

Lourdes
196

MARIA DE LOURDES NASCIMENTO

Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851

(Heteroptera: Pentatomidae : Asopinae) em laboratório

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Entomologia, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Dr. Gilberto José de Moraes

**Lavras
MINAS GERAIS - BRASIL
1996**

MARIA DE LOURDES NASCIMENTO

Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851

(Heteroptera: Pentatomidae : Asopinae) em laboratório

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Entomologia, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Dr. Gilberto José de Moraes

**Lavras
MINAS GERAIS - BRASIL
1996**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da Biblioteca Central da UFLA

Nascimento, Maria de Lourdes

Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae) em laboratório / Maria de Lourdes Nascimento. -- Lavras : UFLA, 1996.

56 P. : il.

Orientador: Gilberto José de Moraes.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Bacteria. 3. Impacto. 4. Percevejo. 5. Entomologia. 6. Entomopatogeno. 7. Tabela de vida. 8. *Bacillus thuringiensis*. 9. *Podisus nigrispinus*. I. Universidade Federal de Lavras. II Título.

CDD-595.754

MARIA DE LOURDES NASCIMENTO

Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851

(Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae) em laboratório

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Entomologia, para obtenção do título de "Mestre".

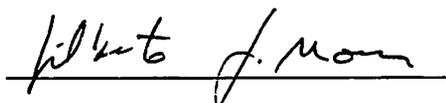
Aprovada em 26 de dezembro de 1996



Prof.^a Dr.^a Vanda H. Paes Bueno



Prof. Dr. Américo Iorio Ciociola



Prof. Dr. Gilberto José de Moraes

(Orientador)

A Deus

Abrigo seguro da minha alma

e luz dos meus caminhos

AGRADEÇO

Ao povo Nordestino pela simplicidade e determinação

A Paulino Ferreira meu querido pai e

Antonia F. do Nascimento

minha mãe (*In memoriam*)

OFEREÇO

Aos meus amáveis irmãos, Tunica, Eliza, Raimundo e José Ferreira

e a todos meus amados sobrinhos, especialmente: Carmilda,

Gláucia, Railane, Joacélia, Jocelia, Paulo, Flavio, Carlos,

Guto, André, Sidney e Ferreira, Léo e Linalda

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA pelo fornecimento das instalações para realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Gilberto José de Moraes pela confiança em mim depositada, pelo apoio seguro nos momentos difíceis, orientação e presença sempre constante em todas as etapas deste trabalho.

Aos professores Dr. Américo Iorio Ciociola, Dr^a. Vanda Helena Paes Bueno, Dr. Evóneo Berti Filho, Dr. Jair Campos de Moraes, Dr^a. Brigida de Souza, Dr. Lucimar Leão Silveira, Dr. René Luís de Oliveira Rigitano e Dr^a. Léa Rosa Mourgues Schurter pelo apoio dispensados, incentivo, colaboração e ensinamentos transmitidos.

À minha amiga e primeira mestra, Dr^a Francisca Nemauro Pedrosa Haji, Pesquisadora do CPATSA/EMBRAPA Petrolina PE, por ter me aceito como estagiária e discípula, abrindo-me novos horizontes e encaminhando-me continuamente na vida profissional.

Aos meus amigos de Petrolina, terra querida, em especial Nizane, Lucimar, Laurinha, Iraildes, Jane, Elizabeht, Rosangela e Andrea, pelo carinho e amizade.

À minha coorientadora Dr^a Deise M. F. Capalbo pesquisadora do CNPMA/EMBRAPA pela presença constante em todas as etapas desta pesquisa, auxiliando na condução dos experimentos e na correção deste trabalho. Também pelo carinho e amizade com que me acolheu, e estímulo sempre presente.

Aos pesquisadores do CNPMA/EMBRAPA, Dr.^a Elizabeth de Nardo pela amizade e apoio sempre dispensado, ao Dr. Roberto Cesnik pela preciosa ajuda, grande incentivo e amizade, a Dr.^a Aline de Holanda N. Maia pela amizade, ensinamentos transmitidos e análise estatística dos dados a Simon Luke Elliot pela preciosa ajuda na elaboração do summary.

Ao senhor Doraci Milano da Champion pelo gentil fornecimento de *Podisus nigrispinus* para início da criação, ao senhor José Eduardo de Almeida chefe do Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura de Gália S.P., e a senhora Amarilide Beluse, pelo fornecimento dos ovos de *Bombyx mori*.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Fitossanidade especialmente Daniel C. Gamarra pelo carinho e compreensão, Elberes P. Botrel, Alessandra R. Carvalho, Carla Galbiate, Antônio José Ferreira, M^a José Fachini Oliveira Paron, Carlos Kato, Alexander Machado Auad, Luciano C. Diniz e Valucia Teodoro, pela amável convivência e oportunidade de crescimento mútuo na troca de experiências. Ao secretário Fábio Pereira Carriço e às secretárias Lisiane O. Orlani e Maria de Lourdes O. Silva e a laboratorista Nazaré Vitorino pela amizade e auxílio dispensados.

Aos amigos do CNPMA, Rita de Cássia Oliveira, Roseli Nascimento, Carla Mazon, Romildo C. Siloto, Maria Amélia Lemos, Valmir Alves e Vanessa D. Nakamura, pelo apoio na condução dos trabalhos e aos amigos Elizabete Miki Uchino, Maurício Zacarias, Maria Aparecida Zacarias, Imeuda Peixoto, Maria Teresinha Siscaro, Cristiane Santos, Irene Domingos, Ana Paula Almada, Sandra Simões, Cristina Bataglioli e Jeferson Mineiro, pela amizade e carinho fraterno.

Aos funcionários da biblioteca da UFLa pela colaboração e presteza.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Dados biológicos e importância do predador <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae).....	4
2.2 Características gerais de <i>Bacillus thuringiensis</i> , utilização e importância comercial.....	6
2.3 Efeito de <i>Bacillus thuringiensis</i> em predadores	8
2.4 Efeito de <i>Bacillus thuringiensis</i> em parasitoides	10
2.5 Importância da tabela de vida	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Criação de manutenção de <i>Podisus nigrispinus</i>	15
3.2 Criação de <i>Bombyx mori</i>	16
3.3 Condições de condução do experimento	16
3.4 Características do Agente Microbiano Utilizado	17
3.5 Tratamentos	18

