

**PATOGENICIDADE DE DOIS
FORMULADOS À BASE DE
BACILLUS THURINGIENSIS VAR.
KURSTAKI (H-3a:3b) EM LARVAS DE
ANAGASTA KUHNIELLA (ZELLER,
1879) (LEP.: PYRALIDAE)**

**PATHOGENICITY OF TWO
FORMULATIONS BASED ON
BACILLUS THURINGIENSIS VAR.
KURSTAKI (H-3a;3b) TO
ANAGASTA KUHNIELLA LARVAE
(ZELLER, 1879)
(LEP.: PYRALIDAE)**

Mohamed E. M. HABIB*
Gílcia Ap. de CARVALHO**
Carlos Eduardo P. de SOUZA**
José Cláudio HOFLING***

RESUMO

Foram realizados estudos patológicos do estágio larval de *Anagasta kuhniella* com a finalidade de avaliar as

(*) Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP.

(**) Departamento de Zoologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP.

(***) Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Departamento de Biologia, Av. John Boyd Dunlop, s/nº, CEP 13020-904, Campinas, SP.

respostas à ação de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em uma formulação comercial (DIPEL) e um isolado (ZOOCAMP-78).

Estes estudos incluíram a descrição de sintomas externos causados pela bacteriose e avaliações dos níveis de susceptibilidade de dois estádios larvais.

O critério usado para expressar a susceptibilidade das larvas de *A. kuhniella* ao patógeno foi o de Tempo Letal Mediano (TL₅₀).

ABSTRACT

Pathological studies in *Anagasta kuhniella* larvae were realized in order to evaluate their responses to the action of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a commercial formulation (DIPEL) and an isolated (ZOOCAMP-78).

These studies include the description of the external symptoms caused by the bacteriosis as well as evaluations of the susceptibility levels of two larval instars. The criterion used to express the susceptibility of the *A. kuhniella* larvae to the pathogen was the Medium Lethal Time (LT₅₀).

1. INTRODUÇÃO

Os produtos armazenados como café, cacau, amendoim, trigo, milho, arroz, outros cereais e seus sub-produtos como farinhas, farelos, fubás e rações, podem ser atacados por insetos pragas que causam sérios prejuízos econômicos.

De acordo com dados fornecidos pela FAO 'Food and Agriculture Organization' as perdas são estimadas a 10% da produção total. No Brasil, essas perdas chegam a 20%, pois as condições de armazenamento no meio rural são precárias (GALLO, 1988).

A entomofauna de grãos armazenados e sub-produtos é composta por traças (Lepidoptera), gorgulhos, carunchos e outros besouros (Coleoptera) que possuem como características próprias o elevado potencial biótico, a

capacidade de infestar os produtos nos depósitos e no campo (infestação cruzada) e a polifagia. Estas três características explicam a alta capacidade de infestação e proliferação dessas pragas de produtos armazenados.

Devido à alta diversidade da entomofauna de produtos armazenados, o presente trabalho restringi-se à estudos patológicos de *Anagasta kuhniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera, Pyralidae) conhecida como traça de farinha ou mariposa de farinha do Mediterrâneo.

As larvas de *A. kuhniella* danificam preferencialmente farinhas, farelos e fubás, podendo ocorrer também em amendoim, milho, trigo e arroz estocados, bem como, em frutas secas, chocolate e carne.

Diversos trabalhos tem sido desenvolvidos com a finalidade de elaborar possíveis métodos de controle de *A. kuhniella*.

No Brasil o método químico é o mais utilizado. Mais recentemente, tem-se intensificado o estudo dos métodos de controle integrado de insetos pragas de produtos armazenados através da utilização de insetos entomófagos, agentes microbianos (bactérias, fungos e vírus) e feromônios, associados a outras medidas de controle.

O controle microbiano trata da utilização racional dos patógenos visando a manutenção da população das pragas a níveis não econômicos (ALVES, 1986).

Segundo HABIB (1968) o controle microbiano de *A. kuhniella* pode ser realizado através da utilização da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H-3a:3b), que é formadora de esporo, gram e catalase positivo, aeróbica e possui como característica típica a presença de um cristal protéico intracelular.

De acordo com HABIB (1982) a larva após a ingestão do *Bacillus thuringiensis* sofre perda de apetite ou até para de alimentar devido ao 'desconforto' no canal alimentar ou paralisia intestinal, respectivamente.

Através do presente trabalho avaliou-se as respostas de larvas de *A. kuhniella* à ação do entomopatógeno *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em uma formulação comercial (DIPEL) e um isolado (ZOO CAMP-78).

Os níveis de susceptibilidade de dois estádios larvais (3° e 5°) foram determinados, bem como, a sintomatologia externa nos insetos doentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Patologia de Insetos, do Departamento de Zoologia, IB, UNICAMP, no decorrer do ano de 1991, sob condições controladas de laboratório ($25 \pm 2^\circ \text{C}$, U. R. $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Larvas de *A. kuhniella* foram coletadas em farinha de trigo do Moinho Duratex S. A. (Rações Anhanguera), Campinas - SP. Estas foram mantidas em frascos de vidro com 18 cm de altura por 8 cm de diâmetro contendo ao fundo dieta composta por 80% de farinha de trigo integral e 20% de farelo de trigo, tampados com um tecido de algodão e papel de filtro fixos por elástico.

Para a realização dos estudos de susceptibilidade e patologia foram montados bioensaios com larvas de 3° e 5° estádios pertencentes a geração F_1 , com pesos médios de 9,3mg e 17mg respectivamente, obtidas da criação estoque. Dois produtos à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H-3a:3b) em formulação de pó molhável foram utilizados. O primeiro produto é comercial (DIPEL) com virulência equivalente a 16.000 UI/mg produzido pela ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda. e o outro é um isolado (ZOOCAMP-78) com virulência de 39.000 UI/mg obtido no Laboratório de Patologia de Insetos, Departamento de Zoologia, IB, UNICAMP, por PALEARI et al. (1978) a partir de larvas doentes de *A. kuhniella*.

As avaliações basearam-se em cinco concentrações diferentes do patógeno que foram determinadas de acordo com os estudos realizados por AMARAL FILHO (1986) e ROSSI (1990), seguindo um fator 'q' de progressão geométrica. Para cada tratamento utilizamos um número fixo de 40 larvas divididas em duas placas de Petri, medindo 1,5 cm de altura por 9,0 cm de diâmetro, contendo 20 larvas cada uma. Cada placa recebeu 1 g da mistura produto + dieta

nas concentrações 2,82 g, 7,08 g, 17,7 g, 44,24 g e 110,62g de produto em 1.000 g de dieta equivalentes a 45,12 UI/mg, 113,28 UI/mg, 283,20 UI/mg, 707,84 UI/mg e 1.769,92 UI/mg de dieta para o DIPEL e 109,98 UI/mg, 276,12 UI/mg, 690,30 UI/mg, 1725,36 UI/mg e 4.314,18 UI/mg de dieta para o isolado ZOOCAMP. Para a testemunha (controle) mantivemos o mesmo número de larvas, que receberam 1 g de dieta em cada placa.

