



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Este exemplar corresponde a redação final da  
tese defendida pela candidata Cláudia Maria  
Waib e aprovada pela Comissão Julgadora.

07/04/92

PATOGENICIDADE DE *Bacillus*  
*thuringiensis* VAR. *tenebrionis*  
A COLEÓPTEROS DE PRODUTOS  
E SUBPRODUTOS ARMAZENADOS

CLÁUDIA MARIA WAIB <sup>in 1992</sup>

Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual de Campinas (UNICAMP) para a  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Biológicas (Parasitologia).

Orientador:  
Prof. Dr. MOHAMED E. M. HABIB†

Campinas

1992

W131p  
16687/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

9215-007

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho, mais que o fruto de um esforço individual, é o resultado da colaboração de muitas pessoas. A não citação nominal de qualquer um desses colaboradores não significa de maneira alguma qualquer ponderação na ajuda prestada. No entanto, gostaria de registrar aqui meus agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Mohamed Habib, pela orientação, amizade, carinho, apoio e muita compreensão durante todo o período de realização deste trabalho.

Aos grandes amigos Ana Tereza, Heitor, Maria Eugênia, Desi, Gisele e Elaine, pelo apoio e atenção em diferentes fases do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), por tornar possível a realização de minhas pesquisas.

À ABBOTT LABORATORIES LTDA. (EUA) e BASF S.A. (ALEMANHA), pela doação dos preparados experimentais avaliados no presente trabalho.

Ao Sr. Juverlande Lugli, do Departamento de Genética, IB/UNICAMP, pelo auxílio na realização dos experimentos de plaqueamento.

Aos professores, amigos e funcionários dos Departamentos de Zoologia e Parasitologia, pelo apoio e amizade durante todos esses anos, e em especial ao Sr. Ricardo Fabiano, pela assistência prestada sempre que necessária.

Aos meus pais e irmãos, sempre presentes, e que souberam mais do que nunca me apoiar e encorajar nos momentos difíceis desta etapa tão importante da minha vida.

Ao Armando, que mais do que marido sempre foi um grande amigo e companheiro, me apoiando e ajudando muito, sempre com muita paciência e carinho durante todos os momentos deste trabalho, especialmente naqueles mais difíceis.

Ao Lucas (Catatau), pelos chutes e grandes emoções, sem os quais seria muito mais difícil escrever esta tese.

Dedico este trabalho aos dois grandes amores da minha vida, Armando e Lucas

## ÍNDICE

	página
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO HISTÓRICA	
2.1. COLEÓPTEROS PRAGAS DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS ARMAZENADOS .....	05
2.2. CONTROLE DE COLEÓPTEROS PRAGAS DE PRODUTOS ARMAZENADOS .....	12
2.2.1. MÉTODOS FÍSICOS E DE HIGIENE .....	12
2.2.2. MÉTODOS QUÍMICOS .....	14
2.2.3. MÉTODOS BIOLÓGICOS .....	17
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> E A VARIEDADE <i>tenebrionis</i> ..	23
3. MATERIAL & MÉTODOS	
3.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS ESPÉCIES DE COLEÓPTEROS AVALIADAS .....	30
3.2. BIENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE .....	33
3.3. PLAQUEAMENTO E CONTAGEM DE COLÔNIAS DOS PREPARADOS EXPERIMENTAIS (PLATE COUNTING) .....	34

4.	RESULTADOS & DISCUSSÃO	
4.1.	SINTOMATOLOGIA EXTERNA	39
4.2.	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE COLEÓPTEROS	
	PRAGAS AD <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	43
4.2.1.	<i>Lasioderma serricorne</i>	43
4.2.2.	<i>Sitophilus zeamais</i>	45
4.2.3.	<i>Tribolium</i> sp.	45
4.2.4.	<i>Tenebrio molitor</i>	46
4.2.5.	<i>Cryptolestes ferrugineus</i>	49
4.2.6.	<i>Carpophilus</i> sp.	49
4.2.7.	PATOGENICIDADE DE <i>B. thuringiensis</i> VAR. <i>tenebrionis</i>	54
4.3.	PLAQUEAMENTO DOS PREPARADOS EXPERIMENTAIS	61
5.	CONCLUSÕES	66
6.	RESUMO	69
7.	SUMMARY	72
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

## 1 . INTRODUÇÃO

Até a década de 60, poucas foram as manifestações contra a utilização de inseticidas químicos no controle de insetos prejudiciais. Tais inseticidas tiveram sua expansão a partir da II Guerra Mundial, com a descoberta dos organoclorados, principalmente o DDT, como poderosos agentes químicos de combate.

Contudo, ao final daquela década, começaram os problemas devido à má utilização destes inseticidas, principalmente os de desenvolvimento de resistência por parte dos insetos.

A busca de métodos alternativos no controle de vetores e pragas começa a partir de fatos como estes, além da constatação de que os organoclorados podem ser causadores de anomalias genéticas e tumores, são de largo espectro tóxico, e possuem uma longa ação residual, o que torna o problema ainda mais sério quando se pensa a nível de cadeias alimentares (Kucinski, 1986).

Com base nestes fatos, estudos de aspectos biológicos, comportamentais, ecológicos, parasitológicos e patológicos começaram a ganhar destaque na elaboração de medidas de supressão de populações de insetos pragas e de vetores.

As técnicas de Manejo Integrado dessas pragas surgem em resposta ao fracasso de métodos de controle exclusivamente químicos, e englobam desde práticas culturais e legislativas até o controle biológico dos insetos prejudiciais com o uso de

inimigos naturais, como predadores, parasitos e patógenos.

As vantagens ecológicas e econômicas destes métodos de controle têm sido divulgadas por vários pesquisadores nos últimos anos (Metcalfe & Luckmann, 1982 e Gravena, 1987).

Doenças em insetos são importantes fatores de mortalidade em populações de insetos prejudiciais. Ocorrem dependentes de densidade e podem se expressar sob condições de estresse. Os entomopatógenos são importantes aliados do homem no seu esforço para o controle de insetos prejudiciais. Produtos à base desses microrganismos são em geral mais seletivos e ecologicamente mais seguros.

Dentre as estratégias empregadas no MIP, o uso de agentes microbianos ocupa um lugar de destaque, e entre estes uma bactéria entomopatogênica, o *Bacillus thuringiensis* Berliner, é o patógeno mais produzido e utilizado para o controle de insetos daninhos.

Recentemente descoberta, uma nova variedade deste bacilo denominada *tenebrionis* surge como um agente promissor para o controle de coleópteros pragas, aumentando desta maneira o espectro de atividade do *B. thuringiensis*, já amplamente utilizado no controle de lepidópteros e dípteros nos países desenvolvidos.

Na área agrícola, os coleópteros chegam a causar danos muito graves, como no caso do bicudo do algodão, grande ameaça à produção algodoeira (Pierozzi Jr., 1985). Outras culturas como a cana-de-açúcar, a soja e o arroz também sofrem prejuízos por ataque de coleópteros (Gallo et al., 1988).

Os produtos armazenados representam um dos substratos mais procurados por coleópteros, sofrendo danos consideráveis pela ação de larvas e adultos destes insetos. A entomofauna de grãos e subprodutos é praticamente cosmopolita.

Os coleópteros de grãos armazenados, como outros grupos de insetos, caracterizam-se pelo elevado potencial biótico, isto é, pela alta capacidade de reprodução. Estimativas de danos e perdas pelo ataque de insetos pragas de grãos armazenados atingem 5 a 10% da produção mundial, o que equivale à quantidade necessária para alimentar 130 milhões de pessoas anualmente. Estas estimativas se referem somente ao ataque dos insetos ao embrião e endosperma, não se considerando outros fatores como: aquecimento da massa de grãos, disseminação de fungos e outros (Lima *et al.*, 1983).

Em áreas tropicais, o ataque destes insetos alcança uma maior intensidade, pois as condições de temperatura e umidade são extremamente favoráveis.

A busca de novos métodos de controle dos insetos de grãos armazenados tem se intensificado nos últimos anos, principalmente aqueles que ofereçam segurança aos produtos tratados destinados à alimentação. Na verdade, esta busca tem sido motivada não só pela presença de resíduos de inseticidas em produtos tratados, como também pela resistência desenvolvida pelas pragas a um limitado número de inseticidas internacionalmente aceitos para tratamentos de grãos e seus subprodutos. O desenvolvimento de tal resistência seria facilitado pelo ambiente restrito em que estes insetos vivem (Parkin, 1965).



Para que se possa introduzir outros métodos de controle de pragas de grãos armazenados, é necessário que se tenha informações detalhadas, tanto com relação aos insetos-alvo, como dos agentes de controle e seu espectro de ação.

Diferentemente dos estudos de Toxicologia Química, os de Patologia Microbiana exigem investigações contínuas e sem nenhuma estrapolação, uma vez que o sucesso de um agente microbiano depende, dentre outros fatores, de seu grau de especificidade em relação ao hospedeiro. À medida em que se descubram novas variedades ou sorotipos, é necessária a definição correta da interação patógeno-hospedeiro, incluindo a determinação da gama dos possíveis hospedeiros do agente etiológico. Assim, torna-se mais fácil a indicação ou recomendação de um determinado agente para o controle de uma determinada espécie prejudicial.

No presente trabalho pretende-se avaliar a patogenicidade de dois formulados experimentais à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* a espécies de coleópteros pragas de grãos e subprodutos armazenados.

Tais investigações incluem, além do levantamento de espécies de coleópteros susceptíveis a este agente, a determinação do estágio de desenvolvimento mais susceptível para cada espécie e observações da sintomatologia externa da patogenia.

Deste modo, o presente trabalho visa acrescentar informações fundamentais sobre o potencial desta nova variedade do bacilo no controle de coleópteros pragas, especialmente no Brasil.

## 2. REVISÃO HISTÓRICA

### 2.1. COLEÓPTEROS PRAGAS DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS ARMAZENADOS

Desde que o homem aprendeu a cultivar e armazenar grãos entre uma colheita e outra, os insetos têm sido quase sempre constantes como parasitas, no seu primitivo modo de vida. O mais antigo registro de insetos associados com alimentos armazenados é sobre um besouro em jarros que provavelmente continham grãos ou farinha, encontrados em uma tumba egípcia da VI Dinastia, de cerca de 2500 a.C. (Alfieri, 1931 *apud* Solomon, 1965). Este mesmo autor registrou muitas outras espécies em vasos e caixas de madeira na antecâmara da tumba de Tutankamon (1350 a.C.). Muitas das espécies estavam embebidas em resina ou materiais oleosos, incluindo *Tribolium castaneum* Herbst. (Tenebrionidae), *Lasioderma serricorne* Fabricius (Anobiidae), *Gibbium psylloides* (Ptinidae) e *Stegobium paniceum* (Anobiidae). Todos estes insetos são hoje bem conhecidos pelos entomologistas como pragas em armazéns e silos.

A ordem Coleoptera abrange a maioria das espécies pragas de produtos armazenados. Os insetos que vivem em produtos armazenados apresentam características peculiares para adaptação neste tipo de ambiente. A forma adulta desses coleópteros possui

uma estrutura corpórea resistente e de pequena dimensão, o que permite o movimento pelos reduzidos espaços existentes entre os grãos. Além disso, possuem uma alta capacidade de reprodução, permitindo que poucos indivíduos, em um curto espaço de tempo, formem uma população considerável (Puzzi, 1977 e Merck & Gomes, 1982).

Em áreas tropicais, como é o caso do Brasil, o ataque destes insetos alcança uma maior intensidade, pois as condições climáticas como temperatura e umidade elevadas favorecem a multiplicação das espécies que normalmente infestam os grãos e seus subprodutos, provocando perdas elevadas nos produtos armazenados. A temperatura mais favorável situa-se na faixa dos 23 a 30 °C, e a umidade da massa de grãos em 15% (Puzzi, 1977 e Merck & Gomes, 1982).

A temperatura é um fator limitante no desenvolvimento dos coleópteros pragas de grãos, assim como para qualquer outro inseto. Howe (1965) demonstrou que a temperaturas inferiores a 17 °C o desenvolvimento era insignificante na maioria das 43 espécies estudadas. Evans (1987), trabalhando com estágios imaturos de coleópteros pragas de grãos, verificou que quando expostos a uma temperatura de 9 °C ou 13,5 °C, havia uma baixa taxa de sobrevivência dos indivíduos. A grande maioria dos coleópteros que atacam os grãos armazenados e farinhas são de origem subtropical e não apresentam o fenômeno de diapausa, que é como um "repouso" fisiológico, durante algum tempo, de uma das fases da vida do inseto a fim de transpor um período de adversidade como temperaturas muito baixas ou muito altas (Puzzi, 1977).

Outro fator limitante é o teor de umidade dos grãos. Grãos com teores de umidade abaixo de 9% não oferecem condições para a multiplicação da maioria dos insetos que atacam armazéns. A elevação do teor de umidade dos grãos constitui o meio ideal para o desenvolvimento de microrganismos, fermentações e infestações de insetos (Puzzi, 1977).

Muitos são os prejuízos causados pelos coleópteros em grãos e subprodutos armazenados, dentre eles: perda de peso e do poder germinativo dos grãos, poluição da massa de grãos pela presença de ovos, larvas, pupas e adultos além de fragmentos de insetos mortos, excrementos de microrganismos que vivem associados aos insetos, e disseminação de fungos na massa de grãos, sendo que todos estes fatores levam à desvalorização do produto (Puzzi, 1977).

Alguns coleópteros de grãos armazenados podem ainda ser hospedeiros de parasitas, como é o caso de *Tribolium sp.* e *Tenebrio molitor* Linnaeus (Tenebrionidae), que atuam como hospedeiros intermediários de *Hymenolepis nana* e *H. diminuta* (Cestoda). Os besouros adquirem os parasitas pela ingestão de ovos encontrados em fezes contaminadas de roedores. A infecção no homem ocorre pela ingestão direta dos ovos do parasita, ou quando os besouros são ingeridos acidentalmente com o alimento infestado (Phillips & Burkholder, 1984 e Kettle, 1985).

Besouros da família Dermestidae, que são encontrados em muitos ambientes de armazenagem podem causar irritações na pele e mucosa nasal, quando os restos destes insetos são reduzidos à pó. Há registros também de coleópteros, como alguns curcu-

lionídeos de grãos, causando alergias inalantes, como rinites e asma. Ainda, temos os tenebrionídeos que produzem quinonas como defesa contra predação; estas substâncias podem causar no homem dermatites, eritemas e a formação de pápulas e vesículas, além de conjuntivites e ulceração na córnea por exposição aos seus vapores (Phillips & Burkholder, 1984).

Em geral, os insetos que atacam os grãos e seus subprodutos dividem-se em pragas primárias e secundárias, de acordo com a sua forma de alimentação. Desse modo, temos que as pragas primárias são aquelas que têm a capacidade de atacar grãos inteiros e sadios, podendo ou não passar seu estágio imaturo dentro do grão. Como estes insetos têm a capacidade de romper o tegumento externo do grão, atingindo o endosperma, do qual se alimenta, constitui o grupo de pragas de maior importância econômica. As pragas secundárias, por sua vez, são aquelas que não atacam os grãos inteiros. Elas se alimentam de grãos partidos, partículas de grãos e do pó deixados pelo ataque das pragas primárias (Puzzi, 1977).

Dentre os coleópteros pragas de grãos e subprodutos armazenados pode-se citar representantes de cinco importantes famílias: Tenebrionidae, Cucujidae, Anobiidae, Curculionidae e Nitidulidae.

Pertencentes à família Tenebrionidae, temos três espécies de maior importância econômica: *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* e *T. confusum* DuVal.

O besouro *T. molitor* é comum em depósitos de farinhas e cereais e os danos são ocasionados tanto pelas larvas como

pelos adultos. Atacam farelos, farinhas, rações e fubá, e preferem produtos em más condições de conservação. As suas larvas atacam não somente os subprodutos dos cereais como também devoram insetos mortos. É uma espécie de ampla distribuição em todo o mundo, e no Brasil é encontrada inclusive no Estado de São Paulo. Já *T. confusum* e *T. castaneum* apresentam quase a mesma importância econômica, distribuição geográfica e produtos hospedeiros, atacando todos os tipos de cereais moídos, frutas secas, chocolates, nozes e grãos de leguminosas. Podem também atacar as partes germinativas dos grãos, fazendo perfurações mais ou menos amplas e profundas (Costa Lima, 1955; White, 1982; Hill, 1983 e ICI, 1988). Sua presença geralmente é um sinal de que os grãos estão infectados por pragas primárias. Assim como *T. molitor*, os danos são causados tanto por larvas como por adultos. Ocorrem em todas as regiões do mundo. No Brasil são encontradas nos Estados de São Paulo, Maranhão, Pernambuco, Bahia, Pará, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

As três espécies citadas acima são consideradas pragas secundárias, mesmo quando chegam a atacar grãos (Mariconi, 1963).

