média acumulada de lagartas do 5º instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e *B. thuringiensis*, em diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 %; fotofase: 13h).

| | Temp. | TaV (% Mortalidade) | B.t. (% Mortalidade) | Testem. (% Mortalidade) | CV | DMS a 5% |
|----------------|-------|------------------------|-------------------------|----------------------------|--------|-------------|
| 4 dias | 18°C | 0,0 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | 9,82% | 0,22 |
| | 22°C | 0,0 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,0 a A | 0,6 b B | 0,0 a A | | |
| | 30°C | 0,1 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | | |
| 6 dias | 18°C | 0,0 a A | 0,3 b A | 0,0 a A | 11,14% | 0,26 |
| | 22°C | 0,0 a A | 0,3 b A | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,1 a A | 0,7 b B | 0,0 a A | | |
| | 30°C | 0,4 b B | 0,4 b A | 0,2 a A | | |
| 8 dias | 18°C | 0,0 a A | 0,3 b A | 0,0 a A | 10,88% | 0,26 |
| | 22°C | 0,0 a A | 0,4 b A | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,3 b B | 0,8 c B | 0,1 a A | | |
| | 30°C | 0,6 b C | 0,9 c B | 0,1 a A | | |
| 10 dias | 18°C | 0,0 a A | 0,4 b A | 0,0 a A | 9,85% | 0,25 |
| | 22°C | 0,0 a A | 0,8 b B | 0,0 a A | | |
| | 26°C | 0,5 b B | 0,9 c B | 0,0 a A | | |
| | 30°C | 0,7 b B | 1,0 c B | 0,2 a A | | |
| 15 dias | 18°C | 0,3 ab A | 0,5 b A | 0,1 a A | 8,90% | 0,24 |
| | 22°C | 0,4 a AB | 0,9 b B | 0,2 a AB | | |
| | 26°C | 0,6 b B | 1,0 c B | 0,2 a AB | | |
| | 30°C | 1,0 b C | 1,0 b B | 0,4 a B | | |

Obs: Médias seguidas por letras iguais [minúscula para entomopatógenos (linha) e maiúscula para pH (coluna)] não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados em raiz quadrada de $x + 1$.

Quanto à porcentagem de mortalidade, também foi verificada uma mortalidade crescente na testemunha, porém menor em comparação com as lagartas de 3º instar, chegando a 40 % na temperatura de 30°C (figura 6). Os possíveis motivos para esta mortalidade são os mesmos daqueles citados no item anterior.

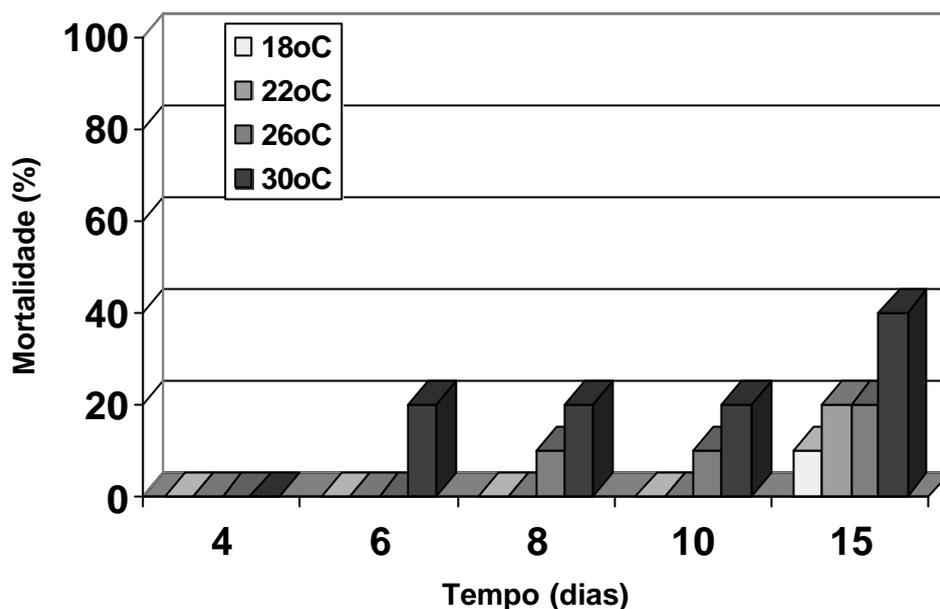


Figura 6. Mortalidade (%) média de lagartas 5^o instar de *T. arnobia* do tratamento testemunha e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Para o TaV, a temperatura teve um efeito mais pronunciado para as lagartas de 5^o instar que para as lagartas de 3^o instar. Novamente, a temperatura de 30°C foi a que proporcionou maiores níveis de mortalidade, desde a primeira avaliação, chegando a 100 % após 15 dias de observações (tabela 3, figura 7). Nas demais temperaturas, a mortalidade sempre foi menor, sendo significativamente diferente apenas à 26°C, após 8 dias. Nas temperaturas menores (18 e 22°C) a mortalidade não chegou a 40% para as lagartas de 5^o instar, não diferindo da testemunha (tabela 3).

Quando se corrigiu a mortalidade, verificou-se uma redução na porcentagem de lagartas mortas na temperatura de 30°C, não ultrapassando 60 %, e para as demais temperaturas, a mortalidade chegou no máximo a 40 % (figura 8).

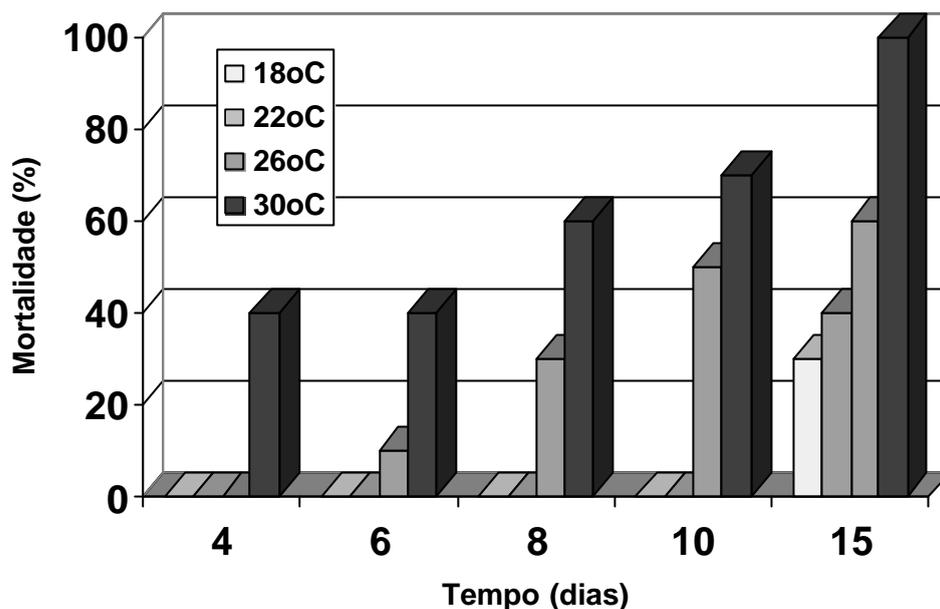


Figura 7. Mortalidade (%) média de lagartas 5º instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

São poucos os estudos sobre efeito de temperatura sobre o processo infeccioso e a mortalidade causada por vírus entomopatogênicos. A maioria dos trabalhos existentes citam que altas temperaturas, acima de 35°C , tem efeitos negativos sobre os vírus (Tanada, 1963; Ignoffo & Couch, 1981; McLeod et al., 1977). Apenas Johnson et al. (1982) indicaram que a temperatura de 30°C foi a mais adequada para o VPN de *A. gemmatilis*. McLeod et al. (1977) relataram que a variação na temperatura de 15 a 30°C não teve efeitos na ação do VPN de *H. zea*, o que não foi observado no presente trabalho, onde as temperaturas de 26 e 30°C apresentaram maiores mortalidade em comparação à 18 e 22°C . Provavelmente, pela *T. arnobia* ser de uma praga que ocorre predominantemente no inverno, a faixa de temperatura testada foi adequada para se verificar qual é o limiar de ação para o TaV, que estaria entre 22 e 26°C .

