

PATOGENICIDADE DE DUAS VARIEDADES DE Bacillus thuringiensis
BERLINER PARA LARVAS DE LEPIDOPTERA E DIPTERA

→ No Vou
doutor

Mohamed Ezz El-Din Mostafa Habib

Departamento de Zoologia

Instituto de Biologia

UNICAMP

Tese apresentada para o Concurso de
Livre Docência na Área de Controle
Biológico do Departamento de Zoo
logia do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas

(UNICAMP)

CAMPINAS

1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A memória do
Professor Dr. Zeferino Vaz
a quem muito devo.

AGRADECIMENTOS

A colaboração sincera e desinteressada de muitas pessoas foi indispensável para a realização deste trabalho. A ausência de citação nominal é falha imperdoável; porém, não significa, de forma nenhuma, esquecimento da colaboração prestada. A todos, os nossos mais profundos agradecimentos.

Ao Professor Dr. Paulo Friedrich Bührnheim, Dept^o de Zoologia, UNICAMP, pela amizade, incentivo e apoio que se refletem em cada palavra desse trabalho, deixamos aqui os nossos sinceros agradecimentos.

Aos colegas do Dept^o de Zoologia, UNICAMP, pelo companheirismo e amizade. A todos, na pessoa do Professor Dr. Ivan Sazima, atual chefe do Departamento, oferecemos nosso muito obrigado.

Aos amigos Maria Alice Garcia, Carlos Fernando S. de Andrade e Catarina da Silva Motta, pela amizade e apoio, dispensando, carinhosamente, seu tempo na revisão dos manuscritos, nossos agradecimentos.

Aos Professores Doutores Pierre Montouchet, do Dept^o de Zoologia, Moustafa El-Guindy, da Faculdade de Odontologia, e Ahmed El-Dash, da Faculdade de Tecnologia de Alimentos, todos da UNICAMP, os meus agradecimentos pela amizade e estímulo.

Ao Deptº de Histologia, na pessoa do Professor Dr. Walter August Hadler, Chefe do Deptº e Diretor do Instituto de Biologia, UNICAMP, pelo estímulo e apoio, os nossos profundos agradecimentos.

Ao Deptº de Parasitologia, UNICAMP, na pessoa do Professor Dr. Angelo Prado, atual Chefe do Departamento, pela disponibilidade do micrótomo, os nossos agradecimentos.

Ao Professor Dr. Hermógenes Leitão Fº, Chefe do Deptº de Morfologia e Sistemática Vegetal, pela identificação do coqueiro e da aguapé. Ao Victor Py-Daniel, INPA, Manaus, pela identificação dos simulídeos. Ao Professor Dr. Frederico Wiendl, CENA, Piracicaba, pelo fornecimento de amostra da linhagem 109 de Plodia interpunctella, os nossos agradecimentos.

Ao Deptº Técnico da HERBITÉCNICA, S.A., na pessoa do Engº Agrônomo Adel Nassif Chehata, pela amizade e constante estímulo e apoio durante a realização deste trabalho, os nossos sinceros agradecimentos.

A ABBOTT LABORATÓRIOS DO BRASIL, Divisão Agroquímica, na pessoa do Engº Agrônomo Renê Bertozo, pela amizade, fornecimento de produtos e constante apoio durante a realização do trabalho. A SANDOZ, S.A. e INDÚSTRIAS QUÍMICAS ELETRO CLORO, S.A., pelo fornecimento de amostras de produtos, o nosso obrigado.

Aos nossos alunos de Pós-Graduação e estagiários na UNICAMP e no INPA, pelo carinho, estímulo e apoio, os nossos agradecimentos.

A minha esposa Sawsan e aos meus filhos Nader, Mona e Shadi, pelo carinho, amor, apoio e compreensão que me sustentaram durante todos estes anos, minha eterna gratidão.

Í N D I C E S

A. ÍNDICE DE CAPÍTULOS E SEÇÕES :	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO HISTÓRICA	4
2.1. ASPECTOS TAXONÔMICOS DE <u>Bacillus thuringiensis</u>	5
2.2. PRINCIPAIS TOXINAS PRODUZIDAS POR <u>B.thuringiensis</u> ..	10
2.3. MODO DE AÇÃO DE <u>B. thuringiensis</u>	14
2.4. APLICABILIDADE DE <u>B. thuringiensis</u>	22
2.5. PADRONIZAÇÃO DE PRODUTOS A BASE DE <u>B.thuringiensis</u> ..	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. <u>Bacillus thuringiensis</u>	30
3.2. ESPÉCIES DE INSETOS	32
3.3. CRIAÇÕES DE ESTOQUE	33
3.4. BIO-ENSAIOS	36
3.5. DETERMINAÇÃO DE DOSES E TEMPOS LETAIS	42
3.6. HISTOPATOLOGIA	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. PATOGENICIDADE DE <u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> PARA LARVAS DE LEPIDOPTERA	45
4.1.1. SINTOMATOLOGIA EXTERNA	45
4.1.2. ALTERAÇÕES NO pH DO CONTEÚDO INTESTINAL E DA HEMOLINFA	50
4.1.3. HISTOPATOLOGIA	53
4.1.3.1. Alterações no intestino médio	53

4.1.3.2.	Alterações nas glândulas labiais	56
4.1.3.3.	Alterações nos túbulos de Malpighi	57
4.1.3.4.	Alterações nos gânglios nervosos	59
4.1.3.5.	Alterações nas fibras musculares	61
4.1.3.6.	Alterações no tecido adiposo	61
4.1.4.	SUSCEPTIBILIDADE E VIRULÊNCIA	63
4.1.4.1.	<u>Alabama argillacea</u>	63
4.1.4.2.	<u>Brassolis sophorae</u>	73
4.1.4.3.	<u>Spodoptera latifascia</u>	82
4.1.4.4.	<u>Plodia interpunctella</u>	90
4.2.	PATOGENICIDADE DE <u>Bacillus thuringiensis</u> var. <u>israelensis</u> PARA LARVAS DE DIPTERA	99
4.2.1.	PATOGENICIDADE PARA LARVAS DE <u>Culex declarator</u> ..	100
4.2.1.1.	Sintomatologia Externa	100
4.2.1.2.	Histopatologia	103
4.2.1.2.1.	Alterações no mesenteron	103
4.2.1.2.2.	Alterações nos gânglios nervosos	105
4.2.1.2.3.	Alterações nas fibras musculares	107
4.2.1.3.	Susceptibilidade de larvas de <u>Culex declarator</u>	109
4.2.1.4.	Virulência de dois produtos à base de H-14..	115
4.2.2.	PATOGENICIDADE PARA LARVAS DE SIMULÍDEOS	117
4.2.2.1.	Sintomatologia externa	117
4.2.2.2.	Susceptibilidade	118
5.	CONCLUSÕES	122
6.	RESUMO	126

7. SUMMARY 130
8. LITERATURA CITADA 134

B. ÍNDICE DE TABELAS :

1. Sorotipos de B. thuringiensis registrados até 1981 .. 11
2. Tempos letais medianos em horas e intervalos de confiança para larvas do 5º estágio de A. argillacea infectadas por 4 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki 67
3. TLs-50 e intervalos de confiança, em horas, para larvas de B. sophorae infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki, utilizando 6 doses (UI/larva e equivalência por unidade de peso)..... 77
4. Comparação em três níveis entre a susceptibilidade de larvas de B. sophorae e de A. argillacea ao B. thuringiensis (Dipel)..... 80
5. Tempos letais medianos em horas e intervalos de confiança para larvas de S. latifascia infectadas por 3 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki..... 85
6. Tempos letais em horas e intervalos de confiança para larvas de P. interpunctella infectadas por 4 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki em três concentrações diferentes..... 92
7. CLs-50 de Dipel para larvas de P. interpunctella com os intervalos de confiança, após 4 períodos de exposição..... 98
8. Tempos letais medianos, em minutos, com intervalos de confiança para idades diferentes de larvas de C. declarator tratadas com 3 concentrações de B. thuringiensis var. israelensis112

9. Tempos letais medianos, em minutos, com intervalos de confiança para larvas de duas espécies de simulídeos tratadas com diferentes concentrações de B. thuringiensis var. israelensis120

C. ÍNDICE DE FIGURAS :

1. Aplicação do patógeno na cavidade bucal de larvas de B. sophorae, com auxílio de microseringa e lupa binocular 38
2. Sintomas externos de infecção por B. thuringiensis em A. argillacea..... 48
3. Sintomas externos de infecção por B. thuringiensis em larvas de B. sophorae 49
4. Alterações no pH intestinal e da hemolinfa em larvas de B. sophorae durante 48 horas após a infecção por B. thuringiensis var. kurstaki 51
5. Alterações histológicas no intestino médio em larvas de A. argillacea devido a infecção por B. thuringiensis var. kurstaki 55
6. Alterações histológicas em glândulas labiais de larvas de A. argillacea causadas por B. thuringiensis var. kurstaki 57
7. Alterações histológicas em túbulos de Malpighi de larvas de A. argillacea após 24 horas de infecção por B. thuringiensis var. kurstaki 58
8. Alterações em gânglios nervosos em larvas de A. argillacea infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki..... 60
9. Alterações histológicas em músculos e tecido adiposo em larvas de A. argillacea infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki..... 62
10. Mortalidade em larvas de A. argillacea em função do tempo, em horas, após infecção por uma dosagem equiva-

- lente a 1000 g/ha de 4 produtos à base de B.thuringiensis var.kurstaki (Escala log./prob.)..... 65
11. Mortalidade em larvas de A.argillacea em função do tempo, em horas, após infecção por uma dosagem equivalente a 500 g/ha de 4 produtos à base de B. thuringiensis var.kurstaki (Escala log./prob.)..... 68
12. Mortalidade em larvas de A.argillacea em função do tempo, em horas, após a infecção por uma dosagem equivalente a 300 g/ha de produtos comerciais à base de B.thuringiensis var.kurstaki (Escala log.prob.)... 70
13. Dano causado em coqueiro gerivá por larvas de B. sophorae na região de Campinas, SP..... 74
14. Tempos letais medianos em horas para larvas de B. sophorae em bioensaios com 3 doses de Dipel (16.000 UI/mg)(Escala log./prob.)..... 75
15. Tempos letais medianos em horas para larvas de B. sophorae em bioensaios com 3 doses de Dipel (16.000 UI/mg)(Escala log./prob.) 76
16. Relação entre doses (UI/larva) e mortalidade em larvas de B.sophorae infectadas por Dipel (B.thuringiensis var.kurstaki (Escala log.prob.)..... 81
17. Comparação do tempo letal mediano em horas entre 3 produtos com dosagem equivalente a 0,1 mg/larva em larvas de S. latifascia (Escala log.prob.)..... 84
18. Comparação de tempo letal mediano em horas em larvas de S.latifascia infectadas por uma dose de 0,0666 mg por larva de 3 produtos diferentes, à base de B. thuringiensis var.kurstaki (Escala log. prob.)..... 87
19. Comparação de tempo letal mediano em horas em larvas de S.latifascia infectadas por uma dose de 0,04545mg por larva de 3 produtos diferentes à base de B. thuringiensis var.kurstaki (Escala log. prob.)..... 88
20. Comparação de tempo letal mediano em horas em larvas de P.interpunctella expostas a concentração de 2,65%

de 4 produtos diferentes à base de <u>B.thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> (Escala log. prob.).....	91
21. Comparação de tempo letal mediano em horas para larvas de <u>P.interpunctella</u> expostas a concentração de 0,7075% de 4 produtos à base de <u>B.thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> (Escala log.prob.).....	94
22. Comparação de tempo letal mediano em horas para larvas de <u>P.interpunctella</u> expostas a concentração de 0,188% de 4 produtos à base de <u>B.thuringiensis</u> var. <u>kurstaki</u> (Escala log. prob.).....	95
23. CLs-50 (UI/mg) de Dipel para larvas de <u>P.interpunctella</u> após 4 períodos de exposição (Escala log. / prob.).....	97
24. Alterações graduais (A-F) no mesenteron de larvas de <u>C.declarator</u> infectadas por <u>B.thuringiensis</u> var. <u>israelensis</u>	104
25. Alterações histológicas graduais (A-D) em gânglios nervosos em larvas de <u>C.declarator</u> infectadas por <u>B.thuringiensis</u> var. <u>israelensis</u>	106
26. Alterações histológicas em fibras musculares de larvas de <u>C.declarator</u> infectadas com <u>B.thuringiensis</u> var. <u>israelensis</u>	108
27. Comparação de tempos letais medianos entre larvas de <u>C.declarator</u> de diferentes idades tratadas com concentração de 5248 UI/litro.....	110
28. Comparação de tempos letais em minutos entre larvas de <u>C.declarator</u> de diferentes idades tratadas com concentração de 3936 UI/litro.....	113
29. Comparações entre tempos letais em minutos em larvas de <u>C.declarator</u> de diferentes idades tratadas com concentração de 2624 UI/litro.....	114

1. INTRODUÇÃO

O uso de agentes biológicos, para o controle de insetos, tem recebido uma grande consideração nas estratégias de Manejo Integrado de Pragas. A importância e as vantagens deste método são bem reconhecidas ultimamente. Através do conhecimento mais profundo dos agentes biológicos e dos fatores que possam alterar a sua potencialidade, a aplicação prática desses métodos pode se tornar mais complexa, porém, mais útil e mais eficiente. Os métodos biológicos de controle atualmente atingem áreas de combate às plantas daninhas, patógenos de plantas, nematódeos, insetos e ácaros.

O sucesso de um agente biológico depende, dentre outros fatores, do seu grau de especificidade em relação à praga; ou seja, é tão mais eficiente quanto mais específico. Entretanto, se o hospedeiro tiver a tendência a desaparecer periodicamente da região, apenas aqueles inimigos naturais que têm a capacidade de adaptarem-se a hospedeiros alternativos, serão capazes de sobreviver até o ressurgimento do seu hospedeiro preferencial. A especificidade de agentes biológicos foi bem documentada por vários autores, principalmente por Doutt & DeBach (1964) e Baker & Cook (1974).

Embora o fato de que insetos sofrem doenças, já seja conhecido pelo homem há mais de 2.000 anos, o desenvolvimento

da Patologia de Insetos como ciência é relativamente recente (Steinhaus, 1963). A primeira tentativa mais concreta para o desenvolvimento da Patologia de Insetos em grande escala, como parte da área de Controle Biológico, foi apresentada durante " THE INTERNATIONAL LIVE STOCK EXPOSITION " em 1927, como esforço internacional entre oito países europeus, além dos Estados Unidos e do Canadá (Cameron, 1963).

Hoje em dia e com a experiência adquirida, pode-se dizer que as falhas observadas nas primeiras tentativas de uso de patógenos ocorreram devido à falta ou à deficiência de conhecimentos básicos. Conseqüentemente, ou foi usado um patógeno impróprio, ou até a aplicação foi feita sob condições inadequadas. Neste sentido, apoiamos Cameron (1963) quando disse que por vezes, estudos básicos de identificação do organismo e avaliação do seu efeito nos seus diferentes hospedeiros podiam poupar tempo, energia e material, e o mais importante, evitar a descrença em relação à potencialidade da Patologia de Insetos, como área básica para o Controle Biológico.

Relativamente, são poucos os patógenos explorados como agentes de controle, embora o número de espécies isoladas e identificadas taxonomicamente seja enorme. Isso indica a falta de conhecimentos profundos sobre a maioria dessas espécies. Há cerca de 500 "isolados" de Bacillus thuringiensis Berliner, 350 de vírus da poliedrose nuclear e granulose obtidos de insetos e ácaros (Martignoni & Iwai, 1975), além de centenas de outros patógenos. Porém, são pouquíssimos os patógenos comerciali

zados e usados comumente em programas de controle no Mundo (2 espécies de bactérias, 2 de fungos e 1 de vírus). Isto indica que as investigações sobre patógenos de insetos, assim como a possibilidade da sua utilização como agentes de controle de pragas, ainda representam uma ciência que praticamente está nascendo e que poderia oferecer informações para a total integração e aplicabilidade dos diferentes métodos na área de controle de pragas.

A Bacteriologia de Insetos é uma das linhas mais desenvolvidas nas pesquisas de Patologia de Insetos. Foram investigadas várias espécies de bactérias, principalmente B. thuringiensis. Atualmente, e com as informações obtidas através de inúmeras pesquisas, este bacilo ocupa o primeiro lugar entre os patógenos mais produzidos e usados para o controle de insetos pragas. Esta bactéria foi isolada pela primeira vez em 1911 e é produzida na França desde 1938. B. popilliae, por sua vez, começou a ser usado nos Estados Unidos em grande escala a partir de 1939 (Dutky, 1941). Várias outras espécies de patógenos de insetos são hoje conhecidas e consideradas bastante promissoras para o controle de pragas e são bem documentadas em publicações técnicas e científicas (NAS, 1972 e 1975; WHO, 1973a e 1973b ; AIBS, 1975; Falcon, 1976).

Em relação à B. thuringiensis, já existem condições de prever quais insetos podem morrer por esta bactéria e , em vários casos, de saber como a mesma pode matar o inseto alvo , seja pela ação das toxinas, seja por germinação, multiplicação

e finalmente septicemia, ou mesmo pelos dois mecanismos. Entretanto, ainda faltam várias informações, principalmente sobre a variação de susceptibilidade dos insetos em relação às diferentes linhagens deste patógeno (com os seus variáveis níveis de virulência). As características fisiológicas do inseto exercem um papel fundamental neste aspecto, pois em vários casos foi possível determiná-las e relacioná-las com o potencial do patógeno para o inseto em questão.

Assim, no presente trabalho, pretende-se avaliar alguns isolados de B. thuringiensis, representando duas variedades, e verificar a sua eficiência em alguns insetos daninhos, tanto para a área agrícola como a de saúde humana.

As investigações incluem estudos de susceptibilidade e a sua relação com os problemas de padronização de patógenos. Pretende-se, também, estudar a sintomatologia externa juntamente com as alterações histológicas em insetos infectados pela bactéria, objetivando a caracterização de cada espécie, quanto ao seu tipo sintomatológico dentro da classificação de Heimpel & Angus (1959). Possíveis recomendações para aplicações de campo serão apresentadas.

Os estudos realizados envolvem avaliações da potencialidade de uma linhagem de B. thuringiensis var. kurstaki (Sorotipo H-3a:3b), isolada pelo presente autor no Brasil, amostras experimentais de B. thuringiensis var. israelensis (Sorotipo H-14) e alguns produtos já comercializados à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Sorotipo H-3a:3b).

2. REVISÃO HISTÓRICA

2.1. ASPECTOS TAXONÔMICOS DE Bacillus thuringiensis

As bactérias esporulantes da família Bacillaceae correspondem à maior parte das bactérias patogênicas, conhecidas como agentes microbianos promissores, para o controle de insetos pragas. A adequação e a eficiência de várias espécies foram avaliadas em inúmeros trabalhos. Bacillus sereus Frankland & Frankland, B. thuringiensis Berliner e B. Popilliae Dutky ocupam um lugar de destaque neste sentido. O papel desses agentes como patógenos de insetos foi bem tratado em algumas revisões relativamente recentes (Angus & Heimpel, 1960; Dutky, 1963; Heimpel & Angus, 1963).

B. thuringiensis, gram positivo, aeróbio e formador de esporo, tem recebido a maior atenção nas investigações em relação aos demais patógenos de insetos, devido ao efeito patogênico do seu cristal protéico. Esta bactéria foi isolada pela primeira vez por Berliner em 1911, a partir de larvas doentes de Anagasta kühniella Zeller e descrita pelo mesmo autor em 1915. As larvas de A. kühniella, de acordo com Mattes (1927), sofrem a infecção por via oral e o bacilo multiplica-se dentro do corpo causando a morte do inseto. Desde então, várias linhagens deste bacilo foram isoladas de espécies diferentes de insetos e tratadas em várias publicações (Toumanoff & Vago, 1951;

Talalaev, 1957a e 1957b; Heimpel & Angus, 1958; Krieg et al., 1968; Paleari et al., 1980). A virulência e o potencial de vários desses isolados foram avaliados por muitos pesquisadores (Steinhaus, 1949; Toumanoff & Vago, 1952; Steinhaus & Jerrel, 1954; Lemoigne et al., 1956; Krieg, 1957; Majumdar et al., 1957; Vankova, 1957; Martouret, 1959a e 1959b; Van Damme & Van Der Laan, 1959; McEwen et al., 1960; Angus, 1967).

As descobertas de diferentes variedades de bactérias cristalíferas causadoras de doenças em larvas de Lepidoptera, revelam a possibilidade de ocorrência de evolução e adaptação desses patógenos dentro dessa gama de hospedeiros naturais. Por exemplo, B. thuringiensis var. sotto Ishiwata, originalmente isolada por Ishiwata em 1902 de larvas de Bombyx mori L., é muito mais tóxica para este inseto do que B. thuringiensis var. thuringiensis, isolada de A. kühniella por Mattes em 1927 (Angus, 1956a; Steinhaus, 1960). Da mesma forma, Vankova (1964) avaliou 12 linhagens de bactérias cristalíferas usando larvas de 8 espécies de Lepidoptera e encontrou evidências de patogenicidade seletiva. Junto com estes, vários outros trabalhos realizados confirmam a hipótese de haver co-evolução e adaptação entre essas linhagens e seus hospedeiros (Krieg & Franz, 1959; Grigorova, 1964; Shaikh & Morrison, 1966).

Várias semelhanças morfológicas e bioquímicas entre as variedades de B. thuringiensis e B. cereus levaram alguns pesquisadores a questionar a validade de considerar B. thuringiensis como espécie independente. Smith et al. (1946), por

exemplo, consideram este bacilo como uma variedade de B. cereus. Alguns autores têm apoiado essa designação, tais como Toumanoff (1952) e Toumanoff & Le Coroller (1959) que chegaram a dividir o grupo B. cereus em duas categorias, cristalíferas e acristalíferas. Esta opinião baseou-se na possibilidade de B. thuringiensis originar-se de B. cereus, visto que passagens controladas e consecutivas de certas linhagens deste último em larvas de Galleria mellonella L. resultam em células cristalíferas (característica de B. thuringiensis) (Toumanoff, 1956; Toumanoff & Le Coroller, 1959; Steinhaus, 1960). Entretanto, outros investigadores como DeLaporte & Beguin (1955) e Heimpel & Angus (1958) foram dos que insistiram na opinião de que as variedades cristalíferas devem ser consideradas como um grupo separado e independente de B. cereus. Heimpel & Angus (1958 e 1960) consideraram a formação do cristal protéico como caráter constante e dividiram os bacilos cristalíferos em 3 categorias:

- B. thuringiensis com as suas variedades (thuringiensis, sotto e alesti),
- B. entomocidus Heimpel & Angus, com as suas variedades (entomocidus e subtoxicus) e
- B. finitimus Heimpel & Angus.

Steinhaus (1963) reconheceu a separação de B. thuringiensis como espécie, mas não de B. entomocidus e B. finitimus e considera as duas bactérias como variedades de B. thuringiensis, desde que a diferenciação foi baseada em características não constantes como produção de lecitinase e acetoina.

Até recentemente, houve ainda questionamento quanto à posição taxonômica de B. thuringiensis. Gordon et al. (1973) não concordam que a patogenicidade e a produção do cristal parasporal sejam critérios suficientes para o estabelecimento de uma espécie e sugerem considerar este patógeno como uma variedade de B. cereus. A opinião desses pesquisadores foi baseada na semelhança entre as duas bactérias quanto ao exospório característico, a um antígeno de esporo, e a susceptibilidade cruzada a alguns bacteriófagos. Por outro lado, Buchanan & Gibbons (1974) reconhecem e reconfirmam a individualidade de B. thuringiensis como uma espécie separada de B. cereus, baseando-se na produção do cristal e no espectro de patogenicidade, como critérios. De um modo geral, os patologistas de insetos, não se ocupando da questão taxonômica e por conveniência, apoiam esses dois autores e consideram esta bactéria cristalífera como uma espécie.

Com o número fabuloso de isolados de B. thuringiensis obtidos no Mundo até o início da Década de 60, surgiram os problemas de classificação das variedades deste bacilo. Os critérios bacteriológicos clássicos, entre morfológicos, fisiológicos e culturais, não eram satisfatórios para resolver a questão. O emprego de testes imuno-sorológicos para a classificação dos diferentes isolados deste patógeno foi sugerido pela primeira vez por de Barjac & Bonnefoi (1962) e Bonnefoi & de Barjac (1963). Esses autores determinaram as características culturais e bioquímicas de 50 linhagens de B. thuringiensis, e com o mé-

todo de análise do antígeno-H, foram capazes de identificar e agrupar as mesmas em 9 sorotipos distintos (padrões). Norris & Burges (1963) e Norris (1964), através de análise eletroforética das formas moleculares de esterase em extratos de células vegetativas de 46 linhagens, estabeleceram 9 padrões que correspondem aos grupos sorológicos obtidos por de Barjac e Bonnefoi, com raras exceções. As variedades sotto e dendrolimus que são sorologicamente idênticas, mostraram ser diferentes quando sujeitas à análise das esterases, fortalecendo deste modo a recomendação de Norris & Burges (1965) para o uso dessa análise em estudos taxonômicos das linhagens de B. thuringiensis.

Esses estudos indicam claramente que entre as diferentes linhagens e variedades desta bactéria existem diferenças bioquímicas e sorológicas (Ohba & Aizawa, 1978 ; Lavini, 1981). Tais diferenças são ainda relacionadas com outros fenômenos, como a especificidade e a virulência (Angus, 1965). Os frequentes isolamentos de novas cêpas a partir de novos hospedeiros revelam a ampla distribuição natural desta bactéria, podendo ser atualmente considerada cosmopolita (Aizawa et al., 1961; de Barjac & Bonnefoi, 1962 e 1968; Bonnefoi & de Barjac, 1963; Norris, 1964 ; Krywienczyk & Fast, 1980).

Heimpel (1967) elaborou uma chave de identificação das bactérias cristalíferas, na qual apoiou a sugestão de Steinhaus (1963) de eliminar B. entomocidus como espécie e considerá-la como variedade de B. thuringiensis. Desde então,

surgiram vários trabalhos de isolamento e identificação de novos sorotipos (sorovariedades) deste bacilo. A tabela 1 relaciona tais trabalhos com os sorotipos identificados até 1981.

2.2. PRINCIPAIS TOXINAS PRODUZIDAS POR B. thuringiensis

As variedades de B. thuringiensis produzem algumas toxinas já caracterizadas além de substâncias com ação tóxica pouca definida para muitos insetos. As toxinas que se seguem são as mais importantes:

1. α -exotoxina :

Toumanoff (1953) denominou e caracterizou esta toxina como Lecitinase-C; solúvel em água, termolábil e tóxica para insetos. Krieg (1971) isolou uma toxina semelhante a esta e de ação tóxica para macacos e larvas de Plutella xylostella (=maculipennis). Tal toxina foi encontrada no sobrenadante de culturas de B. thuringiensis e foi denominada por ele como "toxina de macacos" ou "toxina termosensível", desde que diferia quimicamente de Lecitinase-C.

2. β -exotoxina :

Este nome foi sugerido por Heimpel (1967). Esta toxina, termostável e solúvel em água, é altamente tóxica para muitos insetos e certos vertebrados (McConnell & Richards, 1959; Hall & Arakawa, 1959; Heimpel & Angus, 1963; Burgerjon, 1965 e

TABELA 1 : Sorotipos de B. thuringiensis registrados até 1981

Sorotipo	Variedade	Isolada de	Encontrada em
H-1	<u>thuringiensis</u>	<u>Anagasta kühniella</u>	Europa
H-2	<u>finitimus</u>	<u>Malacosoma disstria</u>	América N
H-3	<u>alesti</u>	<u>Bombyx mori</u>	Europa
H-3a	<u>alesti</u>	<u>Bombyx mori</u>	Europa
H-3a:3b	<u>kurstaki</u>	<u>Anagasta kühniella</u>	Europa
H-3a:3b-K1	<u>kurstaki</u>	<u>Anagasta kühniella</u>	Europa
H-3a:3b-K73	<u>kurstaki</u>	<u>Anagasta kühniella</u>	Europa
H-4a:4b	<u>sotto</u>	<u>Bombyx mori</u>	Asia
H-4a:4b	<u>dendrolimus</u>	<u>Dendrolimus sibiricus</u>	Africa
H-5a:5b	<u>galleriae</u>	<u>Galleria mellonella</u>	Asia
H-5a:5c	<u>canadensis</u>	<u>Diparopsis</u> sp.	América N
H-6	<u>subtoxicus</u>	<u>Paralipsa gularis</u>	América N
H-3a:3b	<u>kurstaki</u> , HD-1	<u>Pectinophora gossypiella</u>	América N
H-7	<u>aizawai</u>	<u>Ephestia cautella</u>	Asia
H-8a:8b	<u>morrisoni</u>	<u>Galleria mellonella</u>	Europa
H-8a:8c	<u>ostriniae</u>	<u>Ostrinia nubilalis</u>	Asia
H-9	<u>toloworthi</u>	<u>Plodia interpunctella</u>	Europa
H-10	<u>darmstadiensis</u>	<u>Galleria mellonella</u>	Europa
H-11a:11b	<u>toumanoffi</u>	<u>Galleria mellonella</u>	Europa
H-11a:11c	<u>kyushuensis</u>	<u>Bombyx mori</u>	Asia
H-12	<u>thompsoni</u>	<u>Galleria mellonella</u>	América N
H-13	<u>pakistani</u>	<u>Cydia pomonella</u>	Asia
H-14	<u>israelensis</u>	Solo (mosquito)	Oriente M
H-15	<u>dakota</u>	Solo (plantação)	América N
H-16	<u>indiana</u>	Solo (plantação)	América N
H-17	<u>tohokuensis</u>	Viveiros de <u>B.mori</u>	Asia
H-18	<u>kumamotoensis</u>	Viveiros de <u>B.mori</u>	Asia
H-19	<u>tochigiensis</u>	Viveiros de <u>B.mori</u>	Asia

Isolada por	Serotipo determinado por
Berliner, 1911; Mattes, 1927	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Mac Name, 1956	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Toumanoff & Vago, 1951	Bonnefoi & de Barjac, 1963
de Barjac & Lemille, 1970	de Barjac & Lemille, 1970
Kurstak, 1962	de Barjac & Lemille, 1970
Krywienczyk <u>et al.</u> , 1978	Krywienczyk <u>et al.</u> , 1978
Krywienczyk <u>et al.</u> , 1978	Krywienczyk <u>et al.</u> , 1978
Ishiwata, 1902	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Talalaev, 1956	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Isakova, 1956	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Morris, 1962	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Steinhaus, 1945	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Dulmage, 1967	Dulmage, 1970
Aizawa, 1962	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Norris, 1963	Bonnefoi & de Barjac, 1963
Ren, 1975	Ren <u>et al.</u> , 1975
Norris, 1963	de Barjac & Bonnefoi, 1963
Krieg <u>et al.</u> ,	Krieg <u>et al.</u> , 1968
Toumanoff, 1956	Krieg, 1969
Ohba & Aizawa, 1977	Ohba & Aizawa, 1979
Thompson, 1969	de Barjac & Thompson, 1970
Shaikh, 1975	de Barjac <u>et al.</u> , 1977
Goldberg & Margalit, 1977	de Barjac, 1978
DeLucca & Larson, 1978	DeLucca <u>et al.</u> , 1979
DeLucca & Larson, 1978	DeLucca <u>et al.</u> , 1979
Ohba <u>et al.</u> , 1981	Ohba <u>et al.</u> , 1981a
Ohba <u>et al.</u> , 1981	Ohba <u>et al.</u> , 1981b
Ohba <u>et al.</u> , 1981	Ohba <u>et al.</u> , 1981b

1971; Faust, 1974). Como esta toxina não sofre degradação no intestino do gado, a sua adição nas refeições desses animais foi sugerida para o controle de moscas nas fezes. Entretanto, o seu efeito teratogênico e a possível mutagenicidade levaram as autoridades, nos EUA e Canadá, a impedir o seu uso (Burgess, 1975).

Essa toxina, de peso molecular pequeno, análoga a ATP e composta de adenina, ribose e fósforo (1:1:1) (de Barjac & Dedonder, 1965), impede a biosíntese de RNA nas células afetadas. O termo exotoxina sugerido por Heimpel (1967) foi considerado inadequado para esta substância, devido a sua estrutura química. Em substituição, o termo "Thuringiensina" foi sugerido por vários autores (Kim & Huang, 1970; Pais & de Barjac, 1974; Farkas et al., 1977).

A Thuringiensina é produzida em grande quantidade pelo sorotipo H-1 (var. thuringiensis) (Sebesta et al., 1967). Outros sorotipos (H-4a:4b, 4a:4c, 5, 9, 10, 11, 12) produzem pouca quantidade dessa toxina (de Barjac et al., 1966; Bond et al., 1971; de Barjac & Burgerjon, 1973). Os produtos comerciais à base do sorotipo 1, que produziam essa toxina, foram substituídos por outros sorotipos não produtores da mesma, a partir de 1970 (Bassand & Carpy, 1977; Bassand et al., 1977).

3. δ -endotoxina :

O cristal protéico (corpo parasporal), descoberto por Hannay (1953), é um agregado de moléculas, em forma

bipiramidal, e com peso molecular de 230.000 daltons. Este cristal representa o componente principal dos produtos comerciais à base de B. thuringiensis. Heimpel (1967) sugeriu o nome de δ -endotoxina para este cristal.

Após o crescimento vegetativo, B. thuringiensis transforma-se num esporo resistente às condições ambientais adversas. O cristal é formado durante esse processo de esporulação. Somerville & James (1970), Monro (1961) e Fitz-James & Young (1959) descreveram os passos da formação do cristal durante a esporulação e a formação do exospório (a parede do esporo). As características químicas, sorológicas e patogênicas da proteína do cristal são idênticas às da proteína da parede do esporo (Somerville et al., 1968 e 1970; Delafield et al., 1968; Lecadet et al., 1972; Schesser & Bulla, 1978). Entretanto, a quantidade de proteína na parede do esporo é bem menor do que a do cristal. Desde que a parede do esporo de B. cereus contém uma proteína semelhante à de B. thuringiensis, a produção do cristal seria uma adaptação coevolutiva que capacitaria B. thuringiensis a ocupar novos nichos ecológicos, ou seja novos insetos hospedeiros (Somerville & Pocket, 1975; Burges, 1981).

O cristal protéico de B. thuringiensis não é na verdade tóxico para insetos, sendo considerado como uma prótoxina. A dissolução do cristal em meio alcalino, em tampões alcalinos redutores ou em soluções de enzimas proteolíticas, produz moléculas de tamanhos variáveis, das quais algumas são tóxicas para insetos. Deste modo, δ -endotoxina seria uma ou mais dessas

moléculas que participam na formação do cristal, sendo que a solubilização é sempre necessária para a sua liberação e atuação (Nagamatsu et al., 1978; Fast & Martin, 1980).