Da família Cucujidae pode-se citar *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens). Ataca milho e outros cereais, farinhas, frutas secas, macarrão e até carne seca. É uma praga secundária, pois ataca grãos já infestados ou danificados, principalmente na região do embrião. Nos grãos perfeitos, conseguem provocar riscos e cicatrizes. É uma espécie cosmopolita (ICI, 1988). No Canadá é considerada a mais séria praga de importância econômica em grãos,

chegando a infestar 53% dos vagões de carga ferroviários em 1978 (Smith, 1985).

Na família Anobiidae temos *L. serricorne* que ataca principalmente o fumo estocado, mas pode também infestar frutos secos, tapetes, papéis, grãos e seus derivados. Larvas e adultos escavam galerias em fardos de tabaco; chegam a abrir furos em charutos e muitas vezes o fumante aspira um pó irritante deixado como detrito pelo besouro. Quando atacam grãos e sementes, frequentemente mostram preferência pelo embrião para se alimentar. Pode ser uma praga muito séria em muitos armazéns. No Brasil é encontrado principalmente nos Estados de São Paulo, Pernambuco, Bahia e Rio Grande do Sul (Mariconi, 1963 e Gallo et al., 1988).

A família Curculionidae é muito conhecida, não somente por ter representantes que atacam grãos armazenados como também por aqueles que atacam culturas agrícolas, como por exemplo o bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*. Como pragas importantes de grãos armazenados podemos citar *Sitophilus oryzae* (Linnaeus), *S. zeamais* Motschulsky e *S. granarius* (Linnaeus). As duas primeiras espécies atacam, além do arroz e milho, sorgo, farinha e outros cereais estocados. Os adultos além disso, também devoram substâncias secas como pêssegos, uvas e macarrão. A terceira espécie ataca trigo, arroz, cevada e milho. Causam sérios prejuízos como perda de peso, do valor comercial e do poder germinativo quando os grãos se destinam à semeadura. Além disso, o orifício da postura dos ovos pode servir como porta de entrada para pragas secundárias. As espécies *S. oryzae* e *S. zeamais* colocam seus ovos diretamente nos grãos, tanto no campo como nos ar-

mazéns. Já *S. granarius* não é capaz de infestar os grãos no campo, pois tendo seu par de asa membranosas atrofiadas, não é capaz de voar, infestando grãos somente em armazéns e silos. Todas estas espécies são cosmopolitas. No Brasil, *S. oryzae* e *S. zeamais* são encontradas principalmente em São Paulo, Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Já *S. granarius* tem uma distribuição mais restrita no país, sendo encontrada em São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (Mariconi, 1963; Hurlock, 1965; Munro, 1966 e Hill, 1983).

Dentro da família Nitidulidae encontra-se *Carpophilus hemipterus* (Linnaeus) e *C. dimidiatus* (Fabricius), ambas espécies cosmopolitas, sendo encontradas no Brasil, em São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro (Mariconi, 1963). *C. hemipterus* é considerado uma praga primária em frutas secas, especialmente passas e figos, enquanto que *C. dimidiatus* tem como produtos hospedeiros o milho, cacau e chocolate (Hill, 1983). Na Nigéria, foram encontrados em sacos de coquinhos juntamente com outras espécies como *T. castaneum* e *L. serricornis*, dentre outras, causando uma perda de peso de cerca de 21% e uma alta porcentagem de ácido graxo na reduzida porcentagem de óleo contida nestas sementes (Allotey, 1988).



## **2.2. CONTROLE DE COLEÓPTEROS PRAGAS DE PRODUTOS ARMAZENADOS**

O controle de insetos pragas de produtos armazenados nos trópicos, depende principalmente do uso de fumigantes e inseticidas residuais. No entanto, os métodos de controle dessas pragas podem ser agrupados em: físicos e de higiene, químicos e biológicos.

### **2.2.1. MÉTODOS FÍSICOS E DE HIGIENE**

Métodos físicos e de higiene englobam vários tratamentos, e visam complementar as demais medidas de controle de coleópteros pragas dos produtos armazenados.

Os principais métodos físicos de controle são o uso de temperaturas altas e baixas, o que inclui o resfriamento de certos produtos como grãos; armazenamento hermético e irradiação por raios gama ou elétrons (Munro, 1966).

O uso de armadilhas e feromônios também pode ser incluído neste grupo, embora os feromônios sejam substâncias químicas liberadas do corpo de um indivíduo, ou produzidas sinteticamente, que afetam o comportamento de outro indivíduo da mesma

espécie. Muitos coleópteros associados a produtos armazenados, como *S. oryzae* e *C. ferrugineus*, produzem feromônios que estimulam respostas específicas como alarme, dispersão, agregação ou atração do sexo oposto. Atualmente, a maioria dos feromônios utilizados para fins de monitoramento são sintéticos (Hodges, 1984a; Loschiavo *et al.*, 1986; Pierce *et al.*, 1986 e Trematerra & Girgenti, 1989).

Os métodos de higiene são básicos e indispensáveis para evitar a infestação dos produtos estocados, em qualquer tipo de depósito. A preparação do local antes do armazenamento deve incluir a limpeza do depósito de resíduos de colheitas anteriores e aplicação de inseticida nas paredes, piso, teto, portas e estrados. Para evitar focos de infestação deve-se desinfetar periodicamente os veículos de transporte como vagões de carga e contêineres e as máquinas de colheita e limpeza dos grãos, assim como tubulações; fumigar a sacaria usada vazia, evitar misturar colheitas novas e velhas e manter a sacaria suspensa sobre estrados. Além disso, o depósito e arredores devem ser limpos periodicamente, eliminando grãos soltos, resíduos, palha etc. (Gallo *et al.*, 1988).

É importante salientar que as medidas de higiene são diferentes para cada tipo de depósito (Munro, 1966).

## 2.2.2 MÉTODOS QUÍMICOS

Os métodos químicos para o controle de pragas de produtos armazenados podem ser agrupados em três tipos básicos: fumigação ou expurgo, nebulização e pulverização.

A fumigação é provavelmente um dos mais antigos métodos de controle químico de pragas utilizado pelo homem (Munro, 1966). A operação de fumigação consiste em encerrar os produtos em um ambiente hermético, onde é introduzido o inseticida em estado gasoso, chamado fumigante. Em geral, os grãos são expurgados antes da armazenagem. Depósitos de madeira e silos rústicos, apresentando rachaduras e fendas de vários tamanhos por onde se verificam fugas de gás, não se prestam para a operação do expurgo em virtude de perdas apreciáveis da concentração dos fumigantes, tornando a operação pouco eficiente. Os principais fumigantes utilizados em todos os países que possuem grande produção de grãos, são o brometo de metila (Cherif *et al.*, 1985 e Bell *et al.*, 1988) e a fosfina (Hole *et al.*, 1976; Winks, 1985; Price & Mills, 1988; Hobbs & Bond, 1989 e Celaro *et al.*, 1991). No Brasil, estes dois produtos são muito empregados (Puzzi, 1977). Como todo método de controle, a fumigação tem vantagens e desvantagens. A principal vantagem é a mortalidade imediata e quase total das pragas após a aplicação; contudo, não há proteção residual (Dobie, 1984).

A nebulização é o processo pelo qual os inseticidas são dissolvidos em óleo leve, como por exemplo o óleo diesel,

transformando-se em densa e penetrante neblina. Para que a nebulização possa ser eficiente, o armazém deve achar-se bem vedado, a fim de evitar-se a fuga do nebulizante.

A pulverização consiste na aplicação de inseticidas dissolvidos em diluentes, sendo a água o mais comum. Pode ser feita aplicando-se na correia transportadora dos grãos quando os mesmos estão passando pela esteira, nas pilhas de ensacados, em milhos em espigas e aplicações periódicas na superfície da massa de grãos quando houver reinfestações de pragas vindas de fora ou quando os grãos forem armazenados por períodos mais longos (ICI, 1988).

Estes dois tipos de tratamentos com inseticidas podem proteger o produto contra as infestações por alguns meses (Puzzi, 1977). Malation e Pirimifós-metil são os inseticidas de contato mais comumente usados em todo o mundo para o tratamento de grãos armazenados (White, 1985; White & Nowicki, 1986 e Shawir *et al.*, 1988). Alguns inseticidas e fungicidas vêm sendo avaliados para uso em produtos armazenados devido a resistência desenvolvida por vários insetos aos dois produtos citados anteriormente. São eles: fenoxicarb, cipermetrina, fenvalerate, diclorvós, cloropirifós e outros (Joia *et al.*, 1985; Kramer *et al.*, 1985; Benezet *et al.*, 1986 e Chander & Ahmed, 1989). Conhecidos como inseticidas de 3ª geração, os reguladores de crescimento (diflubenzuron, metoprene etc.) podem também ser usados no controle de coleópteros pragas de produtos armazenados, sendo uma opção a ser considerada no caso de populações resistentes aos produtos convencionalmente utilizados (Mian & Mulla, 1982). Sua baixa toxicidade

dade aos vertebrados os torna muito adequados, especialmente no caso de produtos destinados à alimentação (Stockel & Edwards, 1981).

A resistência desenvolvida por certas espécies de coleópteros pragas a alguns inseticidas amplamente utilizados para o seu controle é um problema que se estende por todo o mundo. Vários trabalhos vêm demonstrando o desenvolvimento de resistência aos organofosforados e às fosfinas nos últimos dez anos (Zettler, 1982; White & Loschiavo, 1985; Beeman & Nanis, 1986; Subramanyam *et al.*, 1989; Beeman & Wright, 1990 e Zettler & Cuperus, 1990). Na realidade, o desenvolvimento de resistência por estes insetos já havia sido detectado há muito tempo em um levantamento mundial realizado pela FAO durante 1972/73, inclusive no Brasil, em decorrência do uso contínuo e inadequado dos inseticidas. À semelhança de outros grupos de insetos, a resistência de coleópteros também tem sido relacionada à utilização repetida por um longo período de tempo, com dosagem e períodos insuficientes de exposição. A constatação de resistência aos fosforados e às fosfinas alertam para a necessidade de um manejo adequado no controle de pragas de grãos armazenados, o que inclui a diversificação de inseticidas utilizados e a busca de métodos alternativos de controle (Brown, 1986 e Pacheco, 1991).

### 2.2.3. MÉTODOS BIOLÓGICOS

Os métodos biológicos de controle de pragas existem há muito tempo, mas somente a partir dos anos 60 começaram a ser melhor estudados e difundidos, devido à constatação dos problemas causados pela má utilização dos inseticidas químicos como os organossintéticos.

O controle biológico de pragas possui várias vantagens sobre outros tipos de controle, desde que seja seguro, permanente e econômico, exercendo um papel fundamental dentro do Manejo Integrado de Pragas (Stehr, 1975).

De Bach (1964) definiu o termo controle biológico natural como sendo "a ação de parasitos, predadores ou patógenos na manutenção de uma densidade baixa de uma população, a qual poderia ocorrer na sua ausência".

O termo controle biológico aplicado foi recentemente redefinido pela "National Academy of Sciences" (EUA) como sendo "o uso de organismos naturais ou modificados, genes ou produtos gênicos, para reduzir os efeitos de organismos indesejáveis (pragas), a favor de organismos desejáveis como lavouras, árvores, animais e insetos, além de microrganismos benéficos" (Garcia *et al.*, 1988).

As tentativas iniciais de controle biológico das pragas de produtos armazenados foram feitas pelos chineses, que levavam ninhos de formigas do faraó, *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera, Formicida), aos depósitos de produtos agrícolas pa-

ra que estas atacassem as larvas das pragas presentes nesses locais (Simmonds *et al.*, 1976).

Com relação aos predadores e parasitos, nenhuma estratégia de controle normalmente poderia eliminar a população praga em um armazém ou silo, mas isto é também comum para muitos procedimentos convencionais de controle. Além disso, a completa eliminação de uma população é muito raramente o objetivo econômico no controle de pragas. Sob condições especiais, estes inimigos naturais podem chegar a causar uma eliminação de uma pequena população praga, mas isto normalmente não ocorre na prática por várias razões, incluindo a migração da praga e a tendência dos inimigos naturais de não eliminarem por completo sua fonte de alimento. A relação inimigo natural-praga é dependente de densidade, ou seja, a eliminação da praga normalmente conduziria à eliminação do predador ou parasito, a menos que ele tivesse uma fonte de alimento secundária (Haines, 1984).

Poucas espécies de predadores e parasitos têm sido objeto de estudos ecológicos e comportamentais e, vários destes estudos fixam-se somente em um aspecto da biologia da espécie ou foram conduzidos em condições que não são relevantes na prática.

Como alguns exemplos de predadores temos o ácaro *Cheyletus eruditus* (Acarina, Cheyletidae) que ataca dentre outras espécies, larvas jovens de coleópteros e *Blattisocius tarsalis* (Acarina, Ascidae), predador de ovos de *Ephestia cautella* (Lepidoptera, Pyralidae) que utiliza ovos de *T. castaneum* como fonte secundária de alimento (Haines, 1984). Press *et al.* (1975) verificaram que o predador *Xylocoris flavipes*

(Hemiptera, Anthocoridae) causava uma supressão muito efetiva nas populações de *T. castaneum*, e que esta supressão era obtida com uma baixa densidade inicial de *X. flavipes*. Arbogast (1976) também observou que o mesmo predador causava uma supressão muito grande em populações de *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera, Cucujidae). LeCato *et al.* (1977) mostraram que *X. flavipes* previne o crescimento de pequenas populações residuais de pragas e sugeriram que este predador poderia ser utilizado para eliminar infestações residuais em armazéns.

No caso de parasitos, pode-se citar *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera, Pteromalidae), que ataca vários coleópteros, parasitando seus estágios imaturos. Estudos recentes têm demonstrado que populações residuais de *S. oryzae* podem ser suprimidas com sucesso por fêmeas deste parasito (Press *et al.*, 1984 *apud* Cline *et al.*, 1985). Outros parasitos que também atacam estágios imaturos são *Choetospila elegans* (Hymenoptera, Pteromalidae) e *Heterospilus prosopidis* (Hymenoptera, Braconidae). Williams e Floyd (1971) demonstraram que em um período de quatro meses, sob condições de laboratório, o número de *S. zeamais* produzidos quando *A. calandrae* e *C. elegans* estavam presentes era de 5 e 11%, respectivamente, do número produzido na ausência destes parasitos. Almeida e Matioli (1984) observaram uma relação inversa entre o crescimento populacional de *C. elegans* e maiores densidades populacionais de *S. oryzae* em duas variedades de milho, indicando a inviabilidade da utilização deste microhimenóptero como agente no controle biológico em milho armazenado. O braconídeo *H. prosopidis* ataca por



sua vez, larvas de bruquídeos como *Callosobruchus chinensis* e *Zabrotes subfasciatus* (Hassell et al., 1985 e Kistler, 1985). *A. calandrae* e *C. elegans* parasitam também larvas de *L. serricorne* (Bare, 1942).

Muitas espécies de predadores e parasitos são comuns e amplamente distribuídas em produtos armazenados nos trópicos. Existem evidências que sugerem que a utilização destes agentes de controle seria viável com a modificação dos procedimentos convencionais de controle, uma vez que estes têm um amplo espectro de ação. Outro aspecto importante a ser considerado é que a introdução desses agentes para controle de pragas de produtos armazenados representaria uma maior quantidade de resíduos no produto a ser comercializado e consumido.

Dentre os patógenos encontrados causando doenças em populações de pragas de grãos tem-se protozoários, fungos, vírus e bactérias.

As doenças causadas por esses agentes microbianos são frequentemente fatais às pragas, especialmente no estágio larval; contudo, não infectam o homem ou himenópteros parasitos. A transmissão dos patógenos pode ocorrer de várias maneiras: pela ingestão de larvas ou adultos mortos infectados, pelo consumo de alimento contaminado, durante o acasalamento ou pela fêmea à sua progênie durante a oviposição (Hodges, 1984b).

Vários protozoários são conhecidos por serem patogênicos à coleópteros. Entre os mais promissores para uso no controle microbiano pode-se citar *Nosema whitei* (Microsporea) para *T. castaneum* e *T. confusum*; *N. whitei* e *N. oryzaephili* para *D.*

*surinamensis*, e *Nattesia trogodermæ* (Sporozoea) para *Trogoderma* spp. (Coleoptera, Dermestidae). Além destes, *N. dispersa* e *Adelina tribolii* (Sporozoea) também têm recebido muita atenção. A possível mistura de esporos de protozoários, em particular os de *N. whitei*, a grãos armazenados tem sido discutida. Como protozoários são relativamente específicos, sugere-se que seria necessária a aplicação de um "coquetel" de patógenos para combater a gama de coleópteros pragas que podem ser encontrados em qualquer situação de armazenamento (Tanada, 1976; Hodges, 1984b e Maddox, 1987).