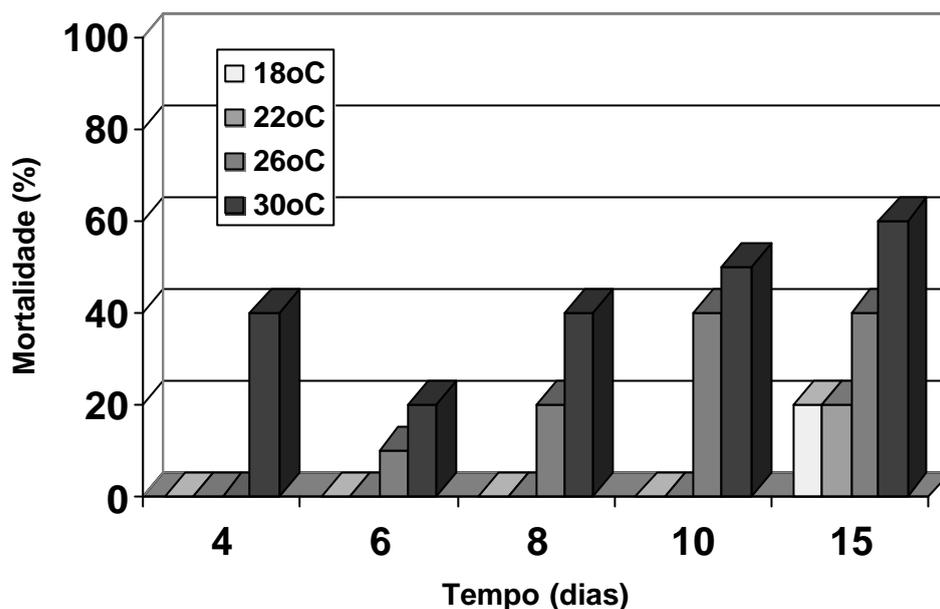


Figura 8. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas 5^o instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Entretanto, outro ponto importante é a dose utilizada do TaV. Por ser um vírus isométrico, de partícula livre, é difícil realizar a quantificação das partículas/volume. Desta forma, tem sido adotado o peso de lagartas/área aplicada que, neste caso, foi utilizado o equivalente a 50 g de lagartas mortas por hectare. Essa quantidade tem demonstrado ser patogênica a lagartas de *T. arnobia* de diferentes instares, mas de ação lenta (baixa virulência), levando em média 13 dias para causar mortalidade à temperatura de 26°C (Orlato, 2002). Provavelmente, uma dose maior poderia aumentar a mortalidade para lagartas de 5^o instar.

Portanto, estes dados indicam que o TaV não deve ser empregado no controle de lagartas de 5^o instar, principalmente quando se tem surtos populacionais e em temperaturas mais amenas, e que doses mais elevadas devem ser avaliadas para lagartas dessa idade.

Quanto ao *B. thuringiensis*, constatou-se uma maior mortalidade na temperatura de 26°C em relação às demais, nas avaliações de 4 e 6 dias após a aplicação. Apenas aos 8 dias é que a mortalidade a 30°C superou a mortalidade a 26°C (figura 9). Essa maior mortalidade a 26°C não seguiu o padrão observado para as lagartas de 3^o instar, onde houve, aparentemente, uma relação entre a mortalidade e o aumento de temperatura.

Na mortalidade corrigida, a eficiência do *B. thuringiensis* a 30°C foi reduzida na avaliação final, sendo menor em relação às temperaturas de 22 e 26°C (figura 10).

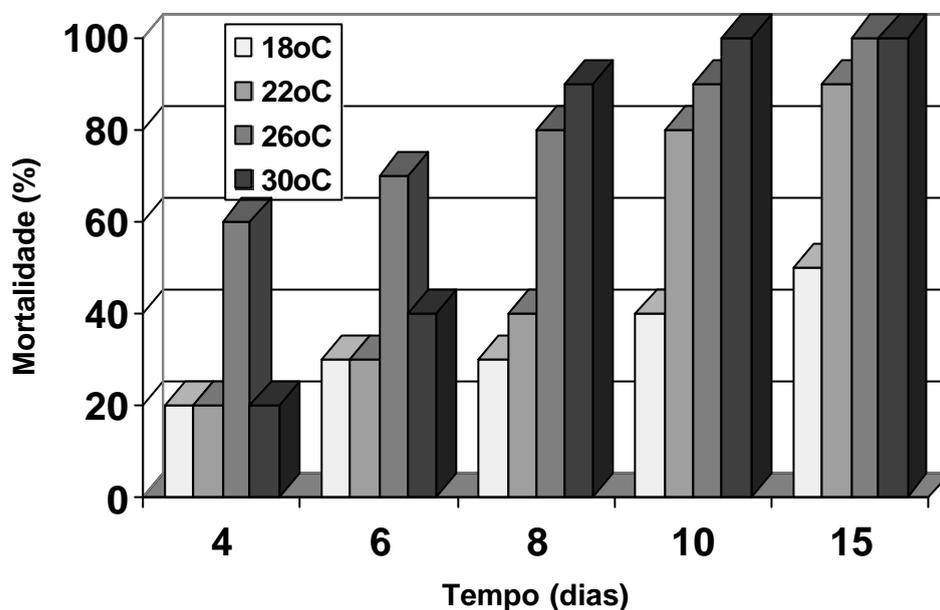


Figura 9. Mortalidade (%) média de lagartas 5ª instar de *T. arnobia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Dos poucos estudos feitos para verificar o efeito da temperatura sobre a ação do *B. thuringiensis* no controle de lagartas de importância florestal, Frankenhuyzen (1990) verificou que houve um aumento progressivo da mortalidade de lagartas de *C. fumiferana* quando se aumentou a temperatura de 13 para 25°C. Frankenhuyzen (1994) obteve a mesma resposta com temperaturas variando de 3 a 25°C e discutiu que o aumento da atividade das células bacterianas na maior temperatura testada seria o responsável pela morte mais rápida para a lagarta dos ponteiros do abeto.

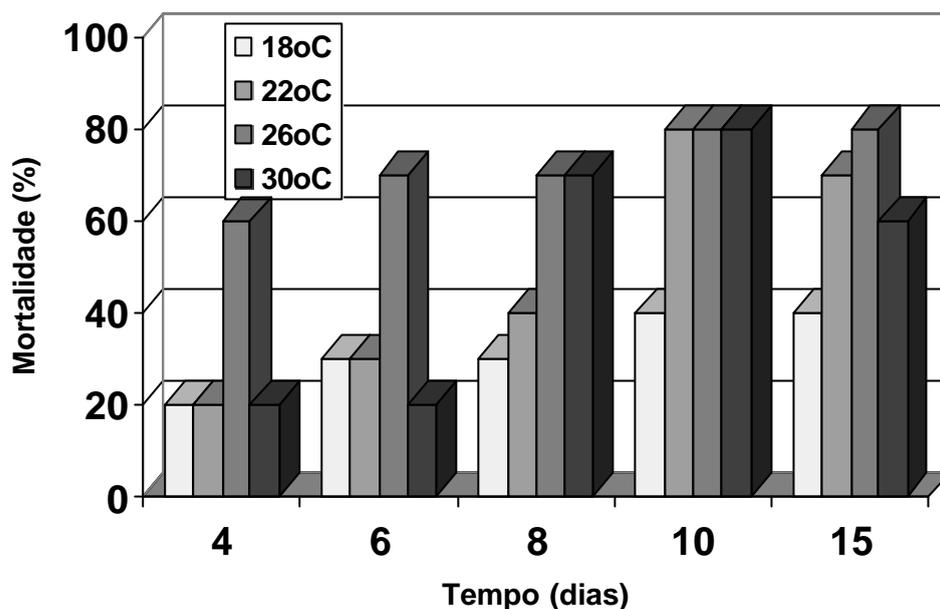


Figura 10. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas 5^o instar de *T. arnobia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes temperaturas, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Entretanto, isso não foi constatado para as lagartas de 5^o. instar de *T. arnobia* neste estudo. Provavelmente, como a temperatura de 30°C não é a mais adequada para esta espécie de lepidóptero (Peres Filho, 1989), isso pode ter afetado o consumo inicial, uma vez que todas as lagartas utilizadas no experimento foram mantidas em dieta artificial na temperatura de 25°C, sendo dado o tempo de um dia para que as mesmas se acondicionassem às novas temperaturas. Talvez este tempo não tenha sido suficiente para lagartas de 5^o. instar. O ideal seria repetir o ensaio para se comprovar tal resultado.

Apenas a 18°C não se obteve mortalidade significativa para as lagartas de 5^o. instar de *T. arnobia* (tabela 3). Portanto, em condições de temperaturas mais baixas no campo tem-se que aumentar a dose de *B. thuringiensis* ou utilizar inseticidas químicos em mistura com este entomopatógeno.

De modo geral para ambos os patógenos estudados nos dois ínstares de lagartas de *T. arnobia* verificou-se um aumento na mortalidade de acordo com o aumento da temperatura.

A maior mortalidade na temperatura de 30°C pode ser consequência do alto metabolismo que as lagartas apresentam nessa temperatura, por ser um animal pecilotérmico. Conseqüentemente, quando são submetidas a menores temperaturas, como

no caso da temperatura de 18°C, as lagartas apresentam uma redução no seu metabolismo, alimentando-se menos e atrasando o efeito das infecções.

Conforme citado anteriormente por Benz (1987), existem dificuldades em separar os efeitos da temperatura sobre o vírus daqueles sobre o inseto infectado. Entretanto, como as folhas tratadas com os dois entomopatógenos testados permaneceram por, no máximo, 48 horas nas temperaturas estudadas, acredita-se que os efeitos na virulência foram, principalmente, intrínsecos à relação patógeno-hospedeiro e ao metabolismo do inseto e não efeitos diretos sobre o *B. thuringiensis* e sobre o TaV.

Do ponto de vista prático, deve-se evitar o uso do TaV no controle de lagartas de *T. arnobia* nos meses mais frios do ano na região Sudeste, tanto para lagartas de 3^o. e de 5^o. instar. Quanto ao *B. thuringiensis* pode-se empregá-lo durante todo o ano para lagartas de 3^o. instar, com restrições para lagartas de 5^o. instar.