Para os estudos de susceptibilidade foram analisadas as respostas das larvas a infecções nos bioensaios, através da mortalidade causada pelo patógeno. O critério adotado para a avaliação destas respostas foi o de Tempo Letal Mediano (TL_{50}), cujos horários de leitura seguiram um fator 'q' de progressão geométrica. Utilizamos este critério, pois de acordo com HABIB (1982) é o mais viável quando se trabalha com uma população pouco homogênea, ou seja, com grande variabilidade genética. E também pelo fato do patógeno ter sido misturado à dieta, não sabemos a quantidade exata do mesmo ingerida pelo inseto.

Os TL_{50} foram calculados através de regressão log-probite, em programa BASIC para microcomputador Itautec PC-XT. Para estes resultados serão apresentados tabelas e gráficos.

Foram observados também, a sintomatologia externa da bacteriose e os possíveis efeitos do patógeno nos indivíduos sobreviventes aos tratamentos (peso das pupas, emergência dos adultos e viabilidade dos ovos).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. SINTOMATOLOGIA EXTERNA

As larvas de *A. kuhniella* responderam ao patógeno através de uma seqüência de alterações morfológicas e comportamentais.

Os sintomas iniciais da bacteriose observados foram a perda do apetite e o abandono do alimento pela

maioria das larvas, com algumas alimentando-se esporadicamente. Notou-se também que as larvas se movimentavam mais lentamente e apresentavam início de regurgitação. Algumas larvas adquiriram uma coloração creme mais escura e um tanto opaca. Estes sintomas foram notados a partir da primeira avaliação que ocorreu após 12,0 horas da aplicação do patógeno.

Após 18,0 horas o tegumento das larvas começaram a apresentar uma coloração entre o creme escuro e o marrom claro e algumas larvas passaram a ter manchas escuras nas extremidades do corpo que logo se expandiam tornando-o totalmente escurecido. Observamos também que nesta fase as larvas diminuíram sensivelmente seus movimentos, não respondendo facilmente, na maioria das vezes, aos toques de estilete, apresentando também diarréia. Todavia, as larvas não sofreram paralisia geral e provavelmente não tenham sofrido paralisia intestinal.

A morte das larvas infectadas, que ocorreu por septicemia, começou a se manifestar após 30,0 horas se estendendo por dez dias ou mais em baixas concentrações do patógeno. Porém larvas de 5º estágio tratadas com as concentrações de 44,24 g e 110,62 g de ZOOCAMP em 1.000 g de dieta apresentaram mortalidade a partir de 24,0 horas. Os principais sintomas pós-mortais ocorriam rapidamente incluindo escurecimento do corpo chegando a coloração preta e a flacidez que o mesmo adquiria (Fig. 01). O tegumento não se rompia, permanecendo intacto, e não liberando qualquer odor de putrefação. Posteriormente, os cadáveres adquiriam o aspecto de larvas carbonizadas.

As larvas de *A. kuhniella*, de acordo com os sintomas apresentados, enquadram-se no Tipo III da classificação de insetos susceptíveis ao *B. thuringiensis* de HEIMPEL & ANGUS (1959). Estes autores indicaram as mesmas como exemplo do Tipo III dessa classificação.

Os sintomas observados no presente trabalho são semelhantes aos detectados por vários autores, entre eles, HABIB (1968) em *A. kuhniella*, HABIB (1982) em *A. argillacea*, *B. sophorae*, *Spodoptera latisfacia* e *Plodia interpunctella* e AMARAL FILHO (1986) em *A. Kuhniella* e *Plodia interpunctella*.

De acordo com HABIB (1982) a perda de apetite e a parada alimentar ocorrem devido certos distúrbios no sistema digestivo da larva infectada, causados pela ação tóxica da δ -endotoxina nas células epiteliais do intestino médio. A δ -endotoxina é liberada através da dissolução do cristal protéico no líquido intestinal alcalino de *A. kuhniella*.

A regurgitação é interpretada por STEINHAUS (1963) como um mecanismo de defesa através do qual o inseto tenta se livrar do agente etiológico.

Segundo HABIB (1982) o escurecimento do tegumento pode ser explicado pelas alterações histológicas que ocorrem a nível de hemolinfa e de epiderme do tegumento. Enquanto que a flacidez pode ocorrer devido à degeneração do tecido adiposo e à alterações histológicas nos músculos da larva.

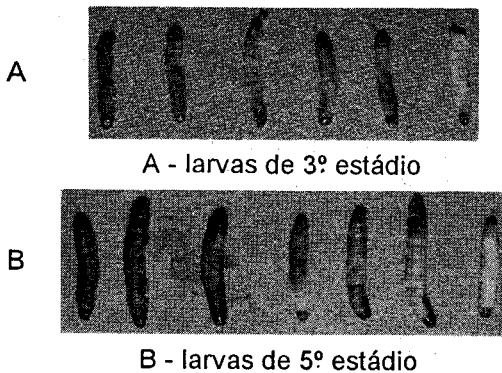


Figura 1. Seqüência de sintomas externos em larvas de *A. kuhniella* infectadas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

3.2. SUSCEPTIBILIDADE

3.2.1. LARVAS DE 3º ESTÁDIO

Os resultados obtidos do Tempo Letal Mediano (TL_{50}) de larvas de 3º estágio de *A. kuhniella* tratadas com os dois produtos à base de B.t.k. em cinco concentrações diferentes são apresentadas na Tabela 01 e nas Figuras 02 a 10.

Tabela 1 - Tempos Letais Medianos (TL_{50}), em horas, e Intervalos de Confiança para lavras de 3º estágio de Anagasta kuhniella, tratadas com 5 concentrações diferentes de 2 produtos à base de B. t. k.

| Produto | 2,82g/kg dieta | | 7,08g/kg dieta | | 17,7g/kg dieta | | 44,24g/kg dieta | | 110,62g/kg dieta | |
|---------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|-----------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo |
| DIPEL | 377,549 | 348,814 - 408,85 | 182,078 | 154,178 - 215,026 | 104,176 | 100,312 - 108,188 | 88,9845 | 78,8357 - 100,44 | 65,0084 | 54,4577 - 77,6031 |
| ZOOCAMP | 84,366 | 67,5279 - 105,403 | 55,0004 | 38,8651 - 77,8943 | 54,2065 | 41,5339 - 70,7458 | 43,7545 | 33,4545 - 57,2257 | | |

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 348.814 | 377.549 | 408.65 |
| N = 40 | Y = 15.9064 + 3.04113 X | | |
| VARIÂNCIA = .0930 | DESVIO PADRÃO = .3049 | COEF. CORREL. = .9933 | |