Com relação à utilização de fungos entomopatogênicos, poucas são as informações disponíveis. O uso destes patógenos como agentes microbianos de controle em grãos armazenados é altamente discutível, uma vez que a umidade relativa necessária para a sobrevivência do patógeno e conseqüente desenvolvimento da doença é extremamente alta, o que praticamente inviabiliza seu uso. Hluchý e Samsináková (1989) chegaram a avaliar a susceptibilidade de adultos de *S. granarius* a um preparado à base de *Beauveria bassiana*, contudo a umidade necessária para a obtenção de resultados satisfatórios era muito alta (cerca de 90%). Searle e Doberski (1984) avaliando a infecção em adultos de *C. surinamensis* pelo mesmo fungo, também utilizaram umidades semelhantes e não observaram mortalidade alguma até 50 dias após aplicação com 90% de umidade relativa.

Throne (1989) descreveu pela primeira vez um fungo ascomiceto do gênero *Dimeromyces* associado a adultos de *C. ferrugineus* coletados em um armazém graneleiro nos EUA. Entretanto, a maioria dos fungos desta família aparentemente não chegam a

causar sérios danos em seus hospedeiros.

Outros fungos entomopatogênicos como *Metarrhizium anisopliae* e *Spicaria farinosa* já foram observados parasitando larvas de *T. molitor* em estudos de laboratório, além de fungos facultativos como *Fusarium* sp. e *Myrothecium* sp (Roberts, 1981 e Zacharuck, 1981).

Os registros de viroses em coleópteros pragas de produtos armazenados são escassos. Um dos poucos existentes é o de Martignoni e Iwai (1981) onde foi relatada uma virose causada por um iridovírus em *T. molitor*.

Apesar da grande diversidade de bactérias entomopatogênicas, os relatos da ocorrência de bacterioses em coleópteros pragas de produtos armazenados são muito escassos. *Serratia marcescens* é uma das poucas espécies isoladas destes insetos (Steinkaus, 1959 e Bucher, 1963). Seis outras espécies de bactérias já foram avaliadas em laboratório contra *T. castaneum*. São elas: *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Bacillus cereus* e *B. subtilis* (Kumari & Neelgund, 1985).

Desde 1982, uma nova variedade do *Bacillus thuringiensis* patogênica a coleópteros vem sendo avaliada no sentido de se determinar seu potencial no controle microbiano de pragas. Esta variedade, *tenebrionis*, é o objeto de estudo do presente trabalho.

### 2.3. *Bacillus thuringiensis* E A VARIEDADE *tenebrionis*

A bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* Berliner ocupa o primeiro lugar entre os patógenos mais produzidos e utilizados para o controle de insetos prejudiciais (Habib, 1982 e Dulmage, 1989).

*B. thuringiensis* foi isolada pela primeira vez por Berliner em 1911, a partir de larvas doentes de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidae) e descrita pelo mesmo autor em 1915. Desde então, várias linhagens deste bacilo vêm sendo isoladas de diferentes espécies de insetos (Habib, 1982).

Das bactérias entomopatogênicas, as esporulantes e facultativas como *B. thuringiensis* merecem uma atenção especial, principalmente do ponto de vista econômico por poderem ser produzidas em larga escala. Sendo uma bactéria cristalífera, produz protoxinas durante sua esporulação. Estas são proteínas depositadas como cristais parasporais e, em alguns casos, também são encontradas na superfície do esporo. Quando o cristal (e/ou esporo) é ingerido por um inseto susceptível, a protoxina é solubilizada no intestino médio, já que todas as espécies susceptíveis apresentam um pH intestinal alcalino. O intestino de tais insetos também contém proteases necessárias para converter as protoxinas em polipeptídeos tóxicos e talvez receptores na superfície de suas células epiteliais, nos quais as toxinas se ligariam para iniciar sua ação. Evidências eletrofisiológicas e bioquímicas su-

gerem que as toxinas geram poros na membrana celular do epitélio intestinal, deste modo perturbando o balanço osmótico. Conseqüentemente, as células incham e sofrem lise; o inseto pára de se alimentar, sofre paralisia intestinal e/ou geral e finalmente, morre. O sintoma de parada alimentar que o inseto sofre após a infecção oral tem alto valor do ponto de vista aplicado, pois através de aplicações de produtos comerciais à base deste patógeno, o inseto praga pode parar de causar danos antes mesmo de morrer, como por exemplo no caso de lagartas fitófagas (Fast *et al.*, 1978; Habib, 1982; Aronson *et al.*, 1986 e Hofte & Whiteley, 1989).

As variedades de *B. thuringiensis* produzem algumas toxinas já caracterizadas, além de substâncias com ação tóxica pouco definida para muitos insetos; dentre elas temos: endósporo,  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina e  $\delta$ -endotoxina, sendo que a última representa o fator mais importante no quadro patológico causado por este bacilo.

A  $\beta$ -exotoxina é altamente tóxica para muitos insetos, e certos vertebrados (Habib & Andrade, 1986). Como esta toxina não sofre degradação no intestino de bovinos, sua adição à dieta destes animais foi sugerida para o controle de moscas nas fezes. Contudo, seu efeito teratogênico e a possível mutagenicidade levaram ao impedimento de seu uso (Burges, 1975).

O nome  $\delta$ -endotoxina foi sugerido por Heimpel (1967) para o cristal proteico, o qual em si não tem ação tóxica, sendo considerado uma protoxina. A  $\delta$ -endotoxina é uma das moléculas que participam na formação do cristal. Portanto, a dissolu-

ção deste cristal é sempre necessária para a liberação e atuação desta toxina (Habib & Andrade, 1986).

Esta bactéria é atualmente representada por mais de 30 sorotipos, classificados através de análise de antígeno-H (aglutinação flagelar). Estas diferenças sorológicas e bioquímicas, por sua vez, estão diretamente relacionadas a fenômenos de especificidade e virulência (De Barjac, 1981; Habib & Andrade, 1986; Jaquet *et al.*, 1987 e De Barjac & Frachon, 1990).

Dentro de cada sorotipo podemos ainda classificar cada variedade do bacilo por meio de patotipos. Assim, temos que uma variedade tida como patotipo A é patogênica a larvas de lepidópteros, patotipo B para larvas de nematóceros e patotipo C, para coleópteros (Krieg *et al.*, 1983). Carroll e colaboradores (1989) citam ainda o patotipo D, patogênico tanto a lepidópteros como a dípteros, e o patotipo E para aquelas variedades que apesar de produzirem a  $\delta$ -endotoxina, não são patogênicas para nenhuma das espécies avaliadas até o momento.

Deste modo, podemos dizer que a var. *kurstaki* (H:3a-3b) pertence ao patotipo A e a var. *israelensis* (H:14) ao patotipo B. Ambos sorotipos já vêm sendo industrializados há muito tempo, devido à sua grande aplicabilidade tanto na área agrícola como na de Saúde Pública (Amaral, 1982; Habib, 1982 e 1983; Habib & Andrade, 1983; Habib *et al.*, 1986; Amaral FQ, 1986; Krieg, 1987; Payne, 1988; Andrade, 1989 e Dulmage, 1989).

Em 1982, na Alemanha, Krieg e colaboradores isolaram de pupas de *T. molitor* uma nova variedade de *B. thuringiensis* denominada *tenebrionis* e caracterizada como patotipo C do soroti-

po H:Ba-8b. Ao contrário dos cristais de outros patotipos deste mesmo sorotipo, os cristais desta variedade são solúveis não somente em meio alcalino como também em soluções salinas saturadas. Além disso, têm a propriedade única de recristalização de sua forma tóxica depois de sofrer diálise, sem alteração da composição do cristal (Krieg *et al.*, 1983; Bernhard, 1986; Krieg *et al.*, 1987b e Li *et al.*, 1988).

O cristal parasporal do *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* é diferente do das outras variedades, sendo plano com um formato quadrangular, retangular ou romboidal. Após a paralisia intestinal provocada pela toxina e germinação dos esporos no intestino, ocorre a invasão da hemocele e a septicemia, que leva o inseto à morte. Foi comprovado que a  $\beta$ -exotoxina não participa deste processo, pois a var. *tenebrionis* não produz toxina desta natureza (Krieg *et al.*, 1984). A ação deste bacilo sobre larvas de coleópteros fitófagos segue o esquema já conhecido para o patotipo A: interrupção da alimentação após poucas horas e morte após poucos dias, dependendo da dose (Krieg *et al.*, 1983).

Em 1985 foi isolada nos EUA uma variedade de *B. thuringiensis* também patogênica a coleópteros, a qual foi denominada *san diego* (Herrnstadt *et al.*, 1986). Segundo Krieg e colaboradores (1987a) e Huger & Krieg (1989), a var. *san diego* é idêntica à var. *tenebrionis*, assim como o isolado EG-2158, descrito por Donovan e colaboradores (1988).

Trabalhos vêm sendo desenvolvidos na Europa e nos EUA nos últimos anos, visando determinar o potencial desta nova variedade no controle de coleópteros daninhos. A maioria dos

estudos, no entanto, tem se concentrado nas investigações com relação à patogenicidade deste bacilo a uma praga inexistente no Brasil, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). É uma praga importante das plantações de batata e tomate, mostrando-se muito susceptível ao bacilo (Krieg *et al.*, 1984; Jaques & Laing, 1988; Ferro & Gelernter, 1989; Riethmuller & Langenbruch, 1989; Zehnder & Gelernter, 1989; Langenbruch & Riethmüller, 1990 e Hough-Goldstein *et al.*, 1991). Além destes, há estudos relacionados à caracterização do gene da proteína tóxica (Herrnstadt *et al.*, 1987; Hofte *et al.*, 1987; Jahn *et al.*, 1987; Donovan *et al.*, 1988; McPherson *et al.*, 1988; Sekar, 1988 e Rhim *et al.*, 1990) e estudos com outros crisomelídeos, como *Chrysomela scripta* (Bauer, 1990).

Vandenberg (1990) mostrou que o *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* pode reduzir a longevidade de abelhas quando estas são expostas à concentrações muito altas deste bacilo, no entanto não chega a causar nenhum quadro patológico visível.

O *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* é um agente muito promissor para o controle de coleópteros pragas e sua descoberta aumenta ainda mais o campo de ação deste patógeno no controle biológico de pragas.

Agentes microbianos como o *B. thuringiensis* oferecem uma série de vantagens sobre os inseticidas químicos. Uma das características importantes é a sua total segurança para vertebrados, insetos benéficos e plantas. A alta especificidade deste patógeno tem a vantagem de não interferir com os predadores e parasitos que naturalmente controlam os insetos alvo. Este efeito



minimiza o número de tratamentos necessários para o controle da praga, e garantem um maior equilíbrio ecológico.

Outra vantagem do *B. thuringiensis* é que o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos alvo parece, ao menos até o presente, ser muito mais lento e menos pronunciado que aos inseticidas químicos. Enquanto as bases para esta diferença não são entendidas supõe-se que os mecanismos de ação da toxina do bacilo possam ser suficientemente complexos, de maneira que mutações gênicas múltiplas no inseto seriam necessárias para o desenvolvimento de resistência. Por outro lado, o mecanismo patológico pode estar ligado a funções celulares essenciais; assim, mutações nestas funções (necessárias para o desenvolvimento de resistência) poderiam ser letais ao inseto (Carlton & Gonzalez, 1986). O único relato de resistência a este bacilo (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) foi feito por McGaughey (1985), onde populações de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) foram mantidas em condições de laboratório sob intensa seleção artificial. Seus estudos revelaram que aquela resistência tratava-se de um caráter recessivo.

Uma terceira vantagem que pode ser apontada no uso de *B. thuringiensis* é que, como produto de uma fermentação, sua produção é menos custosa quando comparada à dos inseticidas químicos. Atualmente, o mercado internacional conta com a comercialização de produtos em formulação de granulados, líquidos e pó molhável deste bacilo, além de perspectivas para a produção de pastilhas efervescentes (para uso em lagoas no controle de dípteros aquáticos). Tal facilidade além da eficiência, da estabilidade

de e da segurança para a fauna não alvo, aumentam consideravelmente o potencial deste patógeno e de seu uso em vários países do mundo, inclusive no Brasil (Burgess, 1986; Carlton & Gonzalez, 1986 e Habib, 1989).

### 3. MATERIAL & MÉTODOS

#### 3.1. OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS ESPÉCIES DE COLEÓPTEROS AVALIADAS

As espécies de coleópteros coletadas, criadas e avaliadas no presente trabalho foram: *Cryptolestes ferrugineus* (Cucujidae), *Lasioderma serricorne* (Anobiidae), *Sitophilus zeamais* (Curculionidae), *Carpophilus* sp. (Nitidulidae), *Tribolium* sp. e *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae).

Estes coleópteros foram obtidos a partir de material infestado proveniente de moinhos e armazéns da região de Campinas (SP), o qual era trazido para triagem em laboratório.

A espécie *T. molitor* foi mantida em frascos de vidro de 3,0 l, enquanto as demais espécies foram mantidas em frascos de vidro menores (0,5 l), sempre fechados com gaze, náilon ou tecido de algodão e elástico (FIGURA 01).



FIGURA 01. Frascos de vidro fechados com tecido de náilon utilizados para a criação dos coleópteros em laboratório.

Os insetos foram mantidos em criação de laboratório sob condições controladas de temperatura ( $25 \pm 2$  °C), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$  U.R.) e fotoperíodo de 12 horas.

As dietas oferecidas foram previamente autoclavadas (1 atm, 60 min.) para eliminação de ácaros e outras impurezas, e foram específicas para cada espécie. Deste modo, para as espécies *C. ferrugineus*, *L. serricorne* e *Carpophilus* sp. foi oferecido fubá; para *S. zeamais* foi oferecido milho; para *Tribolium* sp., farinha de trigo, e para *T. molitor*, farelo de trigo.

### 3.2. BIENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE

A susceptibilidade de cada uma das espécies estudadas foi avaliada através de bioensaios realizados no Laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Zoologia - IB/UNICAMP, com dois preparados experimentais à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (H:8a-8b): ABG-6256, fornecido pela ABBOTT LABORATORIES LTDA. (EUA) e outro cedido pela BASF S.A. (Alemanha), ambos em formulação pó-molhável.

O preparado ABG-6256 foi avaliado para todas as espécies citadas anteriormente, enquanto que o preparado da BASF foi avaliado somente para *L. serricornis*, *Carpophilus* sp. e *T. molitor*.

A susceptibilidade das espécies estudadas foi avaliada tanto no estágio de larva como no de adulto, com exceção de *S. zeamais* e *C. ferrugineus*, os quais só foram avaliados no estágio adulto, devido à dificuldades no manuseio do estágio larval.

Nos experimentos com larvas medias de *L. serricornis* foram feitas 02 repetições com 27 indivíduos cada para o preparado ABG-6256 e 02 repetições com 20 indivíduos cada para o preparado da BASF, além dos respectivos lotes de testemunha. Nos experimentos com adultos desta espécie foram feitas 04 repetições com 25 indivíduos cada para o ABG-6256 e 02 repetições com 25 indivíduos cada para o preparado da BASF, além da testemunha.

No caso de larvas pequenas de *T. molitor*, foram feitas 02 repetições com 27 indivíduos cada, e para larvas gran-

des foram feitas 02 repetições com 23 indivíduos cada, para o ABG-6256 e 03 repetições com 15 indivíduos cada para o preparado da BASF, além da testemunha. Para os adultos foram feitas 02 repetições com 15 indivíduos cada para o primeiro preparado e 03 repetições com 15 indivíduos cada para o segundo, além da testemunha.

Para avaliação da susceptibilidade de *Carpophilus* sp. foram feitas 02 repetições com 19 indivíduos cada, tanto para larvas como para adultos, além da testemunha, para ambos os preparados. Neste caso, foram avaliadas larvas pequenas e grandes.

Para avaliações com adultos de *C. ferrugineus*, *S. zeamais* e *Tribolium* sp. foram feitas 04 repetições com 25 indivíduos cada e, para as larvas (medias) de *Tribolium* sp., 02 repetições com 25 indivíduos cada, além das testemunhas.

A testemunha é necessária para o cálculo de correção de mortalidade.

Em todos os experimentos realizados, a concentração utilizada foi de 1:10 (preparado:dieta), sendo que os preparados foram homogeneizados manualmente na dieta de cada inseto.

Durante a realização dos bioensaios, os insetos foram mantidos em estufa BOD - Mod. 347F - Fanem, a  $25 \pm 1$  °C e  $70 \pm 10\%$  U.R., na ausência de luz, em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura).

As avaliações foram feitas em intervalos de tempo em progressão geométrica, a partir do momento em que começava a haver mortalidade. As observações foram efetuadas com auxílio de lupa estereoscópica.