4. Esporo :

O potencial tóxico do cristal de B. thuringiensis mascarou durante muito tempo a importância do esporo. Burges et al. (1976) comprovaram que a proteína da parede do esporo é semelhante sorologicamente à do cristal e também tóxica para larvas de Lepidoptera. Por este motivo, esses autores acreditam que a δ -endotoxina representaria uma superprodução da proteína do exospório. Obviamente, nos insetos altamente susceptíveis, a proteína do exospório não teria papel importante na ação tóxica desse bacilo, que dependeria exclusivamente da toxina do cristal. Esses insetos sofrem a toxemia e a morte antes que os esporos possam germinar e liberar a proteína do exospório.

2.3. MODO DE AÇÃO DE B. thuringiensis

Quanto às interações de B. thuringiensis com os seus insetos hospedeiros, Thuringiensina e δ -endotoxina representariam os mecanismos mais importantes no quadro patológico causado por este bacilo.

1. β -exotoxina (Thuringiensina) :

Esta toxina é altamente tóxica para muitos insetos e até para certos vertebrados (Sebesta & Horska, 1968). A gama de espécies de insetos susceptíveis a essa toxina é bem maior do que aquela dos susceptíveis ao cristal (δ -endotoxina) produzido pela mesma bactéria, capaz assim de causar a morte em espécies de Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptera e Orthoptera. O estágio larval é sempre mais susceptível que o adulto. As doses subletais provocam anomalias, deformações e alterações teratológicas. Como este componente, através da inibição de nucleotidases, impede a biosíntese de RNA (Sebesta et al., 1969; Kim et al., 1972), o efeito é mais visível durante as etapas críticas da metamorfose (ecdises e transformações em pupa e adulto). Os adultos sobreviventes são geralmente de tamanho menor e frequentemente inférteis (Burgerjon & Biache, 1967 ; Ignoffo & Gregory, 1972). Mal formação de peças bucais, sistema reprodutor e asas, foi também detectada em insetos tratados com Thuringiensina (Ignoffo & Gregory, 1972). Sintomas patológicos foram observados em hemócitos de larvas de Galleria mellonella tratadas por esta substância (Burges, 1981). Entretanto, os hemípteros não revelaram susceptibilidade à Thuringiensina (Burgerjon & Biache, 1966).

Thuringiensina é considerada tóxica para outros invertebrados, como ácaros (Krieg, 1971) e nematódeos (Prasad et al., 1972). Efeitos tóxicos com lesões em tecidos foram obser-

vados em vertebrados como macacos (Sebesta & Horska, 1968; de Barjac & Riou, 1969) e galinhas (Barker & Anderson, 1975). A ação mutagênica de Thuringiensina, em sistemas de mamíferos, foi verificada por Meretoja et al. (1977) e confirmada por Meretoja & Carlberg (1977) (apud Burges, 1981). Essas evidências resultaram na desativação do uso das linhagens produtoras dessa toxina.

2. δ -endotoxina :

A hidrólise do cristal no intestino médio de uma larva susceptível ao patógeno resulta na liberação da toxina ativa, que atua diretamente no epitélio intestinal ou passa para a cavidade do corpo e afeta os demais órgãos e sistemas. Entretanto, o primeiro efeito é o mais comum nos insetos altamente susceptíveis (Fäst & Angus, 1965), onde várias alterações histológicas e lesões podem ser detectadas nas células epiteliais do intestino médio (Heimpel & Angus, 1959; Hoopingarner & Materu, 1964; Martouret et al., 1965; Sutter & Raun, 1967; Habib, 1968).

As investigações histopatológicas indicam desintegração extensiva no epitélio do intestino médio, principalmente na sua porção anterior. A musculatura circular do canal alimentar sofre relaxamento, explicando assim a paralisia intestinal que ocorre em várias espécies de Lepidoptera. Em estágios mais avançados da doença, esses músculos sofrem de-

sintegração e degeneração. Os mesmos sintomas estendem-se para a musculatura do corpo nas larvas que sofrem paralisia geral (Heimpel & Angus, 1959; Toumanoff & Vago, 1953; Tanada, 1953).

A estimulação da absorção de glicose pelas células epiteliais do intestino médio, num inseto infectado por B. thuringiensis, é o primeiro sintoma que ocorre. Este estímulo é provocado pelo aumento na taxa de respiração celular como resultado da ação tóxica da δ -endotoxina nas mitocôndrias das células atingidas (Travers et al., 1976). Entretanto, não se sabe ainda se a toxina atua externamente às células, ou penetra e em seguida age a nível de mitocôndria. Burges (1981) acredita que a toxina atua na superfície externa das células epiteliais susceptíveis, as quais conteriam receptores específicos à δ -endotoxina, pois se a segunda alternativa for verdadeira, as células de todos os insetos seriam susceptíveis. Heimpel & Angus (1959), por outro lado, sugerem que a toxina destrói as membranas celulares do epitélio, deixando as células sujeitas a autodigestão pelas enzimas proteolíticas do próprio inseto. Fast & Angus (1965) sugerem que a toxina causa permeabilidade seletiva da parede intestinal provocando assim uma alteração no pH da hemolinfa e desencadeamento de septicemia. Angus (1968) menciona a possibilidade de que a δ -endotoxina possa atuar como ionóforo, que facilita o transporte de ions através da membrana celular, explicando assim a maior absorção de glicose após a infecção. Tal atuação acaba causando desequilíbrio iônico intracelular e intramitocondrial, resul

tando em repleção rápida de ATP. Esta opinião foi apoiada por Ramakrishnan (1968), Pendelton (1970) e Narayanan & Jayaraj (1974) que constataram níveis mais altos de íons de potássio na hemolinfa de insetos infectados por δ -endotoxina.

A perda de apetite ou a parada alimentar que a larva sofre após a infecção oral, podem ser explicadas pela paralisia intestinal ou pelo simples "desconforto" (Heimpel & Angus, 1959) no canal alimentar. Este sintoma tem alto valor do ponto de vista aplicado, pois, através de aplicações de produtos comerciais, à base desse patógeno, a plantação será protegida contra a praga, já antes que a morte desta possa ocorrer (Burgess, 1981).

Em alguns insetos, as alterações histológicas e a degeneração do epitélio intestinal provocam a vasão do conteúdo digestivo alcalino para a hemocele, aumentando assim o pH da hemolinfa e causando a paralisia geral no inseto infectado (Heimpel & Angus, 1959). Nos insetos susceptíveis que não sofrem a paralisia geral, a morte pode ocorrer por falta de nutrientes e pelo desequilíbrio iônico. Neste caso, pode ainda ocorrer multiplicação de B. thuringiensis e da microflora intestinal, que ao passarem para a hemolinfa, causam septicemia e morte do inseto (Steinhaus, 1963; Martouret et al., 1965; Habib, 1968).

De acordo com os sintomas e o modo de ação de B. thuringiensis, Heimpel & Angus (1959) dividiram os insetos susceptíveis em 3 categorias ou tipos clássicos :

Tipo I :

Este tipo é representado por Bombyx mori e inclui os insetos de pH intestinal altamente alcalino. Neste caso, os insetos sofrem paralisia geral rápida acompanhada pelo aumento do pH da hemolinfa. Também ocorre paralisia intestinal, porém mascarada pela paralisia geral. Com doses subletais, a paralisia intestinal pode ser detectada. A morte do inseto ocorre por toxemia causada pela δ -endotoxina; pois o inseto morre antes da germinação e da multiplicação do patógeno. O aumento do pH da hemolinfa resulta da vasão do conteúdo intestinal alcalino para a cavidade do corpo.

Tipo II :

Nesta categoria, representada por vários lepidópteros, não ocorre paralisia geral. A paralisia intestinal é rápida e seguida por queda lenta do pH do intestino médio, permitindo a germinação e a multiplicação da bactéria. A morte neste caso ocorre por septicemia.

Tipo III :

Os insetos desta categoria, representada por Anagasta kuhniella, não sofrem paralisia nem geral nem intestinal. O inseto sofre o quadro sintomatológico clássico da bacteriose, acompanhado por septicemia e toxemia crônica, resultando em morte. Observações semelhantes foram obtidas por Heimpel(1954), Yamvrias (1962) e Habib (1968).

Burgerjon & de Barjac (1960) e Martouret (1961) caracterizam um novo grupo (Tipo IV) de insetos não susceptíveis ao cristal protéico, mas susceptíveis à Thuringiensina, ou seja β -exotoxina. Nesta categoria encontra-se a maioria dos noctuídeos resistentes a produtos comerciais à base de B. thuringiensis. Possíveis razões de resistência em larvas de Spodoptera frugiperda (uma espécie resistente a este bacilo) foram avaliadas por Garcia et al. (1980 e 1982). Sinergismo e compatibilidade entre o mesmo patógeno e 2 inseticidas químicos foram estudados por Habib & Garcia (1981) utilizando larvas de S. frugiperda. Por outro lado, há noctuídeos susceptíveis à B. thuringiensis, como por exemplo Alabama argillacea (Ignoffo et al., 1964; Habib & Fávares, 1981) e Anticarsia gemmatalis (Amaral & Habib, 1981; Amaral, 1982). Estes dois noctuídeos representariam o Tipo II na classificação de Heimpelel & Angus (1959).

A idéia de que a δ -endotoxina afeta apenas larvas de Lepidoptera foi corrigida a partir de 1978, quando a variedade israelensis foi descoberta por Goldberg & Margalit (1977). Esta variedade é considerada patogênica para larvas de dípteros aquáticos (Culicidae e Simuliidae). A sua virulência foi avaliada por alguns autores, como de Barjac (1978) e de Barjac & Coz (1979). A especificidade desta variedade para larvas de dípteros aquáticos foi estudada por Tyrell et al. (1979). Estes últimos autores justificam a especificidade desta linhagem como devida à características químicas da sua

δ -endotoxina, as quais são diferentes da δ -endotoxina produzida pela variedade kurstaki (específica para larvas de Lepidoptera). Entretanto, os sintomas, o modo de ação e os efeitos histopatológicos da variedade israelensis ainda não estão bem definidos. Apenas Charles & de Barjac (1981) descreveram as alterações histológicas no epitélio intestinal de larvas de Aedes aegypti infectadas por bactéria desta linhagem. É uma linhagem altamente promissora para o controle microbiano de larvas de pernilongos e borrachudos.

Colbo & Undeen (1980) e Ali (1981) verificaram a segurança total da variedade israelensis para vários invertebrados aquáticos. Alguns ensaios foram feitos para verificar a eficiência deste bacilo para o controle de larvas de pernilongos nos EUA (Ali, 1981; Ali et al., 1981; Mulligan III et al., 1980; Wraight et al., 1981), todos com avaliações após 24 horas do tratamento.

Com as larvas de simulídeos, a variedade israelensis (Sorotipo H-14), também demonstrou alta eficiência. Alguns trabalhos foram realizados sob condições de laboratório e campo no Canadá (Colbo & Undeen, 1980; Undeen & Colbo, 1980) e nos EUA (Gaugler & Molloy, 1980; Molloy et al., 1981) para demonstrar as qualidades promissoras dessa variedade no controle de larvas desses insetos.

2.4. APLICABILIDADE DE B. thuringiensis

Várias são as características de B. thuringiensis que favoreceram o desenvolvimento de inúmeras pesquisas a fim de estabelecer critérios de produção e de aplicação de produtos à base deste patógeno.

Algumas características biológicas como a formação de esporos e cristais e a facilidade de crescimento em meios artificiais estimularam vários pesquisadores a avaliar a patogenicidade de B. thuringiensis em diversas espécies de insetos. O trabalho de Steinhaus (1951) pode ser considerado um dos passos mais significativos para mostrar e revelar as qualidades promissoras deste bacilo como agente efetivo de controle de pragas. Entre vários resultados, esse autor detectou queda na população de Peridroma margaritosa (Haworth), atingindo níveis inócuos de dano, 48 horas após a aplicação deste patógeno no campo. Os insetos conhecidos como susceptíveis a este bacilo, até 1968, eram cerca de 150 espécies (Angus, 1968). Após 6 anos, já atingiram 184 espécies (Faust, 1974). Portanto, acredita-se que o número atual de espécies susceptíveis às diferentes variedades de B. thuringiensis seja bem maior. Surgiram, assim, vários trabalhos sobre a patogenicidade de diferentes variedades e sorotipos deste bacilo e sobre os níveis de susceptibilidade em diversas espécies de insetos (Morris, 1963, 1969a e 1969b; Ignoffo et al., 1964; Vankova, 1964; Angus, 1967; Broersma & Buxton, 1967; Habib, 1968; Afify et al.,

1970b; Salama et al., 1981a e 1981b). A partir de 1978 e, com a descoberta do sorotipo H-14, o qual é patogênico para larvas de dípteros aquáticos (de Barjac, 1978), ficou claro que a δ -endotoxina pode afetar também espécies de outras ordens taxonômicas e não apenas lepidópteros como era estabelecido antes.

A facilidade de produzir B. thuringiensis, em grandes quantidades em meios artificiais, com a manutenção de níveis altos de virulência, estimularam a pesquisa de fermentação e industrialização deste bacilo (Angus, 1956b e 1968; Steinhaus, 1951 e 1963; Moraes, 1973, 1976 e 1981; Mohd-Salleh & Beegle, 1980). Recomendações gerais para industrialização e formulação de produtos à base desse bacilo foram estabelecidas por Briggs (1963) e Dulmage & Rhodes (1971) e podem ser resumidas nos 6 pontos seguintes :

1. Uso de meio artificial econômico e que contenha todos os requerimentos nutricionais necessários para o melhor crescimento e multiplicação do bacilo. Componentes naturais como sementes de soja ou algodão, caseína, amido e levedura podem participar na composição da dieta.
2. Uso de inóculo inicial puro, selecionado e de alta estabilidade.
3. Como B. thuringiensis é uma bactéria aeróbica, a aeração é necessária, tanto para a produção em meio líquido como em meio semi-sólido. Temperatura constante de 30°C e pH neutro são

ideais para a máxima produção entre 24 e 48 horas de fermentação.

4. A colheita e a separação do complexo esporo-cristal, após a fermentação, podem ser feitas por centrifugação (fermentação em meio líquido) ou por secagem (fermentação em meio semi-sólido).

5. A padronização industrial é necessária para estes produtos. Bonnefoi et al. (1958) e Burgerjon (1959) foram os primeiros a mencionar a necessidade de padronização através de bioensaios. Entretanto, apenas a partir de 1966 este critério foi adotado pela indústria (detalhes no item 2.5.).

6. Os produtos podem ser formulados como pó seco, pó molhável, granulado ou até como suspensão emulsionável. Essas formulações devem receber substâncias coadjuvantes de funções determinadas, como adesivas, espelhantes, diluentes e estabilizadores.

Atualmente, existem 12 produtos comerciais à base deste bacilo, produzidos por 5 países (EUA, Rússia, França, Iugoslávia e Tcheco-Eslovaquia)(Burgess & Hussey, 1971; Coopel & Mertins, 1977).

Uma das características importantes de B. thuringiensis é a sua total segurança para vertebrados, insetos benéficos e plantas. Este assunto foi bem tratado por Bailey(1971), Heimpelel (1971) e Benz & Altwegg (1975). Mais uma vantagem a favor deste bacilo é a dificuldade dos insetos desenvolverem

resistência a ele. Não há, até o momento, qualquer indicação de desenvolvimento de resistência por insetos a este patógeno, assunto bem documentado por Burges (1971) e Devriendt & Martouret (1976).

Reconhecendo todas essas qualidades, a pesquisa deslocou-se para a fase de aplicações no campo. Neste caso, dois aspectos podem ser revelados. O primeiro inclui estudos de compatibilidade e sinergismo entre B. thuringiensis e inseticidas químicos, objetivando a integração desses em programas de Manejo Integrado de Pragas. Vários trabalhos destacam-se neste tipo de estudo, tais como Morris (1969b e 1972), Benz (1971), Sutter et al. (1971), Altahtawy & Abaless (1972), Rao & Rana (1977), Garcia (1979) e Habib & Garcia (1981). O segundo aspecto trata de pesquisas sobre técnicas e recomendações de aplicações de produtos à base deste patógeno. As aplicações no campo podem ser feitas por máquinas manuais e tratores ou até por aviões agrícolas. As recomendações envolvem exigências bem maiores do que aquelas propostas para o controle químico. Neste sentido, vários trabalhos foram feitos como por exemplo os de Morris & Armstrong (1975), Morris et al. (1977), Thompson et al. (1977), Amaral & Habib (1981) e Amaral (1982).

2.5. PADRONIZAÇÃO DE PRODUTOS À BASE DE B. thuringiensis

Como regra geral, qualquer defensivo deve incluir no rótulo da embalagem a quantidade presente de ingrediente ativo. Por isso, o produto deve ser padronizado. O caso de produtos microbianos é mais complexo do que o dos químicos. Nesse caso, é importante saber, além da quantidade do patógeno presente no produto, a viabilidade do agente e o seu nível de virulência, desde que estas características podem ser afetadas pelo modo de fermentação, formulação, linhagem do patógeno, composição do meio e outros fatores.

Antes de 1966, os produtos comerciais à base de B. thuringiensis eram padronizados utilizando-se apenas a quantidade de esporos viáveis / g, como critério. Tal critério não é suficiente para indicar o potencial inseticida do produto. Apesar das recomendações de Bonnefoi et al. (1958) e Burgerjon (1959), foi apenas a partir de 1966 que as indústrias começaram a adotar técnicas de padronização por meio de bioensaios com insetos, para avaliar a virulência dos seus produtos (Dulmage & Rhodes, 1971). Assim, o padrão E-61 (var. thuringiensis) do Instituto Pasteur, Paris, França, foi recomendado para esta finalidade e recebeu um potencial arbitrário de 1.000 Unidades Internacionais (UI)/ mg (Burgerjon, 1962 e 1964). O inseto teste recomendado para os bioensaios foi Anagasta kühniella Z. Deste modo, qualquer produto comercial começou a ser avaliado, pela própria indústria, em comparação com o padrão E-61, utilizando a seguinte fórmula, estabelecida por Mechalias & Anderson

(1964) e Mechalias & Dunn (1964) :

$$\text{A virulência do produto (UI/mg)} = \frac{\text{DL}_{50} \text{ do padrão}}{\text{DL}_{50} \text{ do produto}} \times 1.000$$

A padronização dos produtos Norte-Americanos, entretanto, (Biotrol, Dipel e Thuricide), os quais são produzidos à base da variedade kurstaki (sorotipo H-3a:3b), encontrou certas dificuldades devidas à diferença da variedade em relação ao padrão E-61 (var. thuringiensis ; sorotipo H-1) assim como à inadequação de larvas de A. kühniella como inseto teste para tais produtos. Por estas razões, um padrão Norte-Americano , HD-1-S-1971, do sorotipo H-3a:3b foi estabelecido junto com larvas de Trichoplusia ni (Hübner) como inseto teste, para os bioensaios de padronização dos produtos daquele país a partir de 1971. Este padrão tem um potencial comparativo de 18.000 UI / mg em relação ao padrão Frances E-61 (Dulmage, 1973 e 1975). A padronização de Biotrol, Dipel e Thuricide tornou-se assim mais funcional e mais conveniente, pois tanto os produtos como o seu padrões são do mesmo sorotipo (H-3a:3b).

Ainda assim, a situação de padronização de produtos à base desse bacilo não está totalmente resolvida. Sabe-se que o efeito patogênico ou tóxico desta bactéria não varia apenas de acordo com a variedade ou o sorotipo, pois vários isolados do mesmo sorotipo, também, podem revelar níveis diferentes de patogenicidade ou de virulência. Este fato tem dificultado a tentativa de se estabelecer apenas um padrão e um

inseto teste para cada variedade do patógeno (Dulmage , 1975 ; Burgerjon & Dulmage, 1977).

Dada a importância de se estabelecer critérios para técnicas de padronização mais adequados de produtos à base de patógenos de insetos, inclusive B. thuringiensis, Burgerjon & Dulmage (1977) analisam a importância da padronização sob dois pontos de vista, industrial e internacional. O primeiro ponto de vista atinge principalmente a indústria, ou seja, o produtor, com o seu interesse em manter a virulência do seu produto em nível constante, nas diferentes remessas ou lotes da produção, e de acordo com a informação da embalagem. O segundo ponto de vista, entretanto, discute a dificuldade de comparação entre produtos industrializados em países diferentes, por processos diferentes de fermentação e formulação e até a equivalência entre produtos à base de variedades diferentes de B. thuringiensis. Estes autores destacam a importância e a necessidade de estudos com o objetivo de avaliar, com maior precisão, as atividades biológicas desses produtos, utilizando , para esta finalidade, espécies diferentes de insetos susceptíveis e técnicas mais precisas para os bioensaios.

É importante salientar aqui que a padronização dos produtos Norte-Americanos, estabelecida e exigida pelos órgãos oficiais (Deptº Agric. EUA e a Agência de Proteção do Ambiente) é feita através de critérios bem definidos. O inseto teste, T. ni, deve ser criado em dieta artificial , e que contenha 0,17g de hidrocloreto de clorotetraciclina / litro de dieta como

antibiótico. Também larvas de 4 dias de idade foram estabelecidas para esta finalidade (Dulmage, 1973). Para fins de padronização, estes critérios são viáveis, pois garantem a obtenção de população de T. ni sensível e homogênea na sua resposta ao patógeno, facilitando assim a comparação entre produtos diferentes deste bacilo. Entretanto, alguns pesquisadores comprovaram que em certos casos, tanto a idade da larva como a presença ou não de antibióticos não interferiram na resposta comparativa do inseto a diferentes linhagens de B. thuringiensis (Afify & Merdan, 1969 ; Beegle et al., 1981).

Para a padronização de produtos à base da variedade israelensis (sorotipo H-14) promissores para o controle de larvas aquáticas de dípteros, foi estabelecido um padrão (IPS-78), de acordo com a sugestão da Organização Mundial de Saúde, no Instituto Pasteur. Tal padrão tem um potencial arbitrário de 1.000 UI / mg contra larvas de Aedes aegypti. Para critérios de padronização industrial, os bioensaios devem ser feitos com larvas do 4º estágio de A. aegypti (de Barjac & Larget, 1979).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Bacillus thuringiensis

Para os estudos de susceptibilidade, virulência e histopatologia realizados com larvas de Lepidoptera, três produtos comerciais e um isolado obtido pelo presente autor foram utilizados.

Os três produtos comerciais são produzidos à base de B. thuringiensis var. kurstaki (sorotipo H-3a:3b), em formulação de pó-molhável e com nível de virulência de 16.000 UI/mg .

As amostras do primeiro produto (Dipel) foram oferecidas por "ABBOTT LABORATORIES", Illinois, Chicago, EUA; através de "ABBOTT LABORATÓRIOS DO BRASIL". Amostras do segundo produto (Thuricide) foram oferecidas por "SANDOZ, INC", São Diego, California, EUA; através de "SANDOZ, S.A., Divisão Agro-química", Brasil. O terceiro produto (Bactospeine) foi oferecido por "BIOCHEM PRODUCTS, S.A.", Brussels, Belgica; através de "INDÚSTRIAS QUÍMICAS ELETRO CLORO, S.A.", Brasil.

Amostras de material concentrado também foram utilizadas nesses estudos (Dipel com 32.000 UI/mg e Bactospeine com 60.000 UI/mg).

O isolado (Zoocamp-78) foi obtido pelo presente autor a partir de uma enzootia natural em populações de Anagasta kühniella (praga de farinha de trigo) no moinho São Paulo em

Campinas, SP. Este material isolado em 1978 foi identificado pela Dra. de Barjac, Instituto Pasteur, Paris, como Bacillus thuringiensis var. kurstaki (sorotipo H-3a:3b). Uma amostra de Zoocamp-78 foi fermentada e formulada como pó-molhável por "ABBOTT LABORATORIES", EUA. O Departamento de Pesquisa dessa indústria determinou a virulência dessa amostra, após a formulação, como 39.000 UI/mg, utilizando-se nos bioensaios larvas de T. ni como inseto teste.

Para os estudos de susceptibilidade, virulência e histopatologia realizados com larvas de culicídeos e simuliídeos, foram utilizadas amostras experimentais em formulação de pó-molhável à base de B. thuringiensis var. israelensis (sorotipo H-14), produzidas por duas indústrias diferentes :

- A amostra experimental ABG-6108-II foi produzida por "ABBOTT LABORATORIES", EUA, com potencial de 2.000 UI/mg contra larvas de Aedes aegypti. Este material recebeu a permissão nº 275-EUP-23 da Agência de Proteção do Ambiente dos EUA (EPA) para o seu uso experimental.

- Amostras de Bactimos foram oferecidas por "BIOCHEM PRODUCTS", Belgica. O potencial deste produto, de acordo com o rótulo da embalagem, é de 6.000 UI/mg, utilizando-se também larvas de A. aegypti nos bioensaios.

3.2. ESPÉCIES DE INSETOS

- Alabama argillacea (Hübner): Lepidoptera, Noctuidae, praga desfolhadora de algodão.
- Brassolis sophorae (Linnaeus): Lepidoptera, Brassolidae, praga desfolhadora de coqueiros.
- Spodoptera latifascia (Walker): Lepidoptera, Noctuidae, lagarta desfolhadora de algodão e soja.
- Plodia interpunctella (Hübner): Lepidoptera, Phycitidae, praga de grãos e farinhas armazenados.
- Culex declarator (Dyar & Knab): Diptera, Culicidae, inseto de importância médica como vetor de malária.
- Simulium goeldii Cerqueira & Mello: Diptera, inseto pertencente a família Simuliidae; algumas espécies têm importância médica como vetores de filárias.
- Simulium rorotaense Floch & Abonnenc : Diptera, pertencente a família Simuliidae; algumas espécies são de importância médica como vetores de filárias.

3.3. CRIAÇÕES DE ESTOQUE

As criações de insetos estudados no presente trabalho foram todas mantidas sob condições controladas de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e 12 horas de fotoperíodo.

Alabama argillacea :

A criação de estoque desta espécie foi mantida de acordo com Habib (1976 e 1977), utilizando folhas tenras e limpas de algodoeiro para a alimentação das larvas. Recipientes de vidro, capacidade de 3 litros, foram usados para a criação das larvas (cerca de 50 larvas / vidro). Desses vidros as pupas eram separadas e mantidas em gaiolas de tela comum de náilon ($64 \text{ malhas} / \text{cm}^2$) até a emergência de adultos. Para o acasalamento e reprodução, 15 a 20 casais eram transferidos para cilindros de papelão em posição vertical (25 cm de diâmetro e 45 cm de altura) e coberto com gaze. O cilindro era revestido internamente por papel fino para receber os ovos. Dentro do cilindro era arranjado um pé de algodoeiro cujo caule cortado era colocado um vidro com água. Os adultos eram alimentados com solução açucarada a 10%. Os ovos eram separados diariamente das folhas de algodoeiro, da cobertura do cilindro e do seu revestimento interno.

Brassolis sophorae :

Os adultos desta espécie não se acasalam em

condições normais de laboratório (dificuldade detectada por Habib & Andrade, 1977), não permitindo assim a obtenção de gerações consecutivas. Por essa razão, as criações eram iniciadas a partir de material coletado de coqueiros da região de Campinas, SP. Ninhos de larvas eram coletados e mantidos em caixas de 80 x 80 x 80 cm de madeira com 4 lados de tela de náilon (64 malhas / cm²). Essas larvas recebiam diariamente, ao anoitecer, folhas tenras e limpas do coqueiro gerivá (Arecastrum romanzoffianum (Cham.) Bec.).

Spodoptera latifascia :

As larvas desta espécie foram alimentadas com folhas de algodoeiro. Este alimento tem se mostrado mais adequado do que folhas de soja ou alface para o desenvolvimento desta espécie (Habib et al., 1982). Os critérios adotados para a manutenção dos diferentes estágios evolutivos deste inseto foram os mesmos usados para A. argillacea.

Plodia interpunctella :

A criação desta espécie foi iniciada em novembro de 1981 a partir de larvas recebidas da criação do CENA (Centro de Energia Nuclear Na Agricultura), Piracicaba. As larvas desta linhagem (109) recebiam a mesma dieta artificial, usada naquele Centro.

Composição da dieta :

Farinha de milho	250 g
Farinha de trigo	310 g
Fermento seco	400 g
Germe de trigo	50 g
Ração para cães (Papita)	250 g
Aveia	100 g
Glicose de milho (Karo)	500 ml

Para a obtenção de ovos, casais foram mantidos em vidros de 500 ml cobertos por gaze contendo papel preto dobrado em forma de leque. Os ovos colocados nestas dobras eram separados diariamente. Após a eclosão, as larvas eram transferidas para vidros iguais, aos anteriores, contendo cerca de 150 g de dieta. Cada vidro recebia cerca de 150 larvas.

Culex declarator :

A criação desta espécie foi mantida a partir de larvas coletadas em tanques de criação de aguapé (Eichhornia crassipes Solm.) do Departamento de Fisiologia Vegetal da UNICAMP. As larvas, no laboratório, eram criadas em caixas de água (capacidade 200 litros) e recebiam como alimento fezes de coelho trituradas. As pupas eram separadas diariamente em pequenos vidros com água e transferidas para gaiolas com tela fina de filó para a obtenção de adultos. Os adultos dos dois sexos eram alimentados com solução açucarada a 10%. As fêmeas, entretanto, a partir do 3º dia de idade, alimentavam-se de

sangue de mamíferos para a obtenção de ovos. neste caso, ratos brancos recém nascidos eram oferecidos ao anoitecer e retirados na manhã seguinte. Quando faltavam esses animais, as fêmeas alimentavam-se de sangue humano (braço do autor). Na mesma gaiola, uma placa de petri com água era colocada para receber os ovos, os quais eram separados diariamente e levados para as caixas de criação de larvas.

3.4. BIOENSAIOS :

Para os estudos de patologia realizados com larvas de Lepidoptera, foi usada a variedade kurstaki (sorotipo H-3a:3b) devido a sua especificidade para larvas dessa orden. A variedade israelensis (sorotipo H-14), entretanto, foi usada para os estudos com larvas aquáticas de Diptera.

Alabama argillacea :

Os bioensaios feitos com larvas desta espécie foram realizados utilizando-se os produtos Dipel, Thuricide e Bactospeine além do isolado Zoocamp-78. Larvas do 5º estágio foram usadas para esta finalidade. Tais larvas receberam doses equivalentes a 300 g, 500 g e 1.000 g/ha de cada um desses quatro produtos. Para cada dosagem de cada produto, 60 larvas eram usadas e distribuídas em 6 recipientes (10 larvas para cada vidro de 500 ml). Cada grupo de 10 larvas recebia

8,4 cm² de folha de algodoeiro contendo a quantidade calculada do patógeno equivalente a dosagem. A aplicação do patógeno na área foliar foi feita em forma de suspensão em água destilada (10 µl / 8,4 cm² de folha). A suspensão era distribuída na folha, com auxílio de alça de platina, e após a secagem natural a folha tratada era colocada no vidro junto com as 10 larvas. Após o consumo total do alimento, quantidade suficiente de folhas não tratadas era oferecida para as larvas. Antes de cada tratamento, as larvas eram pesadas para possibilitar os cálculos de dose / unidade de peso do inseto tratado. Para o controle (testemunha), 60 larvas, também do 5º estágio, foram usadas.

Brassolis sophorae :

Larvas do 5º estágio desta espécie foram utilizadas para os estudos de susceptibilidade. Apenas o produto Dipel foi usado nestes estudos. As respostas do inseto ao patógeno foram avaliadas através de utilização de seis doses diferentes, com fator geométrico de 1,5 (136,50 ; 91,12 ; 60,75 ; 40,50 ; 27,00 e 18,00 UI / larva). A dose foi oferecida diretamente na cavidade bucal da larva com auxílio de microseringa (Fig.1) e lupa binocular. O volume ingerido de 5 µl de suspensão / larva era sempre constante em todos os tratamentos, variando apenas a concentração do patógeno. Cada dose foi oferecida para 60 larvas. Um número igual de larvas



Figura 1: Aplicação do patógeno na cavidade bucal de larva de B. sophorae, com auxílio de microseringa e lupa binocular.

foi usado como testemunha recebendo apenas água destilada (5 μ l / larva). As larvas de cada tratamento eram mantidas juntas em uma gaiola de tela comum de 30 x 20 x 20 cm (considerando o comportamento gregário dessas larvas).

Para os estudos de alterações no pH intestinal e da hemolinfa, ao curso da infecção de larvas dessa espécie por B. thuringiensis var. kurstaki, foi usada apenas a dose de 136,50 UI/larva, empregando-se a metodologia mencionada anteriormente. Um total de 120 larvas foi utilizado nestes estudos, das quais 50 eram controle (testemunha). Com auxílio de papel indicador de pH (precisão 0,2), o pH nos dois sítios foi

medido 60 minutos após o tratamento para a primeira avaliação. Em intervalos de 6 horas, foram feitas outras 8 avaliações. Para cada avaliação, 10 larvas eram sacrificadas (5 do tratamento e 5 da testemunha). As mesmas larvas eram usadas para a avaliação do pH nos dois sítios (intestino e hemolinfa).

Spodoptera latifascia :

A mesma metodologia empregada nos estudos com A. argillacea foi usada para larvas de S. latifascia. Porém, com as seguintes modificações :

- Foram usadas preparações de Zoocamp-78 (39.000 UI/mg), Dipel concentrado (32.000 UI/mg) e Bactospeine concentrado (60.000 UI/mg).
- Foram utilizadas 3 diluições de cada produto , 1/20, 1/30 e 1/45 em água destilada.
- A área foliar de 8,4 cm² com 10 µl de suspensão era oferecida para 5 larvas do 5º estágio.
- As 60 larvas de cada tratamento eram distribuídas em 12 recipientes (5 larvas por vidro).

Plodia interpunctella :

Como as larvas desta espécie eram criadas em dieta artificial , o patógeno foi misturado diretamente na dieta. Concentrações de 2,666 g ; 0,707 g e 0,188 g/100 g de dieta foram utilizadas para cada um dos produtos usados, Dipel, Thuricide , Bactospeine e o isolado Zoocamp-78. A virulência de cada produto comercial é de 16.000 UI/mg.

Cada concentração recebeu 44 larvas do 4º estágio de P. interpunctella distribuídas em duas placas de Petri (22 por placa). Foi usado um número igual de larvas como controle.

Culex declarator :

Os estudos de susceptibilidade de larvas de C. declarator foram realizados utilizando-se a variedade israelensis (sorotipo H-14) na forma da amostra experimental ABG-6108-II. Três dosagens equivalentes a 1 lb (453,592 g) , 0,75 lb e 0,50 lb/ha foram estabelecidas para tais estudos. Os tratamentos foram feitos em aquários de vidro de 25 x 20 x 20 cm. Em cada aquário foi colocado um litro de água para a manutenção das larvas. Os testes foram realizados em larvas de 1º, 2º, início do 4º e final do 4º estágio. O número de larvas usadas para cada dose variava entre 100 e 150.

Para a comparação de eficiência (virulência) das

duas amostras, ABG-6108-II e Bactimos, foi apenas aplicada uma dosagem equivalente a 1 lb/ha, de cada produto. Os demais passos foram os mesmos mencionados anteriormente.

