

Laboratório de Manejo Integrado de Pragas  
Universidade Federal do Paraná

Eficácia de *Bacillus thuringiensis* à *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório

Preferência de entrada de neonatas de *Grapholita molesta* em maçã em laboratório



MAGDA FERNANDA PAIXÃO

LINO BITTENCOURT MONTEIRO

RUI PEREIRA LEITE JÚNIOR



Eficácia de *Bacillus thuringiensis* à *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório

Preferência de entrada de neonatas de *Grapholita molesta* em maçã em laboratório

MAGDA FERNANDA PAIXÃO<sup>1</sup>; LINO BITTENCOURT MONTEIRO<sup>2</sup>; RUI PEREIRA LEITE JÚNIOR<sup>3</sup>.

Curitiba, agosto de 2021.

<sup>1</sup> Bióloga, Doutora em Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. e-mail: mferpaixao@hotmail.com.

<sup>1</sup> Professor Titular do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LAMIP), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. e-mail: lbmonteiro@terra.com.br.

<sup>2</sup> Doutor em Fitopatologia, Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR. e-mail: ruileite@iapar.br

**Resumo.** *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) é utilizado no controle de *Grapholita molesta* em maçã, embora sua eficácia seja questionada por produtores de maçã. O objetivo desse trabalho foi comparar a eficácia de diferentes métodos de aplicação de Dipel® WG sob o fruto maçã. Foram avaliados os seguintes itens: i. Qualidade de deposição de uma solução de corante sobre maçã; ii. Concentração de células viáveis de *Btk* no cálice, pedúnculo e exocarpo mediano da maçã; iii. Influência do surfactante Ag-Bem® (50 ml i.a 100 l<sup>-1</sup>) na solução de Dipel® WG sobre a mortalidade de larvas de *G. molesta*; iv. Influência dos métodos de pulverização, imersão e imersão + injeção de solução de Dipel® WG no cálice e pedúnculo da maçã. Resultados mostraram que o pedúnculo das maçãs apresentou maior número de amostras com deposição de tinta e o cálice teve a maior concentração de *Btk*; a mortalidade de *G. molesta* não se diferenciou entre os tratamentos Dipel® WG e Dipel® WG + Ag-Bem®; os métodos de aplicação não influenciaram na mortalidade de larvas. A preferência a penetração da neonata foi pelo cálice. Concluiu-se que Dipel® WG não foi eficaz para o controle de neonatas de *G. molesta* em maçã.

**Palavras chave.** *Bt kurstaki*, metodologia aplicação, mariposa-oriental, comportamento alimentar.

**Abstract.** *Bacillus thuringiensis kurstaki* (*Btk*) is used to *Grapholita molesta* control in apples, although its effectiveness is questioned by apple growers. The objective of this work was to compare the effectiveness of different spraying methods of Dipel® WG on apple fruit. The following items were evaluated: i. Quality of deposition of a dye solution on apple; ii. Concentration of viable *Btk* cells in apple calyx, peduncle and medial exocarp; iii. Influence of the Ag-Bem® surfactant (50 ml a.i. 100 l-1) in the Dipel® WG solution on the mortality of *G. molesta* neonates; iv. Influence of the spraying methods, immersion and immersion + injection of Dipel® WG solution in apple calyx and peduncle. Results showed that the apple peduncle had the highest number of samples with paint deposition and the calyx had the highest concentration of *Btk* cells; the mortality of *G. molesta* did not differ between the treatments Dipel® WG and Dipel® WG + Ag-Bem®; application methods did not influence larval mortality. The neonate's preference for penetration was the calyx. It was concluded that Dipel® WG was not effective for the control of *G. molesta* neonate in apples.

**Key words.** Bt kurstaki, spraying methodology, oriental moth, feeding behavior.

## 1. INTRODUÇÃO

Esporos de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) (Berliner) devem ser ingerindo pelas larvas de insetos para ativar as endotoxinas no intestino médio, para agir na parede celular e alterar o balanço osmótico (Naak & Fiuza, 2006; Gill, 1995). Este agente de controle biológico é registrado no Brasil para o controle de mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae), em macieira, sendo normalmente utilizado próximo da colheita em função da ausência de intervalo de segurança (Andrei, 2009).

*Grapholita molesta* na fase larval possui comportamento alimentar broqueador, penetrando nos frutos logo após a eclosão e fazendo galerias em direção ao carpo (Souza et al., 2000). Nessa fase, o controle das larvas com *Btk* em maçã se mostrou insatisfatório para *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) (Reissig et al., 1984; De Reede et al., 1985; Andermatt et al., 1988). Um dos motivos discutidos por Scherrer-Montero et al. (2009) se relaciona com a cutícula cerosa do fruto, a qual dificultaria a adesão de esporos e cristais de toxinas sobre a superfície. Para contornar esse problema, é recomendada a adição de surfactantes para melhorar a aderência (Hanzen, 2000), porém, para formulações de *Btk*, não há esta recomendação pelo fabricante (Andrei, 2009).