4.2. Efeito do pH de calda de pulverização sobre o TaV e *B. thuringiensis*

4.2.1. Em lagartas de 3^o. instar de *T. arnobia*

Verificou-se que, aos 4 dias após a aplicação, iniciou-se a mortalidade das lagartas do 3^o instar, com diferença significativa observada no pH 7,0 para *B. thuringiensis* (tabela 4).

Mortalidade significativa nos pHs 6,0 a 8,0 só foi detectada a partir do 6^o. dia. No 8^o dia, observou-se uma intensificação na mortalidade observada na avaliação anterior no pH 7,0 tanto para o TaV quanto para *B. thuringiensis* e iniciou o efeito no pH 5,0, com o *B. thuringiensis*.

Para o 15^o dia, ambos os entomopatógenos, independente do pH testado, mostraram igual ação para as lagartas de 3^o. instar de *T. arnobia*.

No geral, verificou-se que a variação do pH da calda de pulverização não teve efeito significativo para o TaV ao longo do período de avaliação, mostrando um efeito progressivo e atingindo alta mortalidade apenas aos 15 dias da aplicação (tabela 4). Esta ausência de efeito, em comparação com os resultados da literatura, deve-se, provavelmente, ao fato que o TaV ser um vírus isométrico de partícula livre, diferentemente dos VPNS, que necessitam de pH alcalino para que haja a dissolução da matriz protéica e liberação dos vírions (Alves, 1986). O TaV, provavelmente, independe da

condição do pH do mesênteron para que possa infectar as células do tecido epitelial. Do ponto de vista de campo, a variação do pH da água de pulverização, a qual normalmente provém de córregos, rios ou de pequenos lagos e represas, não afetará a eficiência desse vírus para o controle de *T. arnobia*.

Tabela 4: Mortalidade média acumulada de lagartas do 3º instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: $25 \pm 1^\circ\text{C}$; UR: 70 %; fotofase: 13h).

| | pH | TaV (% Mortalidade) | B.t. (% Mortalidade) | Testem. (% Mortalidade) | CV | DMS |
|----------------|-----------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|------------|
| 4 dias | 5,0 | 0,0 a A | 0,0 a A | 0,0 a A | 7,52% | 0,16 |
| | 6,0 | 0,0 a A | 0,0 a A | 0,0 a A | | |
| | 7,0 | 0,1 a A | 0,3 b B | 0,0 a A | | |
| | 8,0 | 0,0 a A | 0,1 a A | 0,1 a A | | |
| 6 dias | 5,0 | 0,2 a A | 0,3 a A | 0,1 a A | 10,80% | 0,25 |
| | 6,0 | 0,0 a A | 0,3 b A | 0,0 a A | | |
| | 7,0 | 0,1 a A | 0,3 b A | 0,0 a A | | |
| | 8,0 | 0,1 a A | 0,5 b A | 0,0 a A | | |
| 8 dias | 5,0 | 0,2 a A | 0,6 b B | 0,0 a A | 10,96% | 0,27 |
| | 6,0 | 0,2 ab A | 0,3 b A | 0,0 a A | | |
| | 7,0 | 0,3 b A | 0,9 c C | 0,0 a A | | |
| | 8,0 | 0,4 b A | 0,7 c BC | 0,1 a A | | |
| 10 dias | 5,0 | 0,4 a A | 0,7 b AB | 0,2 a A | 10,27% | 0,26 |
| | 6,0 | 0,3 b A | 0,5 b A | 0,0 a A | | |
| | 7,0 | 0,5 b A | 0,9 c B | 0,0 a A | | |
| | 8,0 | 0,5 b A | 0,7 b AB | 0,1 a A | | |
| 15 dias | 5,0 | 0,7 b A | 0,9 b A | 0,3 a A | 7,55% | 0,21 |
| | 6,0 | 0,8 b A | 0,8 b A | 0,2 a A | | |
| | 7,0 | 0,8 b A | 1,0 b A | 0,2 a A | | |
| | 8,0 | 0,8 b A | 0,9 b A | 0,3 a A | | |

Obs: Médias seguidas por letras iguais [minúscula para entomopatógenos (linha) e maiúscula para pH (coluna)] não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados em raiz quadrada de $x + 1$.

Quanto ao *B. thuringiensis*, demonstrou-se que o pH tem efeitos sobre a velocidade de ação do mesmo, sendo o pH 7,0 o mais adequado. Surpreendentemente, o pH 6,0 teve um efeito de retardamento da mortalidade do *B. thuringiensis* em relação ao pH 5,0. Segundo Johnson (1981) e Yunovitz et al. (1987), o pH ácido pode reduzir a toxicidade do *B. thuringiensis*. Entretanto, o pH 6,0 foi mais virulento do que o pH 5,0, nas avaliações de 8 e 10 dias. Aos 15 dias não se observou mais tal efeito.

Quanto ao pH 8,0, teoricamente poderia ter uma ação deletéria sobre os cristais tóxicos do *B. thuringiensis*, fazendo com que se dissolvessem antes de serem ingeridos pelas lagartas (Angus, 1996). Entretanto, como o preparo da calda e a pulverização foram imediatos e o oferecimento das folhas às lagartas foi após, aproximadamente, 30 minutos (o tempo suficiente para a secagem da calda pulverizada), provavelmente, não houve tempo para que esta ação do pH 8,0 se manifestasse sobre as partículas do *B. thuringiensis*.

De modo geral, o *B. thuringiensis* mostrou-se mais sensível que o TaV quanto à variação de pH, sendo que alterações tanto para pH alcalinos quanto para ácidos pode retardar a ação letal do mesmo, porém, sem afetar sua eficiência ao longo dos dias.

As lagartas testemunhas foram avaliadas tomando em conta os cuidados necessários, no entanto uma pequena mortalidade ocorreu nos pHs 5,0 e 8,0 a partir do 8^{vo} dia de avaliação (figura 11). A mortalidade apresentada para os pHs 5,0 e 8,0 foi intensificada ao observar os resultados para o dia 15, sendo mais evidente o efeito do pH no desenvolvimento das lagartas do 3^o. instar de *T. arnobia*. Entretanto, esta variação na mortalidade não foi significativa (tabela 4).

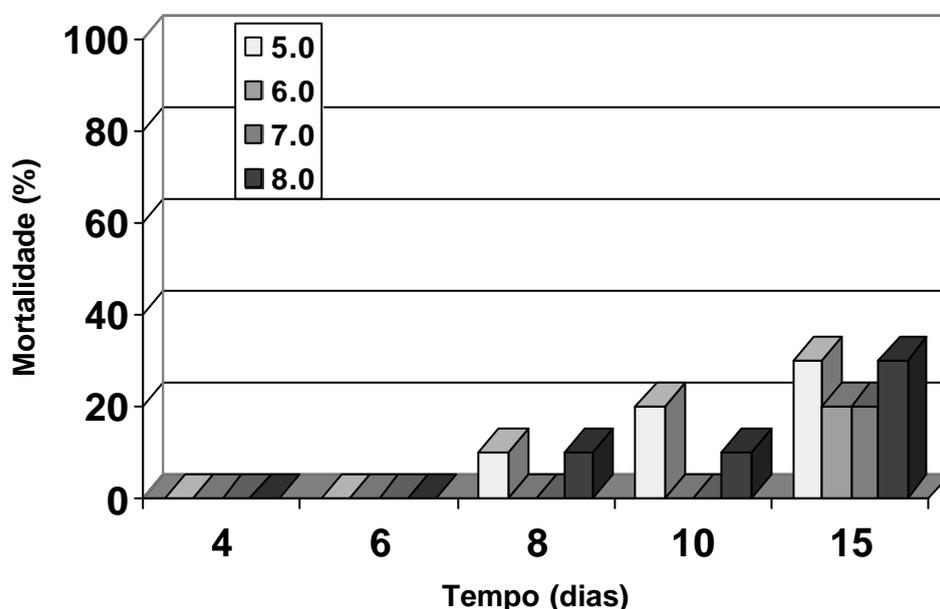


Figura 11. Mortalidade (%) média de lagartas 3^o instar de *T. arnobia* do tratamento testemunha e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Quanto ao efeito do pH sobre o TaV verificou-se que o pH mais adequado para causar mortalidade nas lagartas do 3º instar foi o pH 7,0, apesar do pH 5,0 mostrar um efeito de aceleração da infecção (figura 12).

No entanto, quando se corrigiu a mortalidade, descontando-se a mortalidade das lagartas testemunhas, observa-se que o pH mais adequado foi o 7,0, seguido pelo pH 6,0, sendo os menos favoráveis os pH 5,0 e 8,0, apresentando-se a menor mortalidade no pH 5,0 (figura 13).

Estas observações mostram que o vírus atua melhor em pHs próximos a neutralidade, e que a sua eficiência no controle pode ser afetada quando submetido a pH ácidos ou alcalinos.