3.6	Confecção de tabelas de vida de fertilidade	19
3.7	Contagem de esporos dos discos foliares	19
3.8	Plaqueamento do tubo digestivo de <i>Bombyx mori</i>	19
3.9	Plaqueamento do tubo digestivo, hemolinfa e fezes de <i>Podisus nigrispinus</i>	20
3.10	Teste de preferência com <i>Podisus nigrispinus</i>	21
3.11	Análises estatísticas	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1	Tabela de vida de fertilidade de <i>Podisus nigrispinus</i>	23
4.2.	Duração da fase imatura e percentual de sobrevivência	30
4.3	Longevidade dos adultos.....	32
4.4	Teste de preferência alimentar de <i>Podisus nigrispinus</i>	33
4.4.1	Contagem de esporos dos discos foliares e total de esporos ingeridos pelas lagartas.....	34
4.4.2	Plaqueamento do tubo digestivo de <i>Bombyx mori</i>	35
4.4.3	Plaqueamento do tubo digestivo, fezes e hemolinfa de <i>Podisus nigrispinus</i>	36
5	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	ANEXOS.....	52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Duração dos estágios imaturos e percentual de sobrevivência de *Podisus nigrispinus* em cada estágio, alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis*, primeira geração.....31
- Tabela 2. Duração dos estágios imaturos e percentual de sobreviventes de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis*, segunda geração.....32
- Tabela 3. Longevidade de adultos de *Podisus nigrispinus* alimentados com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em duas gerações consecutivas, temperatura: 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas..... 33
- Tabela 4. Número de esporos e células vegetativas do tubo digestivo de *Bombyx mori* alimentados com discos de amoreira contaminados com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.....35
- Tabela 5. Observações microbiológicas do tubo digestivo, hemolinfa e fezes de *Podisus nigrispinus*37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Taxa líquida de reprodução (R_0) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. As barras ($\pm \tau$) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%.24
- Figura 2. Razão infinitesimal de aumento populacional (r_m) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. As barras ($\pm \tau$) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%.24
- Figura 3. Intervalo médio entre gerações (T) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* para a primeira e segunda geração. As barras ($\pm \tau$) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%. Diferenças significativas para a geração I e não significativa para geração II.....25
- Figura 4. Razão finita de aumento populacional (λ) de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* para a primeira e segunda geração. As barras ($\pm \tau$) representam os limites do intervalo de confiança de 95%.26
- Figura 5. Tempo de duplicação de geração (Td) de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagarta de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis*. As barras ($\pm \tau$) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%.27

- Figura 6. Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias, primeira geração, a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.
.....28
- Figura 7 Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* infectadas com um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, primeira geração, a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.....28
- Figura 8. Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias, segunda geração a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.29
- Figura 9. Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* infectadas com um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, segunda geração a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.....29
- Figura 10. Número médio de ovos/ fêmea/tratamento/geração de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Significancia (P=0,0015)..... 30

RESUMO

NASCIMENTO, Maria de Lourdes. **Efeito de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae) em laboratório.** Lavras: UFLA, 1996, 56p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia, área de concentração Entomologia)*.

As metodologias propostas pelos protocolos com finalidades de estimar o risco potencial dos agentes microbianos sobre artrópodes benéficos avaliam apenas mortalidade em período de tempo determinado. O presente estudo objetivou analisar o efeito do agente microbiano de controle biológico *Bacillus thuringiensis* sobre o predador *Podisus nigrispinus*, através de análise comparativa de tabelas de vida de fertilidade. O experimento foi realizado no laboratório de Entomologia do CNPMA/EMBRAPA em Jaguariúna São Paulo, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas. Constituiu-se de dois tratamentos, no primeiro (t1) os predadores foram alimentados com lagartas sadias de *Bombyx mori* e no segundo (t2) com lagartas infectadas pelo patógeno. Os parâmetros biológicos analisados foram corrigidos através de um programa de estimativas "Jackknife". Os valores de R_0 para a primeira geração foram: 243,96 fêmeas/fêmea no curso de uma geração para o tratamento controle (t1), e 94,6 para o tratamento com lagartas infectadas (t2). Os valores de R_0 observados na segunda geração foram 223,96 para (t1) e 53,34 para (t2). Os valores de r_m na primeira e segunda geração foram 0,17 (t1) ; 0,12 (t2) e 0,14 (t1) ; 0,10 (t2) fêmeas/fêmea/dia respectivamente. Valores de λ na primeira geração foram 1,19 (t1) e 1,12 (t2) fêmeas/fêmea/dia; na segunda geração foram 1,15 (t1) e 1,10

* Orientador: Prof. Dr. Gilberto José de Moraes. Membros da Banca:, Prof.^a. Vanda Helena Paes Bueno, Prof. Dr. Américo Iorio Ciociola.

(t2), respectivamente. Valores de λ na primeira geração foram 1,19 (t1) e 1,12 (t2) fêmeas/fêmea/dia; na segunda geração foram 1,15 (t1) e 1,10 (t2), respectivamente. Os valores de (T), foram 32,3 dias (t1) e 39,4 dias (t2) na primeira geração, respectivamente. Para a segunda geração, os valores de (T) foram 39,2 dias (t1) e 39,3 dias (t2), respectivamente. Foram elaboradas curvas de oviposição e o tratamento controle (t1) demonstrou superioridade nas duas gerações em comparação com o tratamento com lagartas infectadas (t2). O número médio de ovos por fêmea para (t1) nas duas gerações também demonstrou superioridade quando comparado com o número médio do (t2). A duração média dos estágios imaturos de *P. nigrispinus* para a primeira geração apresentou média de $18,4 \pm 1,0$ dias para o tratamento controle e $20,3 \pm 2,0$ dias para o tratamento com lagartas infectadas respectivamente. A taxa de eclosão nos dois tratamentos foi de 100% e o percentual de sobreviventes da fase imatura foi de 80% para t1 e 56% para t2. Para a segunda geração as médias observadas foram $19,7 \pm 1,7$ (t1) e $21,2 \pm 1,0$ (t2), a taxa de eclosão foi de 100% para (t1) e 64% para (t2). O percentual de sobreviventes da fase imatura foi 64% (t1) e 42% (t2). *P. nigrispinus* não apresentou preferência alimentar por lagartas sadias e infectadas com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Não foi verificada a presença de esporos de *B. thuringiensis* na hemolinfa do predador o que sugere-se que esta bactéria não se multiplica neste inseto. Esporos viáveis foram detectados nas fezes de *P. nigrispinus*. Os resultados sugerem que os efeitos adversos observados associados aos parâmetros de tabelas de vida foram provocados pelos adjuvantes e inertes que compõe a formulação do produto comercial *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, ou a presença de metabólitos tóxicos no produto.

ABSTRACT

Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on *Podisus nigrispinus* Dallas, 1851 (Heteroptera : Pentatomidae : Asopinae) in laboratory

Methodologies to evaluate potential risks of microbial biological control agents refers only to mortality in a determined period of time. The objective of the present study was to evaluate the effect of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* on the predator *P. nigrispinus* through comparative analyses of fertility life tables. The experiment was conducted in the Entomology Laboratory at CNPMA/EMBRAPA, in Jaguariúna., State of São Paulo, at 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ RH and photophase of 12 h. There were two treatments; in the first, predators were fed healthy larvae of *Bombyx mori* whereas in the second, predators were fed larvae infected with the pathogen. The biological parameters R_0 , r_m , λ , T and Td were evaluated in two consecutive generations, and the values were corrected through an estimation program "Jackknife". R_0 for the first generation was 243.9 females/female in the course of one generation for the control treatment (t1), and 94.6 for the treatment with infected larvae (t2). R_0 for the second generation was 223.9 for (t1) and 53.3 for (t2). The infinitesimal rate of population increase (r_m) in the first and second generations were 0.17 (t1); 0.12 (t2) and 0.14 (t1) and 0.10 (t2), respectively. The finite rates of population increase (λ) in the first generation were 1.19 (t1) and 1.12 (t2) females/females/day; in the second generation, these were 1.15 (t1) and 1.10 (t2) females/females/day, respectively. The values of the mean interval (T) between generations were 32.3 days (t1) and 39.4 days (t2) in the first generation, respectively. For the second generation, (T) values were 39.2 days for t1 and 39.3 days for t2. Daily and total oviposition rates were higher for the control treatment (t1) in both generations. In the first generation, the mean duration of the immature phase of *P. nigrispinus* was 18.4 ± 1.0 days for t1 and 20.3 ± 2.0 days for t2. Egg hatching in the two treatments was 100%;

immature survivorship was 80% for t1 and 56% for t2. In the second generation, the mean duration of the immature phase was 19.7 ± 1.7 for t1 and 21.2 ± 1.0 for t2. Egg hatching rates were 100% for t1 and 64% for t2; immature survivorship was 64% for t1 and 42% for t2. *P.nigrispinus* did not show any difference between preferences to feed on healthy larvae or larvae infected with *B.thuringiensis* var. *kurstaki*. Spores of *B.thuringiensis* were not detected in the haemolymph of the predator which suggests that this bacterium does not multiply in this insect. Viable spores were detected in the faeces of *P.nigrispinus*, leading to the conclusion that these pass intact through the digestive tract and disseminate in the environment. The results suggest that the observed adverse effects were caused by the inert compounds present in the formulation of the commercial *B.thuringiensis* var. *kurstaki* product.