O critério utilizado para a avaliação da susceptibilidade dos coleópteros ao patógeno foi o de Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>), e os valores de mortalidade foram corrigidos pela fórmula de Abott (1925).

Cada TL<sub>50</sub> foi calculado pelo método de regressão linear entre o próbite da porcentagem de mortalidade e o logarítmico do tempo, usando-se um programa em BASIC para microcomputador PC xt II - ITAUTEC, desenvolvido pelo Prof. Dr. C.F.S. Andrade, do Departamento de Zoologia - IB/ UNICAMP (não publicado). Além disso, os dados obtidos também foram submetidos à análise de variância.



### 3.3. PLAQUEAMENTO E CONTAGEM DE COLÔNIAS DOS PREPARADOS EXPERIMENTAIS (PLATE COUNTING)

Esta etapa de estudo teve como objetivo determinar a concentração do patógeno nos dois preparados utilizados (nº de esporos viáveis/ g), uma vez que tais preparados ainda não contam com qualquer processo de padronização (portanto, sem potência nem concentração determinadas). Ainda, esta investigação permitiu a visualização do comportamento do agente patogênico *in vitro*, em termos de dinâmica de germinação e crescimento, e distribuição das unidades infectantes, informações importantes na interpretação do desencadeamento da bacteriose.

Para a realização dos experimentos de plaqueamento dos preparados experimentais à base de *B. thuringiensis* var. *fenebrionis* contou-se com o apoio técnico e logístico do Laboratório de Microorganismos do Departamento de Genética - IB/UNICAMP.

Uma quantidade determinada de cada preparado (50 mg) foi diluída inicialmente em 2,5 ml de solução de "Tween". A partir desta solução foram feitas diluições em solução salina, onde 1,0 ml da solução inicial era adicionado a 9,0 ml de solução salina e assim sucessivamente, para um total de oito diluições (1:10). A partir das três diluições finais foram feitos os plaqueamentos em meio nutriente completo, utilizando-se 0,1 ml por placa de Petri. Para cada diluição foram feitas 03 repetições mais os respectivos controles.

As placas foram mantidas em estufa Fanen Mod. 002/3, a 37 °C e contagens das colônias foram feitas 8, 12 e 15 horas após a inoculação do patógeno.

**MEIO NUTRIENTE COMPLETO (Pontecorvo et al., 1953):**

nitrato de sódio .....	4,0 g
fosfato dihidrogenado de potássio .....	1,5 g
cloreto de potássio .....	0,5 g
sulfato de magnésio 7H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
sulfato de ferro .....	traços
sulfato de zinco .....	traços
glicose .....	10,0 g
peptona .....	2,0 g
caseína hidrolisada .....	1,5 g
extrato de leveduras .....	0,5 g
solução de vitaminas .....	1,0 ml
ágar .....	15,0 g
água destilada .....	1.000 ml

O pH do meio foi ajustado para 6,8 com hidróxido de sódio 4%.

**SOLUÇÃO DE "TWEEN":**

Foi adicionado "Tween 80" à água destilada em uma concentração de 0,1% (V/V). Aliquotas de 2,5 ml desta solução foram colocadas em tubos de ensaio, autoclavadas (1 atm , 20 min.) e conservadas sob refrigeração até o momento de uso.

**SOLUÇÃO SALINA:**

cloreto de sódio .....	8,5 g
água destilada .....	1.000 ml

Frascos contendo 9,0 ml desta solução foram preparados e autoclavados (1 atm , 20 min.) para uso.

## 4. RESULTADOS & DISCUSSÃO

### 4.1 SINTOMATOLOGIA EXTERNA

A sintomatologia da bacteriose provocada por *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* observada entre larvas no presente trabalho seguiram um padrão diferente quando comparada com adultos tratados com o mesmo patógeno, tanto nas fases pré-mortais como nas pós-mortais.

As larvas doentes de *Lasioderma serricorne*, ao contrário das sadias, movimentavam-se mais lentamente, raramente respondendo ao toque. Este mesmo tipo de resposta foi observado em larvas de *Tribolium* sp. tratadas com o bacilo.

As larvas grandes de *Tenebrio molitor* se apresentaram bem mais lentas após 260 h (10,8 dias) da aplicação do patógeno, quase não respondendo a estímulos como toque e presença de luz. É normal em larvas sadias o comportamento de fototropismo negativo, fugindo da luminosidade penetrando na dieta.

Nos experimentos realizados com ambos os preparados (ABG-6256 e BASF) em larvas grandes de *Carpophilus* sp., a maioria já passava aos estágios de pré-pupa e pupa 282 h após a aplicação do patógeno. Grande parte dos indivíduos (cerca de 85%) morria no estágio de pré-pupa (algumas em pupa), tendo a aparência ressecada. Alguns adultos recém-emergidos também chegavam a

morrer, e algumas pupas apresentavam o aspecto deformado 209 h após a aplicação. Este tipo de resultado observado em pupas e adultos poderia ser explicado pelo fato de que, nesta espécie, uma porção remanescente do intestino médio das larvas é incluso no tubo intestinal do adulto (Crowson, 1981), o que poderia acarretar em uma transferência de esporos e cristais, além das formas vegetativas da bactéria, dando continuidade à sua ação patogênica dentro do hospedeiro.

Um dos sintomas externos pré-mortais clássicos da bacteriose como o escurecimento do tegumento a partir de manchas na região mediana do corpo, cobrindo em pouco tempo todo o corpo da larva, observado em larvas de algumas espécies de lepidópteros tratadas com a var. *kurstaki* por Habib (1982) e Amaral F<sup>o</sup> (1986) não pode ser observado nas larvas dos coleópteros estudados. Isto é devido provavelmente ao tipo de coloração natural do tegumento bastante esclerosado destas larvas, que dificultaria a expressão externa gradual dos sintomas (como é o caso de *T. molitor*); ou então em decorrência da grande quantidade de pêlos que recobrem o corpo da larva, como é o caso de *L. serricornis*.

As larvas das espécies de coleópteros avaliadas não sofreram paralisia geral durante o desencadeamento da bacteriose. Também não foi possível observar a ocorrência de paralisia intestinal, embora este tipo de sintoma tenha sido detectado em larvas fitófagas de coleópteros infectados pelo mesmo bacilo (Krieg et al., 1983). Além disso, a morte lenta indicaria a ocorrência de uma septicemia, e não toxemia, como ocorre em algumas espécies de lepidópteros tratados com a var. *kurstaki* e larvas de

dípteros tratadas com a var. *israelensis* (Habib, 1982).

Os principais sintomas pós-mortais observados foram a flacidez do corpo e o escurecimento total do tegumento, atingindo a coloração preta, sem haver contudo odor algum de putrefação. O tegumento não apresentou qualquer rompimento, permanecendo intacto. As larvas mortas secavam gradualmente, adquirindo o aspecto de larvas carbonizadas (FIGURA 02).

O escurecimento do tegumento pode ser explicado pelas alterações histológicas que ocorrem a nível de hemolinfa e tecidos internos. A flacidez, por outro lado, deve ocorrer devido à degeneração do tecido adiposo e dissociações no tecido muscular, as quais se manifestam durante a bacteriose (Steinhaus, 1963; Habib, 1968 e 1982).

Sintomas externos pré-mortais da bacteriose, como por exemplo a mudança de coloração do tegumento, não foram observados nos adultos das espécies avaliadas. Somente alterações comportamentais com relação à resposta dos insetos tratados a estímulos como o toque foram detectadas. Os adultos infectados mostraram-se mais lentos quando comparados aos adultos sadios.

Adultos de *Carpophilus* sp., tratados com o bacilo, tornavam-se muito lentos, geralmente permanecendo em decúbito ventral e com o 2º par de asas expostos, quando em estado pré-mortal. Ao contrário dos adultos sadios, não voavam. Isto pode sugerir a ação do bacilo sobre o sistema neuro-muscular do inseto, do mesmo modo que outras variedades de *B. thuringiensis*, como por exemplo a var. *israelensis* (Habib, 1982 e 1983).

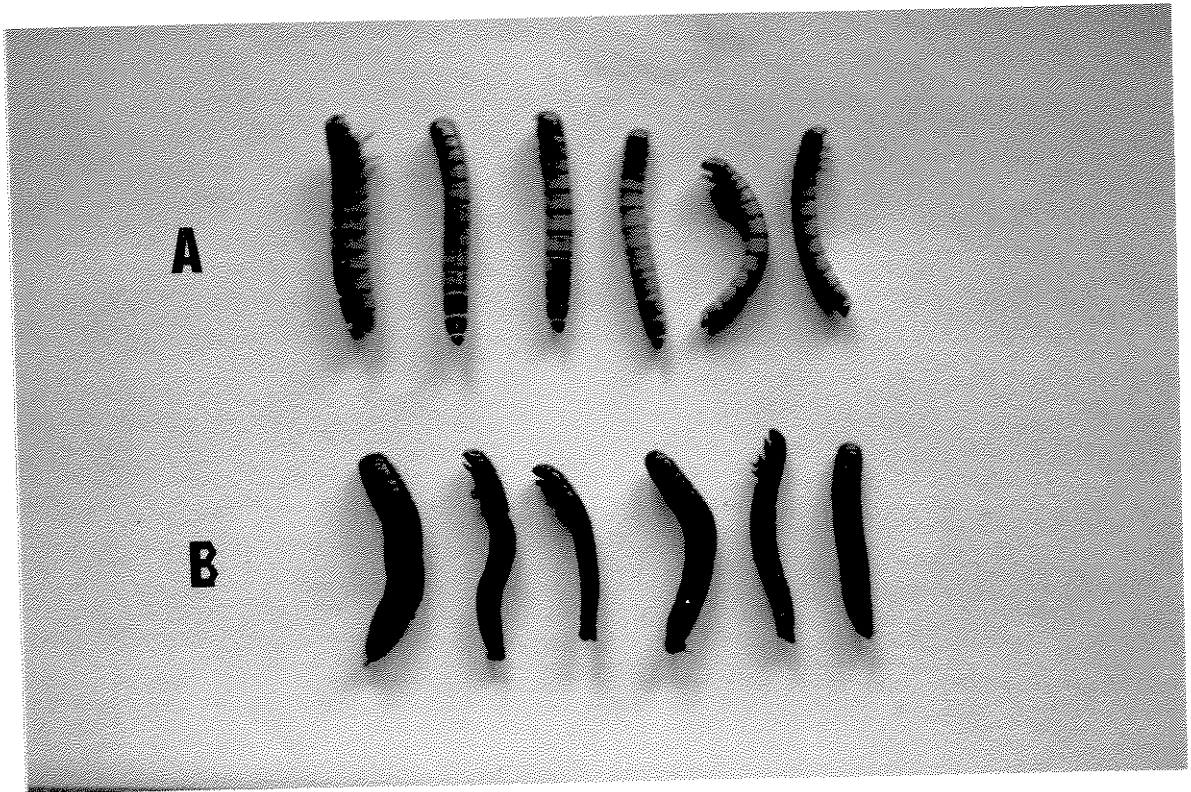


FIGURA 02. Larvas de *Tenebrio molitor*. (A) Larvas sadias ;  
(B) Sintomas pós-mortais das larvas tratadas com *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*.

## 4.2. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE COLEÓPTEROS PRAGAS AO *B. thuringiensis* VAR. *tenebrionis*

### 4.2.1. *Lasioderma serricorne*

A avaliação da susceptibilidade de larvas médias de *L. serricorne* ao preparado ABG-6256 mostrou que, neste estágio, a espécie é susceptível apresentando um TL<sub>50</sub> de 147,91 h (6,1 dias) (FIGURA 03).

Para o preparado da BASF à base da mesma bactéria, as larvas médias desta espécie apresentaram somente 5% de mortalidade após 114 h (4,7 dias) da aplicação. Para o outro preparado, *L. serricorne*, apresentou 27,7% de mortalidade 115,8 h (4,8 dias) após a aplicação.

Pode-se observar portanto, que para as larvas desta espécie o preparado ABG-6256 mostrou-se mais eficiente que o preparado da BASF.

Com relação ao estágio adulto, este mostrou ser pouco susceptível a ambos os preparados. Para o ABG-6256 houve somente 13% de mortalidade 108 h após a aplicação, enquanto que para o preparado da BASF houve 12% de mortalidade 114 h após a aplicação.





#### 4.2.2. *Sitophilus zeamais*

Esta espécie, quando avaliada com o preparado ABG-6256 no estágio adulto, mostrou-se pouco susceptível ao patógeno, apresentando somente 8% de mortalidade em 108 h após a aplicação.

#### 4.2.3. *Tribolium* sp.

Seguindo o mesmo padrão da espécie anterior, os adultos de *Tribolium* sp. também mostraram uma baixa susceptibilidade ao patógeno nas avaliações realizadas com o preparado ABG-6256, com apenas 10% de mortalidade 108 h após a aplicação.

Para as larvas médias desta espécie, avaliadas com o mesmo preparado, o TL<sub>50</sub> foi estimado em 1117,54 h (46,5 dias), com apenas 14,3% de mortalidade após 254,5 h (10,6 dias) da aplicação.

Nota-se que para esta espécie tanto o estágio larval como o adulto não demonstraram uma grande susceptibilidade ao patógeno.

#### 4.2.4. *Tenebrio molitor*

As larvas pequenas de *T. molitor*, avaliadas com o preparado ABG-6256 apresentaram um TL<sub>50</sub> estimado em 437,15 h (18,2 dias), com 29,6% de mortalidade após 254,5 h (10,6 dias) da aplicação. As larvas grandes desta espécie mostraram-se ainda menos susceptíveis, com apenas 13,3% de mortalidade após o mesmo tempo da aplicação do patógeno.

Quando avaliadas com o preparado da BASF, as larvas grandes de *T. molitor* não apresentaram mortalidade alguma até 340 h (14,1 dias) após a aplicação do patógeno, embora apresentassem alguns sintomas conforme já exposto no item 4.1..

Nota-se que, apesar desses resultados mostrarem uma baixa susceptibilidade das larvas de *T. molitor* ao bacilo, o preparado ABG-6256 demonstrou ser mais eficiente que o da BASF, da mesma forma que para as larvas de *L. serricornis*.

Com relação aos adultos de *T. molitor*, estes, no entanto, mostraram ser mais susceptíveis ao patógeno que as larvas. Para o preparado ABG-6256 houve um TL<sub>50</sub> de 70,76 h (2,9 dias) (FIGURA 04), enquanto que para o preparado da BASF o TL<sub>50</sub> foi de 187,01 h (7,8 dias) (FIGURA 05). Pode-se observar que também no caso dos adultos desta espécie, o preparado ABG-6256 mostrou-se mais eficiente que o da BASF.

	LIMITE INFERIOR	TEMPO LETAL MEDIANO	LIMITE SUPERIOR
horas	65.7705	70.7643	76.1372
*****-X-*****-I-*****-X-*****			
N= 30			
VARIANCIA =	.4771	DESVIO PADRÃO =	.6908
		COEF. CORREL. =	.971

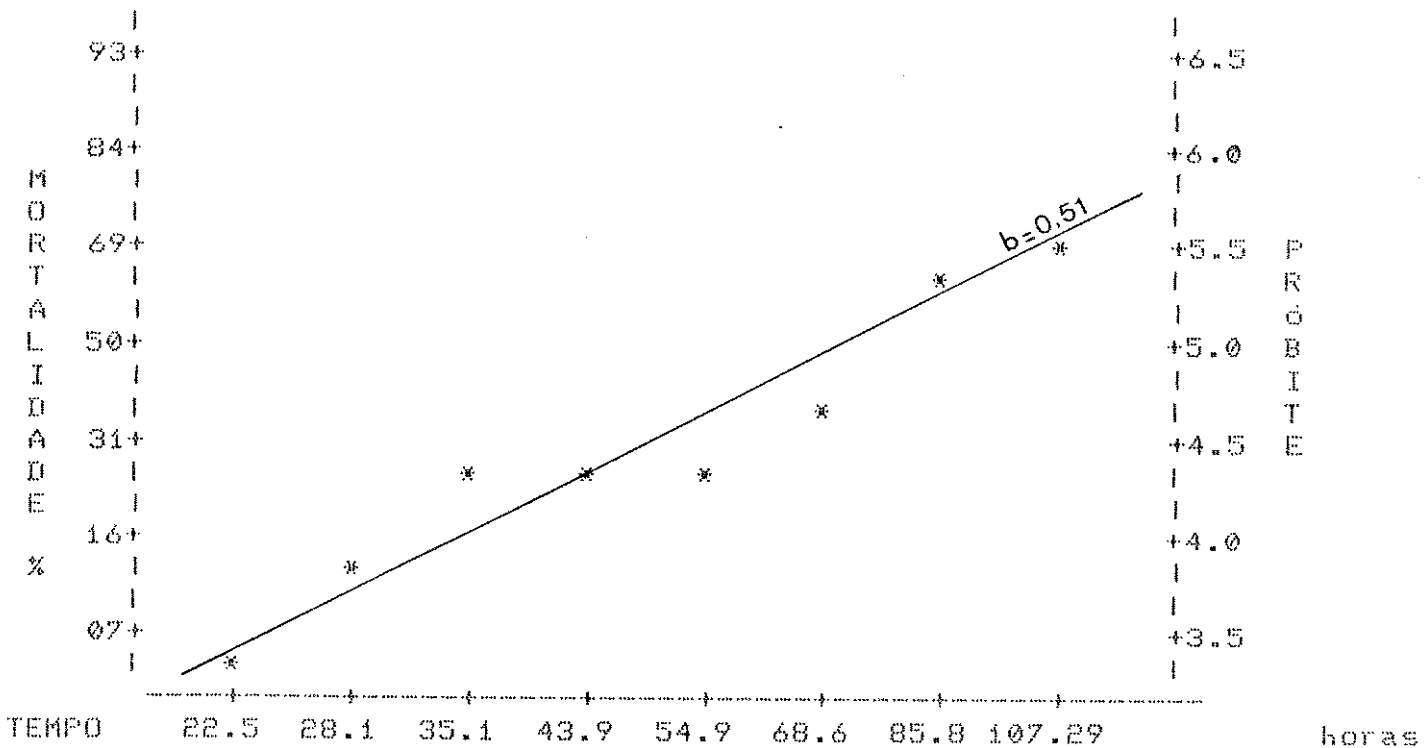


FIGURA 04. Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) e intervalos para adultos de *Tenebrio molitor* tratados com o preparado ABG-6256 à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, na concentração de 1:10.