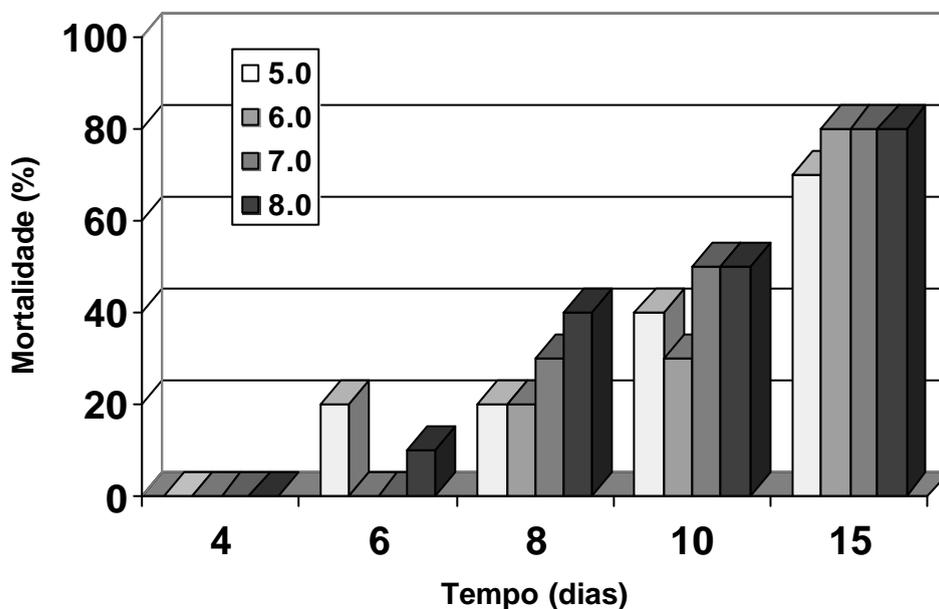


Figura 12. Mortalidade (%) média de lagartas 3º instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

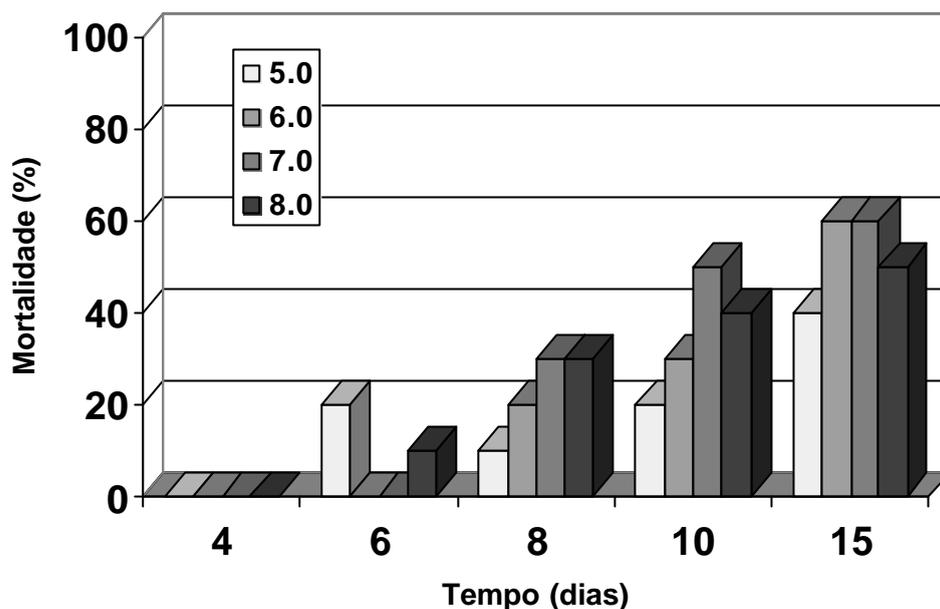


Figura 13. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas 3^o instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Estas observações coincidem com aquelas obtidas por alguns autores que têm observado que *Baculovirus* é inativado por valores extremos de acidez ou alcalinidade e sugerem que o pH de uma formulação deveria ser próximo ao da neutralidade (Ignoffo e Garcia, 1996; Gudauskas e Canerday, 1968; Harpaz e Raccah, 1978, Batista Filho et al. 1997).

Na figura 14 pode se observar o efeito do pH em *B. thuringiensis* em lagartas de *T. arnobia* do 3^o instar. Para o 8^o dia a mortalidade foi incrementada, sendo que o pH 7,0 apresentou a maior mortalidade.

No 15^o dia pode se visualizar melhor o efeito do pH, sendo que o pH onde a bactéria apresentou uma melhor eficiência foi o pH 7,0, seguido pelos pHs 6,0 e 8,0, sendo que o pH 5,0 foi o que apresentou uma menor mortalidade (fig. 14).

Na correção dos dados pela fórmula de Abbott, pode-se constatar que, realmente, o pH 7,0, foi o mais adequado para o *B. thuringiensis*, com nítida diferença da mortalidade encontrada nos demais tratamentos de pH (fig. 15).

Estes resultados coincidem com os obtidos por Gringorten et al. (1992), num trabalho feito para avaliar a supressão da atividade da δ -endotoxina de *B.*

thuringiensis por efeito do pH, onde observaram que a melhor faixa para a expressão da toxicidade de *B. thuringiensis* encontra-se na faixa de pH próximo a neutralidade.

Quando observamos a figura 15 que apresenta a mortalidade corrigida, descontando-se a mortalidade das lagartas testemunhas, verifica-se uma vez mais que o pH que oferece as condições mais favoráveis para a eficiência de *B. thurngiensis* foi o pH 7,0, sendo diminuída sua eficiência quando submetido a pH ácidos ou alcalinos.

Uma vez mais foi evidenciado o efeito do pH ácido ou alcalino na diminuição da virulência de *B. thuringiensis*, sendo que sua melhor expressão apresenta-se em pHs próximos a neutralidade. Essas respostas coincidem com as encontradas por Behle et al., (1967), os quais observaram uma baixa atividade do inseticida em pH alcalino, sendo recomendados os pHs próximos à neutralidade. Apreciando-se que o efeito de *B. thuringiensis* a pesar das condições a que foi exposta, apresentou a maior mortalidade.

Os pHs ácidos podem ter efeito negativo sobre os esporos da formulação comercial, pois é conhecido que os mesmos germinam em pH ao redor de 6,0 e pH alcalino pode afetar o cristal protéico, iniciando sua dissolução antes da ingestão pelas lagartas (Alves, 1986). Em ambos casos, apesar de não ser observada diferença significativa na avaliação final acumulada (tabela 4), constatou-se diferenças ao longo das avaliações, com o *B. thuringiensis* tendo uma ação mais rápida no pH 7,0 em relação aos demais tratamentos.

Portanto, a variação do pH da calda de pulverização, por pequena que seja, pode afetar a eficiência do *B. thuringiensis* no controle da lagarta parda do eucalipto, devendo este fator ser modificado durante as aplicações para controle da praga no campo.

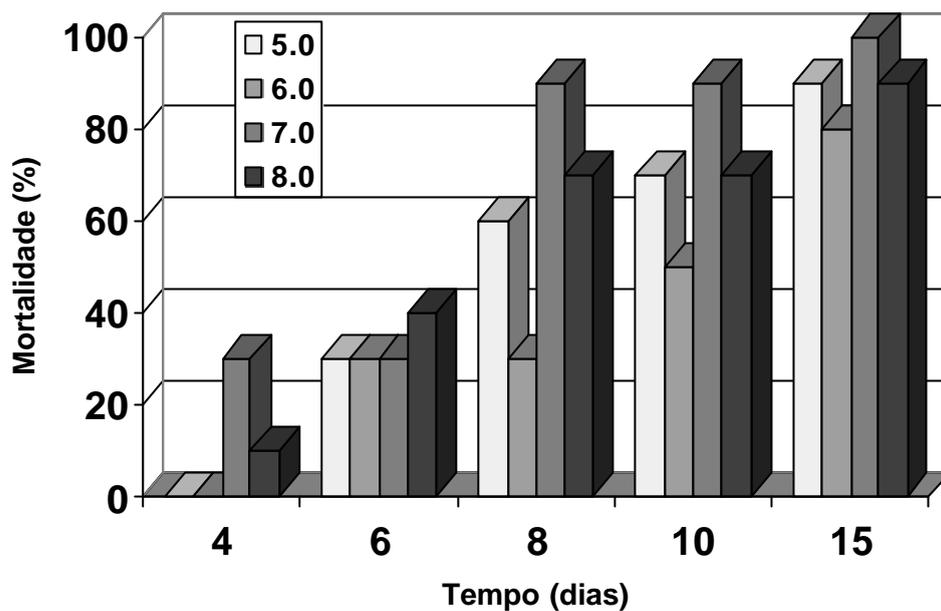


Figura 14. Mortalidade (%) média de lagartas 3^o instar de *T. arnobia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