1 INTRODUÇÃO

Os inseticidas microbianos tem despertado um crescente interesse como método alternativo de controle de pragas nos últimos anos. Apesar do modo de ação dos produtos biológicos ser diferente dos inseticidas químicos, não existe uma portaria para registro destes produtos, que seja específica e contemple as características biológicas, a nível nacional.

Segundo Nardo *et al.* (1995b) o sistema de avaliação utilizado para os produtos químicos não é adequado para a avaliação dos produtos biológicos. Os produtos biológicos registrados até o momento seguem o decreto-lei 98.816 de 11 de janeiro de 1990, sobre registro e avaliação de agrotóxicos. Em alguns países, o processo de avaliação de produtos biológicos para registro está estabelecido em regulamentações e protocolos específicos. Este é o caso dos Estados Unidos, que por mais de duas décadas vem registrando estes produtos. Alguns países da Europa também dispõem destas regulamentações há alguns anos. Atualmente, a Organização para a Cooperação Econômica e de Desenvolvimento (OECD) tem concentrado esforços no sentido de preparar uma harmonização internacional de todos os requisitos exigidos para registro de biopesticidas, com fins de reduzir barreiras comerciais entre países e evitar duplicidade de testes.

A avaliação de risco sugerida nos protocolos de avaliação tóxico-patológica sobre organismos não visados segue metodologia de esquema de fases ou multiníveis utilizadas pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos da América desde 1983. Metodologia similar se encontra em discussão também na Comunidade Econômica Européia (CEE), com grande tendência a ser adotado pelos países membros. Neste sistema de testes em fases, os organismos não visados são submetidos inicialmente a uma dose alta do agente microbiano de controle (testes da fase I). No caso dos testes iniciais não indicarem danos significativos, então nenhum outro teste é geralmente necessário. Entretanto, se resultados significativos forem

encontrados na fase I, então os testes da fase II serão exigidos e assim sucessivamente. Na avaliação tóxico-patológica, os testes da fase II se destinam especificamente a avaliar o comportamento do agente de controle no ambiente, enquanto que os da fase III e IV avaliam os efeitos do agente de controle nos organismos não visados sob condições mais próximas às realmente esperadas no campo (Nardo *et al.* 1995a ; Nardo *et al.* 1995b). Estes testes são aceitos dada a característica de alta segurança de muitos dos organismos microbianos propostos para uso como agente de controle de pragas, sendo que este sistema simplifica muito o processo de avaliação, reduzindo custos e tempo de avaliação.

Os estudos de avaliação de risco no Brasil tornam-se necessários para obtenção de informações com critérios cientificamente comprovados a fim de subsidiar a elaboração de uma portaria específica por parte dos órgãos federais registrantes, e para que se possa maximizar o uso de agentes microbianos de controle de pragas com qualidade e segurança no país. Atualmente, encontra-se em fase de aprovação uma portaria específica elaborada pela EMBRAPA/CNPMA e IBAMA com a colaboração da comunidade científica. que está sendo submetida aos órgãos federais competentes (Ministério da Agricultura e Abastecimento, Ministério da saúde e IBAMA) para registro dos produtos biológicos que se encontram disponíveis no mercado nacional.

Normalmente, os testes de avaliação de risco sugeridos pelos protocolos visam avaliar na maioria dos casos a mortalidade em insetos não alvo em uma geração (PESTICIDE... 1989). Porém esta metodologia pode não detectar efeitos a níveis de redução populacional dos organismos não visados, o que poderia acarretar problemas ecológicos a longo prazo nos ecossistemas em que o agente microbiano de controle é utilizado.

O presente trabalho avalia uma metodologia mais detalhada através de estudos comparativos de tabelas de vida, que tem como finalidade estabelecer o potencial de risco ecológico de agentes microbianos de controle sobre populações de insetos não alvo em gerações consecutivas. Estudos desta natureza podem indicar efeitos não encontrados nas metodologias convencionalmente aceitas em outros países.

Dentre os produtos biológicos utilizados no mercado a nível mundial, as formulações comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner têm sido largamente empregadas no controle de várias pragas. No Brasil, milhares de hectares de florestas implantadas são anualmente

pulverizados para controle de surtos de lepidópteros desfolhadores. Embora existam recomendações para uso de *B. thuringiensis* para controle de pragas nestas áreas, há grande carência de informações sobre a interação deste produto com a fauna benéfica de parasitóides e predadores que normalmente povoam estes ecossistemas.

Ressalta-se que em cada cultura na qual o produto é proposto a ser utilizado, existe normalmente um complexo de inimigos naturais que se comporta de formas distintas, sendo importante o estabelecimento de critérios para a seleção destes organismos. Estes critérios poderão definir os organismos que apresentam potencial para atuar como fator de equilíbrio no complexo de inimigos naturais de uma determinada praga.

Os critérios utilizados neste trabalho para a seleção do predador *P. nigrispinus* no ecossistema florestal foram :

- ⇒ exposição aos produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* com frequência relativamente alta;
- ⇒ frequência com que é encontrado predando lepidópteros em várias culturas de importância comercial;
- ⇒ ser facilmente mantido em grandes números em laboratório e criados com os métodos conhecidos;
- ⇒ apresentar bom potencial biótico;
- ⇒ espécie nativa com potencial para criações massais;
- ⇒ e por ser uma espécie amplamente distribuída.

Os objetivos deste estudo foram portanto, avaliar o efeito de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em *P. nigrispinus* em condições de laboratório, através da análise comparativa de tabelas de vida, e validar metodologias de avaliação de risco como subsídio aos órgãos federais registrantes de produtos biológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dados biológicos e importância do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera:

Pentatomidae: Asopinae)

As espécies entomófagas da família Pentatomidae pertencem a sub-família Asopinae e neste grupo o percevejo *Podisus nigrispinus* Dallas tem sido a espécie mais estudada. Estes percevejos são freqüentemente encontrados associados a surtos de lepidópteros desfolhadores de eucalipto e mencionados como agentes potenciais de controle biológico de pragas (Barcelos *et al.*, 1993; Assis Júnior, 1995; Lopes *et al.* 1996;). O predador *Podisus connexivus* Bergroth é sinônimo júnior de *P. nigrispinus* conforme redescrito por Thomas (1992) referido por Carvalho *et al.* (1995).

Zanuncio *et al.* (1989) e Zanuncio *et al.* (1993) mencionam a ocorrência de diversos predadores em surtos de lagartas desfolhadoras de eucalipto, destacando-se *P. nigrispinus* (= *P. connexivus*) e *Podisus nigrolimbatus* Spínola.