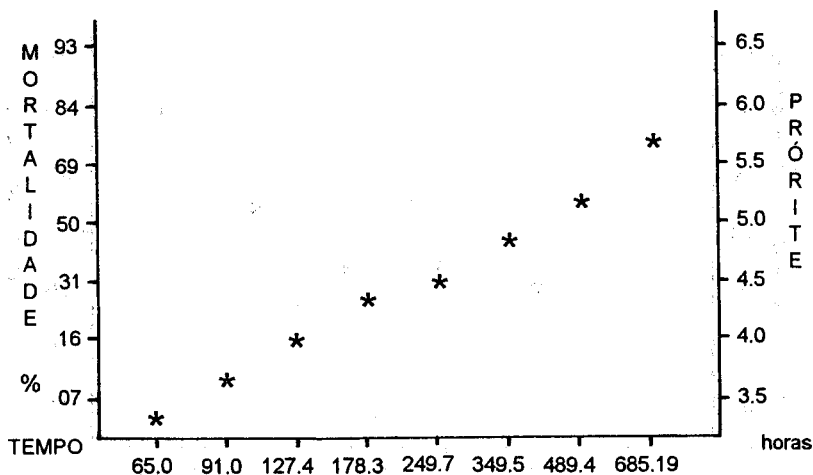


Figura 2. Tempo Letal Mediano (TL₅₀), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 2,82g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 154.178 | 182.078 | 215.026 |
| N = 40 | $Y = 14.9064 + 2.22121 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .4406 | DESVIO PADRÃO = .6638 | COEF. CORREL. = .9483 | |

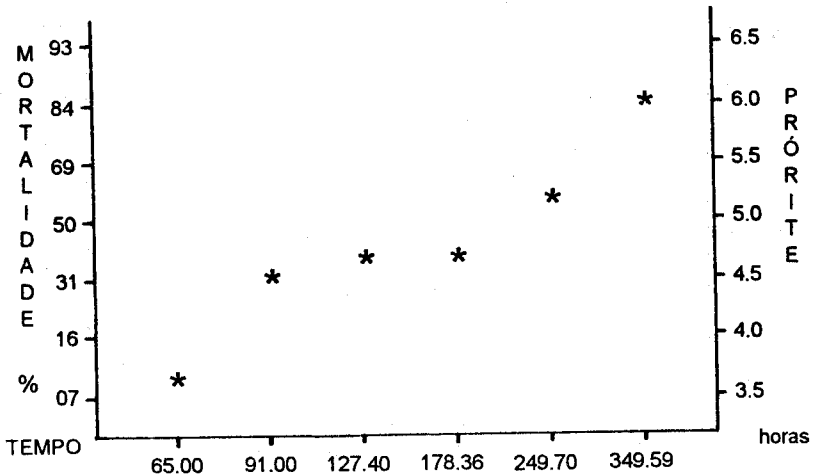


Figura 3. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 7,08g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---|---------------------|-----------------|
| horas | 100.312 | 104.176 | 108.188 |
| N = 40 | $Y = 14.3788 + 2.11136 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .0550 | DESVIO PADRÃO = .2346 COEF. CORREL. = .9951 | | |

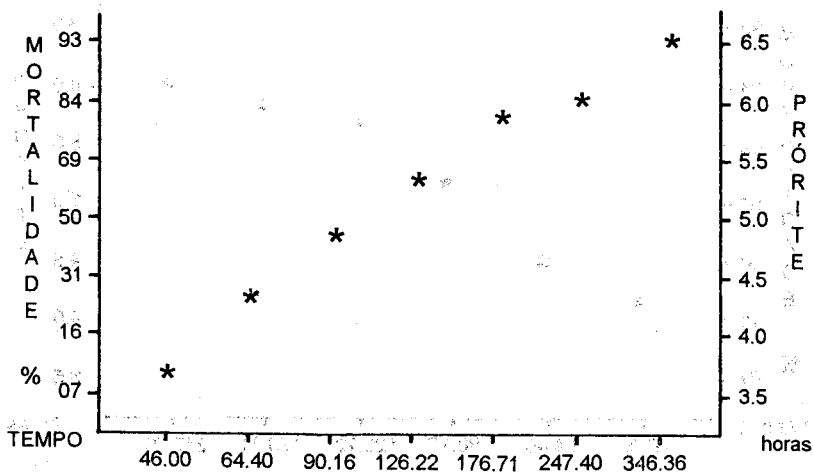


Figura 4. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 17,7g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 78.8357 | 88.9845 | 100.44 |
| N = 40 | Y = 13.8788 + 2.46365 X | | |
| VARIÂNCIA = .2157 | DESVIO PADRÃO = .4644 | COEF. CORREL. = .9751 | |

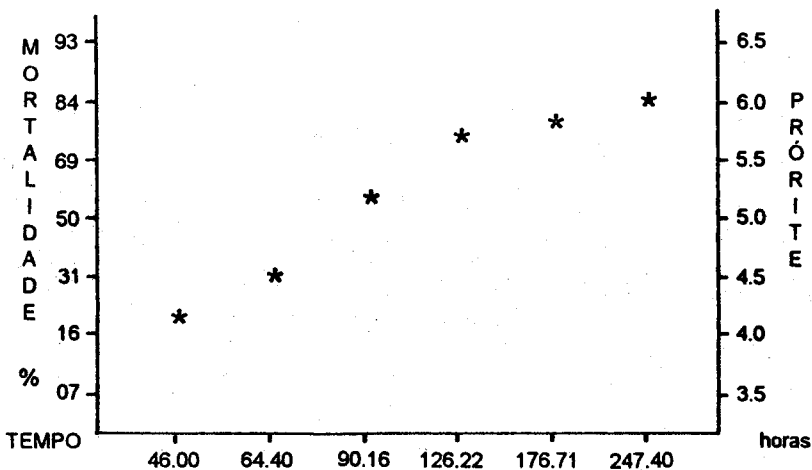


Figura 5. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 44,24g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 54.4577 | 65.0084 | 77.6031 |
| N = 40 | $Y = 13.3788 + 1.86355 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .1591 | DESVIO PADRÃO = .3989 | COEF. CORREL. = .9759 | |