Larvas de simulídeos :

As larvas de Simulium goeldii e as de S. rorotaense foram coletadas em dois igarapés da reserva Duke (Estrada AM-010, Manaus - Itacoatiara, Km-25). O valor do tempo letal mediano (TL_{50}) foi calculado para larvas de S. goeldii através de bioensaios feitos com a concentração de 1,31138 mg/litro (do produto ABG-6108-II). Esses bioensaios foram realizados na sede da reserva utilizando cubas de vidro com capacidade para 8 litros e aeradores para fornecimento de ar e turbulência. A água usada foi a mesma do igarapé em que as larvas foram coletadas, e a sua temperatura durante o tratamento foi em média de 23°C (22,5 a 23,5). Neste bioensaio, 168 larvas serveram para o tratamento e 100 foram utilizadas como testemunha.

Para a segunda espécie, S. rorotaense, as larvas coletadas foram levadas para o laboratório de Entomologia do INPA (Inst^o Nac. Pesq. Am., Manaus) e os bioensaios foram realizados seguindo os mesmos critérios aplicados nos bioensaios com a primeira espécie. Neste caso, foram usadas duas concentrações do mesmo produto, 2,62276 e 5,24552 mg / litro, com 303 e 352 larvas para cada, respectivamente. Como testemunha, foram usadas mais 100 larvas.

3.5. DETERMINAÇÃO DE DOSES E TEMPOS LETAIS :

As avaliações das respostas dos insetos infectados durante os bioensaios eram baseadas na mortalidade provocada pelo patógeno, seja em função das doses ou dos tempos.

A sequência de doses de um mesmo produto, assim como os horários de avaliação seguiam sempre uma progressão geométrica. O número de indivíduos de cada dose e da testemunha e ra constante dentro do mesmo experimento.

Os critérios matemáticos de Thompson (1947) foram adaptados para os cálculos de TL_{50} e intervalos de confiança como se segue :

Cálculos de TL_{50} :

Tempo	Mortalidade absoluta	mort.%	p	q
To			p ₀	q ₀
T1			p ₁	q ₁
T2			p ₂	q ₂
T3			p ₃	q ₃

Onde : o tempo de avaliação segue uma progressão geométrica (q), e 50% de mortalidade localiza-se entre T1 e T2.

$$p = \% / 100$$

e

$$q = 1 - p$$

$$\bar{p}_1 = \frac{p_0 + p_1 + p_2}{3}$$

$$\bar{p}_2 = \frac{p_1 + p_2 + p_3}{3}$$

$$F = \frac{0,5 - \bar{p}_1}{\bar{p}_2 - \bar{p}_1} \quad X_{50} = 1 + F$$

$$\text{Tempo letal mediano (TL}_{50}) = \varphi^{X_{50}} \times T_0$$

Cálculos de intervalo de confiança (I.C.) :

$$\sigma_f = 1 / p_3 - p_0 \sqrt{\frac{(1-F)^2 \cdot p_0 \cdot q_0 + p_1 \cdot q_1 + p_2 \cdot q_2 + p_3 \cdot q_3 \cdot F^2}{n}}$$

$$\text{potencial superior} = X_{50} + t \cdot \sigma_f$$

$$\text{potencial inferior} = X_{50} - t \cdot \sigma_f$$

$$\text{I.C.} = \varphi^{\text{pot. superior}} \times T_0 \quad \text{e} \quad \varphi^{\text{pot. inferior}} \times T_0$$

Os dados são apresentados em gráficos (escala log. prob.) após a correção dos valores de "probits." com o uso das Tabelas de Fisher & Yates (1963).

3.6. HISTOPATOLOGIA :

Foram usadas as técnicas clássicas de fixação por Bouin e coloração com hematoxilina e eosina para a preparação de cortes histológicos em larvas de A. argillacea e de C. declarator infectadas por B. thuringiensis. O material foi cortado na espessura de 7 μm . Foram utilizadas 30

larvas da primeira espécie e 45 da segunda para os estudos his
topatológicos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PATOGENICIDADE DE Bacillus thuringiensis var. kurstaki PARA LARVAS DE LEPIDOPTERA

4.1.1. SINTOMATOLOGIA EXTERNA

Embora as larvas de espécies de Lepidoptera estudadas, no presente trabalho, pertençam 4 gêneros de famílias diferentes (2 Noctuidae, 1 Brassolidae e 1 Phycitidae), o desenvolvimento de sintomas externos gerais nessas larvas, devido à infecção por B. thuringiensis var. kurstaki, foi o mesmo com pequenas variações e exceções. A cronologia dos diferentes sintomas variou de acordo com o nível de susceptibilidade de cada espécie e com a dosagem aplicada.

A perda de apetite e o abandono de alimento foram os sintomas iniciais da bacteriose nas larvas das 4 espécies estudadas. Tais sintomas foram observados a partir de 20 - 60 minutos após a ingestão do patógeno. Entretanto, as larvas de Spodoptera latifascia começaram a sofrer os mesmos sintomas apenas a partir de 180 minutos. Esses sintomas podem ter surgido devido a certos distúrbios, de níveis variáveis no sistema digestivo da larva doente, causados pela ação tóxica da δ -endotoxina nas células epiteliais do intestino médio.

A partir de aproximadamente 3 horas após o tratamento, as larvas foram acometidas de regurgitação e diarreia, indicando efeitos e alterações mais acentuados no epitélio intestinal. Nesta fase a larva não se alimentava mais.

O tegumento das larvas infectadas começou a perder o seu brilho, adquirindo coloração fosca a partir de 12 horas da infecção, indicando possível ocorrência de alterações a nível de tecidos internos e hemolinfa. O alimento, entre intacto e mal digerido, era acumulado em algumas regiões do intestino, revelando a disfunção deste e possível paralisia intestinal, pois a larva doente não tinha mais capacidade de defecar. Posteriormente, as larvas perdiam a sua agilidade e tornavam-se mais lentas nos seus movimentos. Esta fase foi acompanhada por alterações mais acentuadas na coloração do tegumento das larvas doentes, adquirindo tonalidades do creme ao marrom. Tais alterações eram mais visíveis no lado ventral das larvas infectadas (normalmente é o lado que tem menos pigmentos no tegumento).

A medida que a bacteriose ia progredindo, a intensidade das respostas das larvas a toques, sofria redução gradual. Entretanto, nenhuma das espécies estudadas sofreu paralisia geral.

O tegumento das larvas e pré-pupas de Alabama argillacea (Fig. 2A e 2C) e de Plodia interpunctella começou a escurecer a partir de manchas na região mediana do corpo que se expandiam em poucas horas, cobrindo todo o corpo da larva.

Tais manchas eram mascaradas nas larvas de Brassolis sophorae (Fig. 3A) e de S. latifascia, pela coloração já naturalmente escura nestas espécies.

As larvas infectadas morriam após 2 a 3 dias da infecção e os sintomas pós-mortais desencadeavam-se rapidamente. Flacidez do corpo e escurecimento do tegumento atingindo a coloração preta, eram os principais sintomas pós-mortais. O tegumento permanecia sempre intacto sem qualquer rompimento. Os cadáveres secavam gradualmente, adquirindo o aspecto de larvas carbonizadas (Figs. 2B e 3B). Tal aspecto facilitaria as avaliações no campo, após aplicações de produtos à base desse bacilo.

Vários aspectos desse quadro sintomatológico foram observados por alguns autores, como Heimpel & Angus (1959) em larvas de Bombyx mori e Anagasta kühniella, Steinhaus (1963) em alguns lepidópteros inclusive B. mori, Habib (1968) em A. kühniella, Habib & Fávares (1981) em A. argillacea, Amaral & Habib (1981) em Anticarsia gemmatalis, Amaral (1982) em A. gemmatalis e Berti Fº & Gallo (1977) em Brassolis astyra. Porém, os últimos dois autores relatam que as larvas de B. astyra apresentavam sintomas semelhantes aos de B. mori, quando infectadas por B. thuringiensis. Tal relato não coincide com as observações do presente trabalho com B. sophorae, desde que as larvas agora estudadas não sofreram paralisia geral nem aumento no pH da hemolinfa. Essas larvas devem ser colocadas então no tipo II na classificação de Heimpel & Angus (1959) e

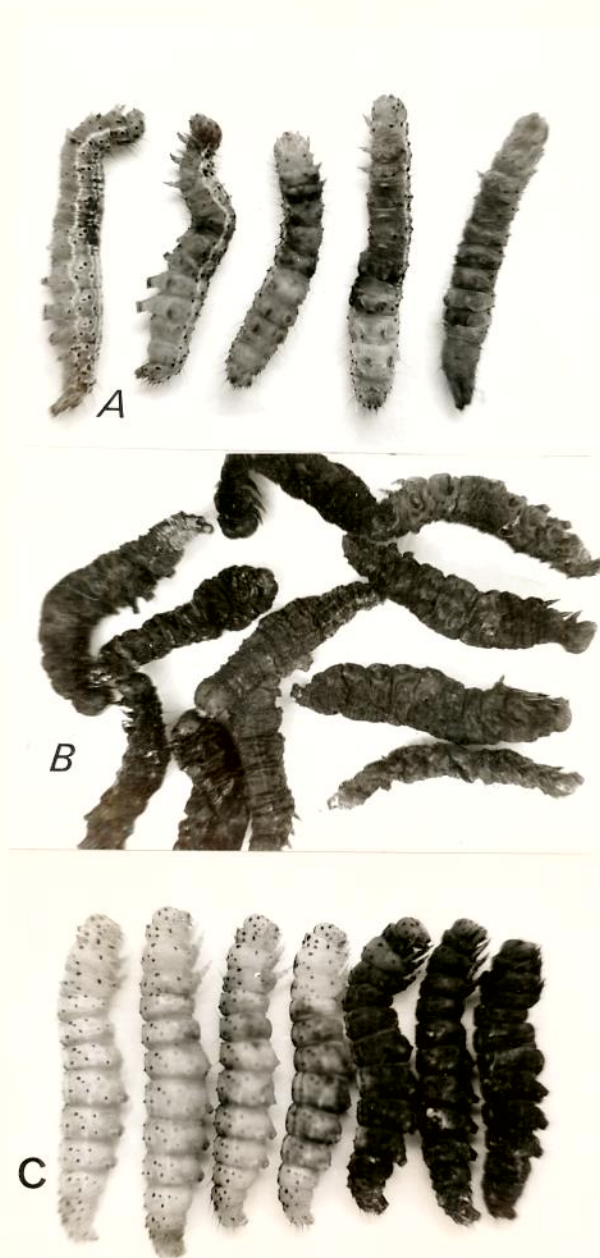


Figura 2: Sintomas externos de infecção por *B. thuringiensis* em *A. argillacea*.

A. Sintomas pré-mortais em larvas.

B. Sintomas pós-mortais em larvas.

C. Sintomas pré- e pós-mortais em pré-pupas.

não no tipo I, representado por B. mori, onde ocorre paralisia geral e aumento no pH da hemolinfa após a infecção.

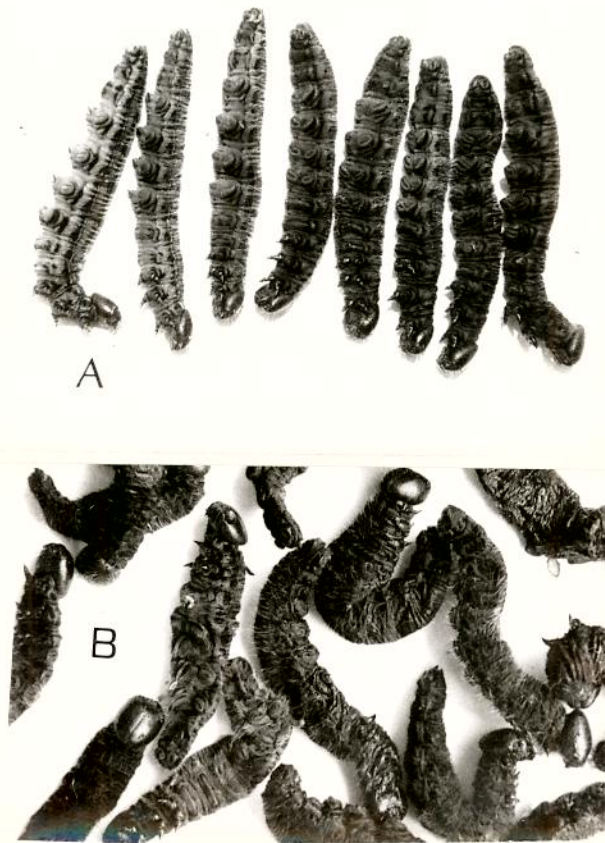


Figura 3: Sintomas externos de infecção por B. thuringiensis em larvas de B. sophorae.
A. Sequência de sintomas pré- e pós-mortais.
B. Larvas mortas carbonizadas.

4.1.2. ALTERAÇÕES NO pH DO CONTEÚDO INTESTINAL E DA HEMOLINFA

Os sintomas observados em larvas de Lepidoptera infectadas com B. thuringiensis var. kurstaki, durante o presente trabalho, revelaram a não ocorrência de paralisia geral em nenhuma das espécies estudadas. Ao mesmo tempo, a paralisia intestinal foi detectada nas larvas de A. argillacea, S. latifascia e B. sophorae. Essas duas observações indicam que, no mínimo as larvas destas 3 espécies, pertencem ao tipo II na classificação de Heimpel & Angus (1959). Para confirmar esta classificação, larvas de B. sophorae foram escolhidas como representantes, para mostrar as alterações no pH do conteúdo do intestino médio e da hemolinfa, após a infecção pelo bacilo.

As larvas infectadas, por via oral, com dose equivalente a 136,5 UI / larva, ou seja 30,29 UI/g de peso da larva, sofreram uma queda gradual no pH intestinal durante 48 horas após a ingestão do patógeno. Em 24 horas, o pH caiu de 9,7 (9,4 - 10,1) para 8,2 (7,8 - 8,5). Após 48 horas o pH intestinal atingiu o nível de 6,8 (6,6 - 7,1). A hemolinfa, entretanto, sofreu durante o mesmo período uma queda não significativa no seu pH, permanecendo dentro da faixa entre neutra e fracamente ácida, como nos insetos sadios (testemunha) (detalhes na Fig. 4).

Estas alterações podem explicar a razão pela qual não ocorreu a paralisia geral nas larvas infectadas e con-

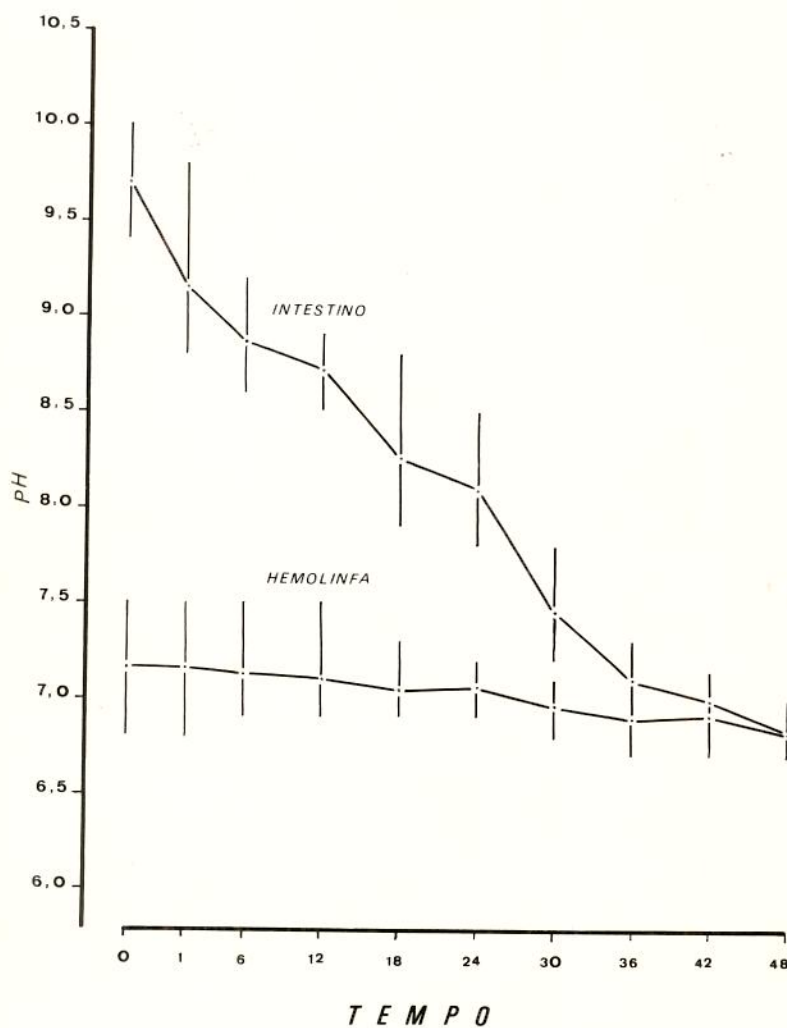


Figura 4: Alterações no pH intestinal e da hemolinfa em larvas de B. sophorae durante 48 horas após a infecção por B. thuringiensis var. kurstaki.

firma, portanto, a colocação das larvas das espécies estudadas no tipo II da classificação de Heimpel & Angus (1959).

A ocorrência de paralisia geral exige mudança no pH da hemolinfa para a faixa alcalina. Confirmando isso, Heimpel & Angus (1960) conseguiram provocar paralisia geral em larvas de B. mori apenas por injeção de um tampão alcalino não tóxico na hemolinfa desses insetos.

Narayanan et al. (1976) obtiveram resultados semelhantes aos do presente trabalho e agruparam nove espécies de Lepidoptera no tipo II, enquanto que para o tipo I, no qual as larvas sofrem paralisia geral, encontraram apenas uma espécie, Papilio demoleus. Angus & Heimpel (1959) e Heimpel & Angus (1960) agruparam B. mori, Protoparce quinquemaculata (Haworth), Protoparce sexta (Johannson), e Antheraea pernyi Guérin-Méneville no tipo I. O aumento no pH da hemolinfa, que ocorre no tipo I, resulta de dano no epitélio do tubo digestivo, seguido por variação do conteúdo intestinal alcalino para a cavidade do corpo do inseto infectado.

4.1.3. HISTOPATOLOGIA

Como representante dos lepidópteros estudados no presente trabalho, larvas de A. argillacea foram escolhidas para os estudos histopatológicos. A anatomia e a histologia de larvas sadias dessa espécie foram anteriormente estudadas por Habib (1978).

As avaliações histopatológicas foram feitas a partir de larvas de 5º estágio infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki com uma dosagem equivalente a 8.000 UI / ha.

4.1.3.1. Alterações no intestino médio :

O intestino médio nos insetos é responsável pela síntese e secreção de enzimas digestivas, onde ocorre a quebra e hidrólise das moléculas grandes do alimento e absorção dos produtos digeridos e água (Bursell, 1970; Wigglesworth; Habib, 1978).

Os distúrbios histológicos detectados na fase inicial da infecção incluíram condensação de cromatina nos núcleos das células epiteliais, deslocamento dos núcleos para a região basal das células, e início de vacuolização no citoplasma. Em seguida o intestino médio sofreu relaxamento dos músculos circulares, afastamento da membrana basal, abandonando as células epiteliais, cuja vacuolização aumenta (Fig. 5A) .

Essas alterações foram observadas em larvas fixadas 4 horas após a infecção, e eram menos acentuadas na parte posterior do intestino médio. Após 12 horas da ingestão do patógeno, observou-se relaxamento maior na musculatura circular e longitudinal, juntamente com dissociação das células epiteliais e afastamento maior da membrana basal (Fig. 5B). Sinais de autodigestão nas células epiteliais, início de destruição da membrana peritrófica, indicada pela presença do alimento em contato direto com as células em alguns cortes, foram observados de uma forma mais acentuada na região anterior do intestino médio do que na região posterior. Praticamente nessa mesma fase, o inseto não se alimentava mais e já sofria paralisia intestinal. Num estágio mais avançado da bacteriose, aproximadamente 18 horas após a infecção, maior autodigestão do epitélio foi observada, acompanhada por degeneração dos núcleos (Fig. 5C). Nessa fase, as paredes das células epiteliais não eram detectáveis. Logo antes da morte, a destruição do epitélio intestinal era total e apenas encontravam-se restos de tecidos vegetais mal digeridos (Fig. 5D) misturados com vestígios do epitélio e espalhados na luz do intestino

Observações de alterações semelhantes foram feitas em outras espécies de insetos, tais como, larvas de B. mori por Heimpel & Angus (1959), Galleria mellonella por Hoopingarner & Materu (1964), Ostrinia nubilalis por Sutter & Raun (1967), T. ni por Broersma & Buxton (1967) e A. kühniella por Habib (1968). Ebersold et al. (1977), com auxílio de micros

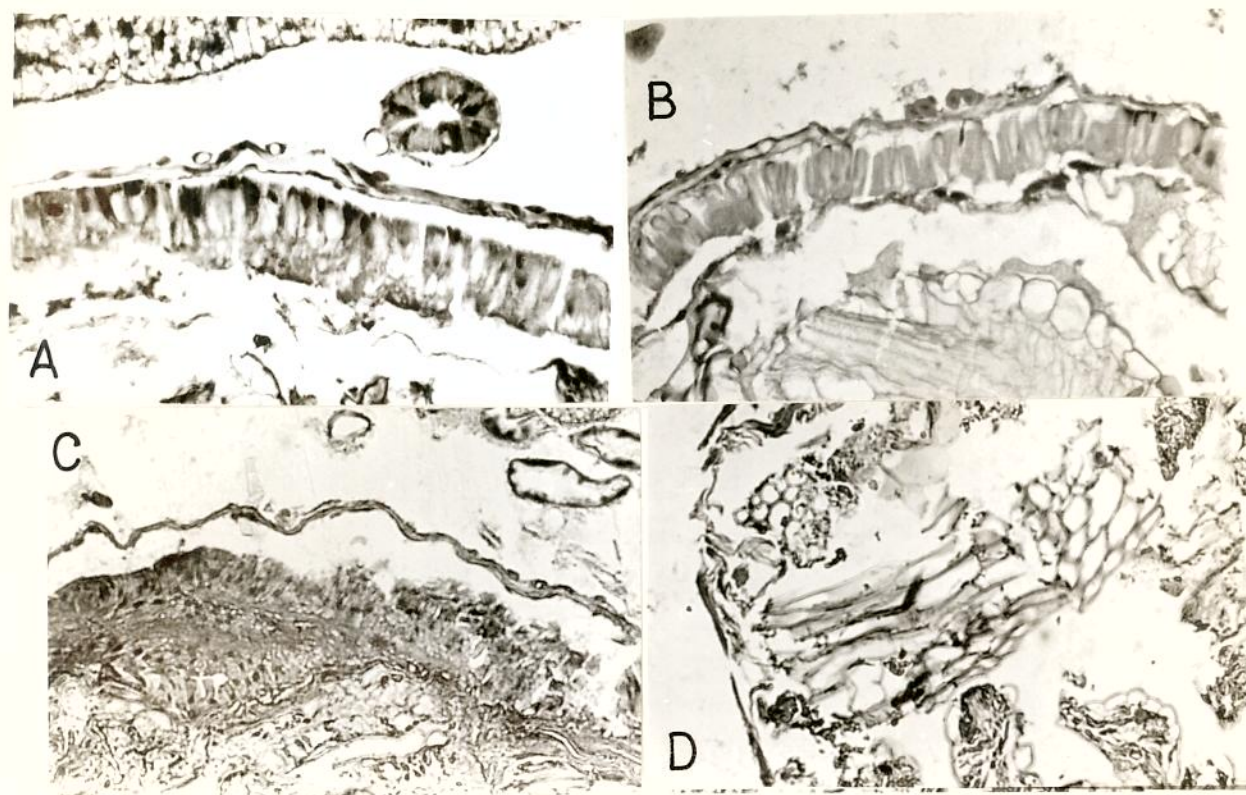


Figura 5 : Alterações histológicas no intestino médio em larvas de A. argillacea infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki.

- A. 4 horas após a infecção.
- B. 12 horas após a infecção.
- C. 18 horas após a infecção.
- D. 24 horas após a infecção.

grafia eletrônica, detectaram alterações em níveis subcelulares principalmente em mitocôndrias e microvilosidades em larvas de Pieris brassicae infectadas por δ -endotoxina.

4.1.3.2. Alterações nas glândulas labiais :

Os efeitos da bacteriose ocorreram numa forma mais acentuada, nessas glândulas, apenas a partir de 12 horas após a infecção. Condensação de cromatina nos núcleos foi o primeiro sinal de alterações observado nas glândulas labiais. Início de degeneração da membrana peritoneal e de separação entre algumas células epiteliais foi observado a partir de 18 horas após a ingestão do patógeno (Fig. 6A). Em larvas fixadas 24 horas após a infecção, total degeneração da membrana peritoneal, destruição na região basal das células e desintegração das paredes celulares eram os sintomas observados na maioria do material examinado (Fig. 6B). Essas alterações devem ter ocorrido como consequência indireta da bacteriose. As mudanças fisicoquímicas das características da hemolinfa no inseto doente podem ter causado tais alterações, visto que, o patógeno nunca foi detectado nessas glândulas. Dados semelhantes foram obtidos por Habib (1968) e Afify et al. (1970a) em glândulas salivares de A. kühniella infectadas pelo mesmo bacilo.

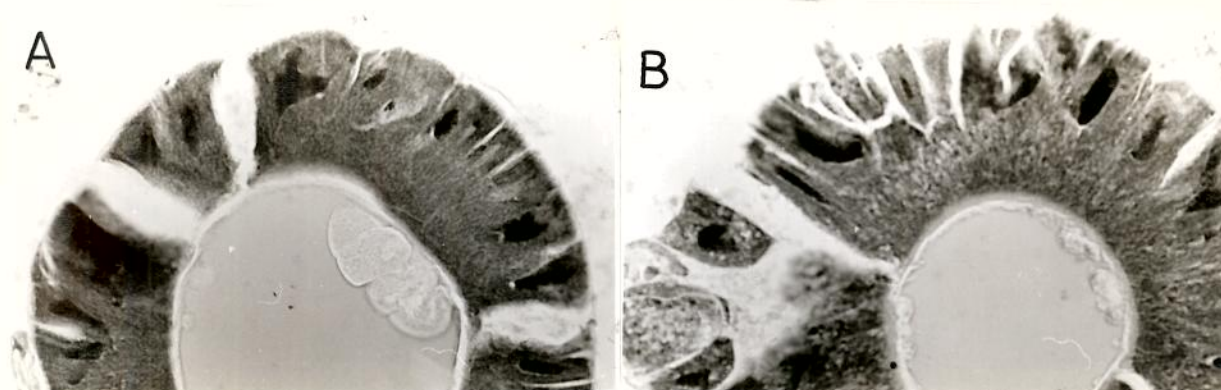


Figura 6: Alterações histológicas em glândulas labiais de larvas de A. argillacea causadas por B. thuringiensis var. kurstaki.

A. 18 horas após a infecção.

B. 24 horas após a infecção.

4.1.3.3. Alterações nos túbulos de Malpighi :

Os túbulos de Malpighi foram os menos afetados pela bacteriose em relação aos demais órgãos. As alterações mais visíveis eram condensação de cromatina dos núcleos das células epiteliais e diminuição dessas células com vacuolização acentuada no citoplasma (Fig. 7).

A urina nos insetos é formada por secreção ativa de íons inorgânicos, particularmente de potássio. De acordo com Bursell (1970), o potássio é transportado da hemolinfa cruzando o epitélio dos túbulos de Malpighi e, em seguida, dentro da



Figura 7: Alterações histológicas em túbulos de Malpighi de larvas de A. argillacea após 24 horas de infecção por B. thuringiensis var. kurstaki.

luz, contra um gradiente eletro-químico. A produção de urina é muito sensível a alterações na pressão osmótica da hemolinfa. A infecção por B. thuringiensis provoca aumento no nível de íons de potássio na hemolinfa do inseto doente (Ramakrishnan, 1968; Pendelton, 1970; Narayanan & Jayaraj, 1974). As alterações observadas no presente trabalho, portanto, podem ser explicadas pela diarreia observada nas larvas doentes o que pode ter implicado em função perturbada e excreção desequilibrada dos túbulos de Malpighi. Alterações semelhantes foram observadas por Habib (1968) e Afify et al. (1970a) em túbulos de Malpighi de larvas de A. kühniella.

4.1.3.4. Alterações nos gânglios nervosos :

Durante as primeiras 12 horas após a infecção foi observada condensação de cromatina nos núcleos das células nervosas, sejam imaginais ou larvais (Fig. 8A). Diminuição no tamanho das células nervosas larvais resultando em afastamento da camada unicelular das células nervosas imaginais, também ocorreu durante as primeiras 12 horas da infecção. Numa fase mais avançada da doença, 18 horas após a ingestão do patógeno, as células nervosas larvais começaram a degenerar (Fig. 8B). As células imaginais foram menos afetadas nessa fase. Entretanto, o neurolema mostrou-se drasticamente afetado. Na fase final da doença, a neurópila mostrou-se vacuolizada e com início de desintegração. As células nervosas larvais sofreram degeneração mais acentuada juntamente com o neurolema (Fig. 8C). Nessa fase, as células imaginais eram menos afetadas na maioria do material examinado. Entretanto, em poucos casos tais células foram totalmente degeneradas, permanecendo apenas restos de neurópila. Tais alterações coincidem com as observações de Habib (1968) e Afify *et al.* (1970a) em larvas de A. kühniella. Esses autores são os únicos, até o presente, que estudaram alterações em outros tecidos, além do intestino médio, em larvas de Lepidoptera infectadas por B. thuringiensis.

Smith & Treherne (1963) usaram o termo "nerve sheath" ou "neural lamella" para o neurolema e "perineural cells" para células nervosas imaginais.

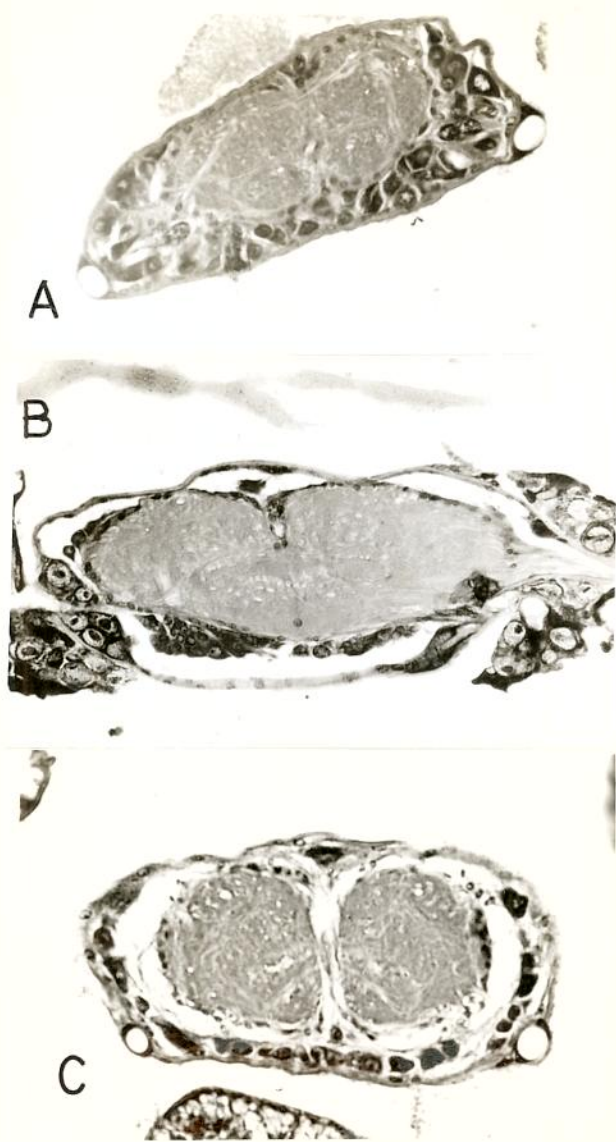


Figura 8: Alterações em gânglios nervosos em larvas de A. argillacea infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki.

- A. 12 horas após a infecção.
- B. 18 horas após a infecção.
- C. 24 horas após a infecção.

4.1.3.5. Alterações nas fibras musculares :

Em larvas fixadas 4 horas após a infecção, os músculos do corpo mostraram-se intactos, apenas com condensação de cromatina nos núcleos (Fig. 9A). A partir de 12 horas após a ingestão do patógeno, iniciou-se o processo de dissociação de fibrilas (Fig. 9B) indicando relaxamento muscular e explicando a flacidez do corpo do inseto doente. O sarcolema sofreu degeneração visível em 18 horas e total em 24 horas após a infecção (Figs. 9C e 9D). As fibrilas na fase final da doença mostraram relativa degeneração. Observações semelhantes às do presente trabalho foram obtidas por Habib (1968) e Afify et al.(1970a) em larvas de A. kühniella, porém, após períodos mais prolongados, 36 - 48 horas após a infecção.

4.1.3.6. Alterações no tecido adiposo :

Na fase inicial da bacteriose, as células adiposas espalhadas perto do tegumento da larva sofreram redução significativa e praticamente não existiam mais a partir de 12 horas após a infecção. O sintoma geral ocorrido nos gomos adiposos localizados na cavidade do corpo foi a diminuição gradual e o adelgaçamento indicando consumo do seu conteúdo (Fig. 9B). Este sintoma ocorre normalmente em insetos que sofrem deficiência alimentar ou jejum obrigatório. Condensação de cromatina e degeneração da membrana conectiva e das paredes das células foram os sintomas finais logo antes da morte. Em alguns

cortes foi detectada degeneração drástica no tecido adiposo .
Dados semelhantes foram obtidos por Habib (1968) e Afify et
al.(1970a) em larvas de A. kühniella.