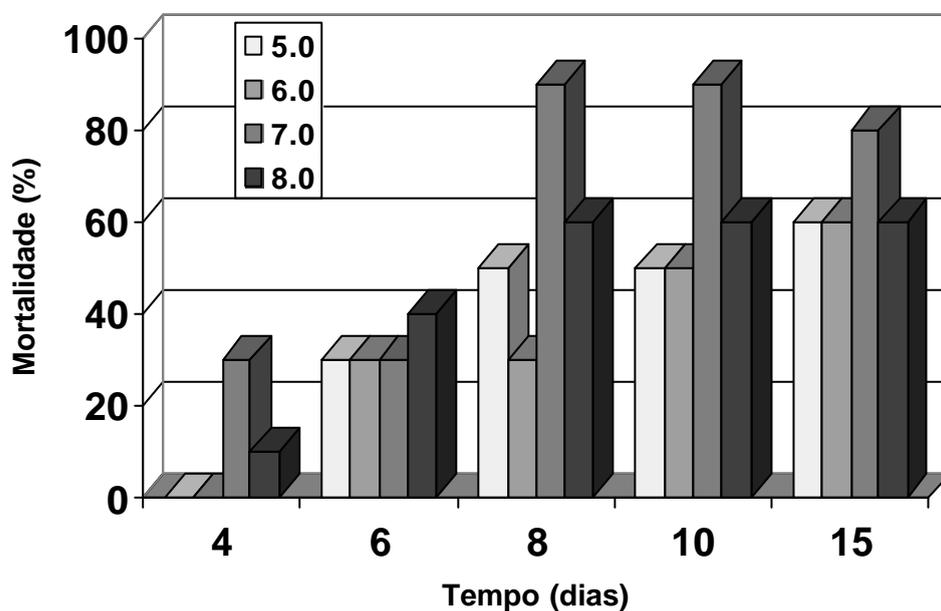


Figura 15. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas 3^o instar de *T. arnobia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

4.2.2. Em lagartas de 5^o. instar de *T. arnobia*

Nas lagartas do 5^o instar (tabela 5), observou-se que no 4^o dia não houve diferença significativa entre os diferentes pHs para TaV, no entanto no mesmo dia para *B. thuringiensis* pode se observar que a maior mortalidade apresentou-se no pH 7,0, com diferenças significativas entre os tratamentos. No 6^o dia a mortalidade anterior foi incrementada, sendo que para *B. thuringiensis* a maior mortalidade apresentou-se no pH 7,0, não sendo detectada para o TaV, independentemente do tempo e pH. No 10^o dia a maior mortalidade do TaV apresentou-se no pH 7,0, no entanto estatisticamente não apresentaram-se diferenças significativas entre os tratamentos. No caso de *B. thuringiensis* evidenciou-se diferença significativa entre os tratamentos sendo que o pH 7,0 apresentou maior mortalidade. No 15^o dia observou-se que, para TaV, não houve influência dos pHs (testados) sobre a mortalidade causada e para *B. thuringiensis* no pH 7,0.

Analisando os dados transformados em porcentagem de mortalidade (figuras 16-20), pode-se visualizar melhor os resultados encontrados.

No caso das lagartas do quinto instar observou-se que apresentaram uma pequena mortalidade, sendo mais expressiva no pH 8,0, e menor em comparação com as lagartas do terceiro instar, as quais observou-se foram mais suscetíveis que as lagartas do quinto instar.

Por outro lado em comparação com as lagartas do terceiro instar, observa-se que o pH 5,0 não afetou as lagartas do quinto instar já que não apresentam neste pH a mortalidade apresentada no terceiro instar.

Tabela 5. Mortalidade média acumulada de lagartas do 5^o instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25± 1°C; UR: 70 %; fotofase: 13h).

| | pH | TaV (% Mortalidade) | B.t. (% Mortalidade) | Testem. (% Mortalidade) | CV | DMS a 5% |
|---------------|-----|------------------------|-------------------------|----------------------------|-------|-------------|
| 4 dias | 5,0 | 0,1 a A | 0,0 a A | 0,0 a A | 7,73% | 0,17 |
| | 6,0 | 0,1 a A | 0,1 a AB | 0,0 a A | | |
| | 7,0 | 0,1 a A | 0,2 b B | 0,0 a A | | |
| | 8,0 | 0,1 a A | 0,1 a AB | 0,0 a A | | |
| | 5,0 | 0,1 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | | |

| | | | | | | |
|----------------|-----|---------|----------|---------|--------|------|
| 6 dias | 6,0 | 0,1 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | 10,00% | 0,23 |
| | 7,0 | 0,2 a A | 0,5 b B | 0,0 a A | | |
| | 8,0 | 0,2 a A | 0,2 a A | 0,0 a A | | |
| 8 dias | 5,0 | 0,2 a A | 0,3 a A | 0,0 a A | 10,77% | 0,26 |
| | 6,0 | 0,2 a A | 0,3 a A | 0,1 a A | | |
| | 7,0 | 0,4 b A | 0,9 c B | 0,0 a A | | |
| 10 dias | 5,0 | 0,4 b A | 0,4 b A | 0,0 a A | 10,35% | 0,26 |
| | 6,0 | 0,4 b A | 0,5 b AB | 0,0 a A | | |
| | 7,0 | 0,6 b A | 0,9 c C | 0,1 a A | | |
| 15 dias | 5,0 | 0,7 b A | 0,7 b AB | 0,2 a A | 8,12% | 0,22 |
| | 6,0 | 0,8 b A | 0,6 b A | 0,2 a A | | |
| | 7,0 | 0,8 b A | 1,0 b C | 0,2 a A | | |
| | 8,0 | 0,8 b A | 0,9 b BC | 0,3 a A | | |

Obs: Médias seguidas por letras iguais [minúscula para entomopatógenos (linha) e maiúscula para pH (coluna)] não diferem entre si pelo teste t (LSD) ao nível de 5 % de probabilidade. Dados transformados em raiz quadrada de $x + 1$.

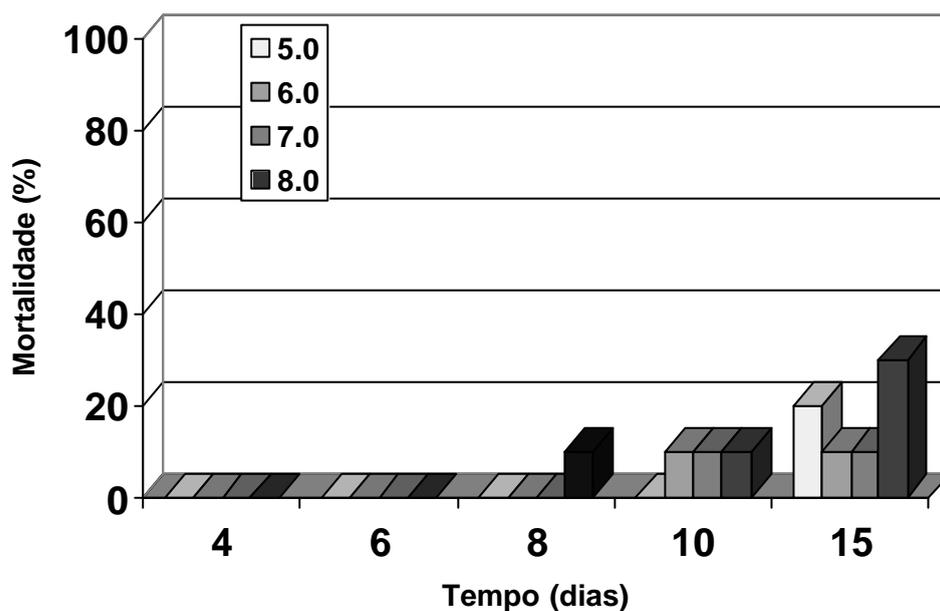


Figura 16. Mortalidade (%) média de lagartas 5^o instar de *T. arnobia* do tratamento testemunha e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Quanto ao efeito do pH sobre o TaV, verificou-se que novamente que as melhores condições para seu efeito na mortalidade são oferecidas no pH 7.

No 8º dia a mortalidade foi maior no pH 7,0 e 8,0, no entanto no 10º dia a mortalidade no pH 7,0 incrementou-se e foi a maior.

No 15º dia evidenciou-se que os pHs 6,0 e 7,0 foram aqueles que ofereceram as melhores condições para a atuação do vírus, apresentando a maior mortalidade seguido pelos pHs 5,0 e 8,0, onde a menor mortalidade foi constatada no pH 5,0 (fig. 18).

Novamente verificou-se que a melhor faixa do pH para que o vírus apresente um melhor desenvolvimento no controle das lagartas e próximo a pH neutro, sendo esta uma informação de importância para a preparação das formulações e no momento de se realizar a mistura e preparo do vírus ao nível do campo.