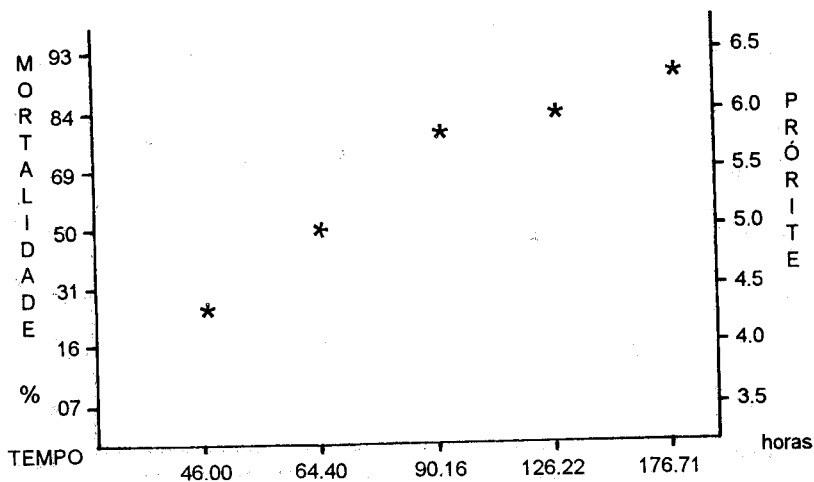


Figura 6. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 110,62g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 67.5279 | 84.366 | 105.403 |
| N = 40 | $Y = 13.8788 + 2.56322 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .5518 | DESVIO PADRÃO = .7428 | COEF. CORREL. = .9349 | |

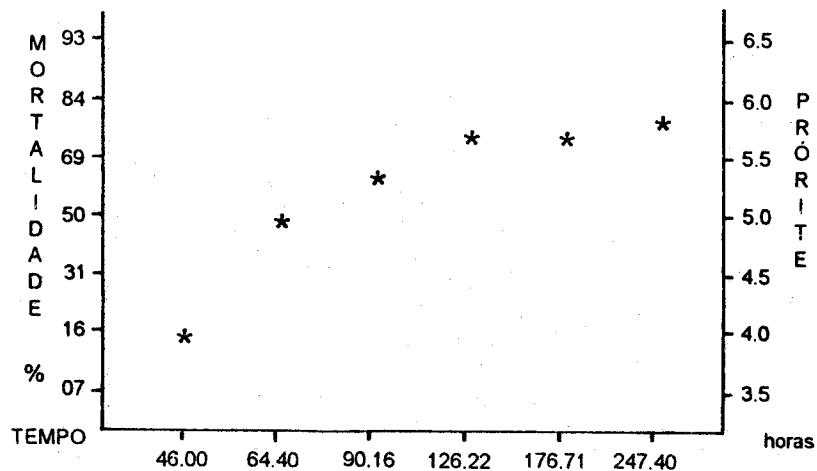


Figura 7. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com ZOOCAMP na concentração 2,82g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 38.8651 | 55.0004 | 77.8343 |
| N = 40 | $Y = 13.8788 + 1.89617 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .4829 | DESVIO PADRÃO = .6949 | COEF. CORREL. = .9432 | |

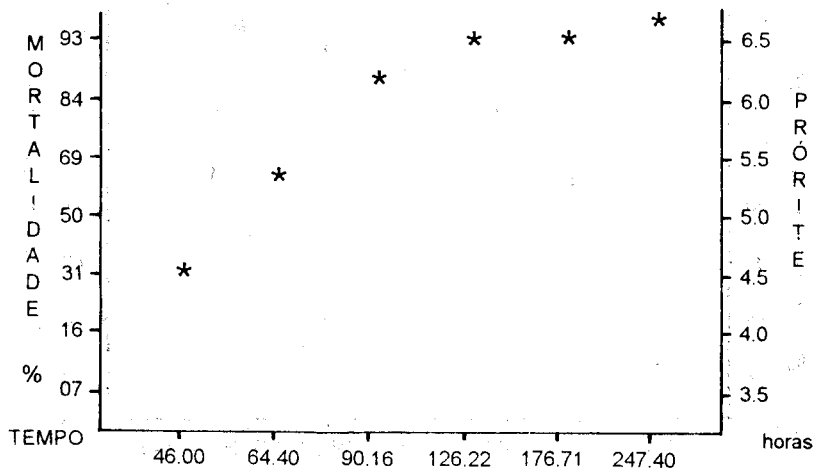


Figura 8. Tempo Letal Mediano (TL₅₀), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com ZOOCAMP na concentração 7,08g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 41.5339 | 54.2065 | 70.7458 |
| N = 40 | $Y = 13.3917 + 1.80221 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .8135 | DESVIO PADRÃO = .9020 | COEF. CORREL. = .9245 | |

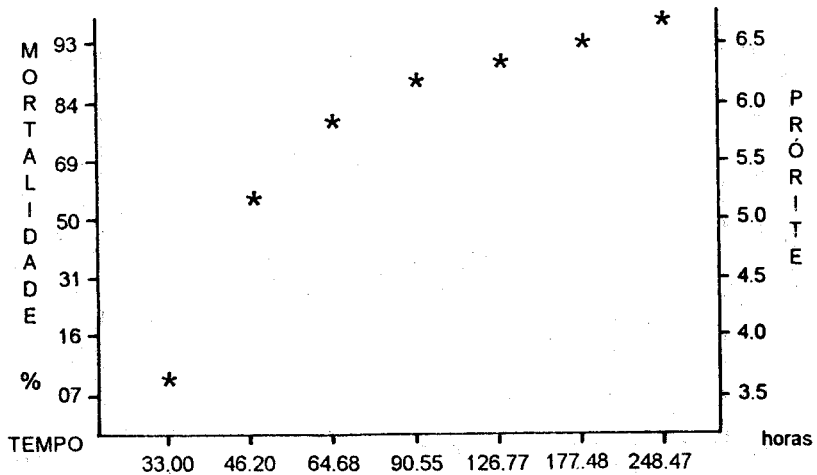


Figura 9. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com ZOOCAMP na concentração 17,7g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 33.4545 | 43.7545 | 57.2257 |
| N = 40 | $Y = 11.8917 + .987031 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .2294 | DESVIO PADRÃO = .4789 | COEF. CORREL. = .9530 | |

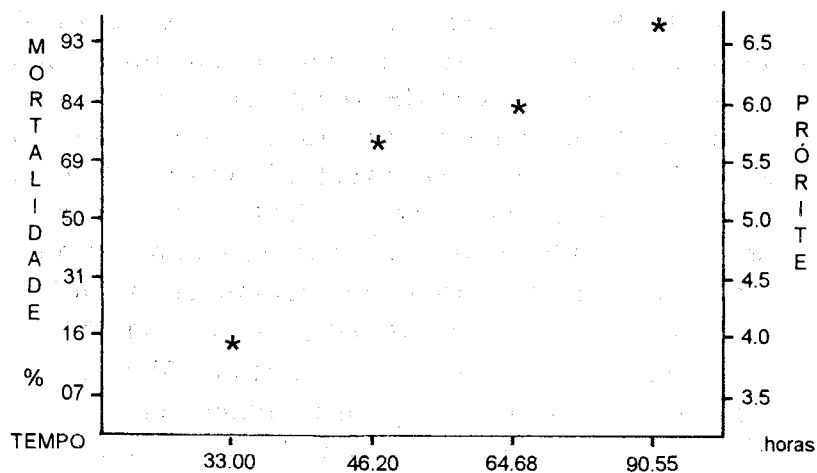


Figura 10. Tempo-Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 3º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com ZOOCAMP na concentração 44,24g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

Observamos que as larvas tratadas com o produto DIPEL, tiveram o tempo letal mediano diminuído a medida que se aumentava a concentração do patógeno, com diferenças significativas entre os tratamentos.