Bioensaios com inseticidas biológicos que atuam por ingestão podem ser realizados por diferentes métodos de aplicação. Em laboratório, os frutos são imersos em soluções de inseticidas (Neto & Silva et al., 2011) ou pulverizados (Andermatt et al., 1988; Morandi Filho et al., 2007), enquanto que, em pomar, são pulverizados (Jaastad et al., 2001; Monteiro & Souza, 2010). Em alguns estudos os resultados foram conflitantes e as diferenças entre os métodos de aplicação podem ser um fator que influencia a ação de *Btk* sobre tortricídeos broqueadores.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar a eficácia de *Btk* comparando diferentes métodos de aplicação em maçã para controle de larvas de *G. molesta* e verificar o local preferencial de entrada da neonata na maçã.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a avaliação da eficácia de *Btk* à *G. molesta* foi utilizada a formulação comercial Dipel® WG (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* linhagem HD-I, 540g i.a/kg) (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA), na concentração de 100 g de i.a. 100 L<sup>-1</sup> em frutos de maçã da cultivar “Eva”. Foram executados os experimentos: Medição da qualidade da deposição da solução de Dipel® WG por coloração do fruto; Concentração de células viáveis de *Btk* na superfície da maçã; Influência da adição de surfactante na eficácia de Dipel® WG e Influência dos métodos de aplicação de Dipel® WG. Estes foram conduzidos no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LAMIP) da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

**2.1. Obtenção de larvas de *Grapholita molesta*.** Larvas foram coletadas de frutos em um pomar de macieira e multiplicadas em dieta artificial à base de milho de acordo com Guennelon et al. (1981), nas condições de 22 ± 1°C, 70% UR e fotoperíodo de 16:8 h (L:E). Fêmeas alimentadas com dieta líquida à base de açúcar (25%) ovipositaram na parede interna de garrafas de politereftalato de etileno (PET), as quais foram recortadas e colocadas em caixas plásticas (15x25 cm) contendo dieta artificial. Neonatas recém-eclodidas (até três horas de vida) foram utilizadas nos experimentos. O desenvolvimento da população utilizada no experimento foi acompanhado, à fim de manter homogênea a idade dos adultos e da oviposição.

**2.2. Medição da qualidade da deposição da solução Dipel® WG por coloração do fruto.** A qualidade da deposição e aderência da solução Dipel® WG + corante azul a base d’água sobre o exocarpo (Fig. 1) foi avaliada pelos métodos: pulverização, imersão e imersão + injeção da solução. A solução foi preparada com Dipel® WG, na concentração de 100 g de i.a. 100 L<sup>-1</sup>, adicionando-se 42 ml de corante azul a base d’água TC 42 Pilot (Pilot Pen do Brasil, São Paulo, SP) em 1 L de água destilada. Os métodos de aplicação foram os seguintes: i. Os frutos foram pulverizados individualmente com Dipel® WG por meio de um atomizador (500 ml) marca Desaga nº

124000 (Heidelberg, Alemanha), por 20” até o ponto de escorrimento em todas as faces da maçã; ii. Os frutos foram imersos na solução de Dipel<sup>®</sup> WG por 20”; iii. Frutos foram imersos por 20” na solução de Dipel<sup>®</sup> WG + injeção de um jato forçado de solução de inseticida (1 ml) para dentro do cálice e do pedúnculo por meio de seringa descartável; Os parâmetros avaliados foram a qualidade da aderência do corante azul no cálice e pedúnculo da maçã de acordo com a intensidade de coloração em três níveis: i. Nível 1- coloração total em azul (100%); ii. Nível 2- parcialmente colorido em azul ( $\pm$  50 %); iii. Nível 3- não colorido (0%). Os frutos foram cortados longitudinalmente para auxiliar na visualização da coloração das estruturas do cálice e pedúnculo dos frutos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com oito repetições, cada uma contendo três frutos.

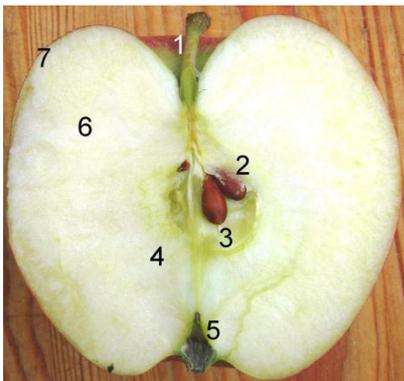


Figura 1. Corte longitudinal de maçã e suas estruturas. 1. pedúnculo, 2. semente, 3. endocarpo, 4. mesocarpo, 5. cálice, 6. polpa, 7. exocarpo (denominado correntemente de casca do fruto).