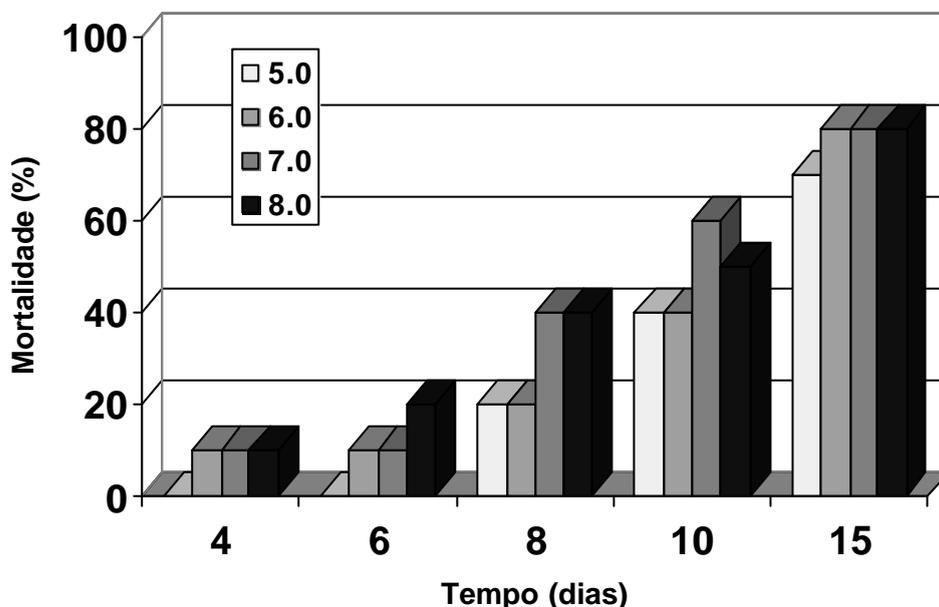


Figura 17. Mortalidade (%) média de lagartas 5ª instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Ao se verificar os dados corrigidos, observou-se mais claramente o efeito dos diferentes pHs na eficiência do vírus, com a maior mortalidade apresentada no pH 7,0, seguido pelo pH 6,0, e as menores mortalidades apresentaram-se nos pHs 5,0 e 8,0, evidenciando-se novamente que a maior eficiência do vírus apresentou-se nos pHs 6,0 (próximos a neutralidade) e 7,0.

Quanto ao efeito do pH na ação de *B. thuringiensis*, pode se observar na figura 19 que para o 4º dia já a maior mortalidade apresenta-se no pH 7,0. Essa mortalidade que se aprecia no 4º dia no pH 7,0 incrementa-se no 6º dia (fig. 19).

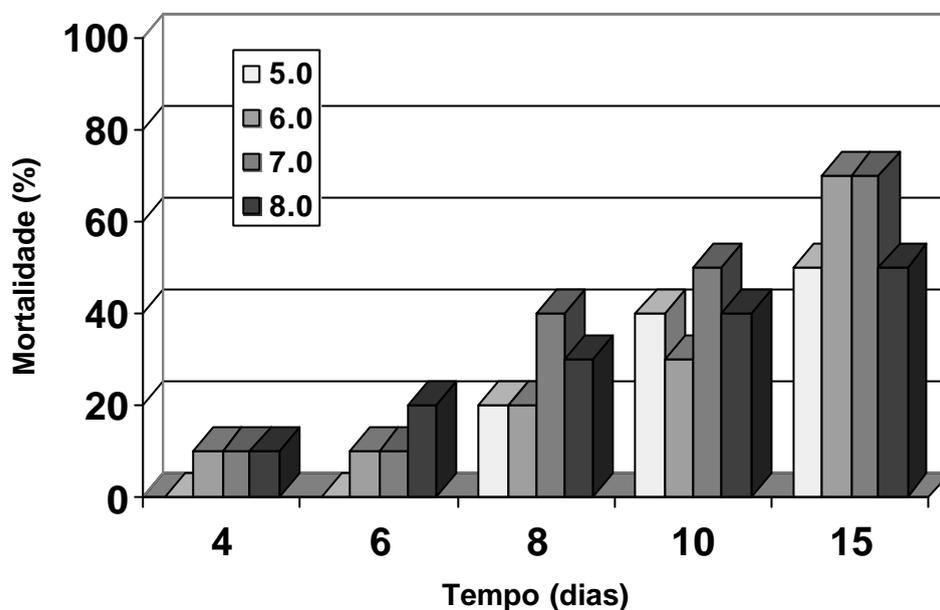


Figura 18. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas 5^o instar de *T. arnobia* tratadas com TaV e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

No 8º dia a mortalidade no pH 7,0 foi mais expressiva apresentando um considerável aumento, apresentando-se a menor mortalidade nos pHs 5,0 e 6,0.

Nos dias 10 e 15 a tendência da mortalidade é a mesma. A maior mortalidade apresenta-se no pH 7,0, seguido pelo pH 8,0 e as menores nos pHs 5,0 e 6,0.

O entomopatôgeno *B. thuringiensis* causou maior mortalidade das lagartas em comparação ao TaV, no entanto para ambos evidencia-se que seu efeito é reduzido quando são submetidos a pH extremos, já que a melhor expressão da eficiência de ambos é melhor em pH neutros ou próximos a neutralidade (fig.19).

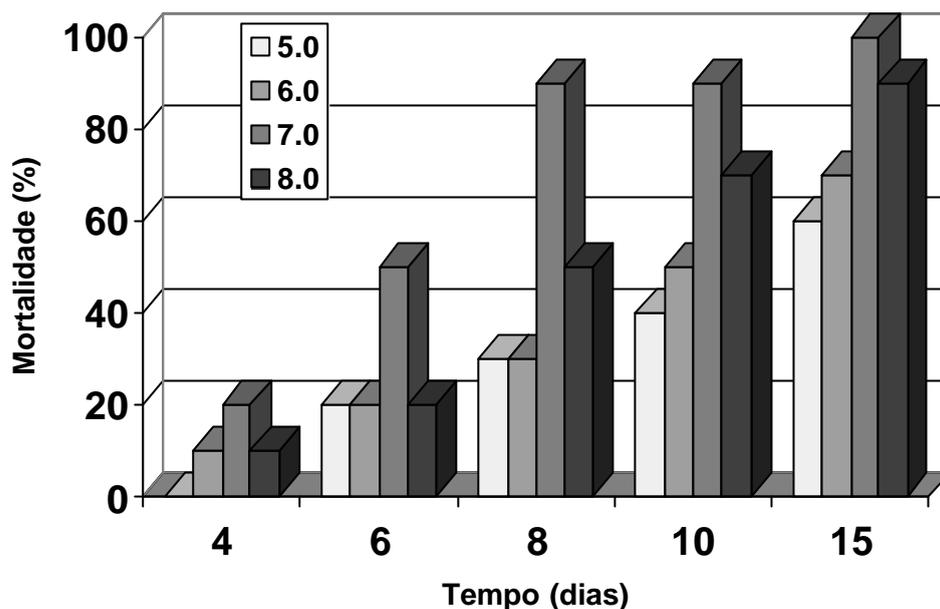


Figura 19. Mortalidade (%) média de lagartas 5^o instar de *T. arnoibia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Observando os dados corrigidos, aprecia-se melhor o efeito mencionado, tendo que para o 6^o. dia observa-se que para o pH 7,0 apresenta a maior mortalidade.

No 8^o. dia a maior mortalidade foi apresentada no pH 7,0, sendo que para o 15^o dia o efeito se visualizou melhor, com o pH 7,0 demonstrando maior mortalidade, seguido pelos pH 6,0 e 8,0, apresentando a menor mortalidade no pH 5,0. Esse efeito é similar ao apresentado nas lagartas do 3^o. instar.

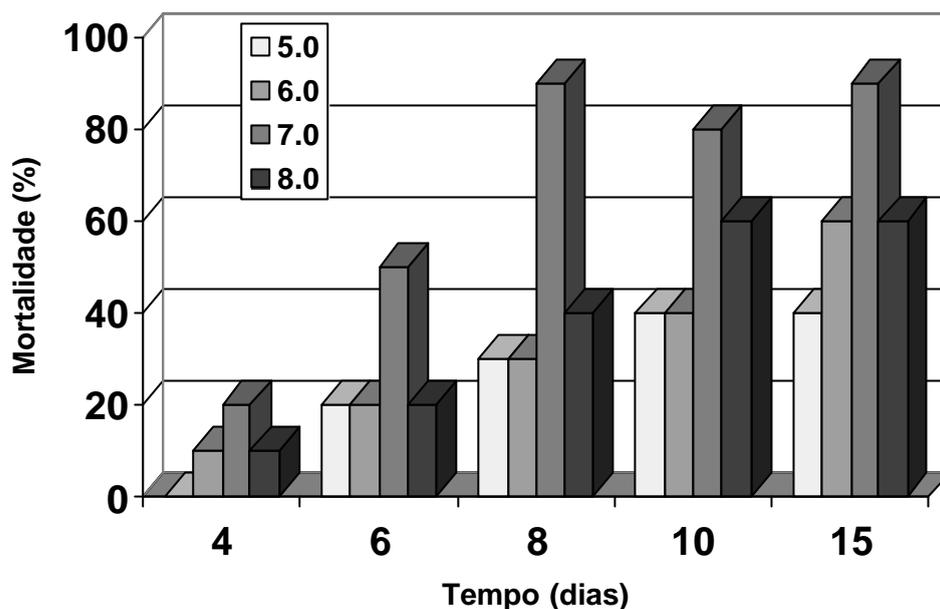


Figura 20. Mortalidade (%) média corrigida de lagartas 5^o instar de *T. arnobia* tratadas com *B. thuringiensis* e submetidas a diferentes pH de calda de pulverização, aos 4, 6, 8, 10 e 15 dias após a aplicação. (Temp.: 25 ± 1 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 13 h).