AMARAL FILHO (1986) verificando a susceptibilidade da mesma espécie e estágio, na concentração 7,08 g obteve um tempo letal mediano de 87,17 horas e ROSSI (1990) realizando estudos semelhantes nas concentrações 7,08 g, 17,7 g e 44,24 g obteve os TL_{50} de 89,9525 horas, 58,1250 horas e 38,1134 horas. Embora os três trabalhos tenham sido realizados nas mesmas condições de UR, temperatura e fotofase, com metodologia semelhante, no presente trabalho foram utilizados como inseto teste, larvas da geração F_1 que constituem uma população muito heterogênea, com grande variabilidade genética, enquanto que os autores acima citados trabalharam com larvas de gerações mais estáveis. Segundo AMARAL FILHO (1986) a população adquire a estabilidade a partir da 6ª geração, passando a ter um nível de susceptibilidade maior e portanto apresentando valores de TL_{50} menores. Acreditamos então, que este seja o motivo dos TL_{50} dos três trabalhos apresentarem diferenças significativas.

Quanto ao isolado ZOOCAMP, observamos também que a medida que a concentração era aumentada o tempo letal mediano diminuía. Embora tendo TL_{50} com valores numericamente diferentes, algumas concentrações não apresentaram diferenças significativas estatisticamente em relação as outras.

A concentração 7,08 g (Fig.08) demonstrou uma diferença significativa ($TL_{50} = 55,0004$ horas) em relação à concentração 2,82 g ($TL_{50} = 84,366$ horas) (Fig. 07). Já as concentrações 7,08g, 17,7 g e 44,24 g com tempos letais medianos de 55,0004 horas, 54,2065 horas e 43,7545 horas (Figs. 08, 09 e 10) não apresentaram diferenças significativas entre si, pois seus intervalos de confiança se sobrepõem.

AMARAL FILHO (1986) obteve para a concentração 7,08g um tempo letal mediano de 88,05 horas, revelando uma diferença significativa em relação a mesma concentração e produto utilizados no presente trabalho ($TL_{50} = 55,0004$ horas).

Para a concentração 110,62 g não obtivemos o tempo letal mediano, pois os valores das leituras não permitiram os cálculos.

Comparando-se os dois produtos, em todas as concentrações e isolado ZOOCAMP mostrou-se mais eficiente que o produto DIPEL, apresentando um menor tempo letal mediano (TL_{50}) com diferenças significativas estatisticamente.

Acreditamos que este fato seja devido ao ZOOCAMP ser originário de uma linhagem isolada de larvas de *A. kuhniella*, no Brasil.

3.2.2. LARVAS DE 5º ESTÁDIO

Os resultados dos tempos letais medianos (TL_{50}) observados para as larvas de 5º estágio de *A. kuhniella* tratadas com B. t. k. são apresentados na Tabela 02 e Figuras 11 a 17.

Tabela 2 - Tempos Letais Medianos (TL_{50}), em horas, e Intervalos de Confiança para larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com 5 concentrações diferentes de 2 produtos à base de B. t. k.

| Produto | 2,82g/kg dieta | | 7,08g/kg dieta | | 17,79g/kg dieta | | 44,24g/kg dieta | | 110,62g/kg dieta | |
|---------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo | TL_{50} | Intervalo |
| DIPEL | 171,654 | 146,079 - 201,705 | 142,508 | 105,857 - 191,849 | 99,6587 | 81,1905 - 122,328 | 61,341 | 47,2442 - 79,644 | 47,144 | 35,8986 - 61,9121 |
| ZOOCAMP | | | 60,0534 | 47,7975 - 75,4519 | 50,6541 | 37,2228 - 66,9319 | 37,03 | 33,908 - 40,4395 | | |

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 105.857 | 142.508 | 191.849 |
| N = 40 | Y = 13.8788 + 3.14215 X | | |
| VARIÂNCIA = .6376 | DESVIO PADRÃO = .7985 | COEF. CORREL. = .9243 | |

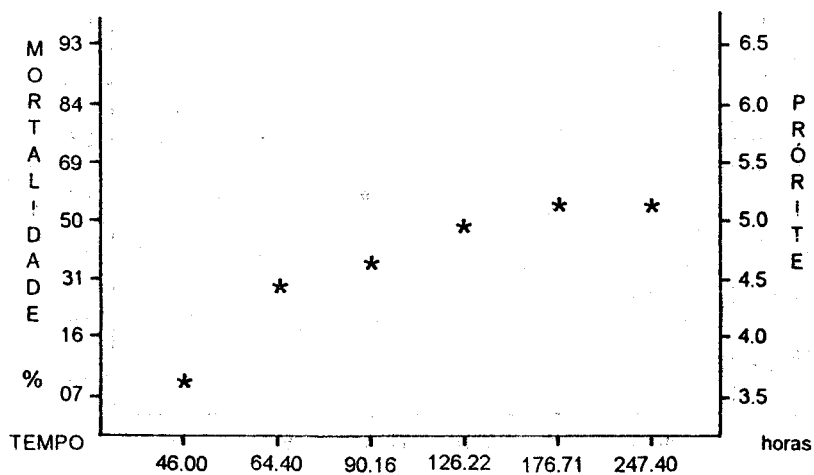


Figura 11. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 7,08g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|---|-----------------|---------------------|-----------------|
| horas | 81.1905 | 99.6587 | 122.328 |
| N = 40 | | | |
| $Y = 13.8788 + 3.39804 X$ | | | |
| VARIÂNCIA = .3920 DESVIO PADRÃO = .6261 COEF. CORREL. = .9542 | | | |

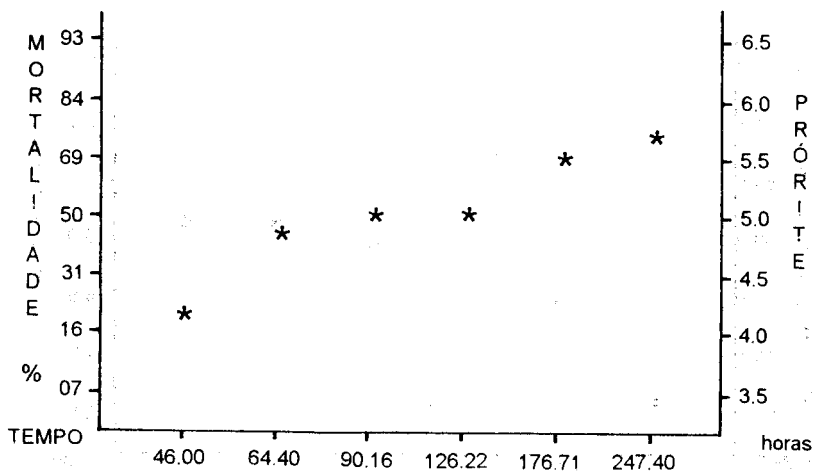


Figura 12. Tempo Letal Mediano (TL₅₀), em horas, de larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 17,7g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|---|-----------------|---------------------|-----------------|
| horas | 47.2442 | 61.341 | 79.644 |
| N = 40 | | | |
| $Y = 13.8788 + 4.30639 X$ | | | |
| VARIÂNCIA = .2248 DESVIO PADRÃO = .4742 COEF. CORREL. = .9741 | | | |