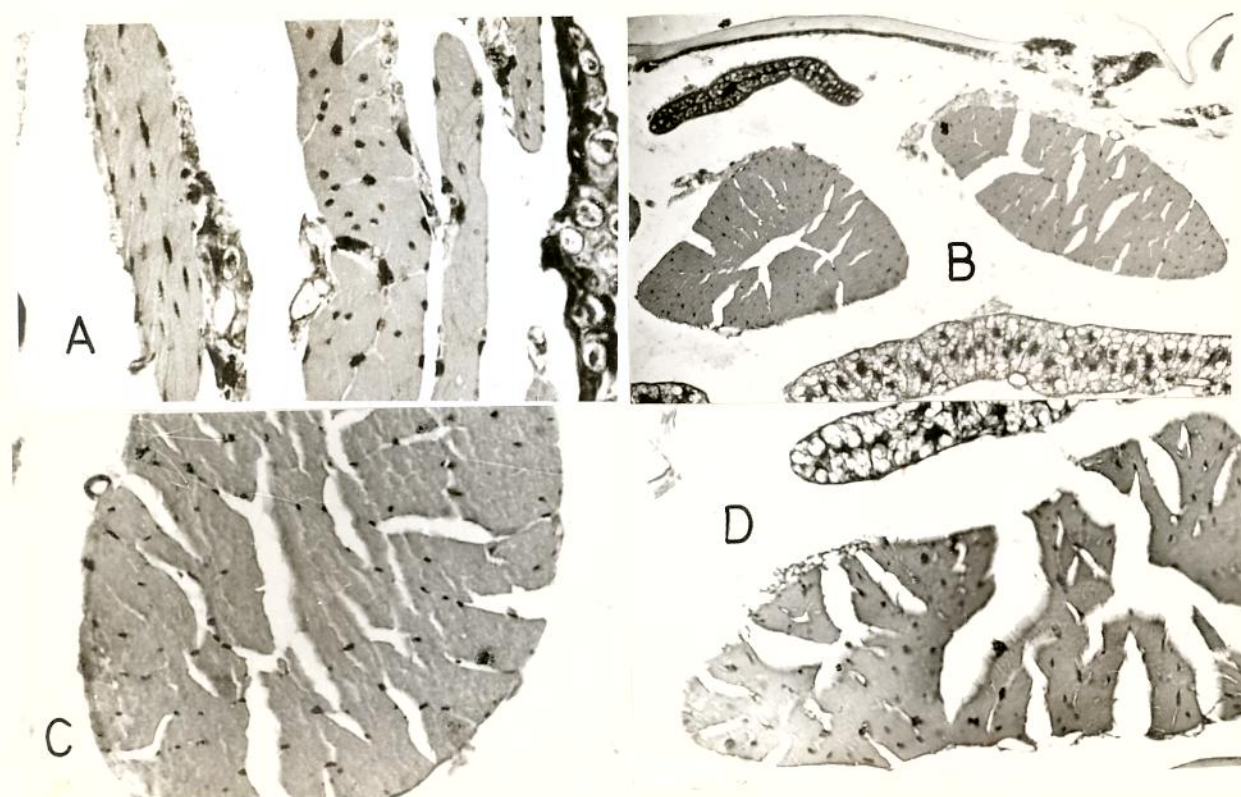


Figura 9: Alterações histológicas em músculos e tecido adiposo em larvas de A. argillacea infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki.

A. Após 4 horas.
C. Após 18 horas.

B. Após 12 horas.
D. Após 24 horas.

4.1.4. SUSCEPTIBILIDADE E VIRULÊNCIA

Os dados obtidos no presente trabalho revelaram claramente que, as respostas de larvas de Lepidoptera a Bacillus thuringiensis var. kurstaki ocorreram em função do nível de susceptibilidade de cada espécie de insetos estudados, da dose aplicada, da origem do patógeno e da diferença nos critérios de industrialização do patógeno. Por esta razão, os resultados são agrupados, apresentados e discutidos a nível de cada espécie de inseto estudado.

4.1.4.1. Alabama argillacea :

A importância econômica dessa espécie foi relatada ultimamente por Habib (1976, 1977 e 1978) e mais recentemente por Andrade (1981). Esses autores mencionaram que o controle dessa praga, restrita aos algodoeiros do Novo Mundo, depende até hoje, exclusivamente de produtos químicos tóxicos. Ignoffo et al. (1964) e Habib & Fávaro (1981) através de estudos preliminares revelaram a alta susceptibilidade de larvas dessa espécie a formulações comerciais de produtos à base de B. thuringiensis.

No presente trabalho, foram estabelecidas 3 doses equivalentes a 1000 g, 500 g e 300 g/ha, de cada um dos produtos Dipel, Thuricide e Bactospeine, além do isolado

Zoocamp-78. Baseadas nos produtos comerciais (com virulência de 16.000 UI/mg), e com o consumo de 0,84 cm² de folha tratada por larva, tais dosagens correspondem a 134 , 67 , e 40 UI por larva, respectivamente. Como a larva de 5º estágio de A. argillacea teve um peso médio de 0,124 g, as mesmas dosagens correspondem, então, a 1081 , 541 e 323 UI/g de peso do inseto tratado.

As larvas desse noctuídeo alimentam-se apenas de folhas de algodoeiro. Devido a esse hábito monofágico e a dependência de uma planta hospedeira que ocorre apenas durante o verão, essa espécie não hibernante é caracterizada por vôos migratórios seguindo a estação chuvosa em busca da sua planta hospedeira (Habib, 1976). Este fenômeno dificulta a manutenção desta espécie em criações de laboratório durante muitas gerações, não permitindo assim a obtenção de populações de pequena variabilidade genética. Por esta razão, os bio-ensaios realizados no presente trabalho com larvas desta espécie foram baseados em critérios de tempos letais e não de doses letais, para evitar possíveis erros em consequência da heterogenicidade genética. Isto é, a progressão geométrica foi aplicada para o tempo de avaliação, o que facilitou o uso apenas de 3 dosagens sem qualquer relação geométrica.

A figura 10 mostra as respostas de larvas do 5º estágio de A. argillacea à dosagem equivalente a 1000 g de produto por hectare. O isolado Zoocamp-78 teve o efeito patogênico mais rápido, quando comparado com os três produtos co-

merciais (Dipel , Thuricide e Bactospeine), revelando um tempo letal mediano (TL_{50}) de 29,57 horas com intervalo de confiança de 27,64 a 31,83 horas. No segundo lugar, encontra-se o produto belga, Bactospeine, atingindo um TL_{50} de 31,9 horas com intervalo de confiança de 29,19 a 34,90 horas. Os dois pro

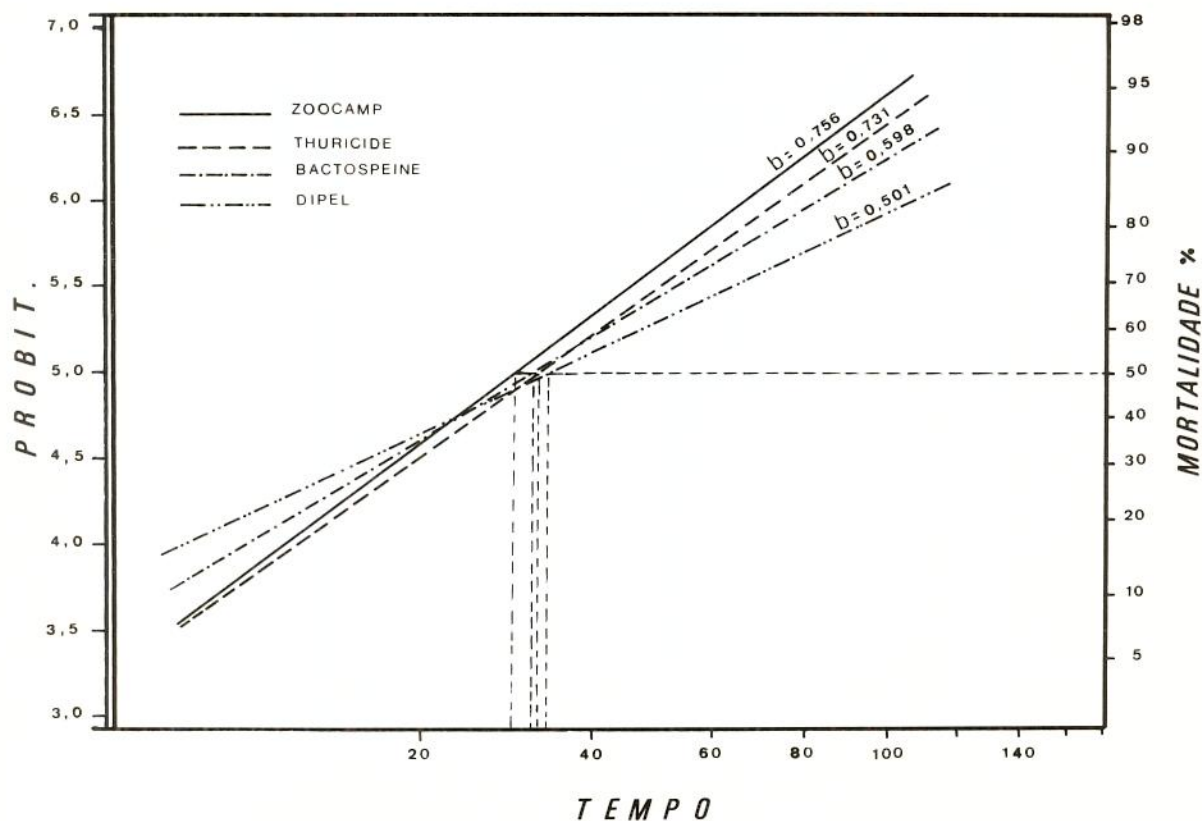


Figura 10: Mortalidade em larvas de *A. argillacea* em função do tempo, em horas, após infecção por uma dosagem equivalente a 1000 g/ha de 4 produtos à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Escala Log./Probit.).

dutos norte-americanos, Thuricide e Dipel, ocuparam o último lugar e sem diferença significativa entre eles. O TL_{50} do Thuricide foi de 33,27 horas e do Dipel foi de 33,52 horas (detalhes na Tabela 2).

Uma comparação entre o potencial do isolado Zoocamp e do produto comercial Dipel pode ser feita, desde que ambos foram produzidos pela mesma indústria e com o mesmo processo de fermentação e formulação. Se o Dipel, com a sua virulência de 16.000 UI/mg contra larvas de Trichoplusia ni, atingiu um TL_{50} de 33,52 horas com as larvas de A. argillacea, então a virulência do isolado Zoocamp que teve, com a mesma dosagem, um TL_{50} de 29,57 horas, é de 18.136 UI/mg. Isto é, o isolado Zoocamp foi superior ao Dipel na razão de 1,1335, adaptando e utilizando as fórmulas de Mechalias & Anderson (1964) e Mechalias & Dunn (1964) para tempos letais, ao invés de doses letais. As razões da diferença na eficiência desses dois preparados podem ser apenas a região de onde foi isolado cada um e o hospedeiro natural de cada (ambos são da mesma variedade e do mesmo sorotipo H-3a:3b). O bacilo do Dipel foi isolado nos EUA de larvas de Pectinophora gossypiella; e o Zoocamp foi isolado no Brasil de larvas de A. kühniella.

Utilizando a dosagem equivalente a 500 g/ha, para comparar as respostas de larvas de A. argillacea aos mesmos produtos (3 comerciais e o isolado), a figura 11 destaca, mais uma vez, o isolado Zoocamp em relação aos demais. O TL_{50} desse isolado foi de 31,71 horas com intervalo de confiança de 29,55

Tabela 2: Tempos letais medianos em horas e intervalos de confiança para larvas do 5º estágio de A. argillacea infectadas por 4 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki.

D O S A G E M E Q U I V A L E N T E						
Produto	1000 g/ha		500 g/ha		300 g/ha	
	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo
Zoocamp-78	29,57	27,64 - 31,83	31,71	29,55 - 33,76	37,00	34,23 - 39,97
Thuricide	33,27	31,87 - 34,69	34,76	32,46 - 37,98	40,19	37,35 - 43,17
Bactospeine	31,90	29,19 - 34,91	41,09	38,94 - 43,14	48,61	45,39 - 51,73
Dipel	33,52	31,42 - 35,72	39,29	36,39 - 42,25	43,84	41,17 - 46,49

a 33,76 horas. O Thuricide ocupou o 2º lugar com essa dosagem, seguido por Dipel e finalmente por Bactospeine (detalhes na Tabela 2). Seguindo o mesmo critério de comparação, anteriormente mencionado, o Zoocamp foi superior ao Dipel, nessa dosagem, com a razão de 1,239; ou seja, com virulência equivalente a 19,825 UI/mg.

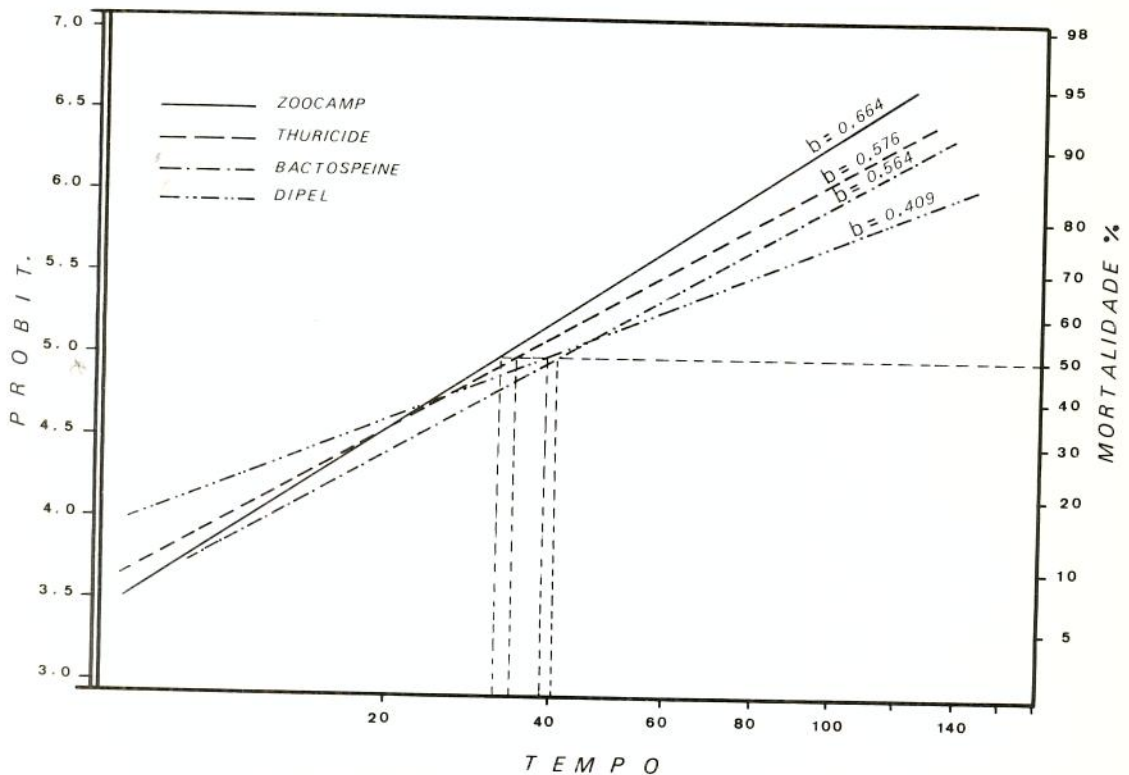


Figura 11: Mortalidade em larvas de A. argillacea em função do tempo em horas, após infecção por uma dosagem equivalente a 500 g/ha de 4 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Escala Log./Probit.).

A figura 12 confirma a relação inversa entre o tempo letal e a dosagem do patógeno. A dosagem equivalente a 300 g / ha resultou em tempos letais medianos maiores do que os das doses maiores anteriormente utilizadas. Também, com essa dosagem, o Zoocamp-78 continuou ocupando o 1º lugar em relação aos demais produtos, revelando um TL_{50} de 37 horas com intervalo de confiança de 34,23 a 39,97 horas. Mantendo a mesma ordem de produtos observada com a dosagem de 500 g/ha, também com a dosagem de 300 g/ha, o Thuricide continuou no 2º lugar, seguido por Dipel e finalmente Bactospeine (detalhes na Tabela 2).

Utilizando o Dipel como parâmetro, o Zoocamp-78 é superior na razão de 1,1848; ou seja, de virulência de 18.957 UI/mg, utilizando os mesmos critérios anteriormente mencionados.

Os resultados dos bioensaios realizados com o isolado Zoocamp indicam claramente que as respostas de insetos a um patógeno variam de acordo com a espécie do inseto, pois este isolado tem demonstrado nível de virulência de 39.000 UI /mg, quando foi comparado com Dipel, utilizando-se larvas de T. ni (dados fornecidos pela própria indústria "ABBOTT LABORATORIES"). Isto significa que o isolado superou o Dipel (16.000 UI /mg) à razão de 2,4375. Por outro lado, com as larvas de A. argillacea, no presente trabalho, a razão de superioridade variou entre 1,1335 e 1,239. Burgerjon & Dulmage (1977) obtiveram resultados semelhantes quando compararam os mesmos três produtos

comerciais utilizados no presente trabalho, porém, com larvas de T. ni e A. kühniella, confirmando a variação na potência do patógeno utilizado, de acordo com a espécie de inseto teste.

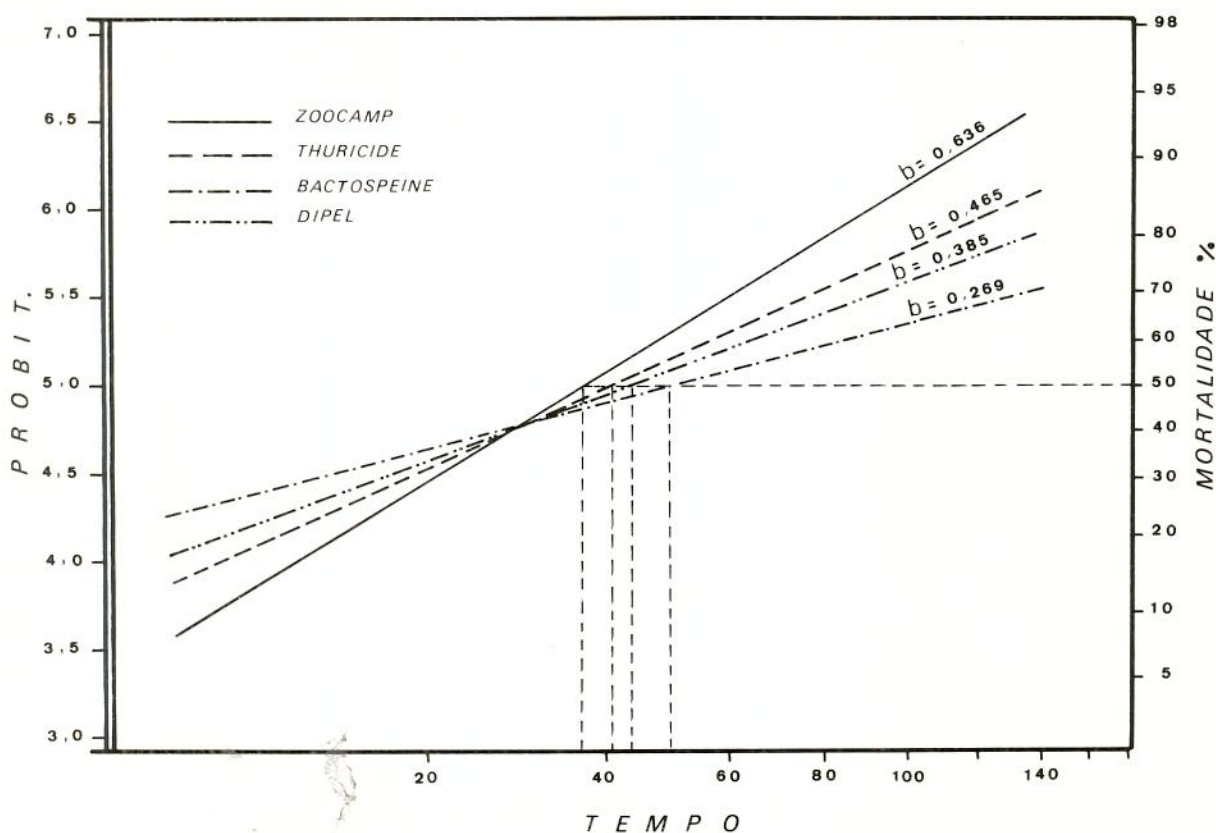


Figura 12: Mortalidade em larvas de A. argillacea em função do tempo em horas, após a infecção por uma dosagem equivalente a 300 g/ha de produto comercial à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Escala Log.Prob.).

Os dados mostram, também, que embora o Bactospeine tenha um potencial de 16.000 UI/mg contra larvas de Anagasta kuhniella (o inseto teste estabelecido para a padronização dos produtos europeus), o seu potencial foi inferior ao do Dipel com as larvas de A. argillacea, variando a razão entre 0,827 e 0,849.

Para a finalidade de aplicação no campo, a dosagem de 500 g/ha pode ser recomendada para o controle de larvas de A. argillacea em campos de algodão. Por outro lado, a dosagem de 1000 g seria desnecessária ou até anti-econômica, enquanto a de 300 g/ha seria insuficiente, apesar do seu efeito satisfatório sob condições de laboratório.

Em termos de adequação à fauna regional, acreditamos que o isolado Zoocamp seria ideal para aplicações na lavoura brasileira. Este isolado, obtido a partir de insetos doentes na região de Campinas, SP, revelou-se mais eficiente do que os produtos estrangeiros avaliados. Tal dado, indica uma necessidade maior de levantar e avaliar os possíveis patógenos que possam ocorrer nas diferentes regiões do Brasil e posteriormente estudar a possibilidade do seu uso, em programas de controle microbiano regional de insetos prejudiciais.

Pouquíssimos são os estudos anteriores ao presente trabalho, realizados com A. argillacea e B. thuringiensis. Figueiredo et al.(1960), através de testes preliminares de laboratório, concluíram que as larvas dessa espécie são susceptíveis a este bacilo. Ignoffo et al.(1964), através de investiga

ções mais precisas, conseguiram mortalidade em larvas da mesma espécie, sob condições de laboratório, entre 72 e 100 %, utilizando folhas de algodoeiro que tinham recebido aplicações de B. thuringiensis no campo. Mais recentemente, Habib & Fávares (1981) detectaram a eficiência da dosagem equivalente e 300 gramas por hectare, em bioensaios realizados com a mesma espécie. Entretanto, nenhum desses trabalhos revela a quantidade do patógeno ingerida pela larva.

4.1.4.2. Brassolis sophorae :

As larvas desta espécie causam grandes danos em coqueiros, desfolhando a planta e deixando apenas as nervuras principais da folha (Fig. 13), tanto em plantas ornamentais na região sul do Brasil, como em plantações na região nordeste do mesmo país. Andrade (comunicação pessoal) mencionou que as larvas dessa espécie são susceptíveis a aplicações de produtos à base de B. thuringiensis. Berti F^o & Gallo (1977), sob condições de laboratório, concluíram que as larvas de Brassolis asytyra são susceptíveis ao mesmo bacilo.

No presente trabalho, foram estabelecidas 6 doses com progressão geométrica do produto comercial Dipel (16.000 UI / mg) para avaliar o nível de susceptibilidade e as respostas de larvas de B. sophorae.

O hábito gregário das larvas dessa espécie e consequentemente, a alta possibilidade de que as de cada ninho sejam irmãs com pequena variabilidade genética, facilitaram a determinação da DL_{50} . Para cada dose, entretanto, as avaliações foram feitas em intervalos de tempo com progressão geométrica, facilitando assim os cálculos de tempo letal para cada dose.

A figura 14 mostra o tempo letal mediano para as doses 136,5 , 91,1 e 60,75 UI / larva. Tais doses correspondem a 30,29 , 20,21 e 13,48 UI / g de peso de inseto tratado. O

TL₅₀ da dose mais alta foi de 19,91 horas, da dose mediana foi de 23,95 e da dose mais fraca foi de 26,71 horas (detalhes na Tabela 3).



Figura 13: Dano causado em coqueiro gerivá por larvas de B. sophorae, na região de Campinas, SP.

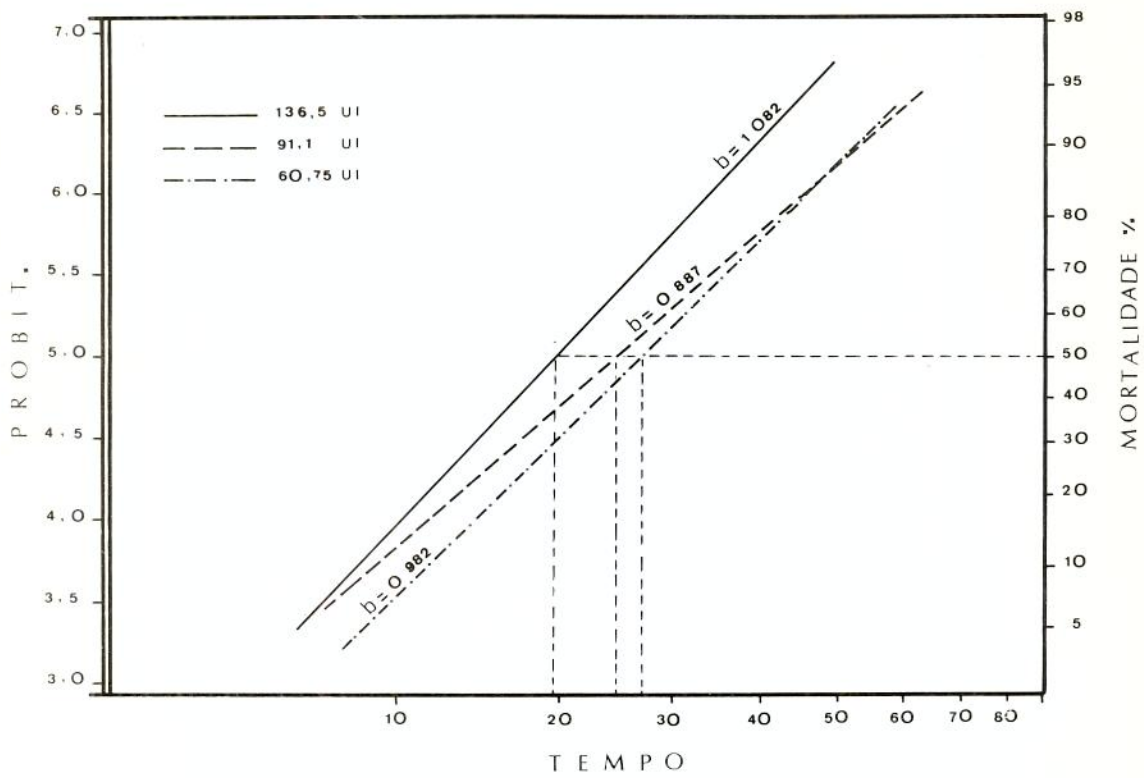


Figura 14: Tempos letais medianos em horas para larvas de B. sophorae em bioensaios com 3 doses de Dipel (16.000 UI/mg) (Escala log./ Probit.)

A figura 15 trata de respostas de larvas de B. sophorae às últimas 3 doses usadas nos bioensaios. Como já era de esperar, as doses fracas causaram 50% de mortalidade nas larvas infectadas em tempos mais prolongados do que as doses mais altas. A dose 40,5 UI / larva resultou em TL_{50} de 27,91 horas, a de 27 UI teve TL_{50} de 31,17 horas e a dose de 18 UI resultou em TL_{50} de 45,58 horas (detalhes na Tabela 3) .

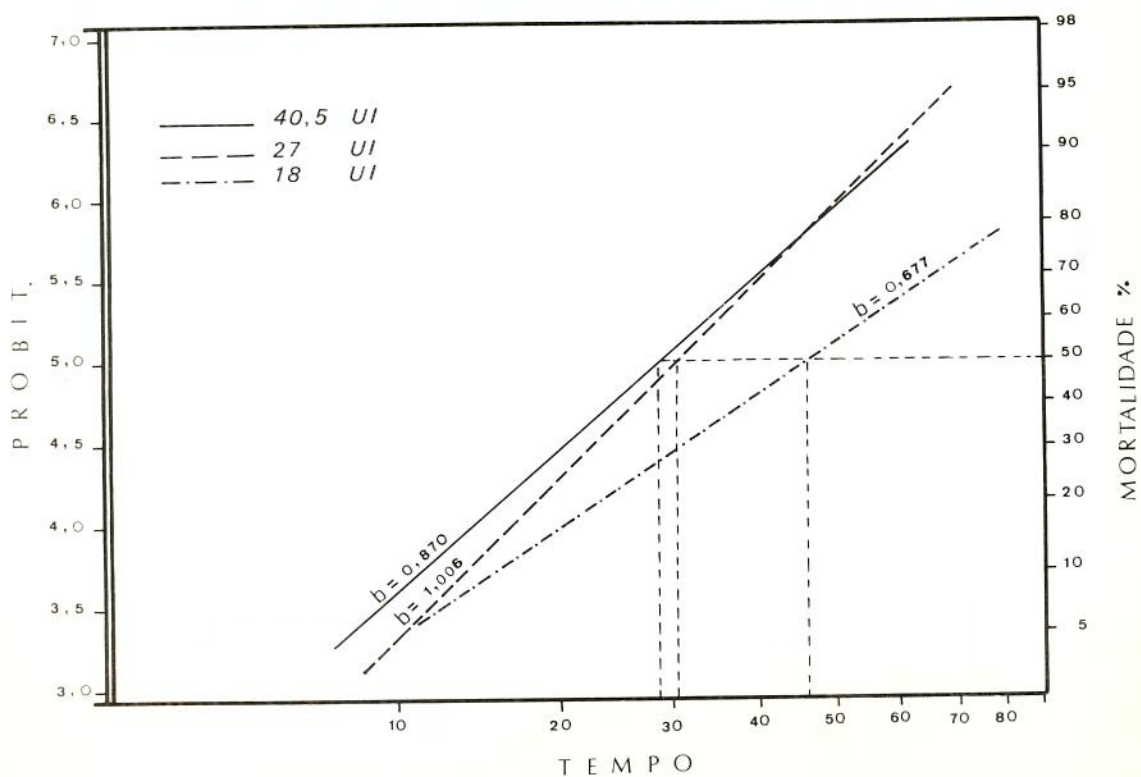


Figura 15: Tempos letais medianos em horas para larvas de B. sophorae em bioensaios com 3 doses de Dipel (16.000 UI/mg) (Escala log. / Probit.).

Tabela 3 : TL_{50} e intervalos de confiança, em horas, para larvas de B. sophorae infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki, utilizando 6 doses (UI / larva e equivalência por unidade de peso).

UI/larva	UI/g	TL_{50}	Intervalo de Confiança		
136,50	30,29	19,91	19,13	-	20,69
91,10	20,21	23,95	23,75	-	24,12
60,75	13,48	26,71	24,83	-	28,84
40,50	8,99	27,91	25,59	-	30,44
27,00	5,99	31,17	28,94	-	33,55
18,00	3,99	45,58	45,12	-	46,03

Os TL_{50} obtidos nos ensaios com larvas de B. sophorae demonstraram um aumento gradual de acordo com a diminuição da dose. Tal aumento seguiu um fator de 1,12 com um mínimo de 1,04 e um máximo de 1,20 entre as primeiras 5 doses. O fator de aumento entre os dois últimos TL_{50} , por outro lado, foi de 1,46, bem maior do que o primeiro. Esta observação indica que a última dose (3,99 UI/g) pode ser considerada subletal para as larvas de B. sophorae. Os TL_{50} das primeiras 5 doses variaram entre 20 e 31 horas; enquanto que o TL_{50} da última dose foi de 45,58 horas.

Os resultados obtidos com o produto comercial Dipel foram utilizados para comparar o nível de susceptibilidade de larvas de A. argillacea e larvas de B. sophorae. A dose mais alta usada com larvas de A. argillacea equivalente a 134 UI / larva e correspondente a 1081 UI/g resultou em TL_{50} de 33,52 horas. Por outro lado, com larvas de B. sophorae, a dose mais alta foi de 136,5 UI/larva (aparentemente próxima à de A. argillacea). Quando esta dose é transformada em UI/g de peso do inseto, a dose correspondente será 30,29 UI/g. Tal dose resultou em TL_{50} de 19,91 horas. Isto quer dizer que, a dose de 1081 UI/g em larvas de A. argillacea teve TL_{50} bem maior do que a dose de 30,29 UI/g em larvas de B. sophorae, indicando, portanto, nível maior de susceptibilidade das larvas da 2a. espécie ao B. thuringiensis do que as larvas da 1a. espécie. Do mesmo modo, as outras doses utilizadas com as duas espécies revelaram o mesmo fenômeno e confirmaram a alta susceptibili

dade das larvas de B. sophorae quando comparadas com as de A. argillacea (detalhes na Tabela 4).

Utilizando as 6 doses, anteriormente mencionadas , com a sua progressão geométrica, a dose letal mediana (DL_{50}) para larvas de B. sophorae infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki foi determinada 27,5 horas após a ingestão do patógeno. Com intervalo de confiança de 34,02 a 35,55 UI / larva, a DL_{50} foi de 34,78 UI (Fig. 16). Esta dose corresponde a apenas 7,717 UI / g de peso do inseto tratado.

Tabela 4 : Comparação em três níveis entre a susceptibilidade de larvas de B. sophorae e de A. argillacea ao B. thuringiensis (Dipel).

<u>B. sophorae</u>			<u>A. argillacea</u>		
UI / larva	UI / g	TL ₅₀	UI / larva	UI / g	TL ₅₀
136,50	30,29	19,91	134,00	1081	33,52
60,75	13,48	26,71	67,00	540,5	39,29
40,50	8,99	27,91	40,00	322,6	43,84

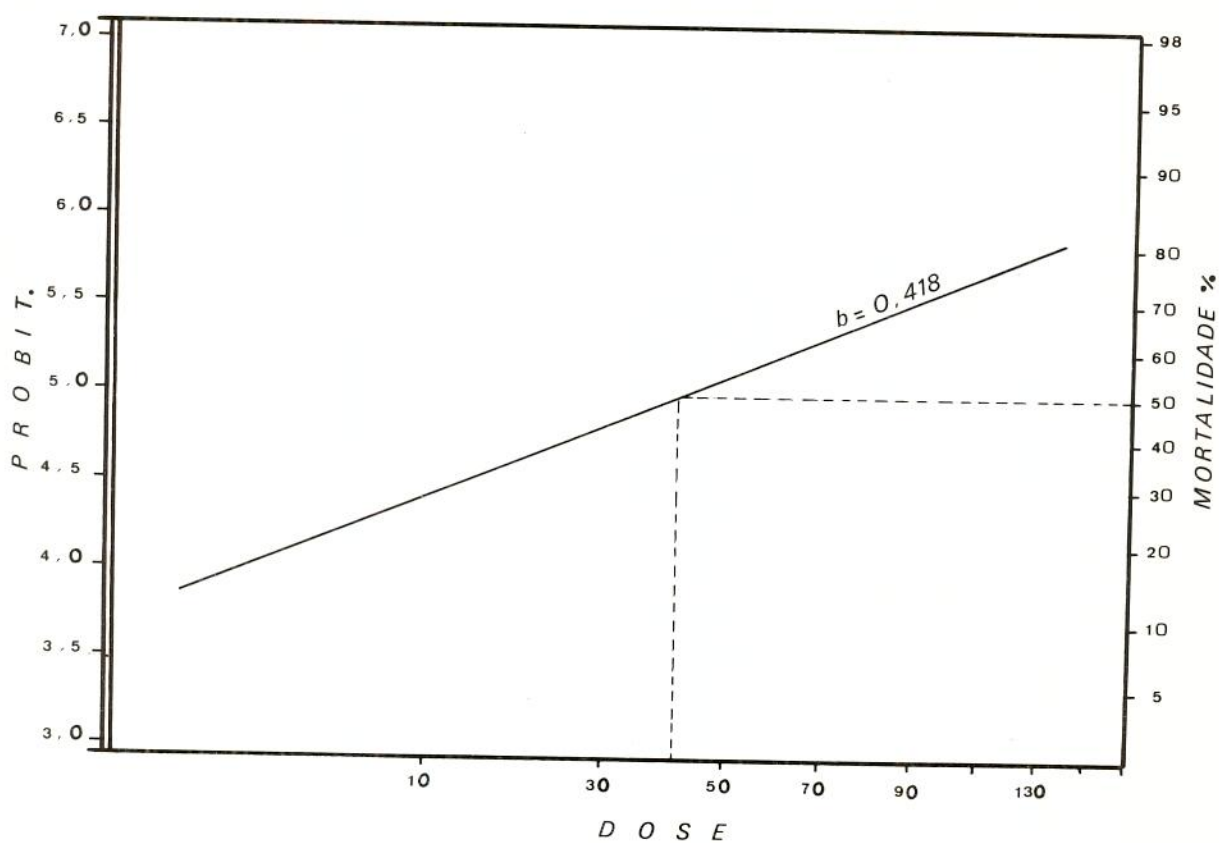


Figura 16: Relação entre doses (UI / larva) e mortalidade em larvas de B. sophorae infectadas por Dipel (B. thuringiensis var. kurstaki) (Escala log.Probit.).