Gonçalves (1990), comparou a ação predatória de *P. nigrispinus* (= *P. connexivus*) e *P. nigrolimbatus* e os caracterizou como espécies de alto potencial biótico. Nascimento *et al.* (1991b) estudaram a biologia de *P. connexivus* sobre lagartas de *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae), obtendo as seguintes médias: período de pré-oviposição, 7,0 dias; ovos por fêmea, 213; postura por fêmea, 6,0; ovos por postura, 31; viabilidade dos ovos, 76%; período embrionário, 5,8 dias; período ninfal, 25 e 24 dias para indivíduos que deram origem a machos e fêmeas respectivamente. Alves *et al.* (1991) observaram o desenvolvimento ninfal de *P. connexivus* alimentado com larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) e de *B. mori* e

observaram que a duração média da fase jovem foi de $24,2 \pm 2$ e $22,3 \pm 0,5$ dias a porcentagem média de sobrevivência foi de $82,0 \pm 5,1$ e $84,3 \pm 4,3$, respectivamente.

Leite (1994) conduziu estudos para avaliar as características biológicas de *P. nigrispinus* (= *P. connexivus*) alimentado com larvas de *M. domestica*, desenvolvendo três metodologias de criação. Leite et al. (1991a) estudaram o desenvolvimento ninfal de *P. nigrispinus* (= *P. connexivus*) em três hospedeiros, *Tenebrio molitor*, *M. domestica* e *B. mori*. Relataram que os hospedeiros mais adequados para o desenvolvimento ninfal foram *M. domestica* e *B. mori*. Lopes et al. (1996a), compararam o desenvolvimento de *P. nigrispinus* com larvas de *Zophobas confusa* (Coleoptera: Tenebrionidae), *T. molitor* e *M. domestica*. Estudos para conhecer a capacidade predatória de ninfas e adultos de *P. nigrispinus* foram realizados por Lopes et al. (1996b), com larvas de *T. molitor* que constataram que o maior número de presas mortas ocorreu nas maiores densidades populacionais destas.

Torres, Zanuncio e Oliveira (1996) estudaram o efeito de múltiplos acasalamentos na longevidade e oviposição de *P. nigrispinus* e concluíram que fêmeas com uma, duas ou nenhuma cópula apresentaram maior longevidade que as acasaladas por períodos maiores sendo que estas últimas produziram maior número de ovos. Fêmeas que foram deixadas em contato contínuo com machos continuaram férteis, mas tiveram menor longevidade, sem contudo aumentar sua capacidade reprodutiva. Leite et al. (1991b) verificaram em condições de laboratório se havia diferenças nos aspectos reprodutivos de fêmeas de *P. nigrispinus* (= *P. connexivus*) criadas em laboratório e que conservam características morfológicas semelhantes às provenientes do campo (cor e tamanho) e fêmeas que apresentavam características diferentes daquelas providas do campo. Os autores não detectaram nenhuma diferença significativa.

Saavedra et al. (1992) compararam a fecundidade e fertilidade de fêmeas de *P. connexivus* alimentadas com dieta artificial e larvas de *M. domestica*. Zanuncio et al. (1993) estudaram a influência da densidade populacional de *P. nigrispinus* na sobrevivência, duração do período ninfal e peso dos adultos. Em experimentos realizados por Batalha et al. (1993), verificou-se que *P. nigrolimbatus* apresentou maior viabilidade ninfal, período ninfal mais curto e adultos mais pesados quando a presa foi *B. mori* do que quando a presa foi *M. domestica*.

2.2 Características gerais de *Bacillus thuringiensis*, utilização e importância comercial

O grupo de bactérias entomopatogênicas mais estudado pertence à família Bacillaceae. As espécies do gênero *Bacillus* caracterizam-se por células vegetativas em forma de bastonetes Gram-positivas aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de formar esporos. A espécie *B. thuringiensis* é conhecida como causadora de doenças em insetos desde 1901, quando foi isolada por Ishiwata no Japão. Em 1911, esta bactéria foi descrita como *Bacillus thuringiensis* por Berliner (Fast, 1981; Habib e Andrade, 1991; Cannon, 1993 Benintende e Marquez, 1996).

De um total de aproximadamente 100 espécies de bacilos entomopatogênicos, apenas *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus lentimorbus* e *Bacillus sphaericus* são utilizadas para preparação de inseticidas bacterianos. *B. thuringiensis* é uma bactéria que tem sido objeto de muitos estudos científicos e investimentos comerciais. Sua ação inseticida tem se mostrado eficaz, especialmente pela especificidade a insetos-praga e compatibilidade com a conservação ambiental (Burgess, 1981; Ferro e Gelernter, 1989; Kurstaki, 1982; Abbot, 1991a; Meadows, 1993 e Arcas, 1995).

Habib e Andrade (1986), citaram que as descobertas de diferentes variedades desta bactéria cristalífera, com seus variáveis níveis de patogenicidade indicam possíveis ocorrências de evolução e adaptação desses patógenos dentro de uma razoável gama de hospedeiros naturais.

Deacon (1983) mencionou que os cristais de *B. thuringiensis* são estáveis em pH de 3,0 a 5,0. Quando ingeridos por insetos que não possuem as condições ideais no trato digestivo, os cristais são eliminados pelas fezes totalmente inalterados ou são inativados pelas condições ácidas do mesêntero dos insetos não suscetíveis. Por outro lado, nos insetos que possuem pH alcalino no mesêntero, os cristais se rompem causando septicemia.

O *B. thuringiensis* atua nos insetos suscetíveis de acordo com a presença apropriada de receptores no mesêntero, onde a atividade proteolítica e o pH são necessários para dissolver os cristais tóxicos, delta- endotoxina, que são os principais componentes inseticidas das formulações atuais desta bactéria. O modo de ação é inicialmente uma interação das toxinas com a membrana plasmática das células epiteliais. A dissolução (hidrólise) do cristal, em meio alcalino (pH superior a 9), produz moléculas menores, de tamanho variável, que são peptídeos resistentes a proteases.

Isso explica porque os insetos de pH intestinal alcalino são susceptíveis ao *B. thuringiensis* (Habib e Andrade, 1991; Gill, Cowles e Pietrantonio 1992 ; Addison, 1993). Em um período de aproximadamente 12 horas, cada esporo pode produzir até 69 bilhões de células vegetativas, quando ingeridos pelos insetos ou expostas às condições favoráveis. Durante o processo de esporulação e formação dos cristais ou corpos paraesporais, as células vegetativas e os esporos excretam lecitinasas, quitinasas e proteases que são enzimas que possibilitam a proliferação da bactéria no hospedeiro (Abbott, 1991a; Drobniowski, 1994; Benintende e Marquez, 1996).

Atualmente, a maior parte do mercado de bioinseticidas corresponde ao uso de produtos que utilizam *B. thuringiensis* como princípio ativo. Mundialmente os agentes de controle microbianos, em particular o *B. thuringiensis*, tem se difundido, em substituição aos produtos químicos convencionais para supressão de coleopteros, dipteros e lepidopteros. O *B. thuringiensis* apresenta-se como um produto biológico cujo consumo tem aumentado drasticamente nos últimos anos. É considerado em vários países do mundo como o microrganismo entomopatogênico com a mais expressiva produção comercial e utilização no controle de pragas, principalmente as da ordem Lepidoptera (Norris 1970; Falcon, 1971; Deacon, 1983; Habib e Andrade, 1986; Arantes, 1989; Abbott, 1991b; Mummigatti e Raghnnathan, 1990 e Daoust, 1994).