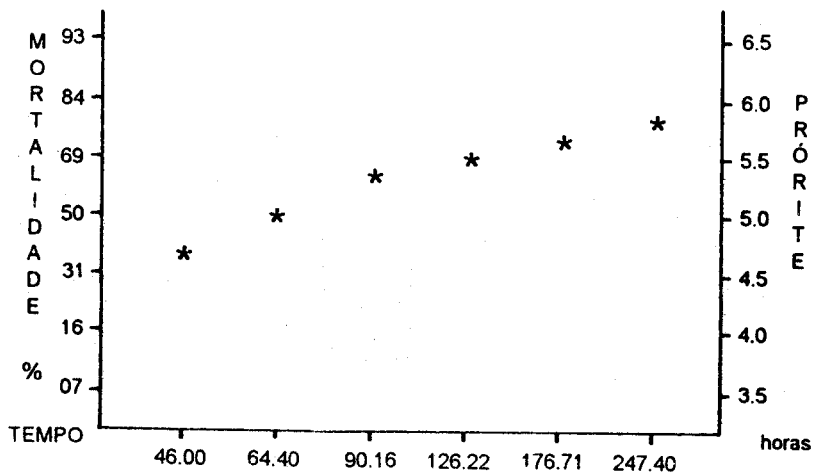


Figura 13. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 44,24g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 35.8986 | 47.144 | 61.9121 |
| N = 40 | $Y = 12.3917 + 1.13906 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .4849 | DESVIO PADRÃO = .6963 | COEF. CORREL. = .9244 | |

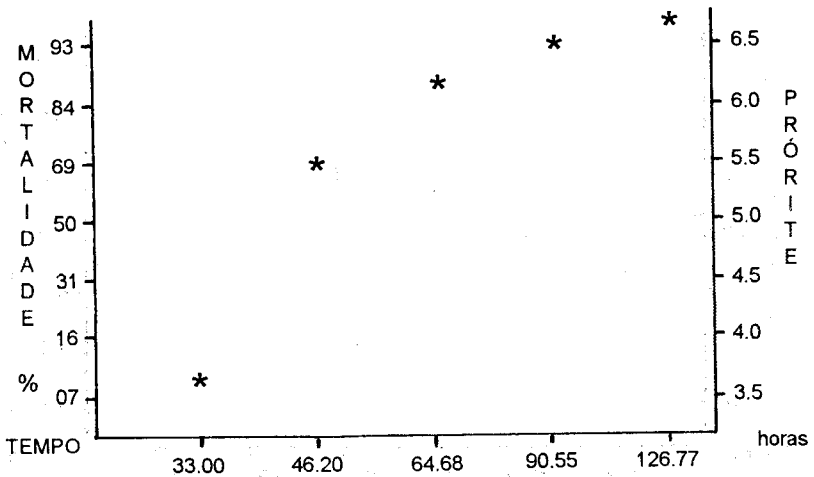


Figura 14. Tempo Letal Mediano (TL₅₀), em horas, de larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com DIPEL na concentração 110,62g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 146.079 | 171.654 | 201.705 |
| N = 40 | Y = 13.8788 + 4.07381 X | | |
| VARIÂNCIA = .1074 | DESVIO PADRÃO = .3277 | COEF. CORREL. = .9878 | |

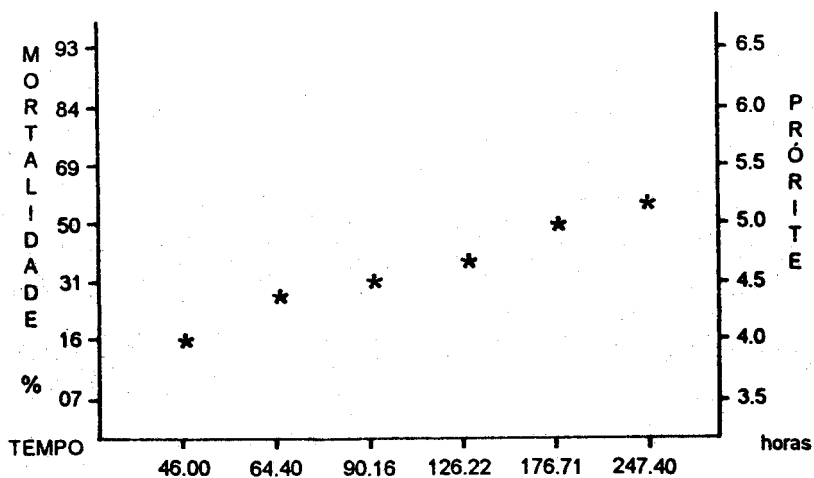


Figura 15. Tempo Letal Mediano (TL₅₀), em horas, de larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com ZOOCAMP na concentração 2,82g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------|
| horas | 47.7975 | 60.0534 | 75.4519 |
| N = 40 | $Y = 12.8917 + 1.85005 X$ | | |
| VARIÂNCIA = .7894 | DESVIO PADRÃO = .8885 | COEF. CORREL. = .9053 | |

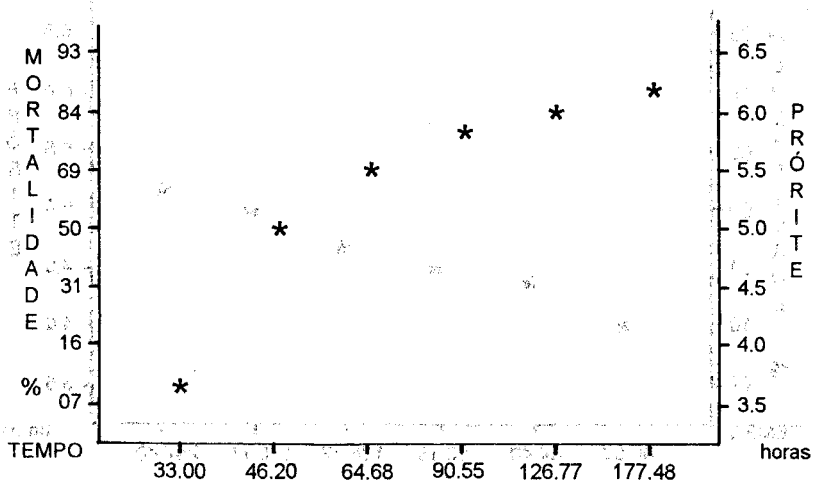


Figura 16. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com ZOOCAMP na concentração 7,08g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

| | LIMITE INFERIOR | TEMPO LETAL MEDIANO | LIMITE SUPERIOR |
|---|-----------------|---------------------|-----------------|
| horas | 37.2228 | 50.6541 | 689319 |
| N = 40 | | | |
| $Y = 12.8917 + 1.63832 X$ | | | |
| VARIÂNCIA = .8005 DESVIO PADRÃO = .8947 COEF. CORREL. = .9038 | | | |