**2.3. Concentração de células viáveis de *Btk* na superfície da maçã.** As maçãs foram imersas em uma solução de Dipel<sup>®</sup> WG, na concentração de 100 g de i.a. 100 L<sup>-1</sup>, por 20”<sup>cc</sup>. Utilizaram-se como testemunha, maçãs imersas em água destilada por 20”. Os frutos foram dispostos lateralmente sobre uma bandeja plástica em temperatura ambiente para secagem por duas horas. A concentração de *Btk* foi determinada no pedúnculo, exocarpo mediano e cálice das maçãs. As estruturas foram destacadas com o auxílio de um furador (18 mm de diâmetro) e colocadas individualmente em um recipiente contendo 50 mL de solução tampão fosfato. Os tecidos foram submetidos à agitação (150 rpm) por 2 h a 27°C. Os conteúdos líquidos foram transferidos para tubos

Falcon (50 ml) e centrifugados (5000 rpm) por 10' a 20°C. O sobrenadante líquido foi descartado, adicionando-se ao pellet 5 ml de água autoclavada. Os tubos foram ressuspendidos em vortex e deixados em banho-maria por 20' a 80°C. Aliquotas de 1 ml foram retiradas de cada amostra para a realização da diluição em série ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ). Placas de Petri contendo 20 ml de meio de cultura Luria-Bertani (LB) receberam 100 µl de cada diluição. As amostras foram mantidas a 30° C durante 24 h e, posteriormente, foi realizada a contagem das colônias de bacterianas. As colônias foram ajustadas para unidades formadoras de colônias (UFC) por local do fruto, expressas em  $\log_{10}$  UFC/ml, onde cada UFC correspondeu a uma célula viável de *Btk*. O delineamento foi inteiramente casualizado com 10 repetições para cada local do fruto.

**2.4. Influência da adição de surfactante na eficácia de Dipel® WG.** Frutos de maçãs (n= 114) foram testados quanto a influência do surfactante Ag-Bem® (Dow AgroSciences Industrial Ltda., São Paulo, SP) na eficácia de *Btk*, utilizando o produto comercial Dipel® WG (concentração de 100 g de i.a.  $100 \text{ L}^{-1}$ ). Para tanto foram realizadas as seguintes aplicações: i. Dipel® + surfactante Ag-Bem® na concentração de 50 mL  $100 \text{ L}^{-1}$ ; ii. Dipel® sem adição de surfactante; iii) testemunha 1- aplicação com água destilada + surfactante Ag-Bem®; iv) testemunha 2- aplicação somente com água destilada. Maçãs “em maturação fisiológica” foram imersas nas soluções durante 20”. Após secagem por 2 h, em temperatura ambiente, as maçãs foram colocadas em recipientes de polietileno (300 mL) e infestadas com uma neonata de *G. molesta* depositada no exocarpo mediano de cada fruto com livre escolha para penetrar no fruto. Os frutos ficaram acondicionados em sala climatizada de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70% UR e fotoperíodo de 16:8 h (L:E).

A avaliação da mortalidade foi feita aos sete dias após o tratamento dos frutos. A avaliação de mortalidade das larvas foi obtida por meio de cortes longitudinais na espessura de aproximadamente 0,5 cm nas maçãs, até encontrar a larva. Estas foram consideradas mortas quando não responderam ao toque do pincel. Esse procedimento foi realizado com auxílio de microscópio estereoscópico. Também foi verificada a preferência de entrada das neonatas nas maçãs, quantificando-se e analisando as galerias em três estruturas dos frutos: pedúnculo, exocarpo mediano e cálice.

**2.5. Influência dos métodos de aplicação de Dipel® WG.** Maçãs ‘Eva’ (n= 90) foram tratadas com uma solução do inseticida Dipel® WG (100 g de i.a. 100 L<sup>-1</sup>) por diferentes métodos: 1. pulverização; 2. imersão; 3. imersão + injeção do inseticida; 4. pulverização de água destilada; 5. imersão em água destilada; 6. imersão + injeção em água destilada;

Tratamento 1 - os frutos foram pulverizados individualmente com Dipel® WG por meio de um atomizador (500 ml) marca Desaga nº 124000 (Heidelberg, Alemanha), por 20” até o ponto de escorrimento em todas as faces da maçã; tratamento 2 - os frutos foram imersos na solução Dipel® WG por 20” (Fig. 2); tratamento 3 - foi realizado a imersão dos frutos por 20” na solução Dipel® WG + injetado. Foi direcionado um jato forçado da solução de inseticida (1 ml) para dentro do cálice e do pedúnculo por meio de seringa descartável; tratamentos 4, 5 e 6 tiveram as mesmas condições experimentais dos tratamentos 1, 2 e 3, respectivamente, utilizando somente água destilada ao invés da solução Dipel® WG.

Após 2 h de secagem, os frutos foram transferidos para recipientes de polietileno e cada maçã recebeu três neonatas de *G. molesta*, depositadas no exocarpo mediano de cada fruto. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições, cada uma com três frutos. A mortalidade foi avaliada sete dias após a infestação, conforme metodologia descrita no experimento 2.2. O experimento foi conduzido em sala climatizada de 22 ± 1°C, 70% UR e fotoperíodo de 16:8 h (L:E).