Os produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* expandiram-se no mercado mundial nas últimas décadas movimentando cerca de 200 milhões de dólares anuais , sendo a América do Norte o maior consumidor, e a América do Sul e América Central, o quarto mercado consumidor. São também muito utilizados na China, Rússia, França, Itália, Inglaterra, Alemanha, África, Canadá, Região do Pacífico e Extremo Oriente. Nestes países, são registrados para o controle de lagartas de importantes culturas: olerícolas, pastagens, mandioca, fumo, algodão, citros, videira, maçã, feijão, soja, plantas ornamentais e espécies florestais, perfazendo um total de cerca de 150 espécies de insetos alvos em mais de 50 culturas (Falcon, 1971; Cantwel e Cantelo, 1984; Castineiras e Calderon, 1985; Moraes e Capalbo, 1988; Salama et al, 1990; Abbott, 1991; Salama et al. 1991a; Lambert e Peferoen, 1992; Davidson et al, 1992; Amsheev, 1993; Cannon, 1993 e Jackson, 1996).

Estima-se que mais de 150.000 ha de culturas são anualmente tratados com *B. thuringiensis* no Brasil. Ultimamente vem sendo empregado com sucesso no país para controle de lagartas desfolhadoras de florestas, soja e tomateiro (Gravena et al, 1980; Capalbo, 1991).

2.3 Efeito de *Bacillus thuringiensis* em predadores

As preparações comerciais à base de *B. thuringiensis* são compostas por esporos, cristais e inertes que podem ser antioxidantes e outros estabilizadores, agentes de proteção a radiação ultravioleta, agentes de suspensão, carreadores, materiais encapsuladores, agentes umectantes, agentes adesivos, agentes espalhantes ou compostos antifloculantes. A composição exata destes inertes é considerada informação de propriedade do fabricante e não é indicada nos rótulos dos produtos. Poucos estudos dos efeitos desses aditivos em organismos não alvo tem sido publicado na literatura, e a preocupação a respeito do seu potencial de toxicidade tem sido manifestada Forsberg, (1976 e Orton, 1987), citado por (Addison, 1993).

É importante a caracterização de diferentes formulações comerciais e raças de *B. thuringiensis* por três razões: (1) cada formulação possui diferentes formas de causar efeitos adversos em organismos não alvo; (2) as variedades de *B. thuringiensis* são formuladas com diferentes concentrações de inertes e ingredientes ativos; (3) as variedades desta bactéria podem conter diferentes taxas de produção de β -exotoxina e δ -endotoxina. Muitas das formulações foram baseadas no serovar 1 (*B. Thuringiensis* var. *thuringiensis*), que produz β -exotoxina que pode ser letal para várias ordens de insetos, apresentando portanto pouca seletividade aos organismos não visados (Faust e Bulla, 1982 ; Flexner, Lighthart e Crofit, 1986;).

Haverty (1982) realizou estudos de laboratório para avaliar o efeito de um óleo carreador que compõe o Dipel® 4L (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*) sobre todos os estágios de *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville (Coleoptera: Coccinellidae) e *Chrysopa carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae), através de pulverizações dos predadores com água + óleo carreador. O autor verificou mortalidade estatisticamente significativa na fase adulta de *H. convergens* e *C. carnea*, devido a ação do óleo.

Wallner e Surgeoner (1974) citados por Melin e Cozzi (1990) estudaram os efeitos adversos de *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* ao predador

Podisus maculiventris (Say) (Heteroptera: Pentatomidae), através de pulverizações de diferentes concentrações destes formulados em áreas florestais para controle do lepidoptero *Heterocampa manteo*. Não foi verificado pelos autores efeito adverso dos produtos sobre o predador após se alimentar de lagartas infectadas.

Giroux *et al.* (1994) realizaram estudos de laboratório para avaliar o efeito de *B. thuringiensis* var. *san diego* em adultos de *Coleomegilla maculata lengi* Timberlake (Coleoptera: Coccinellidae) utilizando como alimento ovos do besouro da batata do colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Say) e pólen. Foram avaliadas diluições representando 0,01; 1 e 10 vezes a dose recomendada para campo. Foi verificado que a eficácia de predação de *C. maculata* não foi afetada na menor dosagem. Entretanto a capacidade predatória foi significativamente reduzida nas outras duas doses.

Ali Abdul-Sattar e Watson (1982) conduziram estudos em casa de vegetação e campo utilizando *B. thuringiensis* para controle da *Heliothis virescens* (Fabricius) à dose recomendada para campo. Os autores não verificaram efeito adverso em *Geocoris punctipes* (Say), no quarto e quinto instares e na fase adulta.

Ao pesquisarem o efeito de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre o predador *Xylocoris flavipes*, Salama *et al.* (1991) verificaram que a taxa de consumo de lagartas infectadas de *Plodia interpunctella* diminuiu com o aumento da concentração do patógeno na dieta. Isto conseqüentemente resultou no declínio da oviposição e taxa de eclosão deste predador.

Chapman e Hoy (1991) conduziram experimentos de laboratório para comparar os efeitos de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre os ácaros *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) e *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Phytoseiidae). Concluíram que os dois produtos reduziram a sobrevivência de fêmeas de *M. occidentalis* em 48 horas, mas não interferiram na sobrevivência de fêmeas de *T. urticae*. Quanto à eclosão das larvas, as duas espécies não foram afetadas pelos produtos avaliados. Segundo os autores, o efeito observado pode estar ligado à ação da bactéria, ou dos inertes.

Estudos de laboratório foram realizados por Dunbar e Johnson (1975) para avaliar o efeito de *B. thuringiensis* na sobrevivência e longevidade de *Jalysus spinosus* (Say), importante predador de ovos de lepidópteros, principalmente de *Heliothis virescens* (Fabricius). O predador

foi exposto a folhas de tabaco tratadas com *B. thuringiensis* por um período de 20 dias. Os autores não verificaram diferença estatisticamente significativa de mortalidade entre o grupo tratado e o controle.

Em culturas de algodão, Harding et al. (1972) citados por Melin e Cozzi (1990) conduziram 2 anos de estudos para avaliar o efeito de algumas variedades de *B. thuringiensis* aos inimigos naturais de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae). Os autores não verificaram efeitos adversos significativos aos inimigos naturais desta praga, dentre os quais *Orius* spp., (Hemiptera: Anthocoridae), *Geocoris* spp., (Heteroptera: Lygaeidae) e os percevejos da família Nabidae e Reduviidae.

2.4 Efeito de *Bacillus thuringiensis* em parasitoides

É improvável que esporos, cristais (δ -endotoxina) ou exotoxinas dos produtos formulados possam causar efeito quando aplicados diretamente sobre o tegumento de insetos que não tenha sofrido injúria. A maioria dos bioensaios realizados até o momento com *B. thuringiensis* em insetos não alvo testa o efeito patológico agudo através da ingestão dos esporos e produtos formulados. O efeito de doses letais e sub-letais na presa pode alterar a qualidade da fonte de alimento sem contudo exercer um efeito direto da bactéria sobre o parasitóide. Algumas larvas de parasitoides se alimentam de órgãos específicos como o corpo gorduroso (fat body) dos lepidópteros que armazena grandes quantidades de nutrientes (Flexner, Lighthart e Crofit, 1986 e Parra, 1991;). Segundo Melin e Cozzi (1990) as condições de condução dos experimentos podem provocar um declínio nutricional prejudicial ou mesmo fatal para o desenvolvimento dos parasitoides, pelo estado de desnutrição do hospedeiro, após ser contaminado com agentes microbiano de controle.