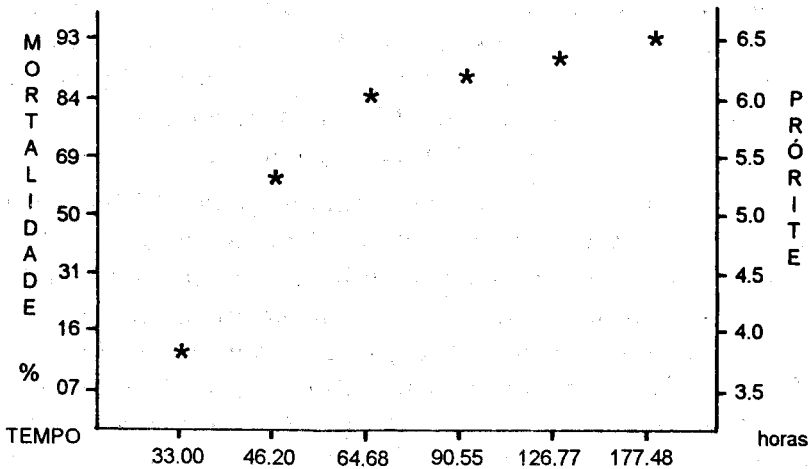


Figura 17. Tempo Letal Mediano (TL_{50}), em horas, de larvas de 5º estágio de *Anagasta kuhniella*, tratadas com ZOOCAMP na concentração 17,7g/kg dieta (Escala Log. Prob.).

As larvas que receberam tratamento com o produto DIPEL apresentaram tempos letais medianos diminuídos de acordo com o aumento da concentração, mostrando diferenças significativas entre as concentrações, exceto as duas maiores que são estatisticamente iguais.

O tempo letal mediano das larvas infectadas com a concentração 2,82 g de DIPEL em 1.000 g de dieta não foi obtido, pois as mesmas empuparam com 41,02% de mortalidade em 348 horas.

Para as concentrações 7,08 g, 17,7 g e 44,24 g observamos um TL_{50} de 142,508 horas (Fig. 11), 99,6587 horas (Fig. 12) e 61,341 horas (Fig. 13) que são valores diferentes numérica e estatisticamente. Porém, os TL_{50} das concentrações 7,08 g e 17,7 g mesmo sendo diferentes estatisticamente, não são muito significativos.

Para as mesmas três concentrações ROSSI (1990) obteve tempos letais medianos de 47,5769 horas, 49,5387 horas e 36,6442 horas, respectivamente, demonstrando uma diferença significativa em relação ao presente trabalho, isto se deve provavelmente à grande variabilidade genética das larvas utilizadas neste. AMARAL FILHO (1986) verificando a susceptibilidade de *A. kuhniella* no 5º estágio à concentração 7,08 g do mesmo produto obteve um tempo letal mediano de 98,57 horas também demonstrando diferença significativa em relação ao presente trabalho.

Para a concentração 110,62 g de DIPEL/Kg de dieta obtivemos um TL_{50} de 47,144 horas (Fig. 14) que estatisticamente não possui diferença muito significativa em relação à concentração 44,24 g. Porém, mostrou diferença altamente significativa em relação às concentrações 17,7 g (TL_{50} = 99,6587 horas) e 7,08 g (TL_{50} - 142,508 horas).

Os TL_{50} observados para as mesmas concentrações, já mencionadas, para o isolado ZOOCAMP também tiveram seus valores diminuídos a medida que se aumentava a concentração.

Os TL_{50} observados para as concentrações 2,82 g e 7,08 g foram de 171,654 horas (Fig. 15) e 60,0534 horas (Fig. 16) respectivamente, com diferenças altamente significativas. Já a concentração 17,7 g teve um TL_{50} de 50,6541 horas (Fig. 17) que é estatisticamente igual ao TL_{50} da concentração 7,08 g. A concentração 44,24 g apresentou um tempo letal mediano de 37,03 horas que consideramos com diferença pouco significativa estatisticamente em relação ao da concentração 17,7 g. Para a concentração 110,62 g não obtivemos o TL_{50} , pois os valores das leituras não permitiram os cálculos.

AMARAL FILHO (1986) obteve um TL_{50} de 88,98 horas para a concentração 7,08 g mostrando uma diferença significativa em comparação com o presente trabalho ($TL_{50} = 60,0534$ horas).

Comparando-se os dois formulados, em todas as concentrações o isolado ZOOCAMP mostrou maior virulência que o DIPEL apresentando um menor tempo legal mediano (TL_{50}) com diferença significativa.

3.2.3. SUSCEPTIBILIDADE COMPARADA DE LARVAS DE 3º E 5º ESTÁDIOS

Para todas as concentrações e produtos, exceto para as concentrações 2,82 g e 7,08 g de ZOOCAMP, as larvas de 5º estágio mostraram-se mais susceptíveis ao B.t.k. que as de 3º estágio, apresentando um menor tempo letal mediano (TL_{50}).

Acreditamos que as larvas de 5º estágio infectadas pelas duas concentrações mais baixas de ZOOCAMP tenham apresentado um TL_{50} maior que o das larvas de 3º estágio nas mesmas concentrações e produto devido ao fato do patógeno não ter sido bem homogeneizado na dieta.

Levando-se em consideração o peso médio das larvas, que é de 9,3 mg e 17,0 mg de 3º e 5º estádios respectivamente, notamos que as larvas de 5º estádio são 1,8 vezes mais pesadas que as de 3º estádio, conseqüentemente ingerindo 1,8 vezes mais alimento e provavelmente mais bacilo.

Então, se o tempo letal mediano do 5º estádio for até 1,8 vezes menor que o do 3º estádio, significa que a susceptibilidade é a mesma (transformando-se a quantidade de patógeno por unidade de peso).

Como a diferença dos pesos é maior que as diferenças dos tempos letais medianos obtidos, podemos afirmar que o 3º estádio é mais susceptível que o 5º estádio (Tabelas 03 e 04).

3.3. LARVAS QUE SOBREVIVEM AOS TRATAMENTOS

As larvas de *A. kuhniella* que sobreviveram às diferentes concentrações dos dois formulados (DIPEL e ZOOCAMP) à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (B.t.k.), utilizados no presente trabalho, não tiveram sua metamorfose afetada e também não sofreram atraso no ciclo biológico, completando-o normalmente como as larvas das testemunhas.