Figura 2. Tratamento de *Btk* por imersão (A) e disposição das maçãs para acompanhamento do bioensaio (B).

**2.6. Análise Estatística.** Os dados que não apresentaram normalidade foram transformados em  $\sqrt{x}$ . Utilizou-se análise de variância pelo teste F ao nível de ( $P \leq 0,05$ ) e comparação de médias pelo teste de Fisher – LSD (Least Significant

Difference), utilizando o programa STATGRAPHICS Centurion XVI. A mortalidade corrigida foi calculada pela fórmula de Abbott (1925).

### 3. RESULTADOS

**3.1. Qualidade da aplicação por teste de coloração.** Os métodos de pulverização e imersão não diferiram nos níveis de intensidade de coloração do cálice. No entanto o método de imersão + injeção foi o único tratamento que não apresentou coloração no nível 3 para esta estrutura ( $F= 3,50$ ;  $df= 2$ ;  $P= 0,0488$ ) (Tabela 1). No pedúnculo, houve maior concentração de corante nos tratamentos de pulverização ( $F= 6,73$ ,  $df= 2$ ;  $P= 0,0055$ ) e imersão + injeção ( $F= 21,50$ ;  $df= 2$ ;  $P < 0,0001$ ). Nestes métodos de aplicação houve maior porcentagem de frutos com pedúnculo 100% coloridos. No método de imersão não houve diferença entre os níveis de coloração do pedúnculo ( $F= 1,29$ ;  $df= 2$ ;  $P= 0,2963$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de frutos ( $\pm$  EP) em três níveis de deposição de uma solução colorida sobre maçãs 'Eva' nas estruturas do pedúnculo e cálice, submetidas por três métodos de aplicação.

Métodos de aplicação	n <sup>2</sup>	<sup>1</sup> Nível 1	Nível 2	Nível 3
		Cálice		
Pulverização	8	37,50 $\pm$ 18,30 aA	50,00 $\pm$ 18,90 aA	12,50 $\pm$ 12,50 aAB
Imersão	8	25,00 $\pm$ 16,37 aA	25,00 $\pm$ 16,37 aA	50,00 $\pm$ 18,90 aA
Imersão + injeção	8	50,00 $\pm$ 18,90 aA	50,00 $\pm$ 18,90 aA	<b>0,00 <math>\pm</math> 0,00 bB</b>
		Pedúnculo		
Pulverização	8	<b>75,00 <math>\pm</math> 16,37 aA</b>	12,50 $\pm$ 12,50 bA	12,50 $\pm$ 12,50 bA
Imersão	8	37,50 $\pm$ 16,37 aA	50,00 $\pm$ 16,90 aA	12,50 $\pm$ 11,18 aA
Imersão + injeção	8	<b>87,50 <math>\pm</math> 12,50 aA</b>	12,50 $\pm$ 12,50 bA	0,00 $\pm$ 0,00 bA

<sup>1</sup>Níveis de coloração: nível 1- estrutura totalmente colorido (100%); nível 2- estrutura parcialmente colorido 50%); nível 3- fruto não colorido; <sup>2</sup>Número de frutos observados. Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ( $P \leq 0,05$ ).

**3.2. Concentração de células viáveis de Btk em maçã.** As médias de contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Btk* foram significativamente diferentes no pedúnculo, exocarpo mediano e cálice ( $F= 450,46$ ;  $df= 5$ ;  $P < 0,001$ ) (Fig. 3). O cálice foi a região do fruto com maior concentração de UFC de *Btk* (4,55  $\log_{10}$ ), em torno de

18% mais do que no pedúnculo. O exocarpo mediano apresentou a menor concentração de colônias. Na testemunha com água destilada não foi observado presença de células bacterianas.

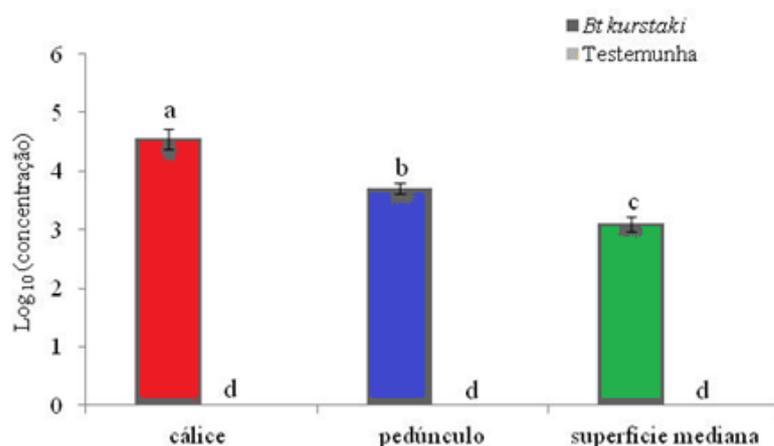


Figura 3. Concentração (média  $\pm$  EP) de *B. thuringiensis kurstaki* no cálice, pedúnculo e exocarpo mediano de maçãs submetidas à imersão com Dipel<sup>®</sup> WG. Analisadas por meio do teste LSD ( $P \leq 0,05$ ).