Hamed (1979) citado por Flexner, Lighthart e Crofit (1986), estudou a suscetibilidade de alguns parasitoides de *Yponomeuta evonymellus* a *B. thuringiensis*. Os parasitóides utilizados nos testes foram dois Ichneumonidae, *Diadegma armillata* e *Pimpla turionellae*, um Encyrtidae *Ageniaspis fusicollis* e um Eulophidae *Tetrastichus evonymellae*. Foi verificado que as larvas dos parasitóides foram susceptíveis a *B. thuringiensis* após ingerirem esporos viáveis. Um grande

número de células vegetativas foi verificado na hemolinfa e trato digestivo dos parasitóides adultos mortos após a ingestão da bactéria.

Marques (1993) realizou estudos em laboratório e casa-de-vegetação utilizando o hospedeiro *Tuta* (= *Scrobipalpuloides*) *absoluta* (Meyrick), para avaliar a influência de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* no comportamento do parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley. O autor observou que a presença da bactéria nas folhas de tomate não diminuiu a capacidade de *T. pretiosum* de parasitar ovos de *T. absoluta*, mas afetou a emergência desse parasitóide, quando a bactéria foi aplicada sobre os ovos já parasitados.

Salama *et al.* (1991) pesquisaram a interação de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* com *P. interpunctella* e o parasitóide *Bracon brevicornis*. Verificaram que o parasitóide apresentou redução significativa do número de ovos postos por indivíduo e longevidade dos adultos.

McDonald, Kok e Yousten (1990) estudaram o comportamento do parasitóide *Cotesia rubecula* Marshall (Hymenoptera: Braconidae) em lagartas de quarto instar de *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera.: Pieridae) infectadas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. Verificaram que nas dosagens de 8,5 e 85 Unidades Internacionais/ml houve emergência normal do parasitóide, (69 e 76%), enquanto que na dosagem de 850 UI/ml a emergência foi apenas 25%. A dosagem de 850 UI corresponde somente um décimo da dosagem recomendada para campo

Experimentos de campo conduzidos por Niwa, Stelzer e Beckwith (1987) para avaliar o efeito de duas formulações de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* e duas dosagens de campo (20 e 30 bilhões de UI) sobre os parasitoides de *Choristoneura occidentalis* Freeman indicaram que *Apanteles fumiferanae* Viereck, *Glypta fumiferanae* (Viereck) e *Phytodietus fumiferanae* Rohwer foram os inimigos naturais mais afetados pelo produto. Os dois primeiros parasitóides não foram capazes de completar o seu ciclo de desenvolvimento no hospedeiro sob condições de campo. Não foi determinada a causa da mortalidade dos parasitóides, que segundo os autores pode ter sido tanto por infecção microbiana, insuficiência nutricional ou morte prematura dos hospedeiros.

Thomas e Watson (1986) avaliaram o efeito de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* na sobrevivência de imaturos e adultos de *Hiposoter exiguae* (Hymenoptera: Ichneumonidae) usando *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) como hospedeiro. Verificaram que o desenvolvimento do parasitóide em hospedeiros tratados foi significativamente alterado,

apresentado uma pequena taxa de emergência de adultos comparado ao hospedeiro não tratado. Verificaram também que a sobrevivência de imaturos e adultos de *H. exiguae* quando em contato com suspensões contendo esporos viáveis de *B. thuringiensis* foi reduzida.

Ticehurst, Fusco e Blumenthal (1982) avaliaram o efeito de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* no parasitismo de *Apanteles melanoscelus* (Ratzeburg) (Hymenoptera : Braconidae), *Phobocampe uncinata* (Gravenhorst) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e sobre três espécies de Diptera da família Tachinidae: *Compsilura concinnata* (Meigen), *Blepharipa pratensis* (Robineau-Desvoidy) e *Parasetigena silvestris* (Robineau-Desvoidy). Os experimentos foram conduzidos em condições de campo por um período de dois anos, utilizando metade da dose normalmente recomendada para controle da *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). Os autores verificaram que o parasitismo por *A. melanoscelus* aumentou significativamente em comparação aos talhões não tratados, enquanto que *P. uncinata* não apresentou parasitismo significativo. Os taquinídeos *C. concinata* e *B. pratensis* apresentaram parasitismo significativamente reduzido nos talhões tratados, enquanto que o parasitismo por *P. silvestris* não foi significativamente alterado.

2.5 Importância da tabela de vida

As tabelas de vida ou tabelas etárias são de grande valia para compreensão da dinâmica populacional de uma espécie. Estas tabelas servem para condensar os dados essenciais de uma população. Atualmente estão bastante difundidas, sendo empregadas com sucesso em estudos de dinâmica populacional de insetos e de manejo de pragas (Silveira Neto *et al.*, 1976). A tabela de vida permite uma visão integrada das características biológicas de uma população, sob condições ambientais determinadas (Coppel e Mertins, 1977).

Para Rabinovic (1978), as tabelas de vida se baseiam no estudo de um grupo de organismos de mesma idade cronológica através do acompanhamento ao longo do tempo do destino dos organismos que nasceram na mesma época. As tabelas de vida simples ou biológicas são feitas para condições de laboratório, podendo ser de fertilidade ou de esperança de vida.

Segundo Silveira Neto *et al* (1976) cada indivíduo na tabela de vida de fertilidade apresenta sua própria velocidade de desenvolvimento, longevidade e fecundidade, sendo tais fatores comumente expressos em termos médios da população.

Ao combinar as funções de sobrevivência e fecundidade específica por idade, pode-se calcular parâmetros populacionais que são de grande utilidade para caracterizar uma população de insetos. A estrutura de uma tabela de vida de fertilidade inclui colunas identificadas como x , l_x e m_x . Os valores da coluna “ x ” representam o intervalo de idade (estágio etário) no qual foi tomada a amostra, e seu valor é o ponto médio do mesmo intervalo. A coluna “ l_x ” é o percentual de fêmeas sobreviventes por intervalo de idade, isto é, a probabilidade do inseto nascido estar vivo na idade “ x ”. Essa taxa é dada por $l_x = N_x/N_0$, em que “ N_x ” é o número de indivíduos (fêmeas) vivos no início das observações e “ N_0 ” o número de indivíduos (fêmeas) sobreviventes na idade “ x ”. A coluna “ m_x ” representa o número de fêmeas nascidas por fêmea em cada intervalo de idade (Silveira Neto *et al.*, 1976 e Rabinovich, 1978).

O crescimento populacional depende do número de fêmeas sobreviventes, e sua produção individual em cada intervalo de tempo é dada pelo produto ($l_x m_x$). A taxa líquida de reprodução (R_0) é a soma dos produtos das colunas l_x e m_x relativos a cada intervalo de tempo e é definido como o número de descendentes fêmeas que darão origem a fêmeas no curso de uma geração, ou seja é o número de vezes que uma espécie consegue aumentar de uma geração para outra, e pode ser calculada pela fórmula: $R_0 = \sum l_x m_x$, (Rabinovich, 1978; Southwood, 1978).