	LIMITE INFERIOR	TEMPO LETAL MEDIANO	LIMITE SUPERIOR	
horas	180.283	187.012	193.991	
*****-X-*****-I-*****-X-*****				
N= 45				
VARIANCIA =	.1811	DESVIO PADRÃO =	.4256	COEF. CORREL. = .983

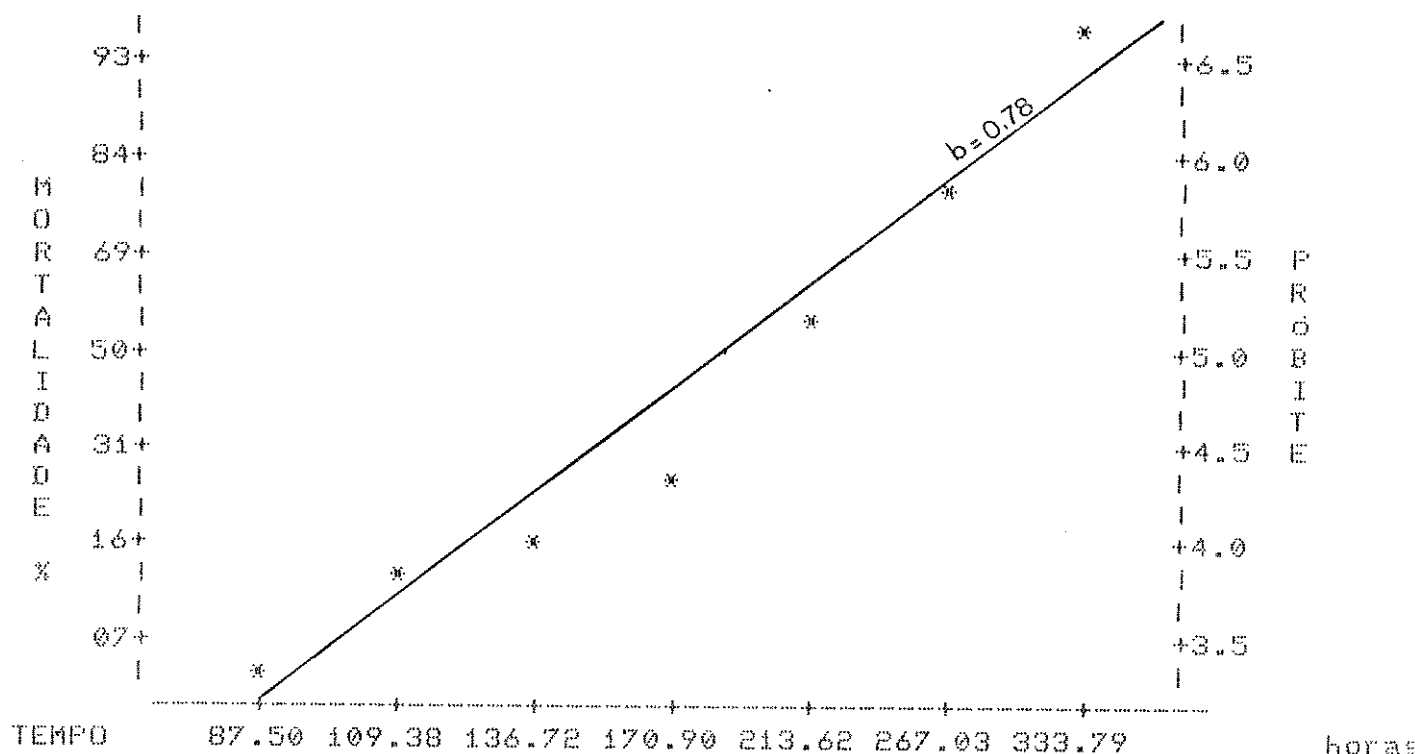


FIGURA 05. Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) e intervalos para adultos de *Tenebrio molitor* tratados com o preparado BASF, à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, na concentração de 1:10.

#### 4.2.5. *Cryptolestes ferrugineus*

O estágio adulto de *C. ferrugineus*, quando avaliado com o preparado ABG-6256, apresentou um TL<sub>50</sub> de 56,23 h (2,3 dias) (FIGURA 06). Esta espécie mostrou ser ainda mais susceptível neste estágio que *T. molitor* e as demais espécies já citadas.

#### 4.2.6. *Carpophilus* sp.

Nas avaliações efetuadas com o ABG-6256, as larvas pequenas de *Carpophilus* sp. não apresentaram mortalidade alguma 146,8 h após a aplicação do preparado. Somente 282 h (11,7 dias) após, houve uma resposta de 32,5% de mortalidade. As larvas grandes desta mesma espécie apresentaram 5% e 27,5% de mortalidade, 146,8 h e 282 h após a aplicação, respectivamente.

Para o preparado da BASF, as larvas pequenas apresentaram 10% de mortalidade 146,8 h após a aplicação e 90% de mortalidade 282 h após a aplicação. As larvas grandes desta espécie apresentaram 2,5% e 52,5% de mortalidade, 146,8 e 282 h após a aplicação, respectivamente.

Pode-se observar que para esta espécie, o preparado da BASF mostrou-se mais virulento que o ABG-6256, tanto para as larvas pequenas como para as grandes, ao contrário do que

ocorreu para larvas de *T. molitor* e *L. serricorne*. Além disso, nota-se também que as larvas pequenas de *Carpophilus* sp. mostraram ser mais susceptíveis que as grandes, em ambos os tratamentos realizados, da mesma maneira como foi observado para as larvas de *T. molitor* tratadas com o ABC-6256.

Krieg *et al.* (1984) e Langenbruch (1991) mostraram que larvas mais jovens de *L. decemlineata* foram mais sensíveis ao *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* do que as larvas mais velhas desta espécie. Muito provavelmente este fato deve-se à quantidade de alimento consumido, e por conseguinte à quantidade de patógeno ingerida, em relação ao peso da larva.

Nos experimentos realizados com adultos de *Carpophilus* sp., tem-se que para o ABC-6256 obteve-se um TL<sub>50</sub> de 45,79 h (1,9 dias) (FIGURA 07). Para o preparado da BASF o TL<sub>50</sub> obtido foi de 41,71 h (1,7 dias) (FIGURA 08).

Os TL<sub>50</sub> apresentados em ambos os tratamentos com adultos de *Carpophilus* sp. diferiram entre si a nível de 95%, embora haja a interpolação dos valores dos limites. Por haver esta interpolação, não nos parece adequado afirmar que um preparado foi mais eficiente que outro para esta espécie. Por outro lado, pelos resultados obtidos com os adultos de *T. molitor*, podemos afirmar que, para esta espécie, o preparado ABC-6256 mostrou-se mais eficiente que o preparado da BASF.

Nota-se que o estágio adulto de *Carpophilus* sp. demonstrou ser mais susceptível que o estágio larval, da mesma maneira como foi observado para *T. molitor*.

TEMPO LETAL  
MEDIANO

	LIMITE INFERIOR	TEMPO LETAL MEDIANO	LIMITE SUPERIOR
horas	48.1851	56.2362	65.6326
*****X-----I-----X*****			
N= 100			

VARIANCIA = .1161      DESVIO PADRAO = .3408      COEF. CORREL. = .97

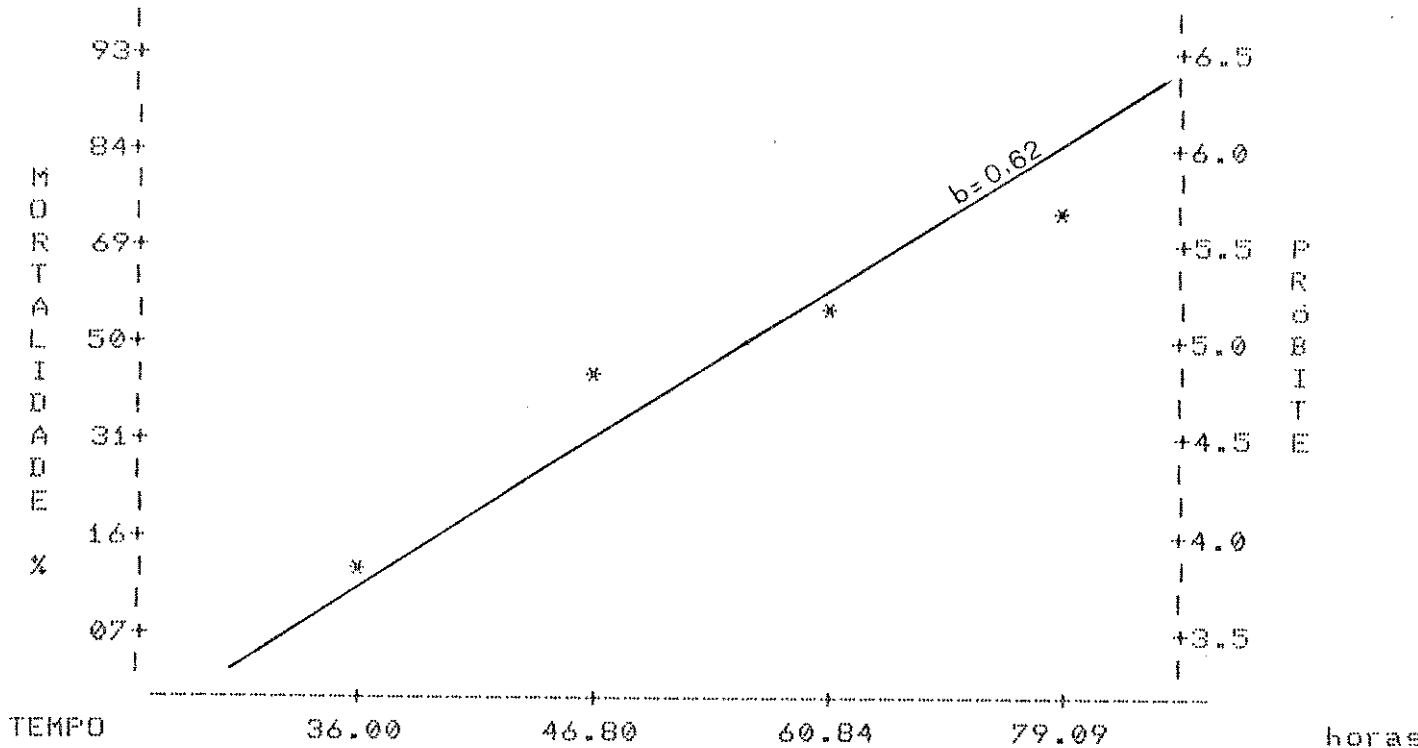


FIGURA 06. Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) e intervalos para adultos de *Cryptolestes ferrugineus* tratados com o preparado ABG-6256, à base de *E. thuringiensis* var. *tenebrionis*, na concentração de 1:10.





TEMPO LETAL  
MEDIANO

LIMITE INFERIOR	TEMPO LETAL MEDIANO	LIMITE SUPERIOR
horas	horas	horas
38.3139	41.7188	45.4262
*****X-----I-----X*****		
N= 38		
VARIANCIA = .2166	DESVIO PADRAO = .4654	COEF. CORREL. = .974

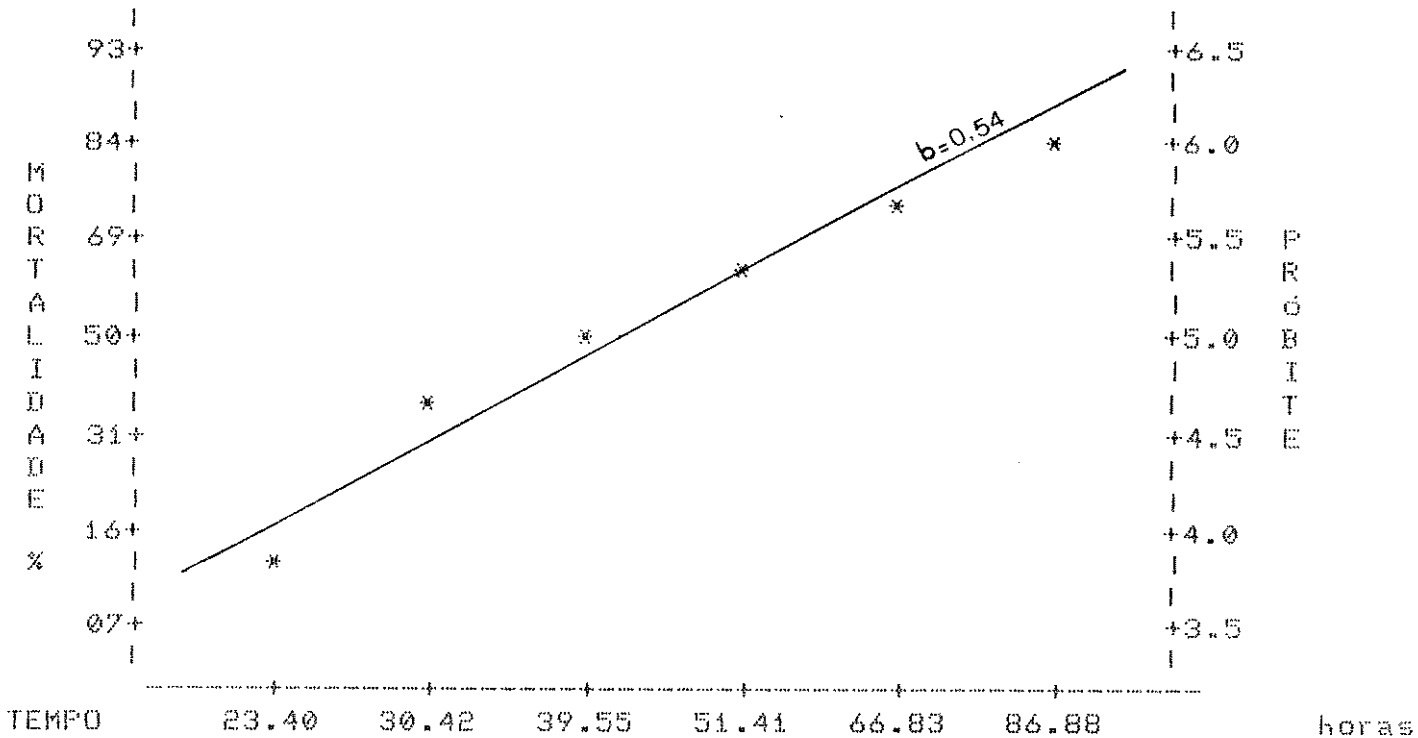


FIGURA 08. Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>) e intervalos para adultos de *Carpophilus* sp. tratados com o preparado BASF, à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, na concentração de 1:10.

#### 4.2.7. PATOGENICIDADE DE *B. thuringiensis* VAR. *tenebrionis*

Comparando-se a susceptibilidade dos adultos tratados com o ABC-6256, podemos observar nas FIGURAS 04, 06 e 07 que os valores dos limites estão próximos entre as diferentes espécies, sem contudo haver interpolação destes valores. Por esta razão, e através de análise de variância ( $P < 0,05$ ), podemos afirmar que realmente *Carpophilus* sp. é a mais susceptível a este preparado, seguida por *C. ferrugineus* e *T. molitor*.