Para o *B. thuringiensis*, o pH foi fator limitante para sua eficiência de ação, sendo esta uma desvantagem em comparação com o TaV. A variação do pH da calda de pulverização deve ser levada em consideração quando do preparo da calda, podendo este fator ser ainda mais expressivo se o tempo entre o preparo e a aplicação for longo (acima de uma hora).

A escassez de informações sobre a influência do pH sobre bioinseticidas limitou que estes dados fossem comparados com outras situações. Porém, estes dados demonstraram que este fator é de grande importância para o sucesso do uso de entomopatógenos no campo e que, se fosse devidamente monitorado durante as pulverizações, poderia explicar alguns dos problemas observados no controle de pragas agrícolas e florestais, que acabam recaindo sobre a qualidade dos produtos biológicos ou sobre a regulação dos equipamentos de aplicação.

5. CONCLUSÕES

Quanto maior a temperatura de desenvolvimento (26 e 30°C) do hospedeiro, maior a mortalidade de lagartas de *T. arnobia* causadas pelo TaV e pelo *B. thuringiensis*.

O pH 7,0 é o mais adequado para a virulência do *B. thuringiensis*, tanto nas lagartas do 3º. instar quanto para as lagartas do 5º. instar de *T. arnobia*.

A ação do TaV sobre lagartas de *T. arnobia* não é afetado pelos diferentes pHs de calda de pulverização testados.

As lagartas do 3º. instar de *T. arnobia* são mais suscetíveis do que as lagartas do 5º. instar, tanto ao TaV quanto ao *B. thuringiensis*.

O *B. thuringiensis* é mais virulento no controle de lagartas de *T. arnobia* que o TaV, com mortalidade mais rápida e mais elevada, nas dosagem testadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. I. Investigations on the nuclear polyhedrosis of teak defoliator, *Hyblaea puera* (Cram) (Lep., Hyblaeidae). *Journal Applied Entomology*, v.119, p.351-354, 1995.

ALMEIDA, C. A. Eficiência dos defensivos depende da qualidade da água. *Laranja e companhia*, n.26, 1990.

ALVES, S.B. *Controle Microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. São Paulo: Manole, 1986. 407 p.

ANDREWS, G. L. & P. P. SIKOROWSKI. Effects of cotton leaf on the nuclear-Polyhedrosis virus of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.22, p. 290-291, 1973.

ANGUS, T. A. Extration, purification, and properties of *Bacillus sotto* toxin. *Canadian Journal of Microbiology*, v.2, p.416-426, 1956.

ANGUS, T. A. Microbiological control of insects: bacteriological pathogens. In: MAXWELL, F. G., HARRIS, F. A. (Eds.). *Proceeding of the summer institute on Biological Control of Plant Insects and Diseases*. Jackson: University of Mississippi. 1974. p.532-540.

ANJOS, N., SANTOS, G.P., ZANUNCIO, J.C. A lagarta parda, *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. Boletim Técnico EPAMIG. n.25, p.1-56, 1987.

BARBIELLINI, A. Sobre pragas do eucalipto, especialmente lagartas. *Chácaras e Quintais*, Rio de Janeiro, v. 82, n. 1, p. 37-40, 1950.

BARROS, M. E. P., ZANUNCIO, J. C., LOPEZ, F. S., PEREIRA, J. M. M. Análise faunística e flutuação populacional dos lepidópteros- praga de eucalipto em regiões do Maranhão, Bahia, Espírito Santo e São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14, 1993, Piracicaba. **Resumos**, Piracicaba: SEB, 1993. p.676.

BATISTA FILHO, A., ALVES, S. B., AUGUSTO, N. T., ALVES, L. F. A., LAMAS, C. Efeito do pH na atividade de *Baculovirus anticarsia*. ARQUIVOS DO INSTITUTO BIOLOGICO. São Paulo, v.64, n.2, p.87-89, 1997.

BEHLE, R. W., MCGUIRE, M. R., GILLESPIE, R. L., SHASHA, B. S. Effects of Alkaline Gluten on the Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis*. *Journal Economical Entomology*, v.90, n.2, p.354-360, 1967.

BERENBAUM, M. Adaptative significance of midgut pH in larval Lepidoptera. *Am. Nat.* v.115, p.138-146, 1980.

BENZ, G. Environment. In: J. R. FUXA & TANADA (Eds.). *Epizootiology of insect diseases*. New York, John Wiley, 1987, p.177-214.

BERTI FILHO, E. *Biologia de Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), e observações sobre a ocorrência de inimigos naturais. Piracicaba, 1974. 74 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. USP.

BERTI FILHO, E. *Insetos associados a plantações de espécies do gênero Eucalyptus nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo.*

Piracicaba, 1981. 176p. Tese (Livre docência). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. USP.

BERTI FILHO, E., MACEDO, N. O uso de *Bacillus thuringiensis* no controle de lagarta das folhas de eucalipto. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE ENTOMOLOGICA DO BRASIL, 1, Viçosa, 1973. *Resumos*. Viçosa, SEB, 1973. 102 p.

CARROW, J. R. *B. thuringiensis* and the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) in North Central Oregon. *Journal Economic Entomology*, v. 80, p.204-207, 1983.

CHAO, Y.C., SCOTT, H., YOUNG III, S. Y. An Icosaedral RNA virus of the soybean looper (*Pseudoplusia includens*). *Journal of General Virology*, v. 64, p.1835-1838, 1983.

CHAO, Y.C., YOUNG III, S. Y., KIM, K. S. Characterization of picornavirus isolated from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.27, p.247-257, 1986.

COOKSEY, K. E. The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: biochemistry and mode of action. In: BURGESS, H. D., HUSSEY, N. W. (Eds). *Microbiological Control of Insects and Mites*. New York/London: Academic press, 1971. p.247-274.

CUNNINGHAM, J. C. Use of microbials for control of defoliating pest of conifers. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5, 1990, Adelaide. p.164-168.

CUNNINGHAM, J. C. Baculoviruses as microbial insecticides. In: REUVENI, R. (Ed.). *Novel approaches to integrated pest management*. Canadá: CRC Press, 1995. p.262-292.

EVANS, H.F. Quantity assessment of relationships between dosage and response of nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 37, p.101-9, 1981.

FALCON, L. A. Use of bacteria for microbial control. In: BURGESS, H. D., HUSSEY, N. W. (Ed.). *Microbial control of insects and mites*. New York: Academic Press, 1971. p.67-95.

FAST, P. G. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). *Microbial Control of Pests and Olnats Disseases*. Academy Press, New York/London, 1981. p.223-248.

FAST, P. G., MARTINS, W. G. *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal toxin: Dissolution into toxin low molecular weight peptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* V.98, p.1314-1320, 1980.

FAUST, R. M., ADAMS, J. R., HEIMPEL, A. M. Dissolução of the toxic parasporal crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *pacificus* by the gut secretions of the silkworm, *Bombix mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.9, p.488-499, 1967.

FRANKENHUYZEN, K. V. Effect of temperature and exposure time on toxicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner spray deposits to spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera: Tortricidae). *The Canadian Entomologist*, v.122, p. 69-75, 1990.

FRANKENHUYZEN, K. V. Effect of temperature on the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* Berliner in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clem. (Lepidoptera: Tortricidae). *The Canadian Entomologist*, v.126, p.1061-1065, 1994.

FUXA, J. R., TANADA, Y. (Eds.) *Epizootiology of Insect Diseases*. New York/Chichester: Wiley press. 1987. 270p.

FUXA, J. R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Ann. Ver. Entomology*, v.32, p.225-251. 1987

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., BATISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIN, J.

D. *Manual de Entomologia Agrícola*. 2. ed. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

GARD, I. E., FALCON, L. A. Autodissemination of entomopathogens: Vírus. *See Ref.*, v.2, p. 46-54, 1978.

GRINGORTEN, J, MILNE, P. G., FAST, P. G., SOHI, S. S., FRANKENHUYZEN, K. VAN. Supression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Activity by low alkaline pH. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.60, p. 47-52, 1992.

GUDAUSKAS, R. T., CANERDAY, D. The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration, and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.12, n.3, p.405-411, 1968.

HABIB, M. E. M., ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogências. In: ALVES, S.B. *Controle Microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.383-446.

HARPAZ, I., RACCAH, B. Nucleopolyhedrosis virus (VPN) of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis* (lepidoptera: Noctuidae): temperature and pH relations, host range and synergism. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.32, n.3, p.368, 1978.

HEIMPEL, M., T. ANGUS. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *Journal of Insect Pathology*, v.1, p.152-170, 1959.

HEIMPEL, A. M. Further observations on the pH in the gut and blood of Canadian forest insects. *Cannadian Jornal of Zoology*, v.34, p.210-212, 1956.

HUBER, J. Use of baculovirus in pest management programs. In: R.R . GRANADOS, B.A. FEDERICI (Eds.). *The biology of baculoviruses*. v.2. Boca Raton, CRC Press, 1986. p.181-202.

HUBER, H. E., LÜTHY, P. *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin: Composition and activation. In: DAVIDSON, E. W. (Eds.) *Pathogenesis of invertebrate Microbial Diseases*, Totowa, New Jersey: Allenheld, Osmun &Co., 1981. p.209-234.