4.1.4.3. Spodoptera latifascia :

A ocorrência deste noctuídeo em plantações de algodão e soja e a sua possível importância econômica como inseto daninho foram relatados por Habib et al. (1982). Esta espécie pertence a um gênero considerado resistente a Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Moore & Navon, 1973; Govendarajan et al., 1975; Garcia, 1979; Habib & Garcia, 1981 ; Garcia et al., 1982).

Os estudos preliminares, realizados no presente trabalho, revelaram a alta resistência de larvas de S. latifascia às dosagens comumente recomendadas para o controle de larvas de Lepidoptera susceptíveis a este bacilo. Por este motivo , material técnico concentrado de dois produtos comerciais (Dipel e Bactospeine) foi utilizado além do isolado Zoocamp-78 para os estudos de susceptibilidade de larvas desta espécie. O potencial do concentrado do produto Dipel é equivalente a 32.000 UI / mg, utilizando-se larvas de T. ni como inseto teste. Cada miligrama do concentrado do Bactospeine, por outro lado, contém 60.000 UI / mg, utilizando-se larvas de Anagasta kühniella como inseto teste. O Zoocamp-78, como foi mencionado anteriormente , contém 39.000 UI / mg, contra larvas de T. ni.

De cada produto foram feitas 3 diluições, 1/20, 1/30 e 1/40. Cada larva recebia 2 ul de suspensão. Portanto, as dosagens em termos de quantidade de produto seriam 0,100 mg , 0,06666 mg e 0,04545 mg / larva respectivamente.

A figura 17 mostra as respostas de larvas desta espécie à dosagem de 0,100 mg / larva, ou seja, 0,2247 mg /g de peso do inseto, dos 3 produtos usados. Tal dosagem teve efeito mortal mais rápido com o produto Dipel, onde o TL_{50} foi de 64,72 horas com intervalo de confiança de 45,68 a 84,57 horas. O Zoocamp-78, com a mesma dosagem ocupou o 2º lugar com TL_{50} de 68,87 horas, enquanto que o Bactospeine teve a ação mais lenta com TL_{50} de 82,66 horas (detalhes na Tabela 5). Esses dados indicam que, embora os três produtos sejam à base da mesma variedade e mesmo sorotipo, tiveram ação diferente nas larvas de S. latifascia. Era de esperar que o Zoocamp-78 resultasse em TL_{50} menor do que o Dipel, pois é de potencial maior em larvas de T. ni, e ambos foram produzidos pela mesma indústria, utilizando-se os mesmos critérios de fermentação e formulação. O resultado inverso então pode ser explicado pelo histórico de cada patógeno desses dois produtos, pois o agente patogênico do Zoocamp-78 foi isolado no Brasil a partir de larvas doentes de A. kühniella e do Dipel foi isolado nos EUA a partir de larvas de Pectinophora gossypiella.

Determinando o potencial de Zoocamp-78 e do Bactospeine, na dosagem de 0,100 mg / larva, com a consideração do Dipel como padrão (32.000 UI/mg) e larvas de S. latifascia como inseto teste, observa-se que a relação entre os 3 produtos seria 32.000 : 30.072 : 25.055 para Dipel, Zoocamp e Bactospeine respectivamente.

As larvas de S. latifascia podem ser consideradas resistentes ao bacilo, desde que a dose mais alta do Dipel

(0,100 mg / larva), que corresponde a 7191 UI/g do peso do inseto, além de ter um TL_{50} de 64,72 horas, foi 6,65 vezes mais alta do que a dose do mesmo produto, que causou o menor TL_{50} em larvas de A. argillacea (1081 UI/g com TL_{50} de 33,52

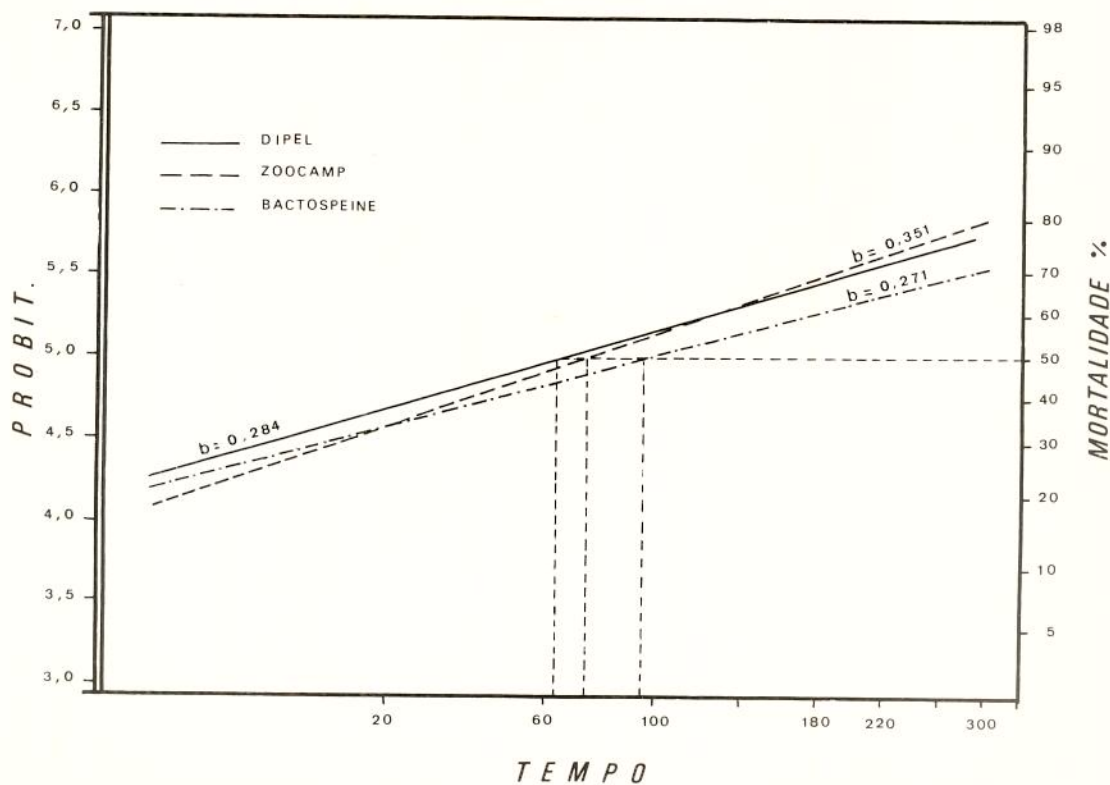


Figura 17: Comparação do tempo letal mediano em horas entre 3 produtos, com dosagem equivalente a 0,1 mg/larva, em larvas de S. latifascia (Escala Log. Probit.).

Tabela 5: Tempos letais medianos em horas e intervalos de confiança para larvas de S. latifascia infectadas por 3 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki.

Produto	0,100 mg/larva		0,0666 mg/larva		0,04545 mg/larva	
	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo
Dipel	64,72	45,68-84,57	71,64	53,17-89,09	134,30	98,67-170,32
Zoocamp-78	68,87	49,52-89,17	156,70	117,8-207,61	223,07	183,45-263,42
Bactospeine	82,66	61,3-103,09	161,55	120,8-201,29	282,33	250,99-313,96

horas). Do mesmo modo, essa mesma dosagem foi 237 vezes mais alta do que a dose do mesmo produto que causo TL_{50} de 19,91 horas em larvas de B. sophorae, confirmando a resistência das larvas de S. latifascia.

Utilizando a dosagem de 0,06666 mg / larva, para comparar as respostas de larvas de S. latifascia aos mesmos produtos, a figura 18 destaca o Dipel, mais uma vez em relação aos outros produtos. O tempo letal mediano desse produto foi de 71,64 horas, seguido por 156,70 e 161,55 horas para Zoo-camp-78 e Bactospeine respectivamente (detalhes na Tabela 5) .

Os três produtos mantiveram a mesma sequência quanto as respostas de larvas desse noctuídeo à dosagem de 0,04545 mg / larva, porém, com tempos letais medianos mais prolongados (Fig. 19 e Tabela 5).

Com o uso de altas dosagens, os baixos níveis de susceptibilidade de larvas de S. latifascia, detectadaos no presente trabalho (valores altos de TLs_{50} com grandes intervalos de confiança), indicam a inaplicabilidade deste patógeno como agente de controle dessa praga, devido a sua resistência.

Embora sejam enúmeros os trabalhos publicados sobre susceptibilidade de larvas de Lepidoptera ao B. thuringiensis, são pouquíssimos aqueles que utilizam critérios e dados precisos que permitam comparações. Muitos usavam apenas determinadas diluições à partir de produtos comerciais, sem qualquer informação direta ou indireta sobre a quantidade recebida do

patógeno pelo inseto (Figueiredo et al.,1960; Shaikh & Morrison, 1966; Malhotra & Choudhary, 1968; Taylor, 1968; Yamvrias & Angus, 1969; Graves & Watson, 1970; Larson & Ignoffo, 1971 ; Kearby et al.,1972; Cheng, 1973; Charpentier et al.,1973;Alves et al.,1981; Geest, 1981). Tais trabalhos têm a sua alta im-

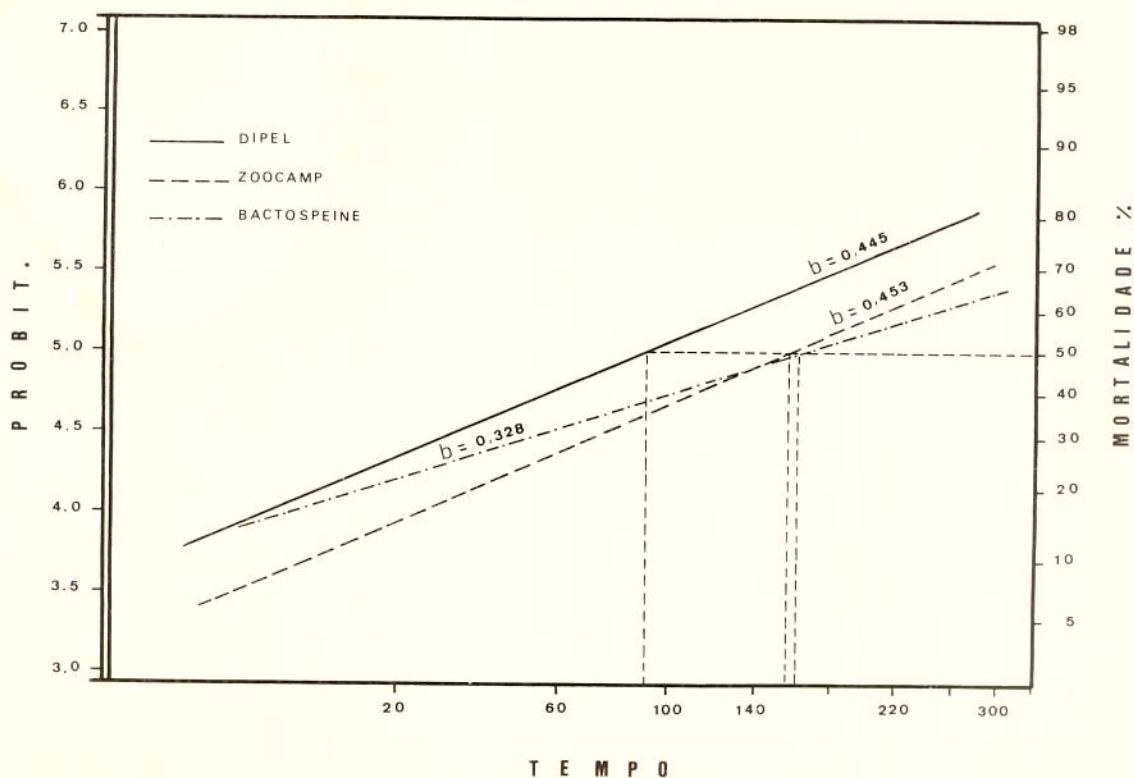


Figura 18: Comparação de tempo letal mediano, em horas, em larvas de S. latifascia infectadas por uma dose de 0,06666 mg/larva de 3 produtos diferentes, à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Escala Log.Prob.)

portância em possíveis aplicações no campo e recomendações para controle microbiano de pragas.

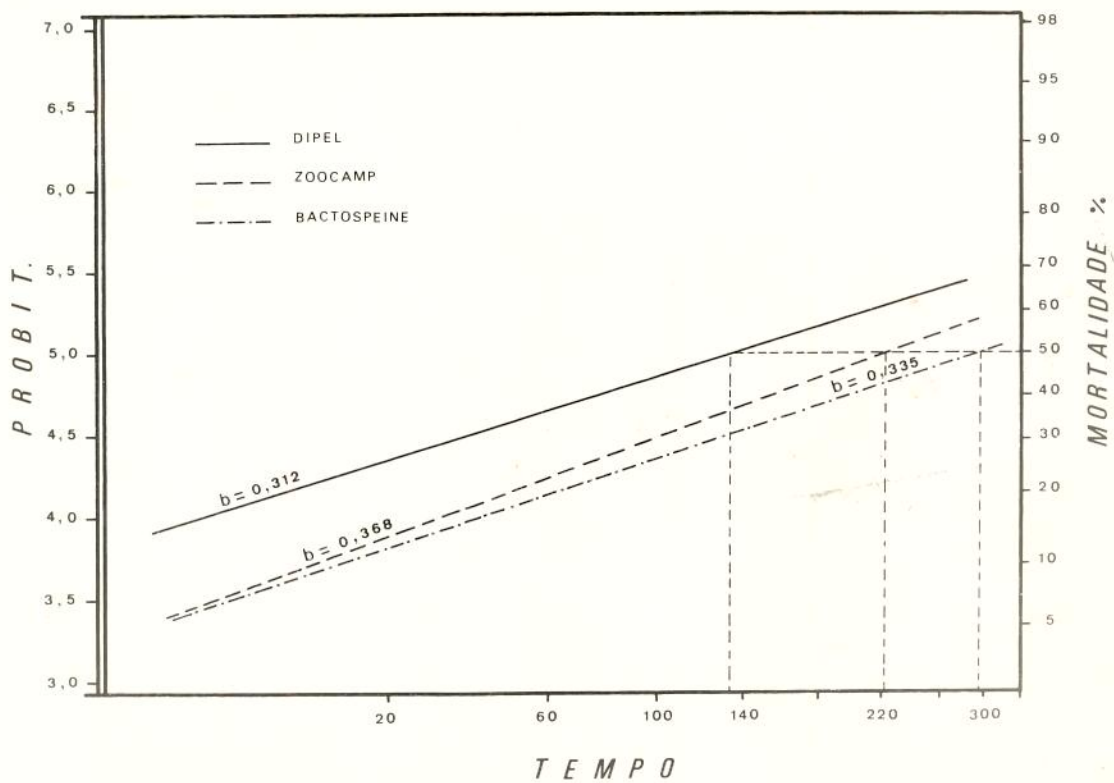


Figura 19: Comparação de tempo letal mediano, em horas, em larvas de S. latifascia infectadas por uma dose de 0,04545 mg/larva de 3 produtos diferentes à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Escala log.Prob.)

Com o interesse de estabelecer critérios de padronização e de possibilitar comparações entre a susceptibilidade de insetos infectadoa por B. thuringiensis, Angus (1967) foi o primeiro a salientar a importância de apresentar os dados em termos de quantidade de patógeno / peso do inseto tratado, onde mencionou que a DL_{50} para larvas de B. mori infectadas por B. thuringiensis var. thuringiensis foi de 5 μg / g de larva . Angus & Norris (1968) seguindo o mesmo critério, revelaram que a DL_{50} de larvas da mesma espécie foi de 10 μg / g de larva , quando utilizaram a variedade alesti.

Ignoffo et al. (1968) foram os primeiros a mencionar que em vários casos as larvas dos estádios iniciais demonstram nível maior de susceptibilidade ao patógeno do que as dos últimos estádios. Porém, quando a dose é relacionada com o peso da larva, sempre ocorre o inverso. Em larvas de T. ni, de acordo com esses autores, a DL_{50} para o primeiro estágio foi de 48×10^6 cristais / g de larva; enquanto que para o quarto estágio foi de 30×10^6 cristais. Garcia (1979), Habib & Garcia (1981) e Andrade (1981) são uns dos poucos que consideram os critérios seguidos por Ignoffo et al. (1968).

4.1.4.4. Plodia interpunctella :

As larvas desta espécie são consideradas praga séria de arroz, trigo, milho, feijão, farinhas, farelos, fubás, doces secos e outros, ocorrendo praticamente no mundo todo (Back & Cotton, 1922; Hill, 1928; Hamlin et al., 1931; Fernald & Shepard, 1942; Gallo et al., 1970). Porém, no Brasil como em outros vários países o controle desta praga é exclusivamente químico utilizando, por exemplo, Malation 2% em polvilhamento (Gallo et al., 1970) e fumigação por gas do ácido hidrociânico (Fernald & Shepard, 1942).

No presente trabalho, a susceptibilidade de larvas de P. interpunctella a B. thuringiensis var. kurstaki foi verificada utilizando 4 preparações para esta finalidade, Bacto speine, Zoocamp-78, Dipel e Thuricide. Concentrações de 2,659 %, 0,7075 % e 0,188 % do patógeno foram aplicadas na dieta artificial para a comparação entre os diferentes produtos.

A figura 20 mostra as respostas das larvas aos 4 produtos com a concentração de 2,659 %. Utilizando o Dipel como indicador de potência, esta concentração corresponderia a 425 UI/mg da dieta. O menor tempo letal mediano de 31,09 horas foi obtido nas larvas tratadas com Dipel, seguido por Bactospeine com 32,94 horas, porém, sem diferença significativa entre eles. O isolado Zoocamp-78 ocupou o 3º lugar com tempo letal mediano de 47,04 horas e o Thuricide no último lugar com 60,98 horas (detalhes na Tabela 6).

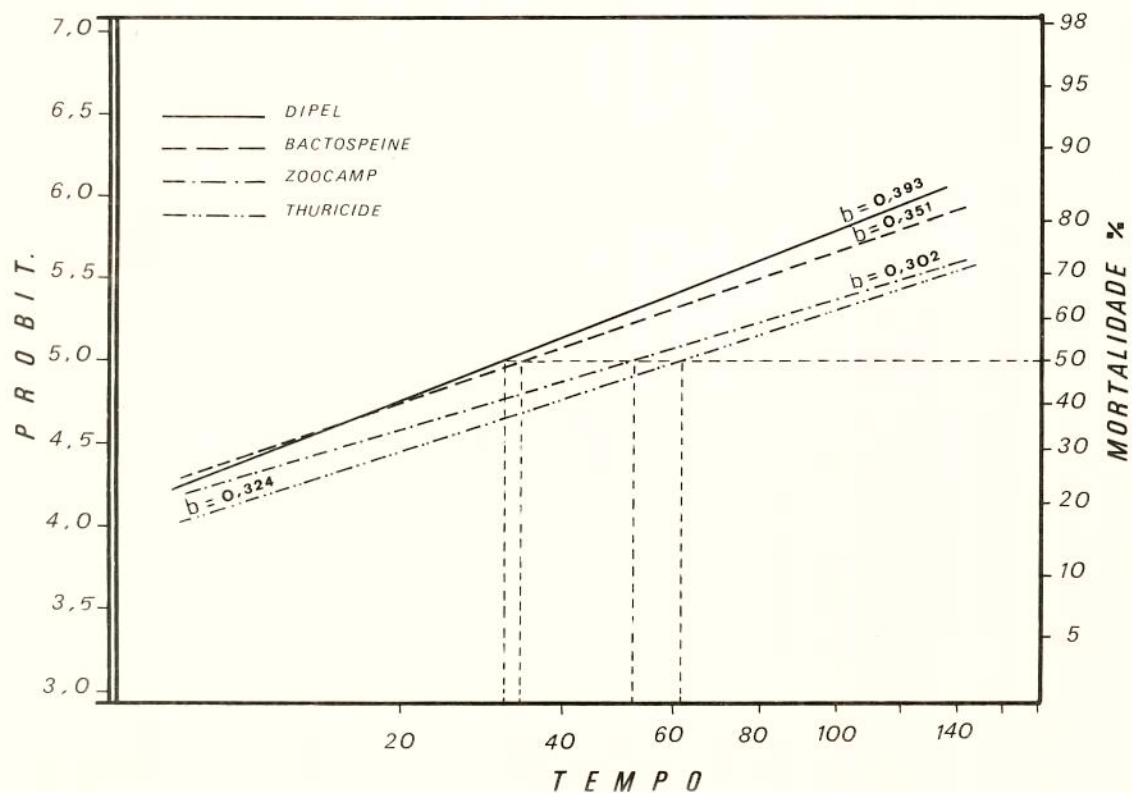


Figura 20: Comparação de tempo letal mediano, em horas, em larvas de P. interpunctella expostas a concentração de 2,659 % de 4 produtos diferentes à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Escala log.Prob.)

Tabela 6: Tempos letais em horas e intervalos de confiança para larvas de P. interpunctella infectadas por 4 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki, em três concentrações diferentes.

Produto	2,659 %		0,7075 %		0,188 %	
	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo
Dipel	31,09	28,21-34,26	48,43	43,05- 54,48	84,86	74,18- 97,09
Bactospeine	32,94	30,79-35,22	32,72	30,59- 34,99	177,53	148,78-209,39
Zoocamp-78	47,04	43,83-50,48	80,14	74,93- 85,72	172,35	153,95-190,85
Thuricide	60,98	57,01-65,23	144,80	125,41-164,31	179,71	155,21-204,01

Com a concentração de 0,7075 % do patógeno na dieta artificial, as larvas de P. interpunctella tiveram valores maiores de TLs_{50} do que os obtidos com a concentração de 2,659 %, com a exceção do produto Bactospeine. Para tal produto, não houve diferença significativa entre o tempo letal mediano nas duas concentrações citadas (Tabela 6). O Bactospeine com a concentração de 0,7075 % substituiu o Dipel ocupando o 1º lugar com TL_{50} de 32,72 horas. O Dipel, entretanto, ocupou o 2º lugar com 48,43 horas. Zoocamp-78 e Thuricide tiveram os maiores valores de TLs_{50} com 80,14 e 144,80 horas respectivamente (Fig. 21).

Com a 3a. concentração utilizada, de 0,188 % o Dipel voltou a ocupar o seu 1º lugar com TL_{50} de 84,86 horas. Os outros três produtos, totalmente afastados do Dipel, ocuparam o 2º lugar sem diferença significativa entre eles e com TLs_{50} acima de 170 horas (Fig. 22 e Tabela 6).

Os dados obtidos, através dos bioensaios realizados com larvas de P. interpunctella, mostraram diminuição na eficiência do patógeno com o decréscimo na concentração, indicada pelos valores de TLs_{50} . Dados semelhantes foram obtidos por Habib (1968) e Afify et al. (1970b) com larvas de A. kühniella. Os mesmos dados, também indicam que não houve excesso de doses na concentração de 2,659 %, a não ser no caso de Bactospeine, pois houve aumento gradual no valor dos TLs_{50} com o decréscimo na concentração, facilitando assim os cálculos da concentração letal mediana (CL_{50}).

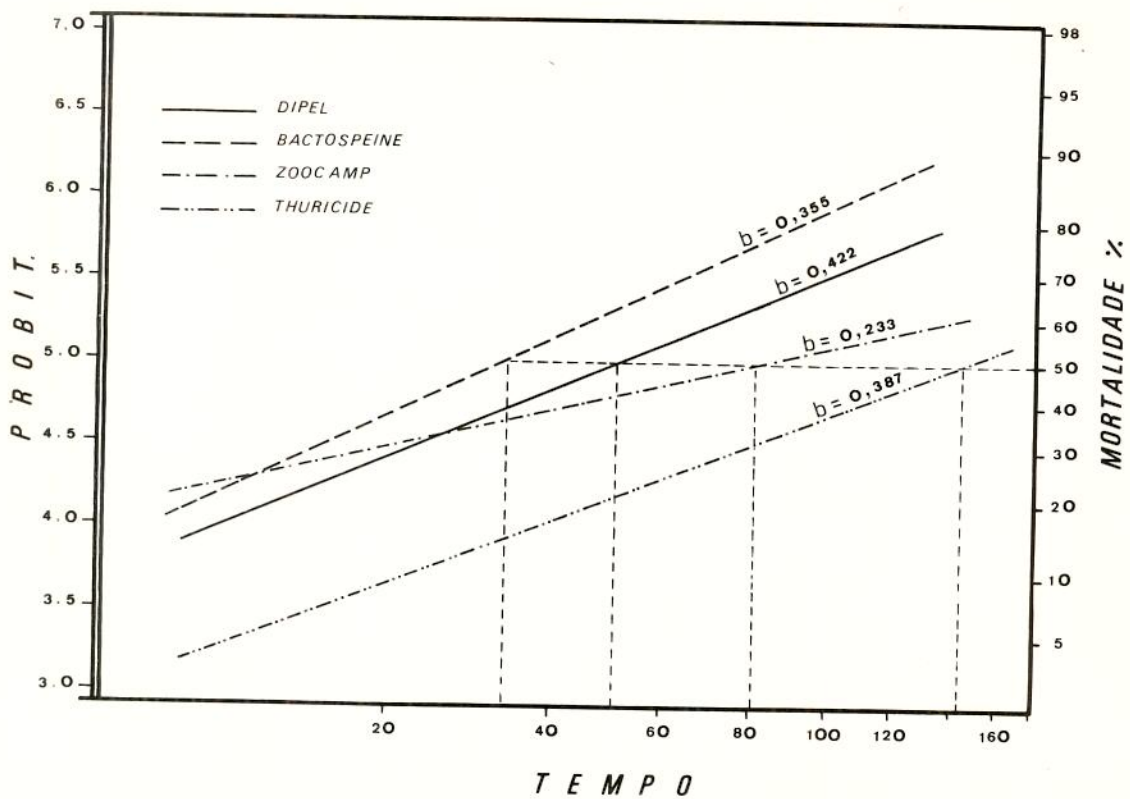


Figura 21: Comparação de tempo letal mediano, em horas, para larvas de P. interpunctella expostas a concentração de 0,7075 % de 4 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Escala Log.Prob.).

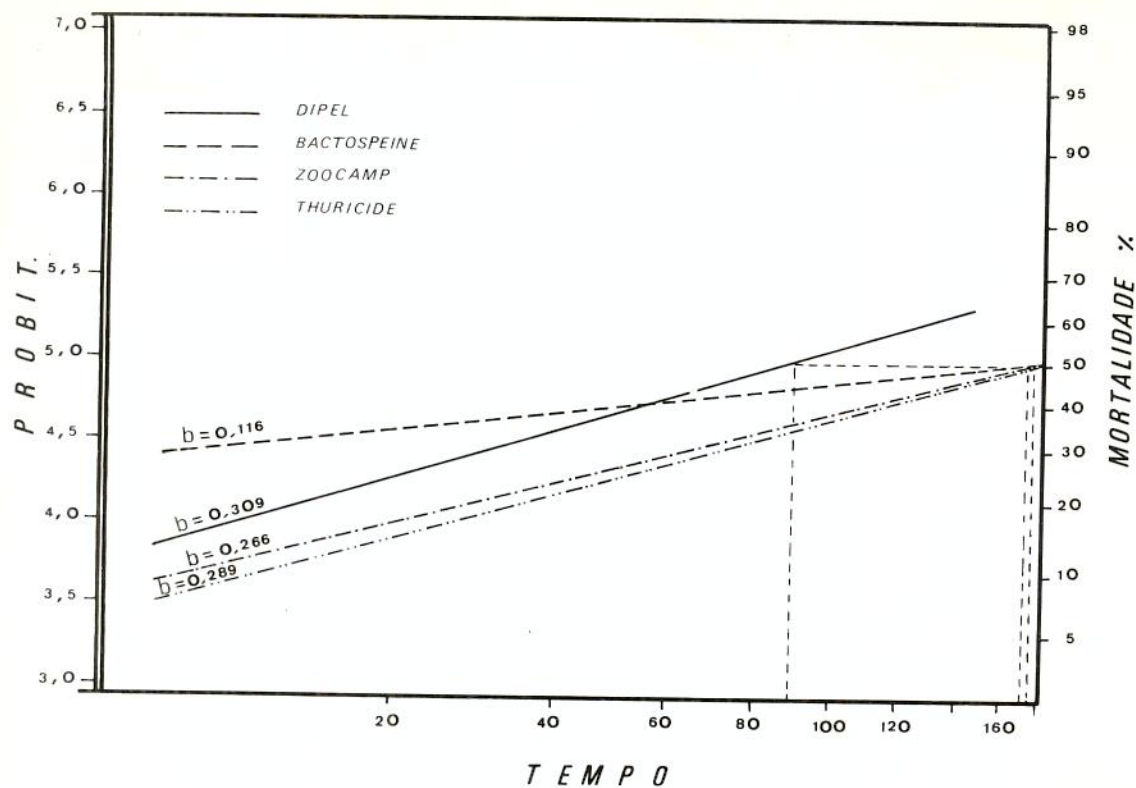


Figura 22: Comparação de tempo letal mediano, em horas, para larvas de P. interpunctella expostas a concentração 0,188 % de 4 produtos à base de B. thuringiensis var. kurstaki (Escala Log.Prob.).

A determinação da CL_{50} foi feita através de bioensaios com 6 concentrações de Dipel e 4 períodos de exposição das larvas ao patógeno. A figura 23 mostra que as maiores doses precisam de tempos menores para causar a mesma percentagem de mortalidade. Após 46 horas, por exemplo, a CL_{50} em larvas de P. interpunctella foi de 68.031 UI / mg de dieta. Esta dosagem corresponde à concentração de 0,4252 % do produto comercial. Este dado indica a alta susceptibilidade das larvas desta espécie a B. thuringiensis var. kurstaki. Pois, Habib (1968) e Afify et al. (1970b) determinaram a CL_{50} de larvas de A. kühniella, que pertence a mesma família Phycitidae, numa dosagem equivalente a concentração de 2,5 % do produto Biotrol BTB-183. Tal produto era produzido, entretanto, a partir da variedade thuringiensis (sorotipo H-1). Também, há a possibilidade de considerar a variedade kurstaki de potencial maior do que a variedade thuringiensis para larvas de Lepidoptera. As CL_{50} de Dipel após 65, 90 e 127 horas em larvas de P. interpunctella foram de 48,64, 19,65 e 14,65 UI / mg de dieta respectivamente (detalhes na Tabela 7).

O fato de que esta espécie foi criada durante muitos anos em condições artificiais totalmente padronizadas, tanto em termos de condições físicas como dieta, facilitou a determinação da CL_{50} . Insetos nessa situação têm sempre pequena variabilidade genética entre os indivíduos.

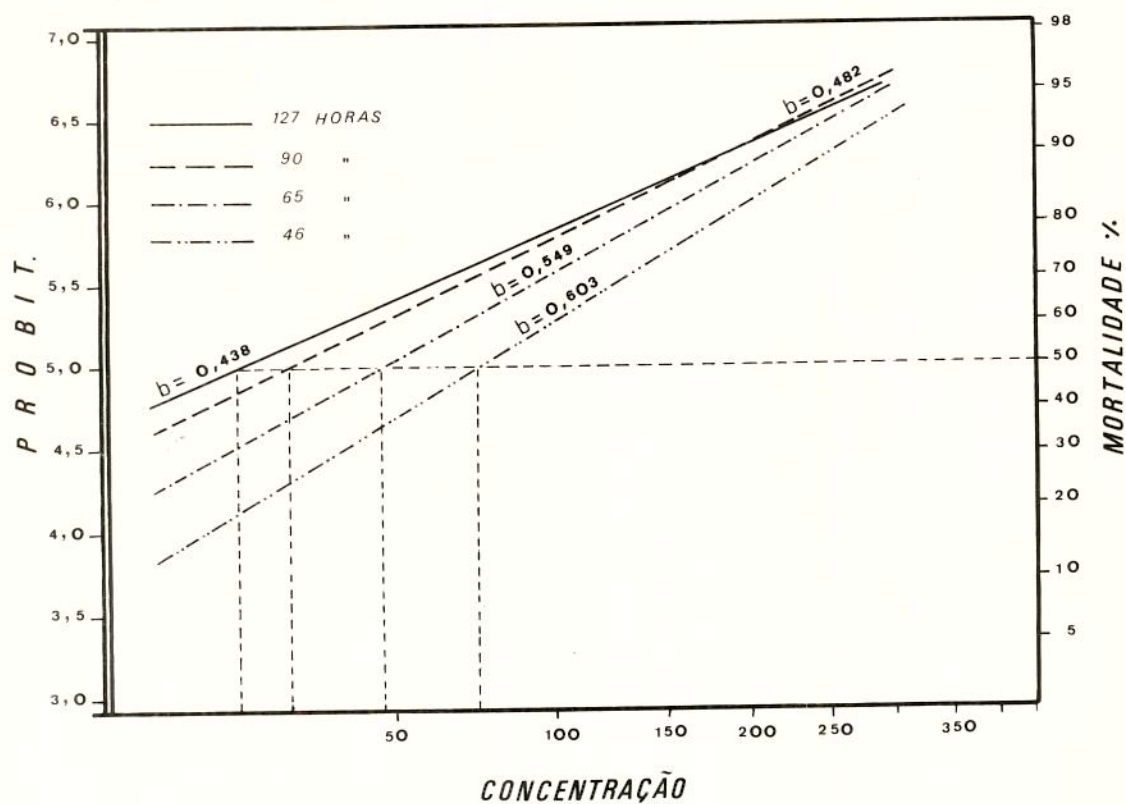


Figura 23: CLs₅₀ (UI/mg) de Dipel para larvas de P.interpunctella após 4 períodos de exposição (Escala Log. Prob.).

Tabela 7: CL_{50} de Dipel para larvas de P. interpunctella, com os intervalos de confiança, após 4 períodos de exposição.