**3.3. Influência da adição de surfactante na eficácia de Dipel<sup>®</sup> WG.** A mortalidade de neonata de *G. molesta* nos tratamentos de Dipel<sup>®</sup> com e sem surfactante não diferiram estatisticamente entre si. Houve diferença apenas em relação à testemunha ( $F = 25,09$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 2). A mortalidade corrigida das larvas submetidas ao tratamento com Dipel<sup>®</sup> sem adição de surfactante foi superior (24,19%) ao tratamento com adição de surfactante (13,98%).

Tabela 2. Porcentagem média de mortalidade ( $\pm$  EP) e mortalidade corrigida de larvas de *G. molesta* em maçãs imersas em Dipel<sup>®</sup> com e sem adição de surfactante.

Tratamento	Com adição de surfactante		Sem adição de surfactante		
	n <sup>1</sup>	Mortalidade (%)	MC <sup>2</sup> (%)	Mortalidade (%)	MC (%)
Dipel <sup>®</sup> WG	114	16,67 $\pm$ 4,14 aA	13,98	25,83 $\pm$ 6,48 aA	24,19
Testemunha	118	3,33 $\pm$ 2,25 aB		1,67 $\pm$ 1,67 aB	

<sup>1</sup>Número de larvas observadas; <sup>2</sup>MC- Porcentagem de mortalidade corrigida (Abbott, 1925). As médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ( $P \leq 0,05$ ).

A preferência de penetração de larvas de *G. molesta* no cálice da maçã foi superior a 70%, na comparação entre as demais estruturas (pedúnculo e exocarpo mediano) nos dois tratamentos: Dipel® WG ( $F= 47,05$ ;  $df= 2$ ;  $P <0,0001$ ) e testemunha ( $F= 52,43$ ;  $df= 2$ ;  $P <0,0001$ ) (Tabela 3). A porcentagem de penetração das larvas no exocarpo mediano foi superior (20,83%) nos frutos tratados com Dipel® WG ( $F= 7,89$ ;  $df= 1$ ;  $P= 0,0073$ ). O local de menor preferência de entrada das larvas foi no pedúnculo com uma porcentagem inferior a 9,17% em ambos os tratamentos.

Tabela 3. Preferência de entrada de neonatas ( $\pm$  EP) de *G. molesta* em maçãs no cálice, pedúnculo e exocarpo mediano.

Tratamento	Local de entrada na maçã (%)			
	n <sup>1</sup>	Pedúnculo	Exocarpo mediano	Cálice
Dipel® WG	120	6,67 $\pm$ 2,60 cA	20,83 $\pm$ 2,55 bA	72,50 $\pm$ 3,77 aA
Testemunha	120	9,17 $\pm$ 2,94 bA	13,33 $\pm$ 3,93 bB	76,67 $\pm$ 5,73 aA

<sup>1</sup>n- número de frutos observados; as médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, pelo teste LSD ( $P \leq 0,05$ ).

**3.4. Influência dos métodos de aplicação de Btk.** Não houve diferença estatística na comparação dos diferentes métodos de aplicação em relação à mortalidade de neonatas de *G. molesta* ( $F= 0,02$ ;  $df= 2$ ;  $P= 0,9823$ ), porém a mortalidade das larvas diferiu significativamente na comparação entre os frutos tratados com Btk e a testemunha ( $F= 48,55$ ;  $df= 1$ ;  $P <0,0001$ ) (Tabela 3). A mortalidade corrigida nos tratamentos de pulverização e imersão + injeção ficou entre 24 e 26%, enquanto que no método de imersão a mortalidade foi reduzida a 13,31%.

Tabela 4. Mortalidade ( $\pm$  EP) de larvas de *G. molesta* infestadas em maçãs submetidas à diferentes métodos de aplicação do inseticida Dipel<sup>®</sup> em laboratório.

Métodos de aplicação	Dipel <sup>®</sup> WG (%)	n <sup>1</sup>	Testemunha (%)	n <sup>1</sup>	Mortalidade corrigida <sup>2</sup> (%)
Pulverização	31,52 $\pm$ 2,84 aA	89	6,94 $\pm$ 3,13 bA	89	26,51
Imersão+ injeção	30,70 $\pm$ 4,08 aA	88	8,89 $\pm$ 3,63 bA	90	23,92
Imersão	24,10 $\pm$ 4,06 aA	88	13,47 $\pm$ 2,11 bA	89	13,31

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste LSD ( $P \leq 0,05$ ). <sup>1</sup>n- número de larvas observadas; <sup>2</sup>Porcentagem de mortalidade corrigida (Abbott, 1925).