A tabela de vida pode ser usada para determinar se uma população está crescendo, diminuindo ou permanecendo estável (Horn, 1988). Uma população é considerada estável quando o valor de R_0 é igual a 1. Valores de R_0 maiores que 1 indicam crescimento populacional, enquanto valores menores que 1 indicam decréscimo populacional (Rabinovich, 1978).

Van Den Bosch *et al.* (1982) citaram que a taxa de natalidade e mortalidade em uma população de insetos é determinada por várias condições, entre elas a qualidade do alimento, temperatura, umidade e fotoperíodo. Estes são os fatores principais que normalmente governam as características biológicas de uma população sob condições controladas ou não.

O parâmetro r_m é designado como a razão infinitesimal de aumento populacional, definida como a capacidade inata de aumento numa população crescendo em condições ótimas, ou seja, a

expressão do potencial biótico de uma população (Price, 1984). Birch (1948) refere-se ao parâmetro r_m como a diferença entre a razão de nascimento e a de mortalidade em uma população. Se a natalidade é maior que a mortalidade, r_m é positivo, havendo crescimento populacional, entretanto se a mortalidade for maior que a natalidade, então r_m assume valores negativos e a população tende a desaparecer. Quando r_m é igual a zero a população permanece estável sem aumento populacional. Para Rabinovich (1978), r_m é um parâmetro geneticamente determinado, que reflete na capacidade potencial de multiplicação populacional, podendo ser calculado pela expressão $r_m = \ln R_0 / T$ (Silveira Neto *et al.*, 1976).

O tempo de geração, normalmente designado por (T) representa o tempo médio entre duas gerações sucessivas de uma determinada população. Sendo considerado como o intervalo compreendido entre a postura de um ovo por uma fêmea e a postura de outra fêmea procedente da primeira (Rabinovich, 1978). O parâmetro (Td) representa o tempo em que as fêmeas da população inicial levaram para duplicação.

Para estimar a variância das estimativas dos parâmetros associado às tabelas de vida de fertilidade, Meyer *et al* (1986) propuseram o uso de técnicas computacionais conhecidas como “Jackknife”, que tem sido comumente usadas por muitos ecologistas. Esta técnica foi recentemente proposta para calcular a variância dos valores de r_m , R_0 , T e λ entre diferentes espécies de insetos ou biótipos. Hulting (1990) mencionou que este programa permite também calcular intervalos de confiança ou erro padrão.

Rabinovich (1978) citou que a razão finita de aumento populacional (λ) representa o número de fêmeas que se agrega a população por fêmea, diferindo-se de r_m por ser uma taxa finita de aumento populacional e não instantânea. Este parâmetro pode ser calculado pela expressão matemática $\lambda = e^{r_m}$.

Quando λ for igual a 1, a população se mantém, estável, e neste caso r_m é igual a zero. O parâmetro λ assume valores menores que a unidade, quando r_m é negativo, logo, a taxa de mortalidade é maior que a de natalidade e a população tende a desaparecer. Se λ for igual a zero, r_m torna-se negativo e neste caso, nenhum inseto de idade reprodutiva é adicionado à população, havendo 100% de mortalidade nos estágios imaturos (Silveira Neto *et al.* 1976).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em Jaguariúna, Estado de São Paulo, de setembro de 1995 a agosto de 1996.

3.1 Criação e manutenção de *Podisus nigrispinus*

A criação de *P. nigrispinus* foi iniciada com adultos fornecidos pelo Laboratório de Controle Biológico da Empresa Florestal Champion localizada em Mogi Guaçu Estado de São Paulo. Os insetos utilizados nos experimentos foram oriundos da terceira geração de laboratório.

A criação e manutenção foi conduzida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas, conforme metodologia sugerida por Zanuncio et al. (1992a). Os adultos foram acondicionados em gaiolas de vidro de 20 cm de largura x 30 cm de altura x 50 de comprimento cobertos com tule branco, cada recipiente continha uma média de dez casais. O interior do recipiente foi forrado com papel filtro. A alimentação diária constituiu-se de lagartas de *B. mori* preferencialmente de quarto e quinto ínstars, que foram fornecidas a cada vinte e quatro horas. Foram colocados brotos de goiabeira no centro das unidades de criação para facilitar a manutenção dos predadores dentro destes recipientes. O fornecimento de água destilada foi através de chumaços de algodão umedecidos e colocados em placas de Petri, no centro dos recipientes de criação. As posturas provenientes destes casais foram coletadas diariamente e

3.2 Criação de *Bombyx mori*

Os ovos de *B. mori* foram fornecidos pelo Centro Estadual de Pesquisa Aplicada em Sericicultura, Gália, Estado de São Paulo. A criação de *B. mori* foi conduzida em temperatura ambiente a 25 ± 5 °C e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas. Após a eclosão, as lagartas foram mantidas em bandejas de madeira (sampakó®) de 93 cm de comprimento x 70 cm de largura, forradas com papel jornal e alimentadas diariamente com folhas de amoreira (*Morus alba* L.) coletadas na região. Antes de serem oferecidas às lagartas, as folhas foram desinfetadas com hipoclorito de sódio (10 %) por um período aproximado de 30 min, para evitar contaminações trazidas do campo. Em seguida, as folhas foram lavadas três vezes com água destilada e secadas com papel absorvente. Nos primeiros e segundo instares, as lagartas foram alimentadas com folhas picadas de amoreira do terço superior dos ramos. Após o terceiro instar os ramos foram colocados sobre as lagartas, sendo que este processo facilitou o deslocamento das mesmas de forma a não ficarem em contato direto com os excrementos .

Lagartas de *B. mori* foram utilizadas como alimento para o predador *P. nigrispinus* durante a condução dos experimento, pois segundo Zanuncio *et al.* (1992b) estas lagartas apresentam características semelhantes as pragas e fornecem ao predador os nutrientes essenciais para o desenvolvimento metabólico dos predadores que delas se alimentam.

3.3 Condições de condução do experimento

Para início dos testes foram individualizados 5 casais selecionados de acordo com o tamanho. Segundo Zanuncio *et al.* (1992b), fêmeas maiores e mais pesadas podem apresentar melhor fecundidade em relação as menores. Os casais selecionados foram colocados em potes plásticos com 15 cm de comprimento x 10 cm de largura x 10 cm de altura cobertos com tampa telada, sendo um casal por pote. Para a primeira geração, de cada um dos cinco casais foram coletados 20 ovos para elaboração das tabelas de vida, sendo dez ovos para cada um dos

tratamentos utilizados. Os ovos foram mantidos juntos até a eclosão das ninfas, sendo individualizados a partir do segundo instar. De acordo com Zanuncio *et al.* (1993) as ninfas de *P. nigrispinus* apresentam hábito gregário nos primeiros estágios. Para alimentação das ninfas de primeiro instar foram fornecidos embebidos em algodão uma solução de mel e água destilada na proporção de 1:4, (Zanuncio *et al.*, 1991b). As ninfas passam a se alimentar de presa só a partir do segundo instar.

Ao atingir o segundo instar, cada ninfa foi colocada em um copo plástico de 9,5 cm de diâmetro x 10 cm de altura com tampa telada, para renovação de ar (Saavedra *et al.*, 1992). Ninfas de segundo e terceiro instares recebiam lagartas de terceiro estágio de desenvolvimento, enquanto ninfas de quarto e quinto instares assim como os adultos, recebiam lagartas de quarto e às vezes de quinto estágio sadias ou infectadas conforme o tratamento. O fornecimento de água destilada foi em copo de acrílico de 2,5 cm de altura x 3,0 de diâmetro, contendo um chumaço de algodão umedecido, colocado no centro da unidade de criação.