Para o preparado da BASF, *Carpophilus* sp. também mostrou ser a espécie mais susceptível dentre aquelas avaliadas, com um TL<sub>50</sub> de 41,71 h (1,7 dias), enquanto *T. molitor* apresentou um TL<sub>50</sub> de 187,01 h (7,8 dias) (FIGURAS 08 e 05).

Um fato interessante observado nestes resultados é que, para cada espécie avaliada, sempre houve um estágio mais e outro menos susceptível ao patógeno. No caso de *T. molitor* e *Carpophilus* sp, por exemplo, o estágio adulto é o que demonstrou ser mais susceptível enquanto que no caso de *L. serricornis*, o estágio larval foi mais susceptível que o adulto. Resultados semelhantes foram obtidos em espécies fitófagas por Krieg et al. (1983 e 1984) que demonstraram *L. decemlineata* ser mais susceptível no estágio larval do que no adulto, assim como *Agelastica alni* (Coleoptera, Chrysomelidae). No estágio adulto *L. decemlineata* sofre interrupção da alimentação e oviposição quando exposta a folhas tratadas, mas este efeito é revertido após sua

transferência para folhas não tratadas.

A diferença na susceptibilidade dos diferentes estágios de desenvolvimento dos coleópteros estudados pode ser explicada, pois embora ocupem nichos similares, eles devem ser fisiologicamente distintos. Adultos de determinadas espécies de coleópteros pragas de grãos consomem significativamente mais alimento que os estágios larvais, como é o caso de *C. ferrugineus* (Baker & Loschiavo, 1987).

Já nos casos dos experimentos com *Tribolium* sp., tanto o estágio larval como o adulto não demonstraram uma grande susceptibilidade ao *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, quando comparados com larvas e adultos das outras espécies avaliadas. Esta baixa susceptibilidade da espécie pode estar relacionada ao seu pH intestinal baixo (5,2 - 6,0) (Wigglesworth, 1972), uma vez que o cristal proteico só se dissolve no intestino do inseto hospedeiro em uma determinada faixa de pH, liberando assim a  $\delta$ -endotoxina, principal responsável pela patogenicidade do bacilo (Habib & Andrade, 1986). Segundo Bernhard (1986), a var. *tenebrionis* necessita de um pH alcalino para a dissolução do cristal (a solubilidade ótima se daria entre 11,0 e 12,5). Desse modo, sem a ação da toxina sobre o epitélio intestinal, o inseto não sofreria parada alimentar, e a bactéria poderia não ser mortal.

O pH do intestino médio de adultos e larvas de coleópteros tende a ser mais alcalino que nas outras porções do intestino. Um fato a ser ressaltado é que mesmo tendo um pH intestinal similar ao de *Tribolium* sp., as larvas de *L. decemlineata*

demonstrarm ser muito susceptíveis à var. *tenebrionis* (Crowson, 1981 e Krieg *et al.*, 1983). Talvez exista, neste caso, uma alteração do pH intestinal do hospedeiro no início da bacteriose, provocada pelo próprio patógeno. Todavia, não há até o momento estudos referentes a este tipo de fenômeno. Já adultos de *S. zeamais*, que muito provavelmente têm o pH intestinal semelhante ao de *S. granarius* (6,8 - 8,4) mostrou ser pouco susceptível ao bacilo no estágio adulto, apesar do pH intestinal ser mais alcalino, e assim propício para a dissolução do cristal proteico.

Estudos preliminares realizados pela autora indicaram que o pH intestinal de *Carpophilus* sp. é menor nas larvas, estando na faixa entre 7,5 e 8,0; enquanto nos adultos o pH situou-se entre 8,0 e 9,0. Este tipo de resultado constitui-se em um dos fatores que poderia justificar a diferença na susceptibilidade de larvas e adultos, apesar da diferença na faixa de pH ser pequena.

O pH intestinal dos insetos hospedeiros, embora seja o principal fator responsável pelo desencadeamento da bacteriose, não é o único envolvido neste processo. Alguns insetos, embora apresentem um pH intestinal relativamente ácido, podem conter outras substâncias que atuam como agentes redutores no seu intestino, os quais acabam por interferir no desenvolvimento da doença, além das enzimas normalmente presentes como as proteases (Fast, 1981). Em alguns casos, o pH do intestino médio pode ser quase neutro, permitindo a germinação do bacilo ou então, a ação da endotoxina pode causar uma redução do pH de modo que a germinação possa ocorrer (Aronson *et al.*, 1986).

A especificidade do bacilo a determinados hospedeiros está relacionada a diferenças no seu intestino, afetando a solubilização e/ou eficiência da protoxina, e à presença de sítios específicos para ligação da toxina (receptores). Tem sido demonstrado que certos insetos têm uma baixa susceptibilidade ao *B. thuringiensis* devido à ineficiente solubilização dos cristais protéicos (Höfte & Whiteley, 1989).

A considerável estabilidade dos cristais protéicos, que pode variar de isolado para isolado, poderia ser uma das razões para diferenças nas suas atividades. Além disso, os fatores específicos do suco intestinal são importantes na determinação do grau de solubilidade dos cristais (Jaquet *et al.*, 1987).

Krieg *et al.* (1983) demonstraram que após a inativação dos esporos da var. *fenebrionis* por ação de ultra-violeta, embora houvesse uma interrupção na alimentação dos insetos avaliados, a mortalidade destes foi reduzida de forma notável. Desta forma, ficaria demonstrada que há ação tóxica dose-dependente devido à toxina do cristal. Por outro lado, estes resultados mostram que há participação dos esporos no processo patogênico. Em outras variedades do *B. thuringiensis* já era conhecida a ação tóxica de uma proteína encontrada na parede do endósporo, a qual é química e sorologicamente semelhante à proteína do cristal. Em insetos que morrem por septicemia, o papel do esporo é nítido, pois misturas de cristais e esporos são muito mais patogênicas do que os cristais sozinhos (Habib & Andrade, 1986). Assim, sendo as formulações utilizadas no presente trabalho um complexo esporo-cristal, a ação do bacilo sobre aquelas espécies cujo pH intesti-

nal tende a ser mais ácido que alcalino poderia ser devida a atuação do esporo, sendo por esta razão mais fraca do que em insetos cujo pH intestinal permitiria a dissolução do cristal e ação tóxica da  $\delta$ -endotoxina.

A propriedade de ser patogênico tanto a adultos como a larvas de coleópteros, torna a var. *tenebrionis* única, entre as mais de 30 variedades de *B. thuringiensis* isoladas até o momento, uma vez que pode ser utilizada para o controle de coleópteros prejudiciais em diferentes estágios de seu desenvolvimento.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que coleópteros de outras famílias, como Anobiidae, Tenebrionidae, Cucujidae e Nitidulidae, também são susceptíveis à var. *tenebrionis*, seja em maior ou menor grau, divergindo das afirmações de Langenbruch et al. (1985) e Krieg et al. (1987b) de que esta variedade seria patogênica somente à crisomelídeos. Waib et al. (1989) em estudos realizados com duas espécies de coleópteros fitófagos, *Ceratomia* sp. e *Colaspis* sp. (Chrysomelidae), obtiveram uma baixa mortalidade para ambas as espécies (2% e 4%, respectivamente), 116 h após a aplicação, sendo que durante todo o período de realização dos experimentos, os adultos mostraram-se normais, tanto morfológica como etologicamente, alimentando-se e acasalando-se.

Herrnstadt et al. (1986) avaliaram como fraca a atividade da var. *san diego* sobre o crisomelídeo *Diabrotica undecimpunctata* (tanto adultos como larvas). Ainda segundo estes autores, o bacilo mostrou-se também pouco patogênico a adultos de

*Gibbium psyllioides*, adultos e larvas de *T. castaneum* e larvas de *T. molitor*, o que confirma os resultados obtidos no presente estudo. Krieg *et al.* (1987a) também obtiveram uma baixa susceptibilidade de larvas de *T. molitor* e *T. confusum* à var. *tenebrionis*.

É importante deixar claro que no presente trabalho considera-se as variedades *tenebrionis* e *san diego* como sendo idênticas, segundo o exposto por Krieg *et al.* (1987a).

Casos semelhantes de diferenças na patogenicidade existem para outras variedades de *B. thuringiensis*. A var. *kurstaki*, por exemplo, é tida como patogênica a larvas de lepidópteros; no entanto, vários representantes desta ordem não são susceptíveis, como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) (Habib, 1982 e Garcia *et al.*, 1982). A bactéria *B. sphaericus*, tida como patogênica a larvas de dípteros culicídeos, apresenta pouca ou nenhuma virulência para espécies do gênero *Aedes* (WHO, 1985 e Abbott, 1986).

O Tempo Letal Mediano relativamente elevado no caso dos coleópteros tratados com a var. *tenebrionis* indica que realmente a morte seja devido a uma septicemia, da mesma maneira que ocorre com larvas de *Alabama argillacea* (Lepidoptera, Noctuidae) infectadas com a var. *kurstaki* (Habib & Andrade, 1986), corroborando os resultados obtidos por Krieg *et al.* (1983 e 1984). Além disso, é preciso levar em consideração o hábito alimentar de coleópteros pragas de grãos e subprodutos armazenados, que é extremamente distinto do de coleópteros fitófagos, e está intimamente ligado ao desencadeamento da bacteriose, a qual



é dependente da quantidade do complexo esporo-cristal ingerido.

*Bacillus thuringiensis* pode persistir por um longo período de tempo em ambientes fechados como aqueles onde grãos são estocados, podendo até causar epizootias neste tipo de ambiente (De Lucca II *et al.*, 1982 e Aronson *et al.*, 1986), embora a ocorrência natural em altas concentrações seja improvável (Burgess & Hurst, 1977). McGaughey e Dicke (1980) mostraram que a invasão de silos de grãos por dois lepidópteros pragas economicamente importantes (*Anagasta kuehniella* e *Plodia interpunctella*) pode ser controlada por inseticidas à base do sorotipo H:3a-3b desta bactéria. Um estudo feito por McGaughey *et al.* (1975) mostrou que algumas espécies de coleópteros tais como *S. oryzae*, *T. castaneum* e *T. confusum*, transferiam esporos viáveis de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* de grãos tratados para não tratados, carregando-os externamente ou disseminando-os com suas fezes, uma vez que estas espécies não são susceptíveis a esta variedade do bacilo. Este tipo de comportamento onde os esporos do bacilo são dispersos por espécies pouco ou nada susceptíveis poderia também vir a ocorrer com a var. *tenebrionis*.

### 4.3. PLAQUEAMENTO DOS PREPARADOS EXPERIMENTAIS

Os resultados obtidos com os experimentos de plaqueamento dos preparados à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* mostraram que o ABG-6256 tem um número maior de esporos viáveis por grama ( $61,8 \times 10^{10}$ ) que o preparado da BASF ( $2,2 \times 10^{10}$ ).

Além disso, notou-se que os esporos do ABG-6256 germinaram mais rapidamente que os do outro preparado. Em 8 h após o plaqueamento já eram visíveis colônias nas placas do ABG-6256, o que ocorreu somente após 12 h do plaqueamento com o preparado da BASF.

A FIGURA 09 evidencia a diferença numérica e também a diferença na distribuição das colônias, ou seja, o ABG-6256 apresentou uma distribuição mais homogênea que o preparado da BASF, para a mesma diluição ( $10^{-7}$ ). Esta distribuição mais homogênea pôde ser detectada também através de lâminas feitas com material da primeira diluição de ambos os preparados e observadas ao microscópio óptico. Os esporos do ABG-6256 estavam bem distribuídos por toda a lâmina, apresentando poucas formações em grumos com algumas dezenas de esporos. Já para o preparado da BASF havia pouca homogeneidade na distribuição dos esporos; a quantidade de grumos formados era bem maior e estes agrupavam um número muito grande de esporos, cuja contagem era impossível.



FIGURA 09. Germinação e crescimento de esporos de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* de dois preparados experimentais (ABG-6256/ABBOTT e BASF) na diluição de  $10^{-7}$ , 12 horas após a inoculação do patógeno.

A distribuição dos esporos quando um preparado é diluído está relacionada com a qualidade da sua formulação, onde atuam diversos fatores como por exemplo as substâncias coadjuvantes que entram na composição do produto final.

Um produto microbiano formulado deve ser totalmente homogêneo, a fim de garantir uma distribuição uniforme no substrato em que será aplicado. Quando esta homogeneidade não é totalmente assegurada, como é o caso do preparado da BASF utilizado no presente estudo, pode ser que a distribuição do patógeno na dieta do inseto avaliado também não tenha sido satisfatória apesar da homogeneização do preparado à dieta.

O fato de não haver uma distribuição homogênea do patógeno na dieta poderia justificar a menor eficiência do preparado da BASF, uma vez que os insetos poderiam ter se alimentado mais em porções da dieta onde houvesse uma menor concentração do preparado, ingerindo deste modo uma menor quantidade de bactéria.

Por outro lado, esta mesma característica do preparado da BASF poderia também justificar a sua maior eficiência para as larvas de *Carpophilus* sp.. Talvez, ao contrário do que poderia ter ocorrido no caso de *T. molitor* e *L. sericorne*, as larvas daquela espécie poderiam ter se alimentado mais em porções da dieta onde houvesse uma maior concentração do patógeno.

Porém, o histórico do patógeno de cada preparado, a espécie hospedeira da qual foi isolado, as suas características genéticas e outros, são fatores que interferem diretamente na virulência deste preparado. Acreditamos que tanto fatores desta natureza como outros relacionados à formulação sejam a causa do diferente comportamento desses dois preparados.

Os dados obtidos com relação à germinação e quantidade de esporos viáveis/g dos preparados avaliados também poderiam explicar a morte mais rápida tanto nas larvas como nos adultos de *T. molitor* e larvas de *L. serricornis* tratados com o preparado ABG-6256, que resultou em Tempos Letais Medianos menores. Tanto a germinação como o crescimento e multiplicação do patógeno no preparado ABG-6256 foram bem mais rápidos que os do outro preparado. Provavelmente este tipo de comportamento ocorra também dentro do inseto, vindo a causar uma septicemia em um espaço de tempo menor.

É conveniente lembrar que cada espécie de inseto responde de maneira diferente ao mesmo patógeno. Sabe-se também que o efeito patogênico ou tóxico de *B. thuringiensis* não depende apenas da variedade ou do sorotipo, pois vários isolados do mesmo sorotipo podem revelar níveis diferentes de virulência. Este fato tem dificultado as tentativas de se estabelecer apenas um padrão e um inseto-teste para cada variedade do bacilo (Burgerjon & Dulmage, 1977 e Habib, 1982 e 1986).

A padronização de preparados à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* ainda é muito controvertida. Produtos como o M-ONE<sup>R</sup>, à base da var. *san diego* (a qual é idêntica à var. *tenebrionis*), foram padronizados utilizando-se como inseto-teste uma espécie praga típica da Europa e América do Norte, *L. decemlineata*. Contudo, ainda não há nenhuma informação com relação aos formulados à base da var. *tenebrionis*. Avaliações relacionadas ao espectro de espécies susceptíveis a esta variedade são fundamentais para a seleção de um inseto-teste.

## 5. CONCLUSÕES

1. Os sintomas externos pré-mortais observados tanto nas larvas como nos adultos infectados restringiram-se a alterações a nível comportamental, como redução na resposta a estímulos mecânicos e físicos. Sintomas externos pós-mortais, como a flacidez do corpo e o escurecimento total do tegumento atingindo a coloração preta, foram observados nas larvas em decorrência da bacteriose. Nos adultos das espécies avaliadas não foi possível a observação de sintomas pós-mortais da bacteriose.

2. Dentre os estágios larvais das espécies avaliadas com o preparado experimental ABG-6256 à base de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, a que se mostrou mais susceptível foi *Lasioderma serricornis*.

3. O preparado ABG-6256 mostrou-se mais eficiente que o da BASF para larvas de *L. serricornis* e *Tenebrio molitor*, enquanto que o inverso ocorreu para larvas pequenas e grandes de *Carpophilus* sp..

4. As larvas pequenas de *Carpophilus* sp. mostraram-se mais susceptíveis que as larvas grandes desta espécie, para ambos os preparados.

5. As larvas pequenas de *T. molitor* também mostraram-se mais susceptíveis que as larvas grandes, embora ambas tenham apresentado uma baixa susceptibilidade ao bacilo.

6. Com relação ao estágio adulto das espécies avaliadas com o preparado ABG-6256, a que se mostrou mais susceptível foi *Carpophilus* sp., seguida de *Cryptolestes ferrugineus* e *T. molitor*.

7. Para o preparado da BASF à base do mesmo bacilo também foi *Carpophilus* sp. que se mostrou mais susceptível.

8. Para adultos de *T. molitor*, o preparado ABG-6256 mostrou-se mais eficiente que o preparado da BASF, enquanto que para os adultos de *Carpophilus* sp., não houve diferença significativa entre a eficiência dos dois preparados.