## 4. Discussão

Dipel<sup>®</sup> está registrado no MAPA para o controle de *G. molesta* em macieira e recomendado para uso durante a pré-colheita e colheita da maçã, em função do intervalo de segurança. Estudos de avaliação da eficácia de Dipel<sup>®</sup> mostraram mortalidade de *G. molesta* inferior a 50% em maçã, não sendo viável a sua aplicação no campo na concentração recomendada pelo fabricante (MFP, dados não publicados). Procurando investigar os fatores que contribuíram para esta baixa mortalidade, foram realizados estudos envolvendo diferentes métodos de aplicação de Dipel<sup>®</sup> no fruto e deposição de esporos de *Btk* sobre o exocarpo, pedúnculo e cálice da maçã.

**4.1. Qualidade da aplicação por teste de coloração.** O objetivo de usar um corante foi de qualificar a deposição da tinta em relação às estruturas da maçã e como isso poderia ser relacionar com a deposição da solução de Dipel<sup>®</sup> WG. A estrutura que apresentou maior coloração foi o pedúnculo, em 75% das maçãs testadas nos tratamentos pulverização. Parece natural que o pedúnculo seja a região da maçã que mais receba uma quantidade de solução colorida, pois a posição natural do fruto na árvore faz com que esta seja um depósito natural de produto. O cálice foi em geral uma região de menor deposição da tinta, visto que, a forma do exocarpo não permite que haja escorrimento para o interior. O teste de imersão do fruto foi o método que apresentou baixa quantidade de corante no interior do cálice. É possível que, ao imergir os frutos na solução, tenha ocorrido a formação de bolha de ar na cavidade do cálice, impedindo a entrada de produto através das sépalas. Para melhorar a qualidade da aplicação da tinta, foi necessário haver uma injeção dirigida para o interior do fruto, assim, houve uma melhora na deposição da tinta em relação à simples imersão. Poderia se dizer que com a corrente de ar produzida pelo pulverizador turbo atomizador contribuiria para melhorar a qualidade da deposição da solução no interior do cálice, embora precise ser comprovado.

**4.2. Concentração de células viáveis de *Btk* em maçã.** A estrutura do cálice recebeu o maior número de células viáveis de *Btk* por fruto (4,55 log<sub>10</sub>) (Fig. 2). Essa maior concentração pode estar relacionada com o tamanho da amostra destacada do fruto, ou

seja, a área isolada nesta região compreendeu não somente a cavidade do cálice, como também a parte externa das sépalas e uma borda do exocarpo, o que aumenta a área de tecido analisado. Provavelmente, a concentração de *Btk* é maior no exocarpo que contorna o cálice, devido ao escorrimento natural da calda pulverizada. A baixa concentração de células de *Btk* no exocarpo mediano da maçã se deve provavelmente à camada cerosa que a cutícula possui (Scherrer-Montero et al., 2009), dificultando a aderência de *Btk* neste local.

**4.3. Influência da adição de surfactante.** Os tratamentos de Dipel® WG com o surfactante Ag-Bem não melhorou a mortalidade das neonatas *G. molesta* (Tabela 1). Embora os produtores adicionem surfactantes aniônicos na solução de inseticidas para promover uma melhor distribuição e adesão do produto sobre o fruto, os nossos resultados mostraram que este procedimento não aumentou a mortalidade de *G. molesta*. Resultados semelhantes também foram observados por Siqueira & Grutzmacher (2005) na cultura do pessegueiro. Independentemente da presença de surfactante, a mortalidade das larvas em ambos tratamentos foi muito baixa e não corresponde ao mínimo necessário para um controle de pragas.

**4.4. Influência do método de aplicação de *Btk*.** Os métodos de aplicação de Dipel® WG por pulverização, imersão + injeção e somente imersão não apresentaram diferença estatística na mortalidade de *G. molesta* (Tabela 4). A mortalidade das larvas nos métodos de pulverização e imersão + injeção de Dipel® WG ficaram em torno de 25%, próxima ao bioensaio 3.3., o que é considerada como insatisfatória.

O uso de *B. thuringiensis* em macieira foi recomendado para o controle de larvas de *G. molesta* por Monteiro & Souza (2010) em trabalhos realizados em pomar. De acordo com a metodologia utilizada pelos autores, houve redução de perda de frutos em relação à testemunha, entretanto, na prática e em vários pomares se observou resultados conflitantes (LBM, comunicação pessoal). Outros estudos para determinar a eficácia de *B. thuringiensis* realizados em dieta alimentar se mostraram positivos para *Bonagota salubricola* (Lepidoptera: Tortricidae) (Pereira et al., 2018).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado em recomendações dos fabricantes, produtores de maçã adicionam surfactantes a solução inseticida Dipel<sup>®</sup> WG (MAPA, 2021) visando melhorar a aderência do ingrediente ativo aos frutos. Com isso, aumentaria a chance de que as neonatas se contaminem ao entrarem nas maçãs. Apesar disso, foi mostrado que os surfactantes aniônicos adicionados na solução de inseticidas não melhoraram o desempenho da formulação Dipel<sup>®</sup> WG em relação as neonatas. A baixa mortalidade encontrada nos nossos estudos pode estar relacionada a vários fatores, entre eles os métodos de aplicação e a quantidade de *Bacillus* sobre o fruto.