Tempo (h)	CL_{50} (UI/mg)	Intervalo de confiança		
46	68,03	52,92	-	87,53
65	48,64	38,33	-	61,75
90	19,65	14,45	-	24,85
127	14,65	12,03	-	17,31

4.2. PATOGENICIDADE DE Bacillus thuringiensis var. israelensis PARA LARVAS DE DIPTERA

Devido aos efeitos colaterais desvantajosos do uso de produtos quimo-tóxicos para o controle de larvas aquáticas de dípteros vetores de doenças para o homem, várias tentativas tem sido feitas em busca de outras alternativas mais adequadas. A maioria destas foi dirigida à procura de agentes patogênicos principalmente bacterianos, que pudessem ser usados para essa finalidade. As variedades de B. thuringiensis que produzem a β -exotoxina têm revelado alta capacidade de causar doença e morte para as larvas de dípteros aquáticos (Hall & Arakawa, 1959; Briggs, 1960; Ignoffa & Gard, 1970; Lam & Webster, 1972). Porém, os seus efeitos tóxicos para os vertebrados (Sebesta et al., 1969; Ignoffo, 1973; Barker & Anderson, 1975; Lacey & Mulla, 1977; Alcey et al., 1978) e a teratogenicidade para insetos (Angus, 1971; Lam & Webster, 1972) foram suficientes, como critério para a retirada do mercado dos produtos à base de variedades que produziam essa toxina. O desenvolvimento de resistência em insetos, também respresenta outro aspecto desvatajoso para o uso de tal toxina, pois foi verificado por Barker & Anderson (1975) que a mosca doméstica desenvolveu rapidamente alta resistência a essa toxina.

Recentemente, Bacillus sphaericus tem demonstrado qualidades promissoras para o controle de larvas aquáticas de

Diptera (singer, 1975; Ramoska et al., 1977 e 1978; Mulligan III et al., 1978). Prorém, a descoberta de B. thuringiensis var. israelensis por Goldberg & Margalit (1977) tornou a ideia de controle microbiano de larvas aquáticas de dípteros um sonho realizável. Alguns estudos sob condições tanto de laboratório como de campo, foram realizados em países como França, Canadá e EUA (de Barjac, 1978; Tyrell et al., 1979; Colbo & Undeen, 1980; Undeen & Colbo, 1980; Mulligan III et al., 1980; Wraight et al., 1981; Larget & de Barjac, 1981; Molloy et al., 1981) para verificar a eficiência desse bacilo em larvas de culicídeos e simulídeos, obtendo resultados altamente satisfatórios. Entretanto, até o presente momento, nada foi feito nos países neotropicais, nesse sentido.

A eficiência de B. thuringiensis var. israelensis foi avaliada, no presente trabalho, em larvas de Culex declarator, uma espécie que ocorre nas Americas Central e do Sul (Forattini, 1965), e em larvas de Simulium goeldii e S. rorotaense, dois simulídeos frequentes na região amazônica.

4.2.1. PATOGENICIDADE PARA LARVAS DE Culex declarator

4.2.1.1. Sintomatologia Externa :

A morte observada nas larvas de C. declarator, devido à infecção por B. thuringiensis var. israelensis (sorotipo H-14), ocorria rapidamente (2 a 3 horas), mecanismo diferente

do verificado em larvas de Lepidoptera quando infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki (2 a 3 dias). Por esta razão, a sequência de sintomas, também, foi muito rápida no caso de larvas de C. declarator.

As larvas infectadas perdiam, gradualmente sua agilidade, aspecto detectado através de respostas aos toques. Alguns minutos após a infecção (como em todos os sintomas, variando de acordo com a concentração) houve redução, também, gradual nos movimentos das peças bucais da larva, indicando perda de apetite que terminava com a cessação da ingestão de alimento. Convulsões esporádicas foram observadas no início da infecção (após 15 minutos) indicando o possível início de absorção da δ -endotoxina do patógeno. O ritmo das convulsões aumentava atingindo o máximo de 20 convulsões por minuto 43 minutos após a infecção, indicando assim, possíveis efeitos no sistema nervoso da larva.

As larvas do último estágio (4º) começaram a perder a sua capacidade de flutuação a partir de 30 minutos após a infecção. Porém, ainda com capacidade de retornar a superfície. A medida que a doença avançava, as larvas perdiam tal capacidade, permanecendo mais tempo no fundo dos recipientes do tratamento. As larvas do primeiro estágio, entretanto, provavelmente devido ao seu pequeno peso, não afundavam na água facilmente e, em vários casos, permaneciam na superfície. As observações indicam que a permanência dessas pequenas larvas na superfície, ocorria exclusivamente pela força da tensão super

ficial da água, pois, as larvas agrupavam-se e separavam-se umas das outras lentamente e sem qualquer esforço próprio ; tal fenômeno ocorre com quaisquer partículas em flutuação. Várias dessas larvas pequenas flutuavam, porém, com o sifão emerso na água. As larvas grandes morriam sempre no fundo do recipiente. As pequenas, entretanto, geralmente morriam flutuando e afundavam facilmente a qualquer toque ou movimento na água. As larvas, logo antes da morte, permaneciam com corpo curvado indicando ação drástica do patógeno sobre a musculatura.

Os sintomas descritos, no presente trabalho, indicam a alta possibilidade de que a morte das larvas de C.declarator ocorria devido a esfixia e não pela ação direta da δ -endotoxina produzida pelo patógeno. As larvas de pernilongos respiram, através do sifão, o ar atmosférico. A toxina, parece que, afetando os sistemas nervoso e muscular, incapacitou a larva de permanecer na superfície da água com o sifão projetado para fora. Assim, as larvas afundavam e morriam por falta de O_2 e excesso de CO_2 e ácido carbônico nos tecidos. Nenhum trabalho publicado foi encontrado explicando a razão da morte rápida das larvas de pernilongos, devida a infecção pela variedade israelensis.

4.2.1.2. Histopatologia :

As alterações histológicas em larvas de C.declarator infectadas pela variedade israelensis foram investigadas em 3 tecidos, mesenteron, gânglios nervosos e fibras musculares.

4.2.1.2.1. Alterações no mesenteron :

Durante a fase inicial da infecção, a condensação de cromatina nos núcleos foi observada nas células epiteliais do intestino médio da larva (Fig. 24A). Numa fase mais adiantada, ocorreu alongamento e estufamento das microvilosidades do epitélio intestinal. Vacuolização e alteração da homogeneidade citoplasmática foram observadas. A camada epitelial afastou-se da membrana basal e dos músculos circulares (detalhes na Fig. 24B). Hipertrofia e intumescimento das células epiteliais foram observadas com frequência (Fig. 24C), alterações não detectadas em larvas de Lepidoptera. Essa tumefação ou intumescimento "swelling",acompanhada de desintegração da microvilosidade foram detectadas numa fase mais adiantada da doença (Figs. 24D e 24E). O mesmo sintoma foi observado por de Barjac (1978) e Charles & de Barjac (1981) em larvas de Aedes aegypti. Logo antes da morte da larva de C. declarator ocorreu desintegração das membranas celulares do epitélio, das membranas peritrófica e basal, e o conteúdo das células apresentou-se misturado com o resto do alimento na luz do intestino médio (Fig. 24F).

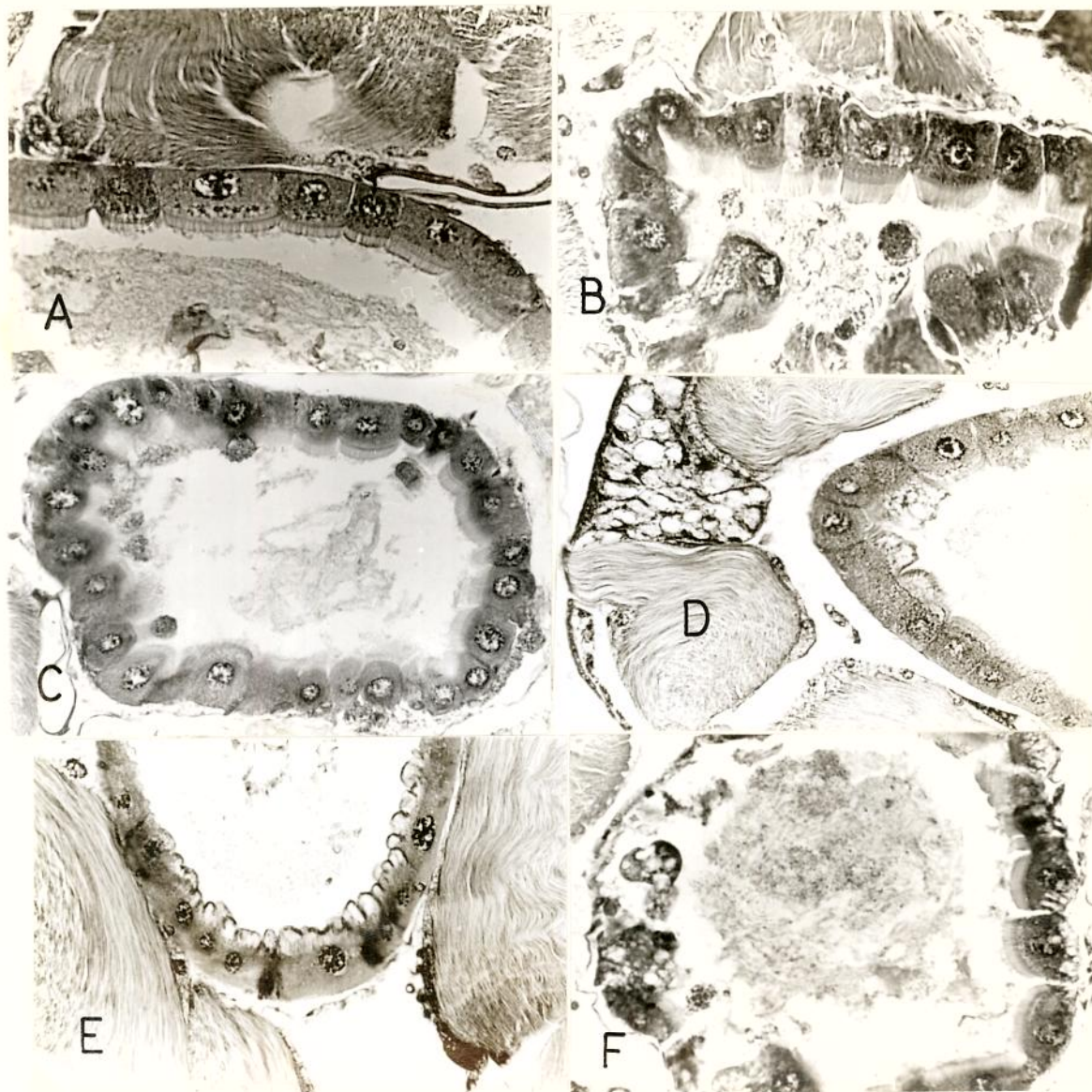


Figura 24: Alterações graduais (A-F) no mesenteron da larvas de C. declarator infectadas por B. thuringiensis var. israelensis.

As alterações detectadas no intestino médio de larvas de C. declarator infectadas com B. thuringiensis var. israelensis e a rapidez da ocorrência dos mesmos, indica a elevada probabilidade de que o pH na luz do intestino seja altamente alcalino, favorecendo assim a rápida dissolução do cristal protéico e a liberação da δ -endotoxina, responsável pela ação patogênica no epitélio intestinal da larva.

4.2.1.2.2. Alterações nos gânglios nervosos :

As alterações histológicas detectadas nos gânglios nervosos em larvas de C. declarator foram, praticamente, semelhantes àquelas observadas no mesmo tecido em larvas de Lepidoptera. Entretanto, o desencadeamento dos sintomas, no caso de C. declarator foi muito mais rápido do que nas larvas de Lepidoptera.

A figura 25 mostra os principais sintomas observados. Numa fase inicial da infecção, ocorreu condensação da cromatina das células nervosas acompanhada por perda na homogeneidade da neurópila (Fig. 25A). Em seguida observou-se degeneração parcial das células nervosas e do neurolema juntamente com maior redução da integridade da neurópila (Fig. 25B). Nas fases finais da bacteriose houve degeneração total das células nervosas e do neurolema, permanecendo apenas a neurópila, totalmente afetada e desintegrada (Figs. 25C e 25D).

Essas alterações a nível de sistema nervoso, explicam alguns dos sintomas externos observados, tais como, perda de agilidade e convulsões musculares.

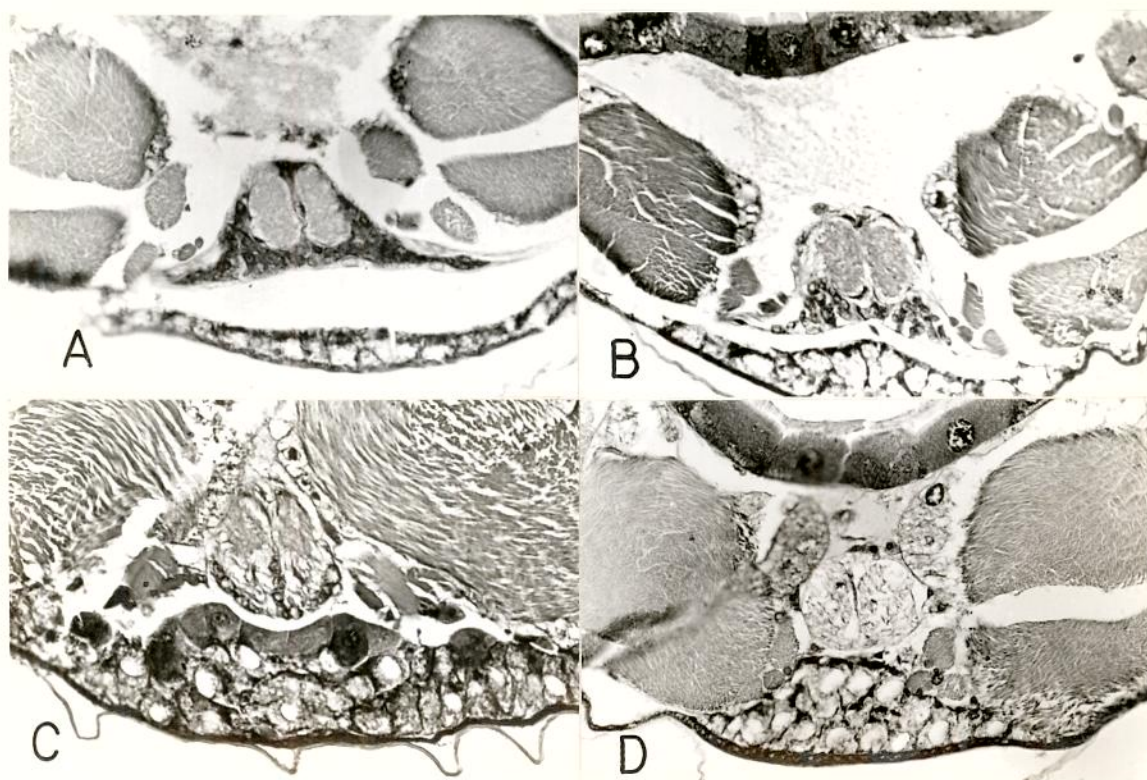


Figura 25: Alterações histológicas graduais (A-D) em gânglios nervosos, em larvas de C. declarator infectadas por B. thuringiensis var. israelensis.

4.2.1.2.3. Alterações nas fibras musculares :

Durante a fase inicial da infecção, as alterações nas fibras musculares eram praticamente invisíveis e a integridade foi observada tanto em cortes longitudinais de fibras (Fig. 26A) como em transversais (Fig. 26B). Entretanto, em fases mais adiantadas, quando a larva não conseguia se manter na superfície da água, houve relaxamento total nos músculos acompanhado por dissociação das fibrilas (Figs. 26C e 26D). Na fase final da doença houve desintegração do sarcolema que envolvia as fibras e, em algumas partes, das próprias fibrilas.

As alterações observadas nos músculos das larvas de C. declarator confirmam a hipótese de que, a morte ocorreu devido a incapacitação dos mesmos para manter tais larvas na superfície da água, posição necessária à respiração do ar atmosférico . Isto é, a δ -endotoxina, após a absorção no epitélio intestinal, afetou o sistema nervoso e os músculos provocando assim, distúrbios suficientes para que a larva afundasse e morresse por asfixia .

4.2.1.2.3. Alterações nas fibras musculares :

Durante a fase inicial da infecção, as alterações nas fibras musculares eram praticamente invisíveis e a integridade foi observada tanto em cortes longitudinais de fibras (Fig. 26A) como em transversais (Fig. 26B). Entretanto, em fases mais adiantadas, quando a larva não conseguia se manter na superfície da água, houve relaxamento total nos músculos acompanhado por dissociação das fibrilas (Figs. 26C e 26D). Na fase final da doença houve desintegração do sarcolema que envolvia as fibras e, em algumas partes, das próprias fibrilas.

As alterações observadas nos músculos das larvas de C. declarator confirmam a hipótese de que, a morte ocorreu devido a incapacitação dos mesmos para manter tais larvas na superfície da água, posição necessária à respiração do ar atmosférico . Isto é, a δ -endotoxina, após a absorção no epitélio intestinal, afetou o sistema nervoso e os músculos provocando assim, distúrbios suficientes para que a larva afundasse e morresse por asfixia .

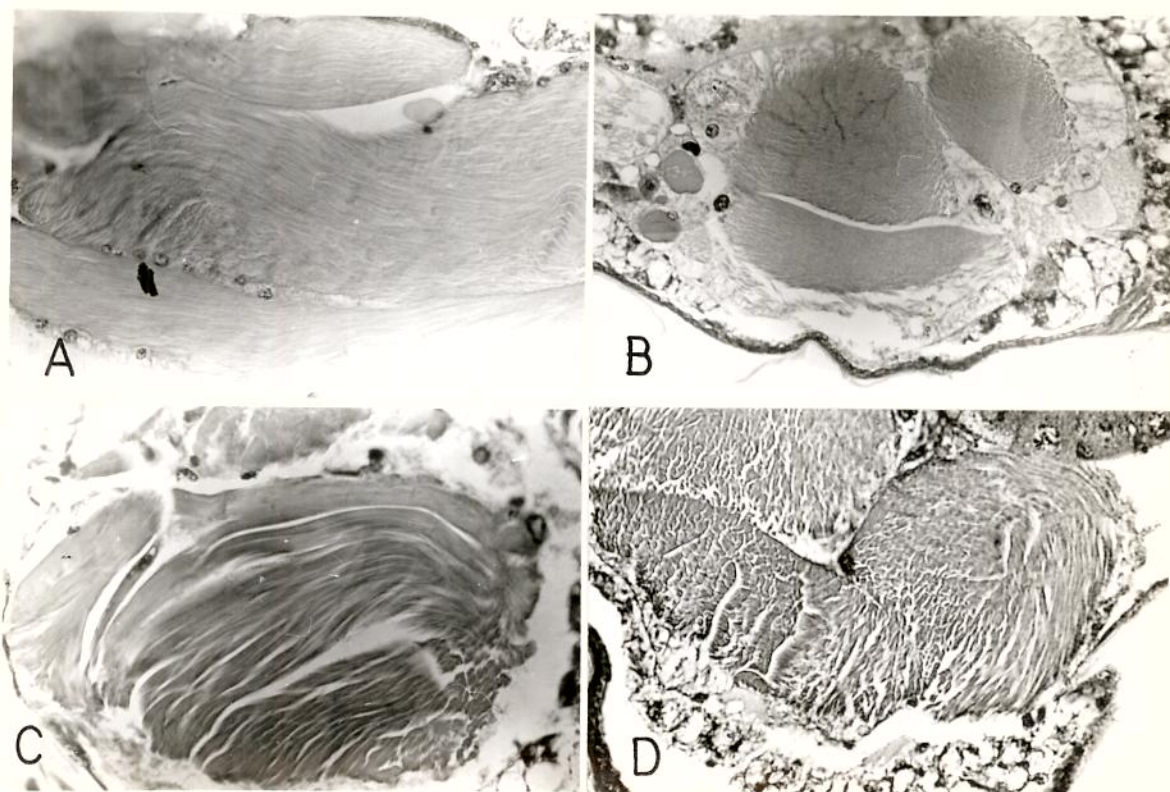


Figura 26: Alterações histológicas em fibras musculares de larvas de C. declarator infectadas com B. thuringiensis var. israelensis.

- A. Corte longitudinal no início da infecção.
- B. Corte transversal no início da infecção.
- C. Corte longitudinal em fase final da infecção.
- D. Corte transversal em fase final da infecção.

4.2.1.3. Susceptibilidade de larvas de Culex declarator :

Os trabalhos publicados, até o momento, sobre a susceptibilidade de larvas aquáticas de dípteros ao B. thuringiensis va. israelensis e ao B. spizizenicus, foram feitos à base de uma única avaliação, 24 horas ou mais após o tratamento, para cálculos de DLs₅₀ (Tyrell et al., 1979; Mulligan III et al., 1980; Ali, 1981; Ali et al., 1981 e outros). Tal critério não representa condições para revelar o tempo necessário para o desencadeamento da doença. No presente trabalho, portanto, foi utilizado o critério de tempo letal mediano (em minutos) para idades diferentes de larvas de C. declarator, utilizando 3 concentrações diferentes do produto ABG-6108-II. Essas concentrações são calculadas em termos de UI / litro de água.

A figura 27 ilustra as respostas de larvas à concentração de 5248 UI/ litro. Em termos de área aplicada, tal concentração era equivalente a 1 lb/ha. O fenômeno que chamou a atenção nesses estudos foi o fato das larvas do 4º estágio (último) revelarem-se mais susceptíveis do que as dos estádios iniciais. Esses dados seriam inesperadas para agentes de controle solúveis em água, ou se a morte estiver diretamente relacionada com a ação da δ -endotoxina. É lógico que, o tamanho das partículas presentes na água é um fator essencial para melhor aproveitamento do alimento, tanto para as larvas desse díptero como para outras aquáticas. Deste modo,

4.2.1.3. Susceptibilidade de larvas de Culex declarator :

Os trabalhos publicados, até o momento, sobre a susceptibilidade de larvas aquáticas de dípteros ao B. thuringiensis va. israelensis e ao B. sphaericus, foram feitos à base de uma única avaliação, 24 horas ou mais após o tratamento, para cálculos de DLs₅₀ (Tyrell et al., 1979; Mulligan III et al., 1980; Ali, 1981; Ali et al., 1981 e outros). Tal critério não representa condições para revelar o tempo necessário para o desencadeamento da doença. No presente trabalho, portanto, foi utilizado o critério de tempo letal mediano (em minutos) para idades diferentes de larvas de C. declarator, utilizando 3 concentrações diferentes do produto ABG-6108-II . Essas concentrações são calculadas em termos de UI / litro de água.

A figura 27 ilustra as respostas de larvas à concentração de 5248 UI/ litro. Em termos de área aplicada, tal concentração era equivalente a 1 lb/ha. O fenômeno que mais chamou a atenção nesses estudos foi o fato das larvas do 4º estágio (último) revelarem-se mais susceptíveis do que as dos estádios iniciais. Esses dados seriam inesperadas para agentes de controle solúveis em água, ou se a morte estiver diretamente relacionada com a ação da δ -endotoxina. É lógico que , o tamanho das partículas presentes na água é um fator essencial para melhor aproveitamento do alimento, tanto para as larvas desse díptero como para outras aquáticas. Deste modo ,

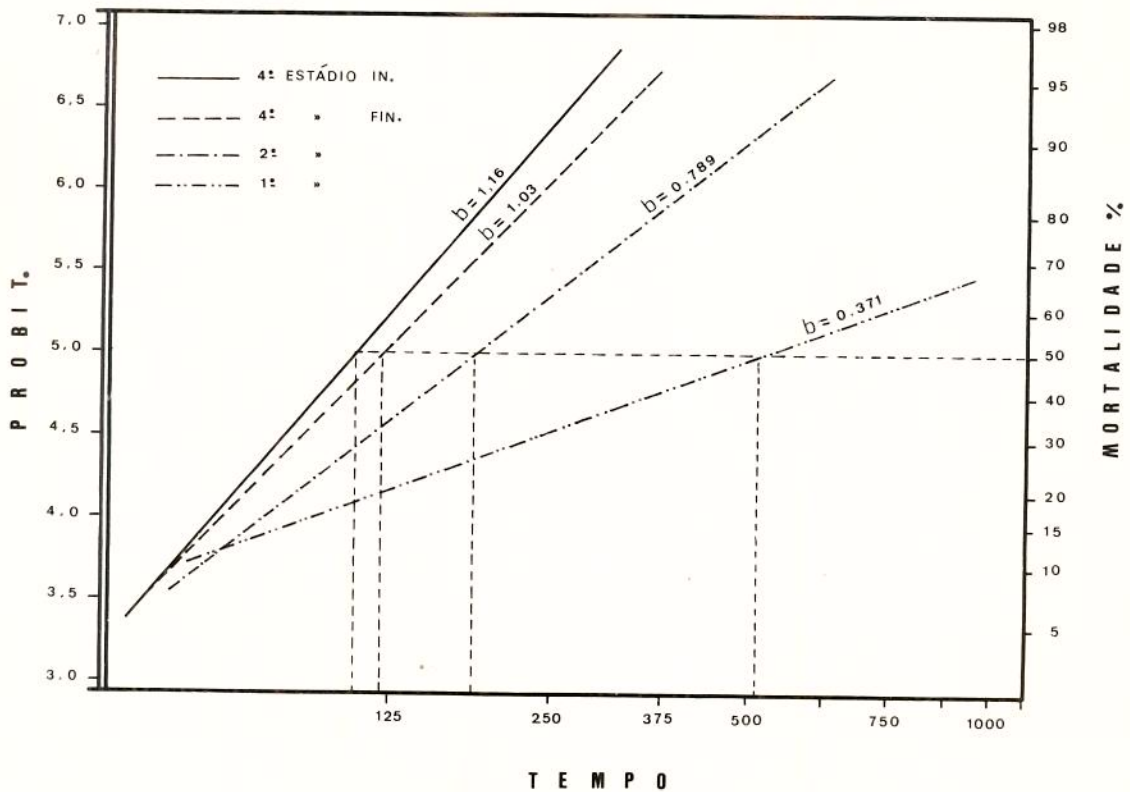


Figura 27: Comparação de tempos letais medianos, entre larvas de C. declarator de diferentes idades tratadas com concentração de 5248 UI/litro.

como o patógeno foi aplicado em forma de pó-molhável já industrializado com partículas de tamanhos variáveis, e não em forma de cristal puro, é de se esperar que as larvas grandes tenham facilidade maior de receber maiores quantidades do pató

geno do que as pequenas. A diferença de susceptibilidade entre larvas no início do 4º estágio e larvas no final do mesmo estágio apoia esta hipótese. No início desse estágio o TL_{50} foi de 76,59 minutos. Por outro lado, 123,96 minutos foi o TL_{50} para larvas no final desse último estágio, indicando menor susceptibilidade. Obviamente, a larva ingere quantidade maior de alimento no início do que no final do estágio. Gaugler & Molloy (1980) detectaram queda na susceptibilidade de larvas de Simulium vittatum quando a infecção foi feita após alimentação. Há mais uma possibilidade que poderia ser considerada junto ou independentemente dessa hipótese, para justificar a maior susceptibilidade observada nas larvas do último estágio. Esta possibilidade trata do peso da larva em relação a tensão superficial da água. Pois, as larvas maiores afundavam mais facilmente do que as menores, sofrendo assim a asfixia e a morte mais rapidamente (76,59 a 123,96 minutos). Por outro lado, as larvas do 1º estágio tiveram um TL_{50} de 561,37 minutos e as do 2º estágio tiveram um TL_{50} de 167,57 minutos (detalhes na Tabela 8).

As figuras 28 e 29 mostram as respostas de larvas de C. declarator às concentrações de 3936 e 2624 UI / litro, respectivamente. Em termos de quantidade de produto comercial por área, a 1a. concentração era equivalente a 0,75 lb/ha e a 2a. a 0,50 lb/ha.

Nas 3 concentrações usadas no presente trabalho, as larvas de todas as idades, com a exceção do 1º estágio, tive

Tabela 8: Tempos letais medianos, em minutos, com intervalos de confiança para idades diferentes de larvas de C. declarator tratadas com 3 concentrações de B. thuringiensis var. israelensis.

Fase	5248 UI / litro		3936 UI / litro		2624 UI / litro	
	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo
4º Estádio In.	76,59	70,33- 83,42	92,28	85,05-100,11	145,63	131,39-161,41
4º Estádio Fin.	123,96	116,56-131,83	195,06	179,11-212,43	244,63	221,33-270,30
2º Estádio	167,57	152,39-184,23	367,24	326,24-414,01	537,53	468,27-617,03
1º Estádio	561,37	550,97-571,97	625,42	550,35-710,67	601,82	540,68-669,85

ram TL_{50} diretamente relacionados com a concentração; ou seja, tempo letal mediano menor para a concentração maior. A exceção das larvas do 1º estágio, as quais não revelaram diferença significativa entre os TL_{50} das diferentes concentrações, confirma a hipótese de que a causa direta da morte das larvas seria a asfixia provocada pela ação da δ -endotoxina nos

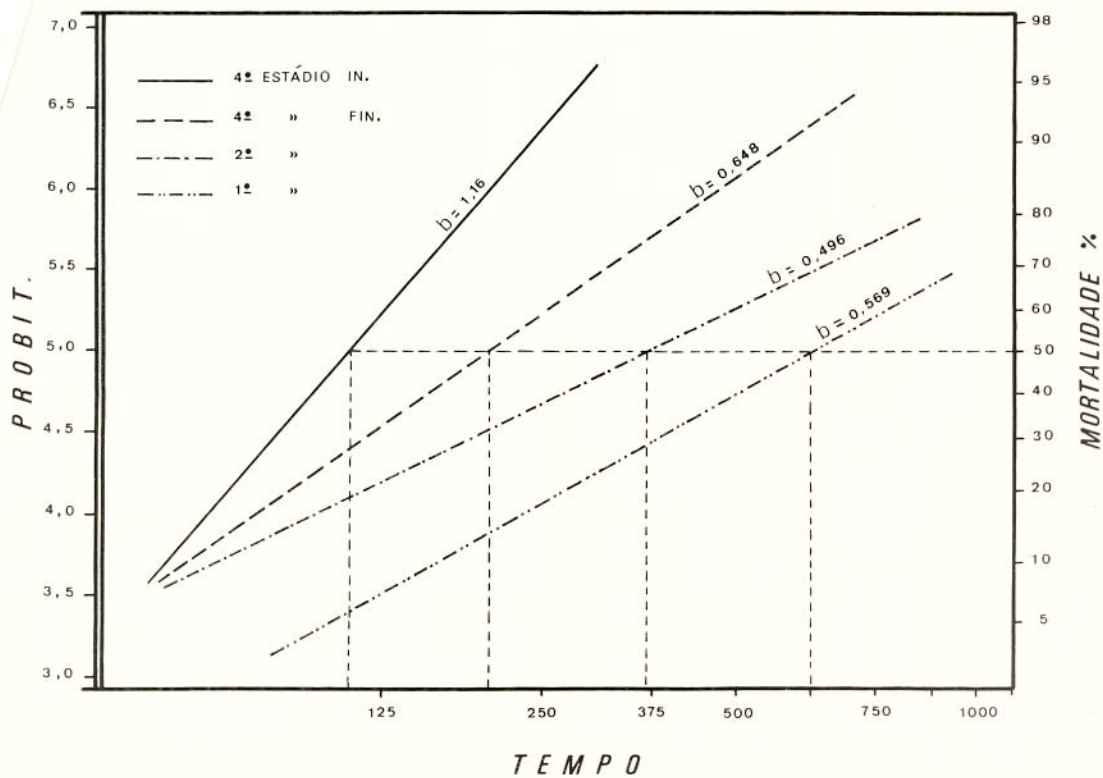


Figura 28: Comparação de tempos letais, em minutos, entre larvas de *C. declarator* de diferentes idades tratadas com concentração de 3936 UI / litro.

sistemas nervoso e muscular. Essas pequenas larvas sempre permaneciam na superfície da água pela força da tensão superficial, conseguindo respirar normalmente e permitindo o desencadeamento da bacteriose que finalmente causou a morte da larva após aproximadamente 10 horas (detalhes na Tabela 8).

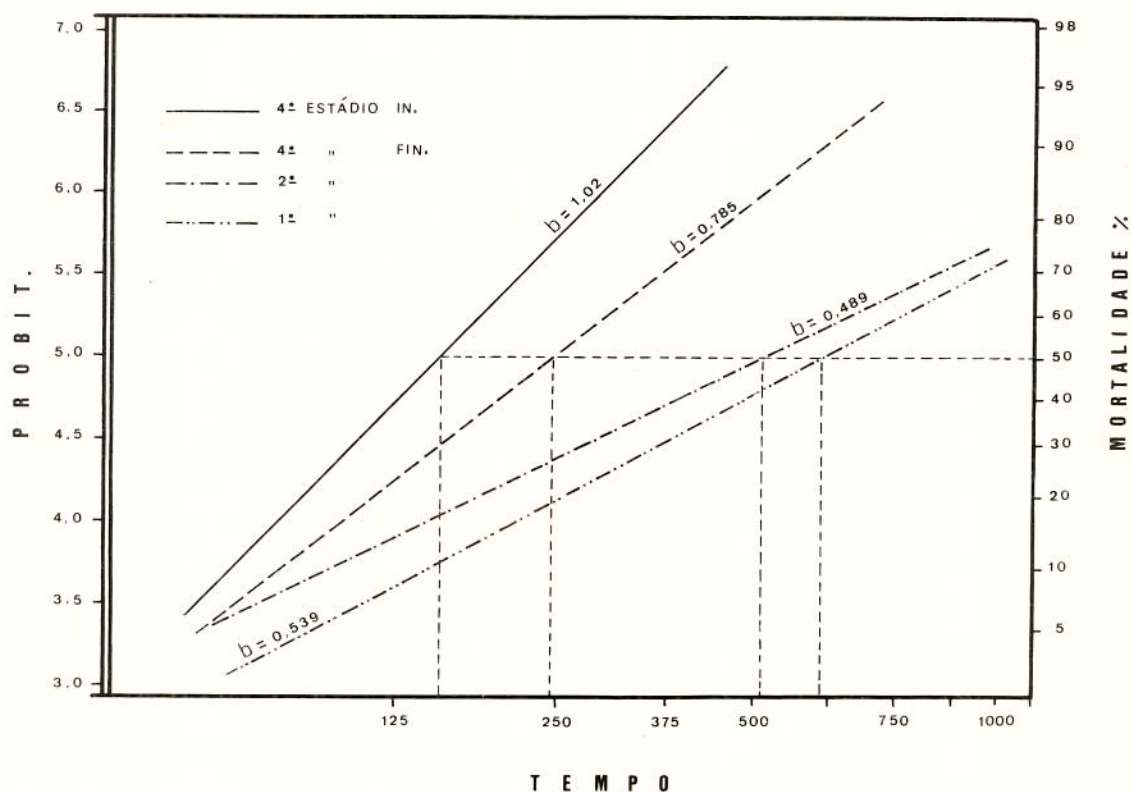


Figura 29: Comparações entre tempos letais, em minutos, em larvas de *C. declarator* de diferentes idades tratadas com concentração de 2624 UI/litro.