9. No caso de *T. molitor* e *Carpophilus* sp o estágio adulto foi o que demonstrou ser mais susceptível ao patógeno, enquanto que para *L. serricornis*, foi o estágio larval.

10. Os resultados demonstraram que representantes das famílias Anobiidae, Cucujidae, Tenebrionidae e Nitidulidae também são susceptíveis à var. *tenebrionis*.



11. O Tempo Letal Mediano relativamente elevado no caso dos coleópteros tratados com a var. *tenebrionis* indica que a morte seja devida a uma septicemia, tanto nos estágios larvais como nos adultos.

12. Os resultados obtidos nos experimentos de plaqueamento dos formulados mostraram que o ABG-6256 tem um maior número de esporos viáveis/ g que o formulado da BASF. Ainda, temos que os esporos do ABG-6256 germinaram mais rapidamente que os do outro formulado, o que poderia explicar a maior eficiência deste formulado a algumas das espécies avaliadas.

## 6 . RESUMO

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (H:8a-8b), isolada em 1982 na Alemanha, tem sido considerada um agente promissor para o controle de coleópteros prejudiciais.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de dois preparados experimentais à base desta bactéria (ABG-6256/ABBOTT e BASF) a espécies de coleópteros pragas de grãos e subprodutos armazenados. O estágio de desenvolvimento mais susceptível para cada espécie, assim como observações da sintomatologia externa da patogenia e dinâmica da germinação dos esporos em meio artificial são aspectos abordados.

As espécies estudadas foram: *Sitophilus zeamais* (Curculionidae), *Cryptolestes ferrugineus* (Cucujidae), *Lasioderma serricorne* (Anobiidae), *Carpophilus* sp. (Nitidulidae), *Tribolium* sp. e *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae). Estes coleópteros foram mantidos em criação de laboratório sob condições controladas de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo, em suas dietas naturais.

A susceptibilidade de cada espécie estudada foi avaliada através de bioensaios utilizando-se o critério de Tempo Letal Mediano (TL<sub>50</sub>), o qual foi calculado pelo método de regressão log-próbite.

O plaqueamento dos preparados experimentais foi feito em meio nutriente completo e as contagens das colônias foram realizadas 8, 12 e 15 h após a inoculação do patógeno.

Nenhum sintoma pré-mortal da doença foi constatado, além de alterações comportamentais como lentidão de movimentos e ausência de respostas a estímulos mecânicos e físicos, tanto nas larvas como nos adultos tratados. Sintomas externos pós-mortais da bacteriose, como a flacidez do corpo e escurecimento total do tegumento, foram observados nas larvas das espécies avaliadas. Já nos adultos, não foi possível a observação de tais sintomas.

O preparado ABG-6256 mostrou-se mais eficiente que o da BASF para larvas de *L. serricornis* e larvas e adultos de *T. molitor*. Já para as larvas de *Carpophilus* sp., o preparado da BASF demonstrou uma maior eficiência. Para os adultos desta espécie não houve diferença significativa entre a eficiência dos dois preparados.

Dentre os estágios larvais das espécies avaliadas com o preparado ABG-6256, a que se mostrou mais susceptível foi *L. serricornis* (TL<sub>50</sub> = 147,91 h). Com relação aos estágios adultos avaliados com o mesmo preparado, a espécie que se mostrou mais susceptível foi *Carpophilus* sp. (TL<sub>50</sub> = 45,79 h), seguida de *C. ferrugineus* (TL<sub>50</sub> = 56,23 h) e *T. molitor* (TL<sub>50</sub> = 70,76 h).

Nas avaliações realizadas com adultos e o preparado da BASF também foi *Carpophilus* sp. que se mostrou mais susceptível (TL<sub>50</sub> = 41,71 h), seguida de *T. molitor* (TL<sub>50</sub> = 107,01 h).

O estágio adulto de *T. molitor* e *Carpophilus* sp. mostrou ser mais susceptível ao patógeno que o estágio larval. Já para *L. ferricorne*, foi o estágio larval que mostrou uma maior susceptibilidade.

Os adultos de *Tribolium* sp. e *S. zeamais* mostraram-se pouco susceptíveis ao bacilo, nas avaliações feitas com o ABG-6256.

O Tempo Letal Mediano relativamente elevado no caso dos coleópteros avaliados indica que a morte seja devida a uma septicemia, tanto nos estágios larvais como nos adultos, da mesma forma como ocorre para algumas larvas fitófagas de lepidópteros tratadas com a var. *kurstaki* (H:3a-3b).

Os resultados obtidos nos experimentos de plaqueamento dos preparados mostraram que o ABG-6256 tem um maior número de esporos viáveis/g que o preparado da BASF. Ainda, temos que os esporos do ABG-6256 germinaram mais rapidamente que os do outro preparado, o que poderia explicar a maior eficiência deste preparado a algumas das espécies avaliadas.

## 7. SUMMARY

The entomogenous bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *fenebrionis* (H:8a-8b), isolated in Germany in 1982, has been considered a promising agent for the control of harmful beetles.

The present study was undertaken to evaluate the pathogenicity of two experimental preparations (ABG-6256/ABBOTT and BASF) based on the var. *fenebrionis*. Aspects such as relative susceptibility of developmental stages of each coleopteran species, symptomatology and germination dynamics of bacterial spores (plate counting) were evaluated.

Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Curculionidae), *Cryptolestes ferrugineus* (Cucujidae), *Lasioderma serricornis* (Anobiidae), *Carpophilus* sp. (Nitidulidae), *Tribolium* sp. and *Tenebrio molitor* (Tenebrionidae) were studied in the present work. These insect species were maintained under laboratory controlled conditions. Each species was fed on its natural diet.

The susceptibility was evaluated using the criteria of Median Lethal Time (LT<sub>50</sub>). The LT<sub>50</sub> were calculated by log-probit regression.

The plate counting was done in complete culture medium.

The pre-mortal symptoms observed in the infected hosts included behavioural modifications as slow movements of the diseased insect and no responses to mechanic and physical stimulus. The post-mortal symptoms of the bacteriosis were observed to be occurred just among the larvae. The body of the dead larvae became flaccid accompanied with a total darkening of the tegument.

The ABG-6256 preparation showed to be more efficient than the BASF one to the larvae of *L. serricornis* and adults and larvae of *T. molitor*. The BASF preparation was more efficient to *Carpophilus* sp. larvae. There was no significant difference between both preparations to *Carpophilus* sp. adults.

The most susceptible species to ABG-6256 preparation, in larval stage, was *L. serricornis* ( $LT_{50} = 147.91$  h). The most susceptible species in adult stage was *Carpophilus* sp. ( $LT_{50} = 45.79$  h) followed by *C. ferrugineus* ( $LT_{50} = 56.23$  h) and *T. molitor* ( $LT_{50} = 70.76$  h).

*Carpophilus* sp. was the most susceptible species to BASF preparation in adult stage ( $LT_{50} = 41.71$  h) followed by *T. molitor* ( $LT_{50} = 187.01$  h).

Adult stage of *T. molitor* and *Carpophilus* sp. was more susceptible to the pathogen than the larval stage. Nevertheless, *L. serricornis* larvae were more susceptible than the adult stage. Adults of *Tribolium* sp. and *S. zeamais* were less susceptible to the ABG-6256 preparation.

The relatively high  $LT_{50}$  observed in the studied coleopterans indicates that septicaemia is the cause of the death in the larval as well as in the adult stages.

The plate counting results showed that the ABG-6256 preparation has more viable spores/g than the BASF one. The spores of ABG-6256 preparation germinated more rapidly than the BASF preparation. These results could explain the higher efficiency of the ABBOTT preparation to some evaluated species.

**8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol., 18: 265-267.
- Abbott 1986. Technical Bulletin. 3 pp.
- Allotey, J. 1988. A study of the insect pests in stored palm produce in Port Harcourt, Nigeria. J. stored Prod. Res., 24: 237-240.
- Almeida, A.A. & Matioli, J.C. 1984. Ocorrência de *Chaetospila elegans* Westwood, 1874 (Hym., Pteromalidae) como parasito de *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Col., Curculionidae). Anais S.E.B., 13: 107-115.
- 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/ Campinas (SP), 198 pp.
- Amaral FQ, B.F. 1986. Estudos Biológicos e Patológicos de Dois Piralídeos Pragas de Produtos Armazenados. Tese de Doutorado/ UNICAMP/ Campinas (SP), 167 pp.



- Andrade, C.F.S. 1989. Ecologia de Supressão de Populações de Culicídeos e Simulídeos. Tese de Doutorado/ UNICAMP/ Campinas (SP), 253 pp.
- Arbogast, R.T. 1976. Suppression of *Dryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Cucujidae) on shelled corn by the predator *Xylocoris flavipes* (Reuter) (Hemiptera, Anthocoridae). J. Georgia Ent. Soc., 11: 67-71.
- Aronson, A.I.; Beckman, W. & Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Reviews 50: 1-24.
- Baker, J.E. & Loschiavo, S.R. 1987. Nutritional Ecology of Stored-Product Insects. Em: Nutritional Ecology of Insects, Mites, Spiders and Related Invertebrates. Slansky Jr., F. & Rodriguez, J.G. eds. John Wiley & Sons, N.Y., 1016 pp.
- Bare, C.O. 1942. Some natural enemies of stored-tobacco insects with biological notes. J. Econ. Entomol., 35: 185-189.
- Bauer, L.S. 1990. Response of the Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego*. Env. Entomol., 12: 428-431.

- Beeman, R.W. & Nanis, S.M. 1986. Malathion resistance alleles and their fitness in the red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Econ. Entomol., 72: 580-587.
- Beeman, R.W. & Wright, V.F. 1990. Monitoring for resistance to chlorpyrifos-methyl, pirimiphos-methyl and malathion in Kansas populations of stored-product insects. J. Kansas Ent. Soc., 63: 385-392.
- Bell, C.H.; Hole, B.D. & Clifton, A.L. 1988. The toxicity of mixtures of methyl bromide and methyl chloroform to stored product insects. J. stored Prod. Res., 24: 115-122.
- Benezet, H.J.; Bowen, M.R.; Helms, C.W. & Huffman, B.B. 1986. Toxicity of selected insecticides to *Lasioderma serricorne* (F) (Coleoptera: Anobiidae) by three methods of exposure. J. stored Prod. Res., 22: 93-96.
- Brown, A.W.A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes. A pragmatic review. J. Amer. Mosq. Control Assoc., 2: 123-140.
- Bernhard, K. 1986. Studies on the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. FEMS Microbiol. Letters, 33: 261-265.

- Bucher, G.E. 1963. Nonsporulating Bacterial Pathogens. Em: Insect Pathology: An Advanced Treatise - Vol. 2. Steinhaus, E.A. ed., Academic Press, N.Y., 689 pp.
- Burgerjon, A. & Dulmage, H. 1977. Industrial and international standartization of microbial pesticides. I. *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga, 22: 121-129.
- Burges, H.D. 1975. Teratogenicity of the thermostable Beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella*. J. Inv. Pathol., 24: 419-420.
- Burges, H.D. 1986. Production and use of pathogens to control insect pests. J. Appl. Bact. Symp., Suppl.: 1275-1375.
- Burges, H.D. & Hurst, J.A. 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. J. Inv. Pathol., 22: 131-139.
- Carlton, B.C. & González Jr., J.M. 1986. Biocontrol of insects-*Bacillus thuringiensis*. Beltsville Symposia in Agricultural Research. Vol. 10: Biotechnology for Solving Agricultural Problems. pp: 253-272.
- Carroll, J.; Li, J. & Ellar, D.J. 1989. Proteolytic processing of a coleopteran-specific  $\delta$  - endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Biochem. J., 261: 99-105.

- Celaro, J.C.; Oliveira, R.L.; Brandão F<sup>o</sup>, C. & Ghidini, R. 1991. Expurgo estático com fosfina em células de altas dimensões. 5<sup>o</sup> Encontro de Atualização sobre os Métodos de Controle de Pragas, EBALQ/USP. Resumos: 44-51.
- Chander, H. & Ahmed, S.M. 1989. Comparative evaluation of fungicidal quinones and natural embelin against some insect pests of storage. J. stored Prod. Res., 25: 87-91.
- Cherif, R.; Leesch, J. & Davis, R. 1985. Effect of temperature on the efficacy of methyl bromide against adults of *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on soft and hard wheats. J. Econ. Entomol., 78: 660-665.
- Cline, L.D.; Press, J.W. & Flaherty, B.R. 1985. Suppression of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), inside and outside of burlap, woven polypropylene, and cotton bags by the parasitic wasp, *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). J. Econ. Entomol., 78: 835-838.
- Costa Lima, A. da 1955. Insetos do Brasil - 9<sup>o</sup> tomo, cap. XXIX, Coleópteros - 3<sup>o</sup> parte. Escola Nacional de Agronomia, Série Didática n<sup>o</sup> 11.
- Crowson, R.A. 1981. The Biology of the Coleoptera, Academic Press, N.Y., 802 pp.

- De Bach, P. 1964. El Alcance del Control Biológico. Em: Control Biológico de Las Plagas de Insectos Y Malas Hierbas. De Bach, P. ed., Compañia Ed. Continental, Mexico, 949 pp.
- De Barjac, H. 1981. Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Burges, H.D. ed., Academic Press, N.Y., 949 pp.
- De Barjac, H. & Frachon, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga, 35: 233-240.
- De Lucca II, A.J.; Palmgren, M.S. & Ciegler, A. 1982. *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. Can. J. Microbiol., 28: 452-456.
- Dobie, P. 1984. Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. VI. Integrated control: The role of biological methods. Trop. Stored Prod. Inf., 48: 37-45.
- Donovan, W.P.; González Jr., J.M.; Gilbert, M.P. & Dankocsik, C. 1988. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. Mol. Gen. Genet., 214: 365-372.

- Dulmage, H.T. 1989. Production and use of *Bacillus thuringiensis* Perspective from 1989. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84, Supl.III: 113-122.
- Evans, D.E. 1987. The survival of immature grain beetles at low temperatures. J. stored Prod. Res., 23: 79-83.
- Fast, P.G. 1981. The Crystal Toxin of *Bacillus thuringiensis*. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Burges, H.D. ed., Academic Press, N.Y., 949 pp.
- Fast, P.G.; Murphy, D.W. & Sohi, S.S. 1978. *Bacillus thuringiensis* - endotoxin: evidence that toxin acts at the surface of susceptible cells. Experientia, 34: 762-763.
- Ferro, D.N. & Gelernter, W.D. 1989. Toxicity of a new strain of *Bacillus thuringiensis* to Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Econ. Entomol., 82: 750-755.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira, S.; Carvalho, R.T.L.; Batista, G.C.; Berti FR, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.; Alves, S.B. & Vendramim, J.D. 1988. Manual de Entomologia Agrícola Ed. Agronômica Ceres, SP, 649 pp.

- Garcia, M.A.; Simões, M. & Habib, M.E.M. 1982. Possible reasons of resistance in larvae of *Spodoptera frugiperda* (Abbot & Smith, 1797) infected by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Rev. Agric., 52: 215-222.
- Garcia, R.; Caltagirone, L.E. & Gutierrez, A.F. 1988. Comments on a redefinition of biological control. BioScience, 38: 692-694.
- Gravena, S. 1987. Manejo Integrado de Pragas. Ciência Hoje, 5: 34-40.
- 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. Agric. Universidade Alexandria/ Egito, 196 pp.
- Habib, M.E.M. 1982. Patogenicidade de Duas Variedades de *Bacillus thuringiensis* para Larvas de Lepidoptera e Diptera. Tese de Livre-Docência/ UNICAMP/ Campinas (SP), 163 pp.
- Habib, M.E.M. 1983 Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against some aquatic dipterous insects. Z. ang. Entomol., 95: 368-376.

- Habib, M.E.M. 1986. Padronização de Inseticidas Microbianos. Em: Controle Microbiano de Insetos. Alves, S.B. ed., Ed. Manole Ltda., 407 pp.
- Habib, M.E.M. 1989. Utilização de bactérias no controle de dípteros de importância médica. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84 (supl. III): 31-34.
- Habib, M.E.M. & Andrade, C.F.S. 1983. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H: 3a-3b) para o curuquerê do algodão, *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae). Rev. Agric., 52: 263-282.
- Habib, M.E.M. & Andrade, C.F.S. 1986. Bactérias Entomopatógenicas. Em: Controle Microbiano de Insetos. Alves, S.B. ed. Ed. Manole Ltda., 407 pp.
- Habib, M.E.M.; Andrade, C.F.S & Fávoro Jr., A. 1986 Classificação patológica e susceptibilidade de larvas de *Brassolis sophorae* (L., 1758) infectadas por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (H: 3a-3b). Rev. Agric., 61: 105-113.
- Haines, C.P. 1984. Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. III. The use of predators and parasites. Trop. Stored Prod. Inf., 42: 17-25.