Comparando a mortalidade obtida nos três métodos de aplicação de Dipel<sup>®</sup>, não se observou melhora na eficácia de *B. thuringiensis* para neonatas de *G. molesta*, mesmo quando foi injetada uma solução de inseticida no cálice. Considerando que as larvas de *G. molesta* tiveram a preferência de penetrar no fruto através do cálice (> 72%), esperava-se que o jato forçado de Dipel<sup>®</sup> WG nessa região pudesse aumentar a eficácia do produto, o que não ocorreu. Segue as dúvidas quanto a quantidade de *Btk* nas estruturas da maçã? Os resultados com corante mostraram que o pedúnculo foi onde teve a melhor cobertura, entretanto, a região do cálice também apresentou uma boa coloração.

A estrutura cerosa da película da maçã pode reduzir a adesão da bactéria no exocarpo mediano (Scherrer-Montero et al., 2009), o que justificaria a baixa concentração de *Btk*. Entretanto, Siqueira & Grutzmacher (2005) tiveram resultados semelhantes quando utilizaram pêssegos como substrato, o que contradiz a ideia de que a cerosidade é um importante fato para a maçã, visto a película do pêssego é mais áspera e sem cera. O escorrimento natural da solução inseticida após uma pulverização é em direção ao cálice, o que faz desta estrutura um local de elevada concentração de células viáveis de *Btk* (Fig. 2), portanto as larvas teriam condições de estarem em contato com esses esporos.

Todavia, é provável que a baixa eficácia de Dipel<sup>®</sup> WG não esteja relacionada com a concentração, deposição e aderência da solução no fruto, mas com o comportamento alimentar da larva. Esta hipótese foi apresentada por Andermatt et al.

(1988), estes autores verificaram que larvas de *C. pomonella* alimentadas com fatias de maçã, previamente tratadas com carvão ativado, apresentavam manchas escuras no intestino médio, fato que não ocorreu com as larvas depositadas no exocarpo da maçã tratada com carvão ativado.

Outros autores também sugeriram que a baixa eficácia de *Btk* pode estar relacionada com o comportamento alimentar de tortricídeos (Simpson, 1903; Bovey, 1966; Garcia & Touza, 1969, Reissing et al., 1984). O mesmo foi constatado por Myers et al. (2006), quando avaliaram em diferentes cultivares de maçã. Resultados insatisfatórios também foram encontrados por Neto e Silva et al. (2011) em testes realizados com maçãs imersas em inseticidas reguladores de crescimento, os quais atuam por ingestão.

De uma forma geral é dito que as larvas de tortricídeos se alimentam do exocarpo para entrar no fruto. Esse comportamento de entrarem no fruto logo após a eclosão se deve a necessidade das larvas de estar ao abrigo da desidratação, além do processo biológico específico dessas larvas. Em laboratório, observou-se que após uma hora da eclosão, as larvas já apresentam sinais de perturbação fisiológica (LBM, comunicação pessoal). No pomar, os fatores abióticos devem acentuar ainda mais esse efeito sobre as neonatas, o qual obriga uma penetração rápida no fruto. A questão é o quanto uma neonata precisa se alimentar para penetrar no fruto. Provavelmente, a alimentação é mínima, até porque as pinças bucais das neonatas ainda estão em formação, assim a prioridade poderia ser a entrada no fruto. A preferência de entrada de neonatas no fruto foi via cálice, o que corrobora com outros trabalhos de Monteiro (dados não publicados) realizados em Fraiburgo, Vacaria, Lages e São Joaquim (Fig. 4). Neste estudo, foram coletados 1.512 frutos com sintomas de ataques de grafolita, dos quais, 41,0% das neonatas penetraram no fruto pelo cálice e 31,6% pelo pedúnculo. Observa-se que a entrada via exocarpo mediano foi elevada em algumas vezes, possivelmente pela presença de frutos se desenvolvendo em cachopas.

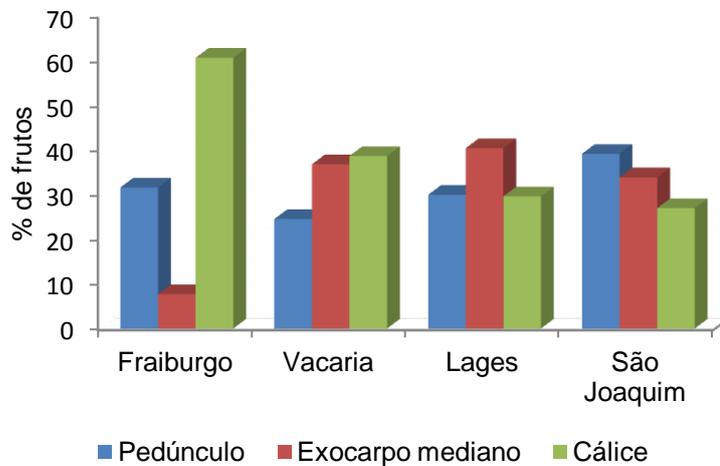


Figura 4. Porcentagem de maçãs apresentando sintomas de entrada de neonatas em função da estrutura do fruto.