Esses dados indicam que aplicações de 1 lb / ha do produto ABG-6108-II seriam suficientes para obter resultados satisfatórios no controle de larvas de C. declarator em criadouros naturais.

Em termos de critérios de padronização, os dados do presente trabalho indicam que a exigência de de Barjac & Larget (1979) de usar larvas do 4º estágio, embora de Aedes aegypti, nos bioensaios não seria suficiente e deveriam estabelecer uma determinada fase deste estágio, desde que as larvas tem demonstrado níveis diferentes de susceptibilidade dentro do mesmo estágio. A aplicação de critérios de tempo letal mediano seria altamente adequada, para evitar erros, em comparações de susceptibilidade e virulência.

4.2.1.4. Virulência de dois produtos à base de H-14 :

No presente trabalho, foi feito um estudo comparativo para avaliar a virulência de dois produtos à base de B. thuringiensis var. israelensis (sorotipo H-14), utilizando larvas de C. declarator como inseto teste.

Ambos produtos foram padronizados pela indústria contra larvas de A. aegypti. Porém, o Bactimos contém 6.000 UI/mg; enquanto que o ABG-6108-II contém apenas 2,000 UI/mg.

Utilizando o tempo letal mediano como parâmetro na comparação, o Bactimos com a concentração de 0,328 mg / litro

(equivalente a 1 lb/ha) resultou em TL_{50} de 50,07 minutos com intervalo de confiança de 47,19 a 53,10, contra larvas de C. declarator. As larvas utilizadas nestes testes estavam próximas à fase final do último estágio. O produto ABG-6108-II, com a mesma concentração de 0,328 mg/litro resultou em TL_{50} de 112,29 minutos com intervalo de confiança de 104,98 a 120,11 minutos.

De acordo com os dados dos fabricantes, utilizando larvas de A. aegypti como inseto teste, o Bactimos teria virulência 3 vezes maior do que o ABG-6108-II (6.000 / 2.000). Porém, com os bioensaios do presente trabalho, utilizando larvas de C. declarator, o Bactimos teria virulência (112,29 / 50,07) apenas 2,2426 vezes maior do que o ABG-6108-II, indicando que da no seu potencial contra as larvas dessa espécie.

Esses dados indicam a alta importância de incluir o nome do inseto teste utilizado juntamente com todas as informações necessárias para facilitar a comparação e a escolha do produto mais adequado para o controle da cada espécie alvo.

4.2.2. PATOGENICIDADE PARA LARVAS DE SIMULÍDEOS

A eficiência da variedade israelensis foi avaliada , durante o presente trabalho, em larvas de duas espécies de Simulídeos. Simulium goeldii ocorre, unicamente, na bacia amazônica; enquanto que S. rorotaense ocorre tanto na bacia amazônica como na bacia do Rio Orenoco (Py-Daniel, comunicação pessoal). O produto ABG-6108-II foi usado nos bioensaios.

4.2.2.1. Sintomatologia externa :

A velocidade do aparecimento dos diferentes sintomas variou de acordo com a concentração usada e o nível de susceptibilidade da espécie. As larvas de S. goeldii mostraram-se mais susceptíveis do que as de S. rorotaense .

Alguns minutos após a infecção, as larvas demonstraram movimentos perturbados e desorganização dos dois leques cefálicos, invés de movimentos alternativos regulares como era observado na testemunha. Aparecimento de bolha de ar na frente da cavidade bucal ocorreu com alta frequência nos tratamentos, mas nunca na testemunha. Observou-se também redução na agilidade da larva e nos movimentos cefálicos, indicando redução na alimentação. Início de convulsões foi detectado a partir de 20 minutos após o tratamento, aumentando o seu ritmo e intensidade gradualmente. Nas fases finais pré-mortais, os leques cefálicos apareciam sempre fechados e sem qualquer movimento, indi

cando parada alimentar. Redução na intensidade das convulsões e perda da capacidade de se fixar na parede do recipiente pelo pseudópodo, também foram observadas. Logo antes da morte a larva perdia totalmente esta capacidade e ficava presa apenas pela extremidade posterior do corpo ou pelos fios de seda. Finalmente a larva não repondia mais aos toques e morria.

A morte rápida que ocorreu (a partir de 40 minutos) nas larvas das duas espécies de simulídeos, indica a alta susceptibilidade das mesmas ao patógeno, mais precisamente à δ -endotoxina. Visto que 40 minutos seriam apenas suficientes para a dissolução do cristal e a absorção da toxina e não a multiplicação da bactéria ou a ocorrência de septicemia. Isto indica a alta possibilidade de que o pH intestinal dessas larvas seja altamente alcalino para permitir a dissolução rápida do cristal e a ocorrência de toxemia. Lacey & Federici (1979) mencionaram que o pH intestinal em larvas de S. vittatum varia de 9,6 a 11,4, ou seja, altamente alcalino.

4.2.2.2. Susceptibilidade :

Os estudos realizados com as larvas de Diptera, confirmam a adequação do uso do critério de tempo letal mediano para as avaliações de susceptibilidade. Tal critério favorece a utilização de uma única concentração com um número grande de indivíduos, diminuindo assim as dificuldades que ocorrem

normalmente com os critérios de DL_{50} . Estes últimos critérios, exigem números bem maiores de indivíduos para o teste, o que funcionaria apenas para criações homogêneas com a mínima variabilidade genética e não para espécies coletadas no campo ou criadas durante poucas gerações no laboratório.

Os dados aqui apresentados foram calculados apenas a partir das fórmulas de Thompson (1947) adaptadas para TL_{50} . As larvas de S. goeldii, no final do estágio larval (7º a 8º estádios) mostraram-se altamente susceptíveis à variedade israelensis (sorotipo H-14). Pois, enquanto não ocorreu nenhuma mortalidade na testemunha, o TL_{50} foi de 125,62 minutos, com intervalo de confiança de 119,29 a 132,28. A concentração usada neste caso foi de 1,31138 mg/litro (do produto ABG-6108-II), o dobro da maior concentração usada com larvas de C. declarator.

Por outro lado, os últimos estádios larvais de S. rorotaense mostraram-se menos susceptíveis ao mesmo produto. Com a concentração de 2,62276 mg/litro, o TL_{50} foi de 144,98; e com 5,24552 mg/litro, o TL_{50} foi de 127,86 minutos (detalhes na Tabela 9).

Desde que não houve diferença significativa entre o TL_{50} no tratamento com S. goeldii e o TL_{50} da concentração mais alta no tratamento com S. rorotaense, a relação entre a susceptibilidade dessas duas espécies seria, então, a mesma das duas concentrações usadas; ou seja, $5,24552 / 1,31138 = 4$. Isto é, as larvas de S. goeldii seriam 4 vezes mais susceptíveis do que as de S. rorotaense.

Tabela 9: Tempos letais medianos, em minutos, com intervalos de confiança para larvas de duas espécies de simulídeos tratadas com diferentes concentrações de B. thuringiensis var. israelensis.

	1,31138 mg / l		2,62276 mg / l		5,24552 mg / l	
Espécie	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo	TL ₅₀	Intervalo
<u>S. goeldii</u>	125,62	119,29-132,28				
<u>S. rorotaense</u>			144,98	141,37-148,69	127,86	124,43-131,38

Os dados do presente trabalho, indicam a alta possibilidade de uso dessa variedade para o controle de simulídeos neotropicais. Porém, serão necessários estudos de campo para determinar as dosagens adequadas do patógeno; visto que as larvas de simulídeos, na sua maioria, vivem em correntezas de água e não em água parada.

5. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas através dos dados do presente trabalho, podem ser resumidas nos seguintes itens :

1. As larvas de Alabama argillacea e de Plodia interpunctella são susceptíveis ao Bacillus thuringiensis var. kurstaki e podem ser controladas facilmente no campo com produtos à base desse bacilo. As larvas de Brassolis sophorae são mais susceptíveis do que as de A. argillacea . Por outro lado , as larvas de Spodoptera latifascia são resistentes e o seu controle no campo, com produtos à base dessa bactéria, seria anti-econômico. Em áreas urbanas, jardins e residências, produtos comerciais dessa variedade do bacilo podem ser recomendados para o controle de larvas de B. sophorae, substituindo assim defensivos químicos que possam representar aspectos desvantajosos para tais locais.

2. A susceptibilidade de larvas, até da mesma espécie, varia de acordo com vários fatores, inclusive a origem geográfica do patógeno, o hospedeiro do qual este foi isolado, e o processamento da produção comercial até do mesmo sorotipo da bactéria. Para facilitar e possibilitar as comparações entre resultados de trabalhos sobre susceptibilidade de insetos e virulência de patógenos, é necessário padronizar os critérios de bioensaios, expressar os dados em termos de Unida

des Internacionais de virulência, determinar a idade do inseto e o seu peso médio e aplicar cálculos matemáticos precisos e definidos para a determinação de DL_{50} , TL_{50} ou CL_{50} . Para estudos de susceptibilidade e virulência o critério de TL_{50} pode ser recomendado para populações de grande variabilidade genética. Os critérios de DL_{50} ou CL_{50} podem ser sugeridos para populações de pequena variabilidade genética.

3. A δ -endotoxina têm ação fatal lenta nas larvas de Lepidoptera, causando a morte 2 a 3 dias após a infecção. Em termos de controle no campo, é importante informar os técnicos e agricultores que a morte é lenta. Porém, o inseto para de se alimentar algumas horas após a aplicação e não representa mais ameaça para a plantação.

4. Nenhuma espécie dos lepidópteros estudados no presente trabalho representa o tipo I da classificação de Heimpel & Angus (1959), pois as larvas não sofrem paralisia geral nem aumento no pH da hemolinfa devido a infecção. A. argillacea e B. sophorae se enquadram no tipo II da mesma classificação. S. latifascia, embora resistente, representaria, também, o tipo II e não o tipo III nem o IV, desde que as larvas sofrem paralisia intestinal e os sorotipos usados não contêm β -exotoxina.

5. As larvas de Lepidoptera, após a morte causada pela ação do bacilo, adquirem a coloração preta resultando em cadáveres carbonizados secos. Com esse sintoma, as avaliações no campo se tornam fáciéis, após aplicações de produtos à base dessa bactéria, com a causa da morte confirmada. Tal sintoma é dife-

rente da flacidez e liqueficação causadas por vírus ou mumificação causada por fungos.

6. As alterações histológicas mais drásticas provocadas pelo bacilo em larvas de Lepidoptera ocorrem a nível de intestino médio, sistema nervoso e musculatura. As alterações iniciais podem ser detectadas a partir de 4 horas após a infecção.

7. A δ -endotoxina tem um efeito rápido e drástico nas larvas aquáticas de Culicidae e Simuliidae, causando a morte em poucas horas após a infecção por B. thuringiensis var. israelensis.

8. A morte nas larvas de Culex declarator ocorre devido a ação da δ -endotoxina no sistema nervoso e na musculatura, incapacitando a larva a permanecer na superfície da água para a respiração. Assim, a larva afunda e morre por asfixia. A morte rápida das larvas aquáticas de Díptera indica que o inseto sofre apenas toxemia e não chega a sofrer septicemia. Além disso, o pH intestinal dessas larvas deve ser altamente alcalino para que possa dissolver o cristal, liberando assim a δ -endotoxina responsável pela toxemia.

9. A susceptibilidade de larvas aquáticas de Diptera ao B. thuringiensis var. israelensis varia de acordo com o produto, a espécie de inseto e a idade das larvas.

10. Os insetos no início de um estágio larval são mais susceptíveis do que no final do mesmo. Para finalidades de padronização industrial é necessário estabelecer uma fase do 4º estágio larval de Aedes aegypti desde que a morte é mais rápida no

início deste estágio e ocorre poucas horas após a infecção.

11. As larvas de C. declarator são mais susceptíveis do que as de Simulium goeldii. As larvas de Simulium rorotaense, por outro lado, são as menos susceptíveis entre os dípteros estudados no presente trabalho.

12. Aplicações de produtos à base de B. thuringiensis var. israelensis podem ser recomendadas para o controle de larvas de culicídeos e simulídeos nos seus criadouros naturais. Entretanto, estudos de caráter aplicado são necessários para estabelecer melhores critérios, condições e formulações de produtos à base dessa variedade.

13. Estudos de laboratório são necessários para verificar a possibilidade ou não de combater uma determinada espécie de insetos com produtos biológicos no campo.

6. RESUMO

A patogenicidade de duas variedades de Bacillus thuringiensis Berliner foi investigada em larvas de Lepidoptera e Diptera. Através do enfoque patológico no estudo, tentou-se esclarecer alguns aspectos importantes nas áreas de pesquisa, industrialização de patógenos e aplicação de produtos à base de B. thuringiensis no campo.

Os sintomas externos pré-mortais foram descritos em larvas de Lepidoptera infectadas por B. thuringiensis var. kurstaki e em larvas de Diptera infectadas por B. thuringiensis var. israelensis. Algumas alterações histológicas foram detectadas em alguns tecidos de tais larvas, principalmente, no intestino médio, sistema nervoso e musculatura. As alterações observadas nesses tecidos foram relacionadas com o desencadeamento dos sintomas externos da bacteriose.

A variedade kurstaki teve ação fatal lenta (2 a 3 dias) nas larvas de Lepidoptera, quando comparada com a ação da variedade israelensis nas larvas aquáticas de Diptera, onde a morte ocorre em poucas horas após a infecção.

Nenhum dos lepidópteros estudados pertence o tipo I da classificação de Heimpel & Angus (1959); pois não ocorreu paralisia geral ou aumento no pH da hemolinfa nas larvas doentes. Entre as larvas dessas espécies, as de Brassolis sophorae revelaram-se mais susceptíveis em relação às

demais. Por outro lado, as larvas de Spodoptera latifascia eram as mais resistentes à mesma variedade kurstaki (sorotipo H-3a:3b).

A origem do patógeno, o hospedeiro do qual este foi isolado e o processamento da produção comercial, além da variedade do bacilo e da espécie do inseto infectado, eram fatores responsáveis pela variação nas respostas das larvas infectadas.

A expressão da quantidade do patógeno em termos de Unidades Internacionais de virulência / unidade de peso do inseto tratado revelou-se altamente precisa para comparações de susceptibilidade de insetos e virulência de produtos. O uso de critérios de DL_{50} e CL_{50} mostrou-se muito adequado, e até pode ser recomendado, para estudos com populações de insetos geneticamente menos variáveis. A resposta dos indivíduos, no caso, seria diretamente relacionada com e em função da dose ou a concentração aplicada. O uso de TL_{50} , por outro lado, revelou-se mais funcional e, também, pode ser recomendado para investigações com populações de maior variabilidade genética.

Os níveis de susceptibilidade revelados para cada uma das espécies estudadas, indicaram a alta possibilidade de obter resultados satisfatórios no campo, quando produtos comerciais à base da variedade kurstaki forem aplicados contra larvas de B. sophorae, Alabama argillacea e Plodia interpunctella em jardins e áreas urbanas, lavoura e armazens respectivamente.

A morte iniciou-se, nas larvas aquáticas dos dípteros estudados, apenas poucas horas após a infecção pela variedade israelensis. As larvas de Culex declarator (Culicidae) mostraram-se mais susceptíveis a essa variedade do que as larvas de simulídeos, quando infectadas com este patógeno. Entre as duas espécies de simulídeos, as larvas de Simulium goeldii eram 4 vezes mais susceptíveis do que as de S. rorotaense.

As larvas do último estágio de C. declarator revelaram-se mais susceptíveis ao patógeno do que as dos estádios iniciais. No mesmo tempo, as larvas no início do último estágio (4º) eram mais susceptíveis do que no final do mesmo estágio. Este último aspecto, juntamente com a morte rápida causada pelo patógeno (2 a 3 horas), devem ser considerados nas recomendações de alguns órgãos oficiais no exterior. Tais órgãos, exigem que o 4º estágio larval de Aedes aegypti seja usado nos bioensaios de padronização de produtos à base da variedade israelensis ; porém, sem estabelecer uma fase desse estágio.

A especificidade e a alta virulência da variedade israelensis para larvas aquáticas de Diptera, revelam o seu grande valor como agente promissor no controle microbiano de larvas de Culicidae e Simuliidae.

Os sintomas externos observados nas larvas de C. declarator , as alterações histológicas e a morte rápida foram suficientemente convenientes para mostrar a ação da δ -endo toxina produzida pelo patógeno. Tal toxina deve ter afetado

drasticamente o sistema nervoso e a musculatura da larva, dificultando assim a manutenção desta na superfície da água e conseqüentemente a sua respiração do ar atmosférico. Assim, a larva afundada morreu por asfixia.

Esses estudos revelaram a presença de um novo campo para investigações de patologia de insetos e controle microbiano para os dípteros aquáticos neotropicais e subtropicais. Tais investigações terão o seu alto valor do ponto de vista humano, desde que várias dessas espécies tem a sua importância como insetos vetores de doenças humanas.

7. SUMMARY

The pathogenicity of two varieties of Bacillus thuringiensis Berliner was investigated using some lepidopterous and dipterous larvae. The aim of the present study was to clarify certain aspects related to the application of insect pathology, such as susceptibility and virulence evaluations, standardization criteria, and field applications of microbial products to the control of some harmful insects.

The sequence of external symptoms was described in lepidopterous larvae infected with the B. thuringiensis var. kurstaki (syrotype K-3a:3b) and in dipterous larvae infected with the variety israelensis (syrotype H-14). The histological alterations, in these infected larvae, were described, principally those in the mid-gut, nervous system, and musculature. These alterations were found to be directly associated with the different external symptoms of the disease.

The progress of the disease up to the death in the lepidopterous larvae lasted longer time (2 - 3 days) than in dipterous ones (2 - 3 hours).

Type I of Heimpel & Angus (1959) classification did not occur among the lepidopterous species studied, since neither general paralysis nor pH alterations in the hemolymph were detected.

Brassolis sophorae larvae were found to be the most susceptible to syrotype H-3a:3b, when compared with the other lepidopterous species. On the other hand, Spodoptera latifascia larvae were the most resistant.

Origin, natural host, and mass production criteria of the pathogen, in addition to its variety and the tested insect species, were the most important factors responsible for the variation in responses of the infected larvae. Therefore, these aspects should be considered to choice the more adequate product for each insect species to be combatted.

The quantity of the pathogen expressed in International Units of toxicity per unit of body weight, showed to be highly precise for the comparison of insect susceptibility and pathogen virulence. The LD_{50} and LC_{50} criteria were found to be suitable and, therefore, can be recommended for investigations where the populations of insects are of low genetic variability. On the other hand, for genetically variable populations, the LT_{50} was found to be more adequate.

B. sophorae, Alabama argillacea and Plodia interpunctella were found to be highly susceptible to the syrotype H-3a:3b. Therefore, this pathogen can be recommended for their control.

The aquatic dipteran larvae, studied in the present work, died some hours after infection with syrotype H-14. Culex declarator (Culicidae) larvae were more susceptible than those

of the simuliid species. Within Simuliidae, Simulium goeldii larvae were 4 times more susceptible than the S. rorotaense ones.

The last instar (4th.) larvae of C. declarator were more susceptible than those of the first instars. Moreover, within the same instar, these larvae showed different levels of susceptibility. In the initial phase of the last instar they were more susceptible than in the final phase. These informations, in addition to the rapid fatal action of the toxin in dipteran aquatic larvae, should be considered by the governmental agencies, in establishing standardization criteria for future commercial products based on this variety. At the present, these agencies establish the 4th instar larvae of Aedes aegypti as a test insect for standardization bioassays, ignoring the difference in susceptibility within the same instar.

Because of the high specificity and virulence of B. thuringiensis var. israelensis for dipteran aquatic larvae, it can be considered as a promising agent for microbial control of mosquitos and black flies larvae.

Considering the mode of action of syrotype H-14 in mosquito larvae, the results led us to beleive that the δ -endotoxin liberated in the high alkaline mid-gut affected the ventral nervous system and consequently the musculature, provoking disfunction of the latter. The effect on the muscles

made the larva lose its capacity to maintain itself at the water surface. Consequently, the larva submerged and died by asphixiation. The observed sequence of the external symptoms, as well as the histological alterations sustained this hypothesis.

The results obtained in the present study reveal the possibility to utilize the syrotype H-14 in the control of vectors of some human diseases, such as malaria and filaria. This application, however, requires additional extensive research work to complete urgently needed informations.

8. LITERATURA CITADA

- Afify, A.M.; Altahtawy, M.M.; El-Sawaf, S.; Habib, M.E.M. & Hammad, S.M., 1970a
Histopathological effects of Biotrol BTB Process 183, on the third instar larvae of Anagasta kühniella Zeller.
Z. ang. Entomol., 65 : 38 - 48.
- Afify, A.M.; El-Sawaf, S.; Hammad, S.M. & Habib, M.E.M., 1970b
Increase of tolerance to bacterial insecticides with larval development of Anagasta kühniella Z., in relation to its microbial control.
Z. ang. Entomol., 65: 14 - 19.
- Afify, A.M. & Merdan, A.I., 1969
On tracing the response of some Egyptian cotton worms in different larval ages to Bacillus thuringiensis Berliner.
Z. ang. Entomol., 63: 263 - 267.
- AIBS - American Institute of Biological Sciences. 1975
Fungal biocontrols workshop, 22-25 June 1975, Fayetteville, Arkansas. AIBS Report to criteria and evaluation Division, Office of Pesticides Projects, Environmental Protection Agency, Contract 68-01-2457. AIBS, Arlington, VA, 43 pp.
- Aizawa, K.; Takasu, T. & Kurata, K. 1961
Isolation of Bacillus thuringiensis from the dust of silk-worm rearing houses of farmers.
J. Sericult. Sci. Japan, 30: 451 - 455.
- Ali, A. 1981
Bacillus thuringiensis serovar. israelensis (ABG-6108) against chironomids and some nontarget aquatic invertebrates.
J. Invertebr. Pathol., 38: 264 - 272.
- Ali, A.; Baggs, R.D. & Stewart, J.P. 1981
Susceptibility of some Florida chironomids and mosquitos to various formulations of Bacillus thuringiensis serovar. israelensis .
J. Econ. Entomol., 74: 672 - 677.

- Altahtawy, M.M. & Abaless, I.M. 1972
Compatibility of the bio-insecticide Thuricide 90TS flow-
able with insecticides used in the chemical control of
Spodoptera littoralis (Boisd.).
Bull. Entomol. Soc. Egypt, 6: 239 - 245.
- Alves, S.B.; Melo, L.A. & Pereira, R.M. 1981
Controle da broca da cana, Diatraea saccharalis (Fabr.,
1794)(Lep., Pyralidae), com Bacillus thuringiensis Ber-
liner, na forma de isca.
Ecosistema, 6: 105 - 112.
- Amaral, M.E.C. 1982
Controle biológico natural e aplicado de Anticarsia
gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae) em
campos de soja.
Tese de Mestrado, UNICAMP, 198 pp.
- Amaral, M.E.C. & Habib, M.E.M. 1981
Controle microbiano de Anticarsia gemmatalis, lagarta
da soja, por aplicações aéreas de Bacillus thuringiensis.
VII Cong. Bras. Entomol., Fortaleza, CA.
- Andrade C.F. 1981
Estudos ecológicos e patológicos da poliedrose nuclear de
Alabama argillacea (Hübner, 1818)(Lepidoptera, Noctuidae).
Tese de Mestrado, UNICAMP, 153 pp.
- Angus, T.A. 1956a
Association of toxicity with protein-crystalline inclusions
of Bacillus sotto Ishiwata.
Can. J. Microbiol., 2: 122 - 131.
- Angus, T.A. 1956b
Extraction, purification and properties of Bacillus sotto
toxin.
Can. J. Microbiol., 2: 416 - 426.
- Angus, T.A. 1965
Symposium on microbial insecticides.
1. Bacterial pathogens of insects as microbial insecticides.
Bacteriol. Rev., 29: 364 - 372.

- Angus, T.A. 1967
Comparative toxicity of the parasporal inclusions of three entomogenous bacteria.
J. Invertebr. Pathol., 9: 256 - 260.
- Angus, T.A. 1968
The use of Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide.
World. Rev. Pest Control, 7: 11 - 26.
- Angus, T.A. 1971
Bacillus thuringiensis as a microbial insecticide. em "Naturally Occurring Insecticides" (M. Jacobson & D.G. Crosby, eds.), pp. 463 - 497. M. Dekker, New York.
- Angus, T.A. & Heimpel, A.M. 1959
Inhibition of feeding and blood pH changes in lepidopterous larvae infected with crystal-forming bacteria.
Can. Ent. Ontario, 91: 352 - 258.
- Angus, T.A. & Heimpel, A.M. 1960
The bacteriological control of insects.
Proc. Entomol. Soc. Ontario, 90 : 13 - 21.
- Angus, T.A. & Norris, J.R. 1968
A comparison of the toxicity of some varieties of Bacillus thuringiensis Berliner for silkworm larvae.
J. Invertebr. Pathol., 11: 289 - 295.
- Back, E.A. & Cotton, R.T. 1922
Stored-grain pests.
U.S. Dep. Agric., Farm. Bull., 1260: 47 p
- Bailey, L. 1971
The safety of pest-insect pathogens for beneficial insects. em "Microbial Control of Insects and Mites" (Burgess, H.D. & Hussey, N.M. eds.) London & New York, Academic Press, pp . 491 - 505.
- Baker, K.F. & Cook, R.J. 1974
Biological Control of plant pathogens.
Freeman & Company , San Francisco. 433 pp.

- Barker, R.J. & Anderson, W.F. 1975
Evaluation of δ -exotoxin of Bacillus thuringiensis Berliner for control of flies in chicken manure.
J. med. Entomol., 12: 103 - 110.
- Bassand, D. & Carpy, S. 1977
Absence of β -exotoxin in Thuricide preparations. A reply to C.B.S.R. Sharma et al.
Experientia, 33: 1545.
- Bassand, D.; Carpy, S. & Matter, B.E. 1977
Letter to the editor.
Mutation Research, 46: 385 - 386.
- Beegle, C.C.; Lewis, L.C.; Lynch, R.E. & Martinez, A.J. 1981
Interaction of larval age and antibiotic on the susceptibility of three insect species to Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 37: 143 - 153.
- Benz, G. 1971
Synergism of microorganisms and chemical insecticides. em "Microbial Control of Insects and Mites"(H.D.Burges & N.W. Hussey, eds), Academic Press, pp. 327 - 355.
- Benz, G. & Altwegg, A. 1975
Safety of Bacillus thuringiensis for earthworms.
J. Invertebr. Pathol., 26: 125 - 126.
- Berliner, E. 1911
Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe.
Z. ges. Getreidewesen, 3: 63 - 70.
- Berliner, E. 1915
Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (Ephestia kühniella Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis, n.sp.
Z. ang. Entomol., 2: 29 - 56.
- Berti F^o, E. & Gallo, D. 1977
O uso de Bacillus thuringiensis Berliner no controle da lagarta das palmeiras Brassolis astyra astyra Godart, 1765 (Lepidoptera, Brassolidae).
Anais da SEB, 6: 85 - 91.

- Bond, R.P.M.; Boyce, C.B.C.; Rogoff, M.H. & Shieh, T.R. 1971
Em "Microbial Control of Insects and Mites" (H.D.Burges & N.W.Hussey, eds.), pp. 275 - 303. Academic Press, London & New York.
- Bonnefoi, A. & de Barjac, H. 1963
Classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis par la détermination de l'antigène flagellaire.
Entomophaga, 8: 223 - 229.
- Bonnefoi, A.; Burgerjon, A. & Grison, P. 1958
Titrage biologique des préparations de spores de Bacillus thuringiensis Berliner.
Comp. Rend., 247: 1418 - 1420
- Briggs, J.D. 1960
Reduction of adult house fly emergence by the effect of Bacillus spp. on the development of immature forms.
J. Insect Pathol., 2: 418 - 432.
- Briggs, J.D. 1963
Commercial production of insect pathogens. Em "Insect Pathology; an Advanced Treatise" (Steinhaus, E.A., eds.), pp. 519 - 548. Vol.II, Academic Press, London & New York.
- Broersma, D.B. & Buxton, J.A. 1967
A comparative study of the action of six crystalliferous bacteria on the cabbage looper, Trichoplusia ni.
J. Invertebr. Pathol., 9: 58 - 69.
- Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. 1974
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
8th ed. Baltimore, Md; Williams & Wilkins. 1268 pp.
- Burgerjon, A. 1959
Titrage et définition d'unité biologique pour les préparations de Bacillus thuringiensis Berliner.
Entomophaga, 4: 201 - 206.
- Burgerjon, A. 1962
Relation entre l'intoxication provoquée par Bacillus thuringiensis Berliner et la consommation chez Pieris brassicae L.
Ann. Epiph., 13: 59 - 72.

- Burgerjon, A. 1964
 Les méthodes de titrage et la standardisation des préparations de Bacillus thuringiensis Berliner.
Entomophaga, Mém., 2: 255 - 262.
- Burgerjon, A. 1965
 Le titrage biologique des cristaux de Bacillus thuringiensis Berliner par réduction de consommation au laboratoire de la minière.
Entomophaga, 10: 21 - 26.
- Burgerjon, A. 1971
 Effects physiologiques et mutagènes sur les insectes de la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis Berliner.
Ann. Parasit. Paris, 48: 835 - 844.
- Burgerjon, A. & Biache, G. 1966
 Effects tétralogiques chez les nymphes et les adultes d'insectes dont les larves ont ingéré des doses subléthales de toxine thermostable de Bacillus thuringiensis Berliner.
Entomophaga, 11, 279 - 284.
- Burgerjon, A. & Biache, G. 1967
 Contribution a l'etude du spectre d'activite de differentes souches de Bacillus thuringiensis Berliner.
Ent. exp. appl., 10: 211 - 214.
- Burgerjon, A. & de Barjac, H. 1960
 Nouvelles données sur le rôle de la toxine soluble thermostable produite par Bacillus thuringiensis Berliner.
Compt. Rend. Acad. Sci., 251: 911 - 912.
- Burgerjon, A. & Dulmage, H. 1977
 Industrial and international standardization of microbial pesticides. I. Bacillus thuringiensis.
Entomophaga, 22: 121 - 129.
- Burges, H.D. 1971
 Possibilities of pest resistanse to microbial control agents. Em "Microbial Control of Insects and Mites" (H.D.Burges & N.W. Hussey, eds.), pp. 445 - 457. Academic Press, London & New York.

- Burges, H.D. 1975
Teratogenicity of the thermostable Beta exotoxin of
Bacillus thuringiensis in Galleria mellonella.
J. Invertebr. Pathol., 26: 419 - 420.
- Burges, H.D. 1981
Microbial Control of Pests and Plant diseases - 1970 -
1980. Academic Press, London & New York, 949 pp.
- Burges, H.D. & Hussey, N.W. 1971
Microbial Control of Insects and Mites.
Academic Press, London & New York, 861 pp.
- Burges, H.D.; Thomson, E.M. & Latchford, R.A. 1976
Importance of spores and δ -endotoxin protein crystals of
Bacillus thuringiensis in Galleria mellonella.
J. Invertebr. Pathol., 27: 87 - 94.
- Bursell, E. 1970
An Introduction to Insect Physiology.
Academic Press, London & New York, 276 pp.
- Cameron, J.W.M. 1963
How useful is the basic research program in insect pa-
thology to economic entomology.
Proc. Entomol. Soc. Ont., 93: 7 - 16.
- Charles, J.F. & de Barjac, H. 1981
Histopathologie de l'action de la δ -endotoxine de
Bacillus thuringiensis var. israelensis sur les larves
d' Aedes aegypti (Dip. Culicidae).
Entomophaga, 26: 203 - 212.
- Charpentier, L.J.; Jackson, R.D. & McCormick, W.J. 1973
Sugercane borer: control by Delta endotoxin of Bacillus
thuringiensis HD-1, in field tests.
J. Econ. Entomol., 66: 249 - 251.
- Cheng, H.H. 1973
Laboratory and field tests with Bacillus thuringiensis
against the dark-sided cutworm, Euxoa messoria (Lepid.,
Noctuidae), on tobacco.
Can Entomol., 105: 941 - 945.

- Colbo, M.H. & Undeen, A.H. 1980
Effect of Bacillus thuringiensis var. israelensis on non-target insects in stream trials for control of Simuliidae.
Mosquito News, 40: 368 - 371.
- Coopel, H.C. & Martins, J.W. 1977
Biological Insect Pest Suppression.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 314 pp.
- de Barjac, H. 1978
Un nouveau candidat à la lutte biologique contre les moustiques : Bacillus thuringiensis var. israelensis.
Entomophaga, 23: 309 - 319.
- de Barjac, H. & Bonnefoi, A. 1962
Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de Bacillus du type B. thuringiensis.
Entomophaga, 7: 5 - 61.
- de Barjac, H. & Bonnefoi, A. 1968
A classification of strains of Bacillus thuringiensis Berliner with a key to their differentiation.
J. Invertebr. Pathol., 11: 335 - 347.
- de Barjac, H. & Burgerjon, A. 1973
Studies on the presence of the thermostable toxin in serotypes 10, 11, and 12 of Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 21: 325 - 327.
- de Barjac, H.; Burgerjon, A. & Bonnefoi, A. 1968
The production of heat-stable toxin by nine serotypes of Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 8: 537 - 539.
- de Barjac, H. & Coz, J. 1979
Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à Bacillus thuringiensis var. israelensis.
Bull. WHO. 57 : 139 - 141.
- de Barjac, H. & Dedonder, R. 1965
Isolement d'un nucléotide identifiable à la toxine thermostable de Bacillus thuringiensis Berliner.
C.R.Acad.Sc., 260: 7050 - 7053.

- de Barjac, H.; Dumanoir, V.C.; Shaikh, M.R. & Viviani, G. 1977
Bacillus thuringiensis var. pakistani: Nouvelle sous-
espèce correspondant au serotype 13.
C. R. Acad. Sci. Paris, 284: 2051 - 2053.
- de Barjac, H. & Larget, I. 1979
Proposal for the adoption of a standardization method
for the evaluation of insecticidal formulations derived
from serotype H-14 of Bacillus thuringiensis.
Doc. miméogr. OMS / WHO / VBC / 79-744, Geneve, 15 pp.
- de Barjac, H. & Lemille, F. 1970
Presence of flagellar antigenic subfactors in serotype
3 of Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 15: 139 - 140.
- de Barjac, H. & Riou, J.Y. 1969
Action de la toxine thermostable de Bacillus thuringien-
sis var. thuringiensis administrée à des souris.
Revue Path. Comp. Méd. exp., 6: 367 - 374.
- de Barjac, H. & Thompson, J.V. 1970
A new serotype of Bacillus thuringiensis: B. thuringienis
var. thompsoni (serotype 12).
J. Invertebr. Pathol., 15: 141 - 144.
- Delafield, F.P.; Somerville, H.J. & Rittenberg, S.C. 1968
Immunological homology between crystal and spore protein
of Bacillus thuringiensis.
J. Bact. Baltimore, 96 : 713 - 720.
- Delaporte, B. & Beguin, S. 1955
Étude d'une souche de Bacillus pathogène pour certains
insectes identifiable à Bacillus thuringiensis Berliner.
Annl. Inst. Pasteur, Paris, 89 : 632 - 643.
- DeLucca II, A.J.; Simonson, J. & Larson, A. 1979
Two new serovars of Bacillus thuringiensis : serovars
dakota and indiana (serovars 15 and 16).
J. Invertebr. Pathol., 34: 323 - 324.