- Hassel, M.P.; Lessells, C.M. & McGavin, G.C. 1985. Inverse density dependent parasitism in a patchy environment : a laboratory system. Ecology Entomology, 10: 393-402.
- Heimpel, A.M. 1967. A taxonomic key for crystalliferous bacteria related to *Bacillus thuringiensis* Berliner. J. Inv. Pathol., 2: 365-375.
- Herrnstadt, C.; Soares, G.G.; Wilcox, E.R. & Edwards, D.L. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. Bio/Technology, 4: 305-308.
- Herrnstadt, C.; Gilroy, T.E.; Sobieski, D.A.; Bennett, B.D. & Gaertner, F.H. 1987. Nucleotide sequence and reduced aminoacid sequence of a coleopteran-active delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. Gene, 52: 37-46.
- Hill, D.S. 1983. Agricultural Insect Pests of the Tropics and their Control. Cambridge Univ. Press, London, N.Y., 516 pp.
- Hluchy, M. & Samsinakova, A. 1989. Comparative study on the susceptibility of adult *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) to the entomogenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. J. stored Prod. Res., 25: 61-64.

- Hobbs, S.K. & Bond, E.J. 1989. Response of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) to sublethal treatments with phosphine. J. stored Prod. Res., 25: 137-146.
- Hodges, R.J. 1984a. Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. II. The use of pheromones. Trop. Stored Prod. Inf., 48: 9-15.
- Hodges, R.J. 1984b. Biological methods for integrated control of insects and mites in tropical stored products. IV. The use of insect diseases. Trop. Stored Prod. Inf., 48: 27-31.
- Hofte, H. & Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Reviews, 53: 242-255.
- Hofte, H.; Seurinck, J.; Van Houtven, A. & Vaeck, M. 1987. Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera. Nucleic Acids Res., 15: 7183.
- Hole, B.D.; Bell, C.H.; Mills, K.A. & Goodship, G. 1976. The toxicity of phosphine to all developmental stages of thirteen species of stored product beetles. J. stored Prod. Res., 12: 235-244.

- Hough-Goldstein, J.; Tisler, A.M.; Zehnder, G.W. & Uyeda, K.A. 1991. Colorado Potato Beetle (Coleoptera : Chrysomelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* and various feeding stimulants. J. Econ. Entomol., 84: 87-93.
- Howe, R.W. 1965. A summary of estimates of optimal and minimal conditions for population increase of some stored products insects. J. stored Prod. Res., 1: 177-184.
- Huger, A.M. & Krieg, A. 1989. Über zwei typen parasporaler kristalle beim kaferwirksamen Stamm BI 256-82 von *Bacillus thuringiensis* subspec. *tenebrionis*. J. Appl. Ent., 108: 490-497.
- Hurlock, E.T. 1965. Some observations on the loss in weight caused by *Sitophilus granarius* (L) (Coleoptera, Curculionidae) to wheat under constant experimental conditions. J. stored Prod. Res., 1: 193-195.
- ICI 1988. Proteção dos Grãos Armazenados - Manual Técnico, 17 pp.
- Jahn, N.; Schnetter, W. & Geider, K. 1987. Cloning of an insecticidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and its expression in *Escherichia coli* cells. EEMS Microbiol. Letters, 48: 311-315.

- Jaques, R.P. & Laing, D.R. 1988. Effectiveness of microbial and chemical insecticides in control of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on potatoes and tomatoes. Can. Entomol., 120: 1123-1131.
- Jaquet, F.; Hutter, R. & Luthy, P. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta - endotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 52: 500-504.
- Joia, B.S.; Loschiavo, S.R. & Webster, G.R.B. 1985. Cypermethrin and fenvalerate as grain protectants against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae) at different moisture levels and temperatures. J. Econ. Entomol., 78: 637-641.
- Kettle, D.S. 1985. Medical and Veterinary Entomology. John Wiley & Sons Publ., N.Y., 658 pp.
- Kistler, R.A. 1985. Host-age structure and parasitism in a laboratory system of two hymenopterous parasitoids and larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). Env. Entomol. 14: 507-511.
- Kramer, K.J.; Hendricks, L.H.; Wojciak, J.H. & Fyler, J. 1985. Evaluation of fenoxycarb, *Bacillus thuringiensis* and malathion as grain protectants in small bins. J. Econ. Entomol., 78: 632-636.

- Krieg, A. 1987. Diseases Caused by Bacteria and Other Prokaryotes. Em: Epizootiology of Insect Diseases Fuxa, J.R. & Tanada, Y., John Wiley & Sons, N.Y., 555 pp.
- Krieg, A.; Huger, A.M.; Langenbruch, G.A. & Schnetter, W. 1983 *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von Coleopteren wirksamer pathotyp. J. Appl. Entomol., 26: 500-508.
- Krieg, A.; Huger, A.M.; Langenbruch, G.A. & Schnetter, W. 1984 Neue ergebnisse über *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* unter besonderer berücksichtigung (*Leptinotarsa decemlineata*). Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz, 52: 145-150
- Krieg, A.; Huger, A.M. & Schnetter, W. 1987a. "*Bacillus thuringiensis* var. *san diego*" stamm M-7 ist identisch mit dem zuvor in deutschland isolierten kaferwirksamen *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* stamm BI 256-82. J. Appl. Entomol., 104: 417-424.
- Krieg, A.; Schnetter, W.; Huger, A.M. & Langenbruch, G. A. 1987b. *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, strain BI 256-82: a third pathotype withn the H-serotype 8a8b. System. Appl. Microbiol., 2: 138-141.
- Kucinski, B. 1986. O veneno nosso de cada dia. Ciência Hoje, 4: 58-62.

- Kumari, S.M. & Neelgund, 1985. Preliminary infectivity tests using six bacterial formulations against the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. J. Inv. Pathol., 44: 198-199.
- Langenbruch, G.A. 1991. Zur bekämpfung des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*) mit *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis*. Gesunde Pflanzen, 43: 193-196.
- Langenbruch, G.A. & Riethmüller, U. 1990. Kartoffelkäferbekämpfung mit *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 42: 65-69.
- Langenbruch, G.A.; Krieg, A.; Huger, A.M. & Schnetter, W. 1985. Erste feldversuche zur bekämpfung der larven des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*) mit *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Med. Fac. Landhouww. Riiksuniv. Gent, 50: 441-449.
- LeCato, G.L.; Collins, J.M. & Arbogast, R.T. 1977. Reduction of residual populations of stored-products insects by *Xylocoris flavipes* (Hemiptera: Anthocoridae). J. Kansas Ent. Soc., 50: 84-88.
- Li, J.; Henderson, R.; Carroll, J. & Ellar, D. 1988. X-ray analysis of the crystalline parasporal inclusion in *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. J. Mol. Biol., 122: 543-544.

- Lima, J.D.G.; Silva, F.A.P. & Faroni, L.R.A. 1983. Insetos dos grãos armazenados. Inf. Agropec., 2: 46-54.
- Loschiavo, S.R.; Wong, J.; White, N.D.G.; Pierce Jr., H.D.; Borden, J.H. & Dehlschlager, A.C. 1986. Field evaluation of a pheromone to detect adult rusty grain beetles, *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: Cucujidae), in stored grain. Can. Entomol., 118: 1-8.
- Maddox, J.V. 1987. Protozoan Diseases. Em: Epizootiology of Insect Diseases. Fuxa, J.R. & Tanada, Y. eds., John Wiley & Sons, 554 pp.
- Mariconi, F.A.M. 1963. Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas. 2ª edição, Biblioteca Agronômica Ceres, S.P., 607 pp.
- Martignoni, M.E. & Iwai, P.J. 1981. A Catalogue of Viral Diseases of Insects, Mites and Ticks. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Burges, H.D. ed., Academic Press, 949 pp.
- McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 222: 193-195.
- McGaughey, W.H. & Dicke, E.B. 1980. Methods of applying *Bacillus thuringiensis* to stored corn for moth control. J. Econ. Entomol., 73: 228-229.

- McGaughey, W.H.; Kinsinger, R.A. & Dicke, E.B. 1975. Dispersal of *Bacillus thuringiensis* spores by nonsusceptible species of stored-grain beetles. Env. Entomol., 4: 1007-1010.
- McPherson, S.A.; Perlak, F.J.; Fuchs, R.L.; Marrone, P.G.; Lavrik P.B. & Fischhoff, D.A. 1988. Characterization of the coleopteran-specific protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Bio/Technology, 6: 61-66.
- Merch, R.F. & Gomes, N.K. 1982. Beneficiamento e Armazenamento de Grãos. Em: Controle de Pragas em Grãos Armazenados. Cia. Estadual de Silos e Armazéns, 104 pp.
- Metcalf, R.L. & Luckmann, W.H. 1982. Introduction to Insect Pest Management. Wiley-Interscience Publ., 578 pp.
- Mian, L.A.L.S. & Mulla, Mir S. 1982. Biological activity of IGRs against four stored-product coleopterans. J. Econ. Entomol., 25: 80-85.
- Munro, J.W. 1966. Pests of Stored Products. Hutchinson & Co. (Publishers) Ltda., 234 pp.
- Pacheco, I.A. 1991. Resistência de pragas de grãos armazenados a pesticidas. 59 Enc. Atualização sobre os Métodos de Controle ESALQ/ USP, RESUMOS: 100-109.



- Parkin, E.A. 1965. The onset of insecticide resistance among field populations of stored-products insects. J. stored Prod. Res., 1: 3-8.
- Payne, C.C. 1988. Pathogens for the control of insects: where next? Phil. Trans. R. Soc. London, B 318: 225-248.
- Phillips, J.K. & Burkholder, W.E. 1984. Health Hazards of Insects and Mites in Food. Em: Insect Management for Food Storage and Processing. Baur, F.J. ed., American Association of Cereal Chemists, Minnesota, pp.
- Pierce, A.M.; Pierce Jr., H.D.; Borden, J.H. & Dehlschlager, A.C. 1986. Enhanced production of aggregation pheromones in four stored-product coleopterans feeding on methoprene-treated oats Experientia, 42: 164-165.
- Pierozzi Jr., I. 1985. Ecologia Aplicada de *Anthonomus grandis grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera, Curculionidae), na Região de Campinas, SP. Tese de Mestrado/ UNICAMP/ Campinas (SP), 155 pp.
- Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmmonds, L.M.; McDonald, K.D. & Bufton, W.J. 1953. The genetic of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics, 5: 141-238.

- Press, J.W.; Flaherty, B.R. & Arbogast, R.T. 1975. Control of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, in a warehouse by a predaceous bug, *Xylocoris flavipes*. J. Georgia Ent. Soc., 10: 76-78.
- Price, L.A. & Mills, K.A. 1988. The toxicity of phosphine to the immature stages of resistant and susceptible strains of some common stored product beetles, and implications for their control. J. stored Prod. Res., 24: 51-59.
- Puzzi, D. 1977. Os Insetos que Atacam Grãos Armazenados. Em: Manual de Armazenamento de Grãos - Armazéns e Silos. Ed. Agronômica Ceres, S. Paulo, SP. 405 pp.
- Rhim, S.L.; Jahn, N.; Schnetter, W. & Geider, K. 1990. Heterologous expression of a mutated toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. EMBS Microbiology Letters, 44: 95-100.
- Riethmuller, U. & Langenbruch, G.A. 1989. Zwei biotestmethoden zur prüfung von *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* gegen larven des kartoffelafers [*Leptinotarsa decemlineata*]. Entomophaga, 34: 237-245.
- Roberts, D.W. 1981. Toxins of Entomopathogenic Fungi. Em: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1990. Burges, H.D. ed., Academic Press, N.Y., 949 pp.

- Searle, T. & Doberski, J. 1984. An investigation of the entomophagenous fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as a potential biological control agent for *Dryzaephilus surinamensis*. J. stored Prod. Res., 20: 17-23.
- Sekar, V. 1988. The insecticidal crystal protein gene is expressed in vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Curr. Microbiol., 12: 347-349.
- Shawir, M.; Le Patourel, G. N. J. & Moustafa, F. I. 1988. Amorphous silica as an additive to dust formulations of insecticides for stores grain pest control. J. stored Prod. Res., 24: 123-130.
- Simmonds, F.J.; Franz, J.M. & Sailer, R.I. 1976. History of Biological Control. Em: Theory and Practice of Biological control. Huffaker, C.B. & Messenger, P.S. eds., Academic Press, N.Y., 788 pp.
- Smith, L.B. 1985. Insect infestation in grain loaded in railroad cars at primary elevators in southern Manitoba, Canada. J. Econ. Entomol., 28: 531-534.
- Solomon, M.E. 1965. Archaeological records of storage pests: *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae) from an Egyptian pyramid tomb. J. stored Prod. Res., 1: 105-107.

- Stehr, F.W. 1975. Parasitoids and Predators in Pest Management. Em: Introduction to Insect Pest Management. Metcalf, R.L. & Luckmann, W. eds., John Wiley & Sons, N.Y., 587 pp.
- Steinhaus, E.A. 1959. *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. Hilgardia, 28: 351.
- Steinhaus, E.A. 1963. Insect pathology - An Advanced Treatise. Vol. 1 & 2. Academic Press, N.Y., 661 pp. (Vol. 1), 689 pp. (Vol. 2).
- Stockel, J. & Edwards, J.P. 1981. Susceptibility of *Sitotroga cerealella* (Oliv.) (Lepidoptera: Gelechiidae) to two insect juvenile hormone analogues. J. stored Prod. Res., 12: 137-141
- Subramanyam, B.H.; Harein, P.K. & Cutkomp, L.K. 1989. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae) infesting barley stored on farms in Minnesota. J. Econ. Entomol., 82: 989-995.
- Tanada, Y. 1976. Epizootiology and Microbiol Control. Em: Comparative Pathobiology - Vol. 1 - Biology of the Microsporidia. Bulla Jr., L.A. & Cheng, T.C. eds., Plenum Press, 371 pp.

- Throne, J.E. 1989. A fungal parasite (Ascomycetes: Laboulbeniales) of *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Cucujidae) J. stored Prod. Res., 25: 115-116.
- Trematerra, P. & Girgenti, P. 1989. Influence of pheromone and food attractants on trapping of *Sitophilus oryzae* (L.) (Col., Curculionidae): a new trap. J. Appl. Entomol., 108: 12-20.
- Vandenberg, J.D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol., 22: 755-759.
- Waib, C.M.; Mendeleck, E. & Habib, M.E.M. 1989. Uma nova variedade de *Bacillus thuringiensis* Berliner patogênica a coleópteros. XII Congr. Bras. Entomol., Resumos: 231.
- W.H.O. 1985. Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. World Health Organization, Geneva, 24 pp.
- White, G.G. 1982. The effect of grain damage on development in wheat of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). J. stored Prod. Res., 18: 115-119.

- White, N.D.G. 1985. Uptake of malathion and pirimiphos-methyl by rye, wheat, or triticale stored on treated surfaces. J. Econ. Entomol., 78: 1315-1319.
- White, N.D.G. & Loschiavo, S.R. 1985. Testing for malathion resistance in field-collected populations of *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and factors affecting reliability of the tests. J. Econ. Entomol., 78: 511-515.
- White, N.D.G. & Nowicki, T.W. 1986. Persistence of malathion and pirimiphos-methyl residues in two species of rapessed stored at various moisture contents and temperatures. Sci. Aliments, 4: 273-286.
- Wigglesworth, V.B. 1972. The Principles of Insect Physiology. John Wiley & Sons, 827 pp.
- Williams, R.N. & Floyd, E.H. 1971. Effect of two parasites, *Anisopteromalus calandrae* and *Chaetospora elegans*, upon populations of the maize weevil under laboratory and natural conditions. J. Econ. Entomol., 64: 1407-1408.
- Winks, R.G. 1985. The toxicity of phosphine to adults of *Tribolium castaneum* (Herbst): phosphine-induced narcosis. J. stored Prod. Res., 21: 25-29.

- Zacharuk, R.Y. 1981. Fungal Diseases of Terrestrial Insects. In Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases. Davidson, E. W. ed., Allanheld, Osmun Publ., 562 pp.
- Zehnder, G.W. & Gelernter, W.D. 1989. Activity of the M-ONE formulation of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against the Colorado Potato Beetle (Coleoptera : Chrysomelidae) : Relationship between susceptibility and insect life stage. J. Econ. Entomol., 82: 756-761.
- Zettler, J.L. 1982. Insecticide resistance in selected stored-product insects infesting peanuts in the Southeastern United States. J. Econ. Entomol., 25: 359-362.
- Zettler, J.L. & Cuperus, G.W. 1990. Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera:Bostrichidae) in wheat. J. Econ. Entomol., 83: 1677-1681.