As áreas do exocarpo de frutas desenvolvidas em cachopas deve receber menos inseticida, quer seja sintético ou biológico. O mesmo pode ocorrer com o cálice, pois esta estrutura é formada de sépalas e estames, que se projetam para fora e que podem bloquear parcialmente a entrada de uma solução pulverizada, o que já foi observado por Myers et al. (2006). Além disso, no interior do cálice há uma estrutura, chamada de estilo, que se comunica com o endocarpo, assim a larva que se encontra dentro do cálice poderá ter passagem direta para o interior do pseudofruto da maçã sem ter a necessidade de se alimentar do exocarpo, em consequência não se contaminando com *Btk*.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal Economic Entomology*, 18: 265-267, 1925.
- Andermatt, M., Mani, E., Wildbolz, T., Lüthy, P. Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 49: 291-295, 1988.
- Andrei, E. *Compêndio de defensivos agrícola*. 8.ed. São Paulo: Edição do autor. 1380 p., 2009.
- Bovey, P. Super-famille des Tortricoidea: Le Carpocapse ou ver des pommes et poires. En: Balachowsky, A.S., (Eds). *Entomologie appliqué à l'agriculture*, 2: 653-734, 1966 .
- De Reede, R.H., Gruys, P., Vaal, F. Leafrollers in apple IPM under regimes based on *Bacillus thuringiensis*, on diflubenzuron or on epofenonane. *Entomologia Experimentales Applicata*, 37: 263-274, 1985.
- Garcia, M.F., Touza, E.E. *Bioecología de Grapholita molesta* Busck y sistema de alarma. Buenos Aires: INTA, 8p., 1969.
- Gill, S.S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90: 69-74, 1995.
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremond, J.C., El Idrissi, Ammari M.A. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie*, 1: 59-64, 1981.
- Hazen, J.L. Adjuvants-terminology, classification, and chemistry. *Weed Technology*, 14: 773-784, 2000.
- Jaastad, G., Roen, D., Nornes, L. Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* against lepidopterans in Norwegian apple orchards. *Entomologia Experimentalis Applicata*, 100: 347-353, 2001.
- Knaak, N., Fiuza, M.L. Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência Desenvolvimento*, 36: 26-31, 2006.

- Monteiro, L.B., Souza, A. Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* em Fraiburgo – SC. Revista Brasileira Fruticultura, 32: 423-428, 2010.
- Morandi, Filho W.J., Botton, M., Grützmacher, A.D., Zanardi, O.Z. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e inseticidas químicos no controle de *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick, 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) em Videira. Arquivos Instituto Biologia, 74: 129-134, 2007.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit: Consulta de produtos formulados. Disponível em: <[https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso: Ago 2021.
- Myers, C.T., Hull, L.A., Krawczyk, G. Seasonal and cultivar associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. Journal Economic Entomology, 99: 349-358, 2006.
- Neto e Silva, O.A.B., Botton, M., Garcia, M.S., Silva, A. Efeito de inseticidas reguladores de crescimento sobre ovos, lagartas e adultos de *Grapholita molesta* (BUSCK) (Lepidoptera: Tortricidae). Revista Brasileira Fruticultura, 33: 420-428, 2011.
- Pereira, J., Monteiro, L.B., Sosa-Gómez, D.R. Mortalidade de lagarta-enroladeira-da-maçã expostas à diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis* em dieta artificial, em três períodos de avaliação. Revista Brasileira de Fruticultura, 40: e732, 2018.
- Reissig, W.H., Weires, R.W., Forshey, W.G.C., Roclofs, W.L., Lamb, R.C., Aldwinckle, H.S. Insect management in disease-resistant dwarf and semi-dwarf apples trees. Environmental Entomology, 13: 1201- 1207, 1984.
- Scherrer-Montero, C.R., Antes, R.B., Santos, R.P., Schwarz, L.L., Santos, L.C., Andreazza, C.S., Bender, R.J. Efeitos da escovação em máquina classificadora na cutícula de maçãs cultivares Fuji e Gala. Biotemas, 22: 9-17, 2009.
- Simpson, C.B. The codling moths. U.S. Department Agriculture, Div. Ent., 41, 105 p., 1903.
- Siqueira, P.R.E., Grützmacher, A.D. Avaliação de inseticidas para controle da *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de

pessegueiro sob produção integrada na região da Campanha do RS. Revista Brasileira de Agrociência, 11: 185-191, 2005.

Souza, B., Santa-Cecília, C.V.L., Sousa, V.O.L. Ocorrência e danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em pessegueiros no município de Caldas, MG. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 29: 185-188, 2000.