IGNOFFO, C. M., T.L. COUCH. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticide. In: H.G. BURGESS (Ed.). *Microbial Control of pest and plant diseases*. New York, Academic Press, 1981. p. 329-362.

IGNOFFO, C. M. Manipulating enzootic-epizootic diseases of arthropods. In: Biological Control. In: Hoy, M. A., Herzog, D. C. (Eds). *Agricultural Integrated Pest Management Systems*, New York: Academic. 1985. p.243-262

JAQUES, R. P. Effectiveness of the Polyhedrosis virus of the codling moth in orchard trials in Canada. In: *Proceedings International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*, 5, Adelaide, 1990, p.133-137.

JAQUES, R.P. Stability of entomopathogenic viruses. Entomological Society of America, Miscellaneous publications. v.10, 1977, p.99-116.

JOHNSON, D.W., D.G. BOUCIAS, C.S. BARFIELD, G.E. ALLEN. A temperature dependent model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. v.40, p.292-298, 1982.

JOHNSON, D. E. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* entomocidal protein toward cultured insect tissue. *Journal Invertebrate Pathology*. v.38, p.94-101, 1981.

LEMOS, R. N. S. *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). I. Consumo de área foliar produção de excremento em *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus saligna*. II Preferência alimentar e influência da idade foliar em seis espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae). Botucatu, 1996. 82p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agronômicas. UNESP.

MACEDO, N., PARO JUNIOR, L.A., MORAES, G. J. Relatório técnico de vistoria entomológica em plantações de eucalipto. Piracicaba, IPEF/ Departamento de silvicultura, 1975. 7 p.

McLEOD, P.J., W.C. YERIAN, S.Y. YOUNG. Inactivation of *Baculovirus heliothis* by ultraviolet radiation, dew and temperature. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.30, p. 237, 1977.

MORRIS, N., CUNNINGHAM, J. C., FINNEY-CRAWLEY, J. R., JAQUES, R.P., P.KINOSHITA, G. Microbial insecticides in Canada: their registration and use in agriculture, forestry and public and animal health. Entomological Society of Canada. Suppl. Bull. *Entomological Society of Canada*, v.18, p.43, 1986.

MORITA, T., ASSUMPCÃO, R. M. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes: Padronização-preparação-purificação*. São Paulo: Edgar Blucher Ltda. 2ed. 1998. 629p.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja. In: ALVES, S. B. (Ed.). *Controle Microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 1986. p.188-202.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. (Ed.). *Controle Microbiano de insetos*, 2.ed. Piracicaba: FEALQ,1998. p.509-39.

MOSCARDI, F., SOSA-GOMEZ, D. R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brasil. In: COOPPING, L.G., GREEN, M. B. & RESS, R. T. (Ed.) *Pest management in soybean*, London, Elsevier applied Science, 1992. p.98-109.

NAKASHIMA, N., SASAKI, J., TSUDA, K., YSUNAGA, C., NODA, H. Properties of a new picorna-like virus of the brown-winged green bug, *Plautia stali*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 71, p.151-1588, 1998.

NASCIMENTO, M. L., WILCKEN, C. F., NOVAES, Q., REZENDE, J. A. M., KITAJIMA, E. W., ORLATO, C. Susceptibility of immature stages of *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) to a possible Picornavirus. In: INTERNATIONAL

CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21, Foz do Iguaçu, 2000. *Resumos*. Embrapa Soja, 2000. v.1. 664 p.

NASCIMENTO, M. L. *Caracterização de um novo vírus isolado de Thyrinteina arnobia (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)*. Botucatu, 2001. 78 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrônômicas. UNESP.

NISHITSUTSUJI-UWO, J., OHSAWA, A., NISHIMURA, M. S. Factors affecting the insecticidal activity of d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.29, p.162-169, 1977.

ODA, S., BERTI FILHO, E. Incrementos anual volumétrico de *Eucalyptus saligna* sm. em áreas com diferentes níveis de infestações de lagartas de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1982) (Lepidoptera: Geometridae). *IPEF*, Piracicaba, v.17, p.27-31, 1978.

PERES FILHO, O. *Bioecologia de Thyrinteina arnobia (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) mantida em duas espécies de Eucalyptus (Myrtaceae)*. Piracicaba, 1989. 163p. (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz. USP.

PINNOCK, D. E. Pest populations and virus dosage in relation to crop productivity. In: M. SUMMERS; R. ENGLER; L. A. FALCÓN & P. VAIL (eds.). *Baculovirus for insect pest control: Safety considerations*. Washington, American Society. 1975. p.145-57.

PODGWAITE, J. D. Strategies for field use of baculoviruses. In: MARAMOROSH, K., SHERMAN, K.E. (Eds.) *Viral Insecticides for Biological Control*. Orlando, Fla: Academic, 1985. p.775-795.

REEVES, B. The effect of water pH on pesticides. *Oregon Horticulture society*, v.74, p.138-142, 1983.

RINDGE, F. H. A revision of *Nacophorini* (Lepidoptera, Geometridae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. v. 123, n.2, p.87-154, 1961.

RUECKERT, R. R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. *Fundamental virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven publishes, 1996. p.477-522.

SMIRNOFF, W. A., LONDONO, L. L., ARCKERMANN, H. W. A granulosis virus of *Glena bisulca* (Lepidoptera: Geometridae), a serious defoliator of *Cupressus lusitanica* in Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.30, n.3, p. 439-441, 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. *Estatísticas: Exportação Brasileira de produtos de base florestal 1999*. [on line]. São Paulo, s.d. [21 fev. 2001].

SOHI, S. S. The effect of pH and osmotic pressure on the grown survival of three lepidopteran cell lines. In: KURSTAK, E., MARAMOROSH, K., DÜBENDORFER, A. (Eds) *Invertebrate Systems in vitro*, Amsterdam/New York: Elsevier/North-Holland, 1980. p.35-43.

St. JULIAN, G., L.A. BULLA Jr., E.S.SHARP, G.L. ADAMS. Bacteria, spirochetes and rickettsia as insecticides. *Ann. New York Academic Science*, v.217, p.65-75, 1973

TANADA, Y. Epizootiology of infectious diseases. In: STEINHAUS, E. A. (Ed.). *Insect Pathology*. New York, Academic Press, v. 2, 1963, p.423-75.

TANADA, Y., H.K. KAYA. *Insect Pathology*. New York, Academic Press, 1993. 666 p.

THOMPSON, C. G., SCOTT, D. W., WICKMAN, B. E. Long-term persistence of the nuclear polyedrosis virus of the Douglas-fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae), In forest soil. *Environmental Entomology*, v.10, p.254-55, 1981.

TOJO, A., AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin by gut juice protease of of the silkworm *Bombyx mori*. *Applied Environmental Microbiology*. v.45, p.576-580, 1983.

TUNDISI, J. G. Typology of reservoirs in southern Brazil. *E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung*, Stuttgart 1, v. 1, p.103-139, 1981.

VINSON, S. B., IWANTSH, G. F. Host suitability for insect parasitoids. *Ann. Ver. Entomology*, v.25, p397-419, 1980.

WATERHOUSE, D. F. The hydrogen ion concentration in the alimentary canal of larval and adult Lepidoptera. *Ust. J. Sci. Res. Ser. B.*, v.2, p.428-437, 1949.

WATKINSON, I. Global view of present and future markets for *B. thuringiensis* products. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, v.41, p.3-7, 1994.

WILCKEN, C. F. *Estrutura da comunidade de lepidópteros, coletados com armadilhas, que ocorrem em florestas de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden*. Piracicaba, 1991. 148p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP.

WILCKEN, C.F. *Biologia de Thyrinteina arnobia (Stoll, 1782) (Lepidoptera:Geometridae) em espécies de Eucalyptus e em dieta artificial*. Piracicaba, 1996. 129p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". USP.

WILCKEN, C. F., RAETANO, C. G., NAGAMOTO, N. S. Efeito de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Thyrinteina arnobia* (Lep: Geometridae) em condições de laboratório. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3, 1992, Águas de Lindóia. *Resumos*. Águas de Lindóia: Sociedade Entomológica do Brasil, 1992. 301p.

WILLIAMSON, C., VON WELCHMAR, M. B. Two novel viruses associated with severe disease symptoms of green stinkbug *Nezara viridula*. *Journal of General Virology*, v. 73, p-2467-2471, 1992.

YOUNG, S. Y., W. C. YERIAN. Persistence of *Heliothis* NPV on foliage of cotton, soybean, and tomato. *Environmental Entomology*, v.3, p.252-5, 1974.

YUNOVISTZ, H., SNEH, B., YAWETZ, A. The pH characterizing the cytolytic activity of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin in the larval epithelium of *Spodoptera littoralis*. *Journal of Invertebrate Patology*, v.50, p.320-321, 1987.

ZANUNCIO, J. C.(Coord.). *Manual de pragas em florestas. Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle*. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993 140 p.

ZANUNCIO, J. C., SANTOS, G. P., SANTANA, D. L., ZANUNCIO, T. V. Controle de lagartas desfolhadoras de eucalipto. In: ZANUNCIO, J. C. (Coord.). *Manual de pragas em florestas*. PCMIP. IPEF/SIF, 1993. p.67-86.