- Devriendt, M. & Martouret, D. 1976
Absence de résistance a Bacillus thuringiensis chez la
teigne de crucifères, Plutella maculipennis (Lepid.,
Hyponomeutidae).
Entomophaga, 21 : 189 - 199.
- Doutt, R.L. & DeBach, P. 1964
Some biological control concepts and questions. Em
"Biological Control of Insect Pests and Weeds"(P.
DeBach, ed.), pp. 118 - 142. Reinhold Publication
Corp., New York.
- Dulmage, H.T. 1970
Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of Bacillus
thuringiensis var. kurstaki.
J. Invertebr. Pathol., 15: 232 - 239.
- Dulmage, H.T. 1973
Assay and standardization of microbial insecticides.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 217 : 187 - 199.
- Dulmage, H.T. 1975
The standardization of formulations of the δ -endotoxin
produced by Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 25: 279 - 281.
- Dulmage, H.T. & Rhodes, R.A. 1971
Production of pathogens in artificial media. Em "Micro
bial Control of Insects and Mites"(Burgess, H.D. & Hussey,
N.W., eds), pp. 507 - 540, Academic Press, London &
New York.
- Dutky, S.R. 1941
Method for the control of Japanese beetle.
U.S. Patent N° 2,258,319.
- Dutky, S.R. 1963
The milky diseases. Em "Insect Pathology; an advanced
Treatise"(Steinhaus, E.A., ed.), pp. 75 - 115, Academic
Press, New York.
- Ebersold, H.R.; Luethy, P. & Mueller, M. 1977
Changes in the fine structure of the gut epithelium of

- Pieris brassicae induced by the δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis.
Bull. Soc. Entomol. Suis., 50: 269 - 276.
- Falcon, L.A. 1976
Problems associated with the use of arthropod viruses in pest control.
Ann. Rev. Entomol., 21: 305 - 324.
- Farkas, J.; Sebesta, K.; Horska, K.; Samek, Z. Dolejs, S. & Sorm, F. 1977
The structure of exotoxin of Bacillus thuringiensis.
Coll. Czech. Chem. Commun., 42: 909 - 929.
- Fast, P.G. & Angus, T.A. 1965
Effects of parasporal inclusions of Bacillus thuringiensis var. sotto Ishiwata on the permeability of the gut wall of Bombyx mori (Linnaeus) larvae.
J. Invertebr. Pathol., 7: 29 - 32.
- Fast, P.G. & Martin, W.G. 1980
Bacillus thuringiensis parasporal crystal toxin :
Dissociation into toxic low molecular weight peptides.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 95: 1314 - 1320.
- Faust, R.M. 1974
Bacterial diseases. Em "Insect diseases"(Cantwell, G.E., ed.), pp. 87 - 183, vol. I, Marcel Dekker, New York.
- Fernald, H.T. & Shepard, H.H. 1942
Applied Entomology; An Introductory Textbook of Insects and Their Relation to Man.
McGraw-Hill Book Company, INC., New York & London, 400 pp.
- Figueiredo, M.B.; Coutinho, J.M. & Orlando, A. 1960
Novas perspectivas para o controle biológico de algumas pragas com Bacillus thuringiensis.
Arq. Inst. Biol., 27: 77 - 85.
- Fisher, R.A. & Yates, F. 1963
Statistical tables for agriculture, biological and medical research.
Oliver & Boyd, London, 6^o ed., 146 pp.

- Fitz-James, P.C. & Young, E.I. 1959
 Comparison of species and varieties of the genus Bacillus.
 Structure and nucleic acid content of spores.
J. Bact., 78 : 743 - 754.
- Forattini, O.P. 1965
 Entomologia Médica.
 2º vol., Ed. Univ. SP., 506 pp.
- Gallo, D. ; Nakano, O.; Wiendl, F.M.; Neto, S.S. & Carvalho, R.P.L. 1970
 Manual de Entomologia; Pragas de Plantas e seu Controle.
 Ed. Agronômica Ceres, SP., 858 pp.
- Garcia, M.A. 1979
 Potencialidade de alguns fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de Spodoptera frugiperda (Abbot & Smith, 1797)(Lepidoptera, Noctuidae).
 Tese de Mestrado, UNICAMP, 96 pp.
- Garcia, M.A.; Simões, M. & Habib, M.E.M. 1980
 Possíveis razões da resistência de larvas de Spodoptera frugiperda (Abbot & Smith, 1797) ao Bacillus thuringiensis var. kurstaki.
 VI Cong. Bras. Ent., Campinas, SP. Resumo p. 358.
- Garcia, M.A.; Simões, M. & Habib, M.E.N. 1982
 possible reasons of resistance in larvae of Spodoptera frugiperda (Abbot & Smith, 1797) infected by Bacillus thuringiensis var. kurstaki.
Rev. Agric. Piracicaba, Em Press.
- Gaugler, R. & Molloy, D. 1980
 Feeding inhibition in Blackfly larvae (Diptera : Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis.
Environ. Entomol., 9 : 704 - 708.
- Geest, L.P.S. 1981
 Mode of action of Bacillus thuringiensis on the summer fruit tree leafroller Adoxophyes orana (F.v.R.)
Z. ang. Entomol. 91 : 84 - 86.

- Goldberg, L.J. & Margalit, J. 1977
A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univattatus, Aedes aegypti and Culex pipiens.
Mosquito News, 37 : 355 - 358.
- Gordon, R.E.; Haynes, W.C. & Pang, N. 1973
The Genus Bacillus.
Agr. Handb. Nº 427. Washington DC: Agr. Res. Serv.,
US Dept. Agr. 283 pp.
- Govindarajan, R.; Jayaraj, S. & Narayanan, K. 1975
Observations on the nature of resistance in Spodoptera litura (F.) (Noctuidae: Lepidoptera) to infection by Bacillus thuringiensis Berliner.
Indian J. Exper. Biol., 13 : 548 - 550.
- Graves, G.N. & Watson, T.F. 1970
Effect of Bacillus thuringiensis on the pink bollworm.
J. Econ. Entomol., 63 : 1828 - 1830
- Grigorova, R. 1964
Deux souches de Bacillus thuringiensis Berliner isolees de chenilles du Bombyx diparatae Lymantria dispar.
Entomophaga Mém., 2 : 179 - 191.
- 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, Fac. de Agric. Univ. Alexandria, Egito, 196 pp.
- Habib, M.E.M. 1976
Estudos biológicos e anatômicos sobre Alabama argillacea (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae).
Tese de Doutorado, UNICAMP, 117 pp.
- Habib, M.E.M. Contribution to the biology of the American cotton leafworm, Alabama argillacea (Hübner, 1818) (Lepid., Noctuidae).
Z. ang. Entomol., 84 : 412 - 418.

- Habib, M.E.M. 1978
Anatomy and histology of the mature larva of the American cotton leafworm, Alabama argillacea (Hübner, 1818)(Lepid., Noctuidae).
Anais da SEB., 7 : 7 - 14.
- Habib, M.E.M. & Andrade, C.F. 1977
Epizootia em larvas de Brassolis sophorae (Linnaeus) causada por Beauveria bassiana (Bols.) Vuill., com estudos de identificação e sintomatologia.
Anais da SEB., 6 : 230 - 237.
- Habib, M.E.M. & Fávaro Jr., A. 1981
Estudos de susceptibilidade de Alabama argillacea, o curuquerê de algodão, ao Bacillus thuringiensis.
VII Cong. Bras. Ent., Fortaleza, CA, Resumo p. 142.
- Habib, M.E.M. & Garcia, M.A. 1981
Compatibility and synergism between Bacillus thuringiensis var. kurstaki and two chemical insecticides.
Z. ang. Entomol., 91 : 7 - 14.
- Habib, M.E.M.; Paleari, L.M. & Amaral, M.E.C. 1982
Effects of three larval diets on the development of the armyworm, Spodoptera latifascia Walker, 1856 (Lepid., Noctuidae).
Rev. Biol. Trop. em Press
- Hall, I.M. & Arakawa, K.Y. 1959
The susceptibility of the house fly, Musca domestica L. to Bacillus thuringiensis var. thuringiensis Berliner.
J. Invertebr. Pathol., 1: 351 - 355.
- Hamlin, J.C.; Reed, W.D. & Philips, M.E. 1931
Biology of the indian meal moth on dried fruits in California.
US Dept. Agric. Tech. Bull., 242 : 26 pp.
- Hannay, C.L. 1953
Crystalline inclusions in aerobic sporforming bacteria.
Nature , 172 : 1004

- Heimpel, A.M. 1954
 A strain of Bacillus cereus Fr. & Fr. pathogenic for the larch saw-fly Pristiphora erichsoni (Htg.).
Can. Entomol., 86 : 73 - 77.
- Heimpel, A.M. 1967
 A taxonomic key for crystalliferous bacteria related to Bacillus thuringiensis Berliner.
J. Invertebr. Pathol., 9 : 364 - 375.
- Heimpel, A.M. 1971
 Safety of insect pathogens for man and vertebrates. Em "Microbial Control of Insects and Mites" (Burgess, H.D. & Hussey, N.W., eds), Academic Press, London & New York, pp. 469 - 489.
- Heimpel, A. M. & Angus, T.A. 1958
 The taxonomy of insect pathogens related to Bacillus cereus Frankland and Frankland.
Can. J. Microbiol., 4 : 531 - 541.
- Heimpel, A. M. & Angus, T.A. 1959
 The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae.
J. Insect Pathol., 1 : 152 - 170.
- Heimpel, A.M. & Angus, T.A. 1960
 On the taxonomy of certain entomogenous crystalliferous bacteria.
J. Insect Pathol., 2 : 311 - 319.
- Heimpel, A.M. & Angus, T.A. 1963
 Diseases caused by certain spore-forming bacteria. Em "Insect Pathology; An advanced Treatise" (Steinhaus, E.A., ed.), pp. 21 - 73, vol. 2, Academic Press, New York.
- Hill, G.F. 1928
 Notes on Plodia interpunctella (Indian meal moth).
J. Counc. Sci. Ind. Res., 1 : 330 - 340.
- Hoopingarner, R. & Materu, M.E.M. 1964
 The toxicity and histopathology of Bacillus thuringiensis Berliner in Galleria mellonella (Linneaus).
J. Insect Pathol., 6 : 26 - 30.

- Ignoffo, C.M. 1973
Effects of entomopathogens on vertebrates.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 217 : 141 - 164.
- Ignoffo, C.M.; Garcia, C. & Gasparotto, V.A. 1968
Sensitivity of larvae of the cabbage looper, Trichoplusia ni, to Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 11 : 97 - 103.
- Ignoffo, C.M. & Gard, I. 1970
Use of an agar-base diet and house fly larvae to assay β -exotoxin activity of Bacillus thuringiensis.
J. Econ. Entomol., 63 : 1987 - 1989.
- Ignoffo, C.M. & Gregory, B.G. 1972
Toxicity of toxins produced by Bacillus thuringiensis.
Environ. Entomol., 1 : 269 - 272.
- Ignoffo, C.M. ; McGarr, R.L. & Martin, D.F. 1964
Control of Alabama argillacea (Hübner) with Bacillus thuringiensis Berliner.
J. Insect Pathol., 6 : 411 - 416.
- Kearby, W.H.; Hostetter, D.L. & Ignoffo, C.M. 1972
Laboratory and field evaluation of Bacillus thuringiensis for control of the Bagworm.
J. Econ. Entomol., 65 : 477 - 480.
- Kim, Y.T.; Gregory, B.G. & Ignoffo, C.M. 1972
The β -exotoxin of Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 20 : 284 - 287.
- Kim, Y.T. & Huang, P. 1970
The β -exotoxin of Bacillus thuringiensis. I. Isolation and characterization.
J. Invertebr. Pathol., 15 : 100 - 108.
- Krieg, A. 1957
On the possibility of controlling Pieris brassicae by means of artificial infection with a bacterium.
Z. pflanzenkrankh., 64 : 321 - 327.

- Krieg, A. 1969
In vitro determination of Bacillus thuringiensis ,
Bacillus cereus, and related bacilli.
J. Invertebr. Pathol., 15 : 313 - 320.
- Krieg, A. 1970
 Thuricin , a bacteriocin produced by Bacillus
thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 16 : 291 - 294.
- Krieg, A. 1971
 Concerning α -exotoxin produced by vegetative cells of
Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus.
J. Invertebr. Pathol., 17 : 134 - 135.
- Krieg, A. ; de Barjac, H. & Bonnefoi, A. 1968
 A new serotype of Bacillus thuringiensis isolated in
 Germany : Bacillus thuringiensis var. darmstadiensis.
J. Invertebr. Pathol., 10 : 428 - 430.
- Krieg, A. & Franz, J. 1959
 Verniche zur Bekämpfung von Wachsmatten mittels Bakteriose.
Naturwissenschaften, 1: 22 - 23.
- Krywienczyk, J.; Dulmage, H.T. & Fast, P.G. 1978
 Occurrence of two serologically distinct groups within
Bacillus thuringiensis serotype 3a:3b var. kurstaki.
J. Invertebr. Pathol., 31 : 372 - 375.
- Krywienczyk, J. & Fast, P.G. 1980
 Serological relationships of the crystals of Bacillus
thuringiensis var. israelensis.
J. Invertebr. Pathol., 36 : 139 - 140.
- Lacey, L.A. & Federici, B.A. 1979
 Pathogenesis and mid-gut histopathology of Bacillus
thuringiensis in Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae).
J. Invertebr. Pathol., 33 : 171 - 182.
- Lacey, L.A. & Mulla, M.S. 1977
 Evaluation of Bacillus thuringiensis as a biocide of
 black-fly larvae (Diptera. Simuliidae).
J. Invertebr. Pathol., 30 : 46 - 49.

- Lacey, L.A.; Mulla, M.S. & Dulmage, H.T. 1978
Some factors affecting the pathogenicity of Bacillus thuringiensis Berliner against blackflies.
Environ. Entomol., 7 : 583 - 588.
- Lam, A.B. & Webster, J.M. 1972
Effect of the DD-136 nematode and of a β -exotoxin preparation of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis on leatherjackets, Tipula paludosa larvae.
J. Invertebr. Pathol., 20 : 141 - 149.
- Larget, I. & de Barjac, H. 1981
Activité comparée de 22 variétés de Bacillus thuringiensis sur 3 espèces de Culicidae.
Entomophaga, 26 : 143 - 148.
- Larson, L.V. & Ignoffo, C.M. 1971
Activity of Bacillus thuringiensis, varieties thuringiensis and galleriae, against fall cankerworm.
J. Econ. Entomol., 64 : 1567 - 1569.
- Lavini, W.C. 1981
Diagnóstico sorológico de Bacillus thuringiensis Berliner, 1915 em larvas de insetos.
Tese de Mestrado, ESALQ, USP, pp. 153.
- Lecadet, M.M. ; Chevrier, G. & Dedonder, R. 1972
Analysis of a protein fraction in the spore coats of Bacillus thuringiensis.
Eur. J. Biochem. Berlin, 25 : 349 - 358.
- Lemoigne, M. ; Bonnefoi, A. ; Beguin, S. ; Grison, P. ; Martouret, D. ; Schenk, A. & Vago, C. 1956
Essais d'utilisation de Bacillus thuringiensis Berliner, contre Pieris brassicae L.
Entomophaga, 1 : 19 - 34
- Majumdar, S.; Matthu, M. & Pingale, S. 1957
Bacterial control of insects: studies on the field control of the lab-lab-pod-boring caterpillar.
Indian J. Entomol., 18 : 397 - 407.

- Malhotra, C.P. & Choudhary, S.G. 1968
Control of Eublemma amabilis Moore (Noctuidae: Lepidoptera) and Holcocera pulverea Meyr (Blastobasidae : Lepidoptera), predators of the Lac insect Kerria lacca by Bacillus thuringiensis Berliner.
J. Invertebr. Pathol., 11 : 429 - 439.
- Martignoni, M.E. & Iwai, P.J. 1975
A catalog of viral diseases of insects and mites.
US Dept. Agric., Forest Service Technical Report
PNW-40, 35 pp.
- Martouret, D. 1959a
Les conditions d'utilisation des preparations à base de Bacillus thuringiensis contre les larves de lepidopteres.
Rev. Zool. Agric., 58 : 1 - 12.
- Martouret, D. 1959b
Application diverses et normes d'utilisation de Bacillus thuringiensis Berliner souche anduze.
Entomophaga, 4 : 211 - 220.
- Martouret, D. 1961
Les toxines de Bacillus thuringiensis et leur processus d'action chez les larves de lepidopteres.
Symp. Phytopharm. Phytiat. 12th, Ghent. Belgium, 8: 1-14.
- Martouret, D. ; L'Hoste, J. & Roche, A. 1965
Action sur le mesenteron de Pieris brassicae L. de la toxine de l'inclusion parasoprale de Bacillus thuringiensis .
Entomophaga, 10 : 349 - 365.
- Mattes, O. 1927
Parasitäre Krankheiten der Mehlmotenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel.
Sber. Ges. Beförd. ges. Naturw. Marburg, 62: 381 - 417.
- McConnell, E. & Richarda, A.G. 1959
The production by Bacillus thuringiensis Berliner of a heat-stable substance toxic for insects.
Can. J. Microbiol., 5: 161 - 168.

- McEwen, F.L. ; Glass, E.H.; Davis, A.C. & Splittstoesser, C.M. 1960
Field tests with Bacillus thuringiensis Berliner for control of four lepidopterous pests.
J. Insect Pathol., 2 : 152 - 164.
- Mechalas, B.J. & Anderson, N.B. 1964
Bioassay of Bacillus thuringiensis Berliner-based microbial insecticides. II. Standardization.
J. Insect Pathol., 6 : 218 - 224
- Mechalas, B.J. & Dunn, P.H. 1964
Bioassay of Bacillus thuringiensis Berliner-based microbial insecticides. I. Bioassay procedure.
J. Insect Pathol., 6 : 214 - 217.
- Mohd-Salleh, M.B. & Beegle, C.C. 1980
Fermentation media and production of exotoxin by three varieties of Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 35 : 75 - 83.
- Molloy, D.; Gaugler, R. & Jamnback, H. 1981
Factors influencing efficacy of Bacillus thuringiensis as a biological control agent of blackfly larvae.
J. Econ. Entomol., 74 : 61 - 64.
- Monro, R.E. 1961
Protein turnover and the formation of protein inclusions during sporulation of Bacillus thuringiensis.
Biochem. J. Liverpool, Cambridge, 81 : 225 - 232.
- Moore, I. & Navon, A. 1973
Studies of the susceptibility of the cotton leafworm, Spodoptera littoralis (Boisduval), to various strains of Bacillus thuringiensis.
Phytoparasitica, 1 : 23 - 32.
- Moraes, I.O. 1973
Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa.
Tese de Mestrado, UNICAMP, 69 pp.

- Moraes, I.O. 1976
Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em mini-fermentador.
Tese de Doutorado, UNICAMP, 94 pp.
- Moraes, I.O. 1981
Produção, separação e bioensaio da exotoxina termoestável de Bacillus thuringiensis, obtida por fermentação submersa.
Tese de Livre Docência, UNICAMP, 100 pp.
- Morris, O.N. 1963
Pathogenicity of three commercial preparations of Bacillus thuringiensis Berliner for some forest insects.
J. Insect Pathol., 5 : 361 - 367.
- Morris, O.N. 1969a
Susceptibility of several forest insects of British Columbia to commercially produced Bacillus thuringiensis.
1. Studies on the physiological properties of some commercial products.
J. Invertebr. Pathol., 13 : 134 - 146.
- Morris, O.N. 1969b
Susceptibility of several forest insects of British Columbia to commercially produced Bacillus thuringiensis.
II. Laboratory and field pathogenicity tests.
J. Invertebr. Pathol., 13 : 285 - 295.
- Morris, O.N. 1972
Susceptibility of some forest insects to mixtures of commercial Bacillus thuringiensis and chemical insecticides, and sensitivity of the pathogen to the insecticides.
Can. Entomol., 104 : 1419 - 1425.
- Morris, O.N. & Armstrong, J.A. 1975
Preliminary field trials with Bacillus thuringiensis - chemical insecticides combinations in the integrated control of the spruce budworm, Choristoneura fumiferana (Lepidoptera, Tortricidae).
Can. Entomol., 107 : 1281 - 1288.

- Morris, O.N.; Armstrong, J.A. & Hildebrand, M.J. 1977
Aerial field trials with a new formulation of Bacillus thuringiensis against the spruce budworm, Choristoneura fumiferana (Clem.).
Chem. Control Res. Inst., Can. For. Serv., Rept. N^o CC-X-144, 35 pp.
- Mulligan III, F.S.; Schaefer, C.H. & Miura, T. 1978
Laboratory and field evaluation of Bacillus sphaericus as a mosquito control agent.
J. Econ. Entomol., 71 : 774 - 777.
- Mulligan III, F.S.; Schaefer, C.H. & Wilder, W.H. 1980
Efficacy and persistence of Bacillus sphaericus and Bacillus thuringiensis H-14 against mosquitos under laboratory and field conditions.
J. Econ. Entomol., 73 : 684 - 688.
- Nagamatsu, Y.; Tsutsui, R.; Ichimaru, T.; Nagamatsu, M. ; Koga, K. & Hayashi, K. 1978
Subunit structure and toxic component of δ -endotoxin from Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 32 : 103 - 109.
- Narayanan, K.; Govindarajan, R.; Subramaniam, R. & Jayaraj, S. 1976
pH of blood and gut contents of lepidopterous insects and its relation to pathogenicity of two bacterial pathogens.
Indian J. Microbiol., 73 : 65 - 67.
- Narayanan, K. & Jayaraj, S. 1974
Susceptibility of citrus leaf caterpillar, Papilio demoleus to Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 23 : 125 - 126.
- NAS - National Academy of Sciences 1972
Pest Control : Strategies for the future.
NAS, Washington, 376 pp.
- NAS - National Academy of Sciences 1975
Pest Control: An assessment of present and alternative technologies. 5 vols.

- Norris, J.R. 1964
The classification of Bacillus thuringiensis.
J. Appl. Bacteriol., 27 : 439 - 447.
- Norris, J.R. & Burges, H.D. 1963
Esterases of crystalliferous bacteria pathogenic for insects ; epizootiological applications.
J. Insect Pathol., 5 : 460 - 472.
- Norris, J.R. & Burges, H.D. 1965
The identification of Bacillus thuringiensis.
Entomophaga , 10 : 41 - 47.
- Ohba, M. & Aizawa, K. 1978
Serological identification of Bacillus thuringiensis and related bacteria isolated in Japan.
J. Invertebr. Pathol., 32 : 303 - 309.
- Ohba, M. & Aizawa, K. 1979
A new subspecies of Bacillus thuringiensis possessing 11a:11c flagellar antigenic structure : Bacillus thuringiensis subsp. kyushuensis .
J. Invertebr. Pathol., 33 : 387 - 388.
- Ohba, M. ; Aizawa, K. & Shimizu, S. 1981a
A new subspecies of Bacillus thuringiensis isolated in Japan : Bacillus thuringiensis subsp. tohokuensis (Serotype 17).
J. Invertebr. Pathol., 38 : 307 - 309.
- Ohba, M.; Ono, K.; Aizawa, K. & Iwanami, S. 1981b
Two new subspecies of Bacillus thuringiensis isolated in Japan : Bacillus thuringiensis subsp. kumamotoensis (Serotype 18) and Bacillus thuringiensis subsp. tochi-giensis (Serotype 19).
J. Invertebr. Pathol., 38 : 184 - 190.
- Pais, M. & de Barjac, H. 1974
Thermostable exotoxin of Bacillus thuringiensis.
J. Carbohyd. Nucleosides Nucleotides, 1 : 213 - 223.
- Paleari, L.M.; Habib, M.E.M. & Garcia, M.A. 1980
Isolamento, purificação e bioensaios de uma linhagem de Bacillus thuringiensis var. kurstaki.
VI Cing. Bras. Ent., Campinas, SP.

- Pendelton, I.R. 1970
Sodium and potassium fluxes in Philosamia ricini during Bacillus thuringiensis protein crystal intoxication.
J. Invertebr. Pathol., 16 : 313 - 314.
- Prasad, S.S.V.; Tilak, K.V.B.R. & Gollakota, K.G. 1972
Role of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis on the larval viability and egg hatching of Meliodygyne spp.
J. Invertebr. Pathol., 20 : 377 - 378.
- Ramakrishnan, N. 1968
Observation of the toxicity of Bacillus thuringiensis for the silkworm, Bombyx mori.
J. Invertebr. Pathol., 10 : 449 - 450.
- Ramoska, W.A.; Burgess, J. & Singer, S. 1978
Field application of a bacterial insecticide.
Mosquito News, 38 : 57 - 60.
- Ramoska, W.A.; Singer, S. & Levy, R. 1977
Bioassay of three strains of Bacillus sphaericus on field collected mosquito.
J. Invertebr. Pathol., 30 : 151 - 154.
- Rao, M.V.R. & Rana, R.S. 1977
Interaction of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis with commonly used chemical insecticides.
Indian J. Microbiol., 17 : 9 - 12.
- Ren, G.; Li, K.; Yang, M. & Yi, X. 1975
A new subsp. of Bacillus thuringiensis isolated from Ostrinia nubilalis.
Acta microbiol. Sin., 15 : 292 - 301.
- Salama, H.S.; Foda, M.S. & El-Sharaby, A.M. 1981a
Potency of spore- -endotoxin complexes of Bacillus thuringiensis against some cotton pests.
Z. ang. Entomol., 91 : 388 - 398.
- Salama, H.S.; Foda M.S.; El-Sharaby, A.M.; Matter, M. & Khalafallah, M. 1981b
Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endoroxins of Bacillus thuringiensis for different periods.
J. Invertebr. Pathol., 38 : 220 - 229.

- Schesser, J.H. & Bulla, L.A. 1978
 Toxicity of Bacillus thuringiensis spores to the tobacco hornworm, Manduca sexta.
Appl. Environ. Microbiol., 35 : 121 - 125.
- Sebesta, K. & Horska, K. 1968
 Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of Bacillus thuringiensis var. galechiae.
Biochem. Biophys. Acta, 169 : 281 - 282.
- Sebesta, K.; Horska, K. & Vankova, J. 1967
 Biochemistry of Bacillus thuringiensis exotoxins. Em "Insect Pathology and Microbial Control"(van der Laan, P.A., ed.), pp. 238 - 242, N.Holland Publ.Co., Amsterdam.
- Sebesta, K.; Horska, K. & Vankova, J. 1969
 Inhibition of de novo RNA synthesis by the insecticidal exotoxin of Bacillus thuringiensis var. galechiae.
Collect. Czech. Chem. Commun., 34 : 1786 - 1791.
- Shaikh, M.U. & Morrison, F.O. 1966
 Susceptibility of nine insect species to infection by Bacillus thuringiensis var. thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 8 : 347 - 350.
- Singer, S. 1975
 Isolation and development of bacterial pathogens and vectors. Em "Biological Regulation of Vectors"(Briggs, J.H., ed.), pp. 3 - 18. US Dept. Health, Pub. N^o (NIH) 77-1180, Washington, D.C.
- Smith, D.S. & Treherne, J.E. 1963
 Functional aspects of the organization of the insect nervous system. Em "Advances in Insect Physiology"(Beament, J.W.L.; Treherne, J.E. & Wigglesworth, V.B., eds.), vol. 1, pp. 401 - 484. Academic Press, London & New York.
- Smith, N.R.; Gordon, R.E. & Clark, F.E. 1946
 Aerobic mesophilic sporeforming bacteria.
 Misc. Publs. US Dept. Agric. Washington, 559.

- Somerville, H.J.; Delafield, F.P. & Rittenberg, S.C. 1968
 Biochemical homology between crystal and spore protein
 of Bacillus thuringiensis.
J. Bacteriol., 96 : 721 - 726.
- Somerville, H.J. & James, C. R. 1970
 Association of the crystalline inclusion of Bacillus
thuringiensis with the exosporium.
J. Bacteriol., 102 : 580 - 583.
- Somerville, H.J. & Pockett, H.V. 1975
 An insect toxin from spores of Bacillus thuringiensis
 and Bacillus cereus.
J. Gen. Microbiol., 87 : 359 - 369.
- Steinhaus, E.A. 1949
 Principles of Insect Pathology.
 McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 757 pp.
- Steinhaus, E.A. 1951
 Possible use of Bacillus thuringiensis Berliner as
 an aid in the biological control of the alfalfa cater
 pillar.
Hilgardia, 20 : 359 - 381.
- Steinhaus, E.A. 1960
 The duration of viability and infectivity of certain
 insect pathogens.
J. Insect Pathol., 2 : 225 - 229.
- Steinhaus, E.A. 1963
 Insect Pathology - An advanced Treatise.
 Academic Press, New York. Vol. 1, 661 pp.; vol.2 689 pp.
- Steinhaus, E.A. & Jerrel, E.A. 1954
 Further observations on Bacillus thuringiensis Berliner
 and other sporeforming bacteria.
Hilgardia, 23 : 1 - 23
- Sutter, G.R.; Abrahamson, A.D.; Amilton, E.W. & Bick, I.D.
 1971
 Compatibility of Bacillus thuringiensis var. thuringien-
sis and chemical insecticides. I. Effect of insecticides
 on bacterial replication rate.
J. Econ. Entomol., 64 : 1348 - 1350.

- Sutter, G.R. & Raun, E.S. 1967
Histopathology of European corn borer larvae treated
with Bacillus thuringiensis.
J. Invertebr. Pathol., 9 : 90 - 103.
- Talalaev, E.V. 1957a
Eine kunstlich induzierte epizootic der soptikamie von
Dendrolimus sibiricus Raupen.
Ent. Obozr., 36 : 845 - 859 .
- Talalaev, E.V. 1957b
Bacteriologische Bekämpfungsmethoden der sibirischen
Arvenspinner (Dendrolimus sibiricus).
Lesn. Choz., 10 : 36 - 37.
- Tanada, Y. 1953
Susceptibility of the imported cabbageworm to Bacillus
thuringiensis Berliner.
Proc. Hawaii Ent. Soc., 15 : 159 - 166.
- Taylor, T.A. 1968
The pathogenicity of Bacillus thuringiensis var. thurin-
giensis Berliner for larvae of Maruca testulalis Geyer.
J. Invertebr. Pathol., 11 : 386 - 389.
- Thompson, C.G.; Neisess, J. & Batzer, H.O. 1977
Field tests of Bacillus thuringiensis and aerial appli-
cations strategies on western maountainous terrain.
US Dept. , PNW-230, 12 pp.
- Thompson, W.R. 1947
Use of moving averages and interpolation to estimate
median effective dose.
Bacter. Rev., 11 : 115 - 145.
- Toumanoff, C. 1952
A propos d'un Bacille patogène pour les vers à soie au
Japan (Bacillus sotto (Ishiwata)) et ses affinités avec
d'autres bacilles entomophytes.
Ann. Inst. Pasteur, 82 : 512 - 516.

- Toumanoff, C. 1953
Description de quelques souches entomophytes de Bacillus cereus Fr. & Fr. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf.
Ann. Inst. Pasteur, 85 : 90 - 99.
- Toumanoff, C. 1956
Virulence experimentale d'une souche banale de Bacillus cereus Fr. & Fr. pour les chenilles de Galleria mellonella L. et Pieris brassicae.
Ann. Inst. Pasteur, 90 : 660 - 665.
- Toumanoff, C. & Le Coroller, Y. 1959
Contribution à l'étude de Bacillus cereus Fr. & Fr. cristallophores et pathogène pour les larves de lepidoptères.
Ann. Inst. Pasteur, 96 : 680 - 688.
- Toumanoff, C. & Vago, C. 1951
L'agent pathogène de la flasherie des vers à soie endémique dans la région des Cévennes: Bacillus cereus var. alesti., var. nov.
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 233 : 1504 - 1507.
- Toumanoff, C. & Vago, C. 1952
Essais comparatifs sur la virulence pour Bombyx mori L. (Lepidoptera) de divers Bacillus entomophytes du group cereus.
Ann. Inst. Pasteur, 83 : 634 - 639.
- Toumanoff, C. & Vago, C. 1953
Étude histopathologique des vers à soie atteints de Bacillus cereus var. alesti.
Ann. Inst. Pasteur, 84 : 376 - 386.
- Travers, R.S.; Faust, R.M. & Reichelderfer, C.F. 1976
Effects of Bacillus thuringiensis var. kurstaki 6-endotoxin on isolated lepidopteran mitochondria.
J. Invertebr. Pathol., 28 : 351 - 354.
- Tyrell, D.J.; Davidson, L.I.; Bulla, L.A. & Ramoska, W.A. 1979
Toxicity of parasporal crystals of Bacillus thuringiensis

- to mosquitoes.
Appl. Environ. Microbiol., 38 : 656 - 658.
- Undeen, L.A. & Colbo, M.H. 1980
The efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis against blackfly larvae (Diptera, Simuliidae) in their natural habitat.
Mosquito News, 40 : 181 - 184.
- Van Damme, E.N. & Van Der Laan, P.A. 1959
Some observations on the effect of E-58 powder (Bacillus thuringiensis Berliner) on Malacosoma neustria L.
Entomophaga, 4 : 221 - 225.
- Vankova, J. 1957
Study of the effect of Bacillus thuringiensis on insects.
Folia biologica, Prague, 3 : 175 - 182.
- Vankova, J. 1964
Bacillus thuringiensis .
P. ang. Entomol., 2 : 271 - 291.
- WHO - World Health Organization 1973a
The use of viruses for control of insect pests and disease vectors.
WHO Tech. Rept., Nº 531, 48 pp.
- WHO - World Health Organization 1973b
Conference on the Safety of biological agents for arthropod control.
WHO rept. VBC / 73.1 , 23 pp.
- Wigglesworth, V.B. 1974
Insect Physiology
7a. edição. Chapman & Hall, London, 166 pp.
- Wraight, S.P.; Molloy, D.; Jamnback, H. & McCoy, P. 1981
Effects of temperature and instar on the efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis and Bacillus sphaericus strain 1593 against Aedes stimulans larvae.
J. Invertebr. Pathol., 38 : 78 - 87.

- Yamvrias, C. 1962
Contribution à l'étude du mode d'action de Bacillus thuringiensis Berliner vis-à-vis de la teigne de la farine Anagasta (Ephestia) kuhniella Zeller (Lepidoptère).
Entomophaga, 7 : 101 - 159.
- Yamvrias, C. & Angus, T.A. 1969
Toxicity of Bacillus thuringiensis for larvae of the clothes moth, Tineola bisselliella.
J. Invertebr. Pathol., 14 : 423 - 424.