As puras obtidas em cada concentração do patógeno e também as das testemunhas foram pesadas e através de seus pesos médios (Tabelas 05 e 06) foi verificado estatisticamente se haviam diferenças significativas entre elas ou não. Para o isolado ZOOCAMP foram estudados somente os pesos médios das pupas das três concentrações menores e da testemunha, pois as duas concentrações maiores obtiveram 100% de mortalidade.

Através do teste de diferença de duas médias e análise de variância aplicados a estes dados, constatou-se que não houve diferenças significativas entre as médias das pupas das testemunhas e as pupas sobreviventes às diferentes concentrações do patógeno para os dois formulados.

De todas as pupas emergiram adultos que após acasalamento originaram ovos viáveis.

Tabela 3 - Pesos médios, em g, e Tempos Letais Medianos, em horas, de larvas de 3º e 5º estádios de *Anagasta kuhniella* tratadas com 5 concentrações diferentes de DIPEL.

| | | Tempos Letais Medianos (TL ₅₀) | | | | |
|------------------------|----------------|--|----------------|-----------------|------------------|--|
| ESTÁDIOS (\bar{X}) | 2,82g/Kg dieta | 7,08g/Kg dieta | 17,7g/Kg dieta | 44,24g/Kg dieta | 110,62g/Kg dieta | |
| 3º | | | | | | |
| $\bar{X} = 0,0093$ | 377,549 | 182,078 | 104,176 | 88,9845 | 65,0084 | |
| 5º | | | | | | |
| $\bar{X} = 0,017$ | | 142,508 | 99,6587 | 61,341 | 47,144 | |
| \bar{X} = peso médio | | | | | | |

Tabela 4 - Pesos médios, em g, e Tempos Letais Medianos, em horas, de larvas de 3º e 5º estádios de *Anagasta kuhniella* tratadas com 5 concentrações diferentes de ZOOCAMP.

| | | Tempos Letais Medianos (TL ₅₀) | | | | |
|------------------------|--|--|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| ESTÁDIOS (\bar{X}) | | 2,82g/Kg dieta | 7,08g/Kg dieta | 17,7g/Kg dieta | 44,24g/Kg dieta | 110,62g/Kg dieta |
| 3º | | 84,366 | 55,0004 | 54,2065 | 43,7545 | |
| \bar{X} = 0,0093 | | | | | | |
| 5º | | 171,654 | 60,0534 | 50,6541 | 37,03 | |
| \bar{X} = 0,017 | | | | | | |
| \bar{X} = peso médio | | | | | | |

Tabela 5 - Peso médio, em g, de pupas da testemunha e das sobreviventes ao tratamento com 5 concentrações diferentes de DIPEL.

| | Testemunha | 2,82g/Kg dieta | 7,08g/Kg dieta | 17,7g/Kg dieta | 44,24g/Kg dieta | 110,62g/Kg dieta |
|------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|
| \bar{X} | 0,014 | 0,015 | 0,016 | 0,015 | 0,015 | 0,015 |
| e.p. | 0,0005 | 0,0003 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0005 | 0,0001 |
| \bar{X} = peso médio | e.p. = erro padrão | | | | | |

Tabela 6 - Peso médio, em g, de pupas da testemunha e das sobreviventes ao tratamento com 3 concentrações diferentes de ZOOCAMP.

| | Testemunha | 2,82g/Kg dieta | 7,08g/Kg dieta | 17,7g/Kg dieta |
|-----------|------------|----------------|----------------|----------------|
| \bar{X} | 0,015 | 0,015 | 0,017 | 0,016 |
| e.p. | 0,0002 | 0,0005 | 0,0003 | 0,0005 |

\bar{X} = peso médio e.p. = erro padrão

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho, permitem as seguintes conclusões:

4.1. Os sintomas pré e pós-mortais apresentados pelas larvas de *A. kuhniella* de 3º e 5º estádios foram os mesmos.

4.2. As larvas não sofreram paralisia geral enquadrando-se, então, no Tipo III da classificação de HEIMPEL & ANGUS (1959).

4.3. Em ambos os estádios, quanto maior a concentração do entomopatógeno menor o Tempo Letal Mediano (TL₅₀).

4.4. Em todas as concentrações e estádios o isolado ZOOCAMP-78 mostrou-se mais eficiente que o produto DIPEL, apresentando um menor Tempo Letal Mediano (TL₅₀).

4.5. Larvas de 3º estádio mostraram-se mais susceptíveis ao bacilo que larvas de 5º estádio.

4.6. As larvas sobreviventes a bacteriose não tem a metamorfose afetada, completando o ciclo biológico normalmente e originando adultos férteis que produzem ovos viáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. 1986 Patologia Geral. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. 1ª ed., Ed. Manole Ltda., São Paulo, p. 3-70.
- AMARAL FILHO, B. F. 1986 **Estudos Biológicos e Patológicos de Dois Piralídeos Pragas de Produtos Armazenados**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 167 pp.
- GALLO, D. 1988 **Manual de Entomologia Agrícola**. 2ª ed., Ed. Agronômica Ceres Ltda., São Paulo, 649 pp.

- HABIB, M. E. M. 1968 **Histopathological Studies on the Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner, on the Mediterranean Flour Moth, *Anagasta kuhniella* Zeller.** Tese de Mestrado, Faculdade de Agric. Universidade de Alexandria, Egito, 196 pp.
- HABIB, M. E. M. 1982 **Patogenicidade de duas Variedades de *Bacillus thuringiensis* Berliner para larvas de Lepidoptera e Diptera.** Tese de Livre Docência, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 163 pp.
- HEIMPEL, A. M. & ANGUS, T. A. 1959 The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. **J. Insect Pathol.**, 1: 152-170.
- PALEARI, L. M.; HABIB, M. E. M. & GARCIA, M. A. 1980 Isolamento, purificação e bioensaios de uma linhagem de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Resumos do VI Cong. Bras. Entomol.** Campinas - SP, p. 356.
- ROSSI, P. E. 1990 **Estudos Patológicos em larvas de *Anagasta kuhniella* Zeller, 1879, infectadas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H-3a:3b).** Monografia apresentada à Universidade Federal de São Carlos, 29 pp.
- STEINHAUS, E. A. 1963 **Insect Pathology - An advanced Treatise.** Academic Press, New York, vol. 1, 661 pp.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível a partir da colaboração de muitas pessoas, a todas oferecemos o nosso muito obrigado e, em especial:

Aos Profs. Drs. Benedicto F. do Amaral Filho e Carlos Fernando S. de Andrade; aos Pós-Graduandos Cláudia Waib Castelo Branco, Sérgio L. Carvalho e Wedson D. Fernandes; e ao Técnico de Laboratório Ricardo Fabiano, Departamento Zoologia, IB, UNICAMP.