Com a emergência dos adultos, foram formados casais que foram observados diariamente para se determinar a oviposição diária e longevidade. Os ovos provenientes dos casais foram mantidos em copos descartáveis de 5 cm de diâmetro x 3,5 cm de altura, cobertos com tampa de acrílico. Ao atingirem o segundo instar, as ninfas foram transferidas para potes plásticos de 15 cm de comprimento x 10 cm de largura x 10 cm de altura cobertos com tampa telada onde permaneceram até a emergência dos adultos.

Essa metodologia foi adotada em duas gerações consecutivas. Entretanto as observações da segunda geração foram feitas tomando-se 10 ovos de cada um dos cinco casais provenientes de cada tratamento administrado na primeira geração.

3.4 Características do Agente Microbiano Utilizado

O agente microbiano utilizado nos experimentos foi o produto formulado à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, linhagem HD-1, com 17.600 Unidades Internacionais de Potência por mg (mínimo de 27,5 bilhões de esporos viáveis por grama) - 33,60 g/l. Os inertes corresponderam a 96,5%p/p. Este produto é comercializado pelo Abbott Laboratórios do Brasil Ltda sob o nome

de Dipel. Foi realizada uma análise microbiológica do produto, sendo verificado ótima viabilidade. Para infecção das lagartas nos experimentos foram pesados 5 g/ 100 ml (5% p/v) de água destilada estéril, esta dose representou 4 vezes a dose recomendada para campo. Dosagens superiores foram testadas e foi verificado murchamento rápido das folhas inviabilizando as para o consumo das lagartas. Os discos de amoreira foram colocados dentro do recipiente contendo a diluição, homogeneizado e retirado em seguida.

3.5 Tratamentos

O experimento constou de dois tratamentos. No tratamento controle (t1), os predadores foram alimentados com lagartas de *B. mori* sadias. No segundo tratamento (t2), alimentados com lagartas infectadas com o formulado *B. thuringiensis* var. *kurstaki* mencionado no item 3.4. O trabalho foi conduzido durante duas gerações consecutivas utilizando-se os mesmos tratamentos.

Para infecção das lagartas, foram utilizados discos de 1,5 cm de diâmetro obtidos de folhas de amoreira, previamente descontaminados com hipoclorito de sódio (4%) e lavado por quatro vezes em água estéril, conforme metodologia preconizada por Moscardi et al. (1996). Os discos foram imergidos no recipiente contendo a mistura do agente microbiano, por aproximadamente 30 segundos, sendo em seguida colocados sobre papel filtro por um período aproximado de 5 minutos para secar. Logo a seguir, foram oferecidos às lagartas. As lagartas foram fornecidas aos percevejos cerca de 60 minutos após pararem de se alimentar.

Testes preliminares foram conduzidos para averiguar o número de discos consumidos pelas lagartas e em quanto tempo elas paravam de se alimentar, com o objetivo de se estimar o número aproximado de esporos ingeridos pelas lagartas. Esse ensaio foi realizado a 25 ± 5 °C e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa.

O alimento remanescente foi retirado a cada 24 horas e novas lagartas contaminadas foram colocadas nas unidades de criação. Foi estipulado este período para evitar que os predadores se alimentassem de lagartas em alto estado de putrefação, que poderiam já conter grandes quantidades de outros microrganismos associados.

Foram também avaliados nas duas gerações os seguintes dados biológicos: duração da fase imatura; número de ovos por fêmea por geração, sobrevivência e longevidade dos adultos.

3.6 Confeção de tabelas de vida de fertilidade

A elaboração das tabelas de vida de fertilidade foi feita segundo Southwood (1978). Utilizaram-se 50 ovos para cada tratamento. A inferência dos efeitos adversos foi através de análise comparativa das tabelas de vida.

O delineamento foi o de blocos casualizados e os ovos provenientes de cada um dos cinco casais constituíam as unidades amostrais. A análise dos resultados das tabelas de vida foram feitos através do programa S.A.S. usando a estimativa Jackknife da variância.

3.7 Contagem de esporos dos discos foliares

Com a finalidade de estimar o número de esporos ingeridos pelas lagartas procedeu-se a uma contagem dos esporos dos discos foliares contaminados com *B. thuringiensis*, uma vez por semana durante 3 semanas alternadas. Após serem imersos na suspensão de *B. thuringiensis* em água destilada, duas amostras de discos (5 discos por amostra) foram tomadas ao acaso e cada um dos discos foi colocado em tubo de ensaio contendo 4,5 ml de água destilada estéril. O material foi agitado por 30 segundos e em seguida realizadas diluições até 10^6 para permitir a contagem dos esporos. Dos seis tubos contendo as diluições foi retirado 1,0 ml da suspensão que foi novamente agitada e plaqueada pelo método "pour-plate" em meio ágar nutriente, para contagem de colônias típicas de *B. thuringiensis*, conforme metodologia sugerida por Thompson (1984). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C, contando-se as colônias após 24 h, com auxílio de um contador de colônias.

3.8 Plaqueamento do tubo digestivo de *Bombyx mori*

Foram realizados plaqueamentos dos tubos digestivos de lagartas de *B. mori* para verificar a multiplicação de células vegetativas e outras bactérias contaminantes bem como o processo de esporulação da bactéria. Foram plaqueados os tubos digestivos de duas lagartas de quarto ínstar por tratamento, tomadas cerca de 1, 3, 5, 8 e 24 horas, após pararem de se alimentar dos discos contaminados com *B. thuringiensis*, conforme indicado no item 3.5.

As lagartas foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 10% por 3 min para desinfecção externa. Em seguida, foram lavadas com água destilada estéril por cerca de três min. Foi feita uma incisão na região ventral na parte anterior do corpo, próximo a cápsula cefálica utilizando bisturi. O tubo digestivo foi retirado e colocado em tubo de ensaio contendo 4,5 ml de água destilada estéril, foi macerado e agitado por trinta segundos sendo plaqueado em seguida sem choque térmico, para contagem total de colônias típicas de *B. thuringiensis* e verificar o crescimento de outros microrganismos. Parte desta suspensão contida nos tubos foi submetida a choque térmico (10 min a 80 °C e 5 min. a 0 °C) para ativação de esporos e pasteurização das células vegetativas e eliminação de outros contaminantes, permitindo assim a contagem de esporos. O plaqueamento foi realizado em seguida. A contagem das colônias foi 24 h depois do plaqueamento.

3.9 Plaqueamento do tubo digestivo, hemolinfa e fezes de *Podisus nigripinus*

Uma análise microbiológica do tubo digestivo de *P. nigripinus* foi realizada para verificar o número de esporos de *B. thuringiensis*. Trinta insetos adultos foram alimentados com lagartas infectadas com *B. thuringiensis* por aproximadamente 4 semanas. Foram então esterilizados ainda vivos com hipoclorito de sódio a 10% e em seguida lavados com água destilada estéril. Logo após, foram dissecados cuidadosamente para extração do tubo digestivo. Com tesoura de microcirurgia e bisturi cortaram-se pernas, asas e parte do escutelo. Com uma pequena incisão na região dorsal do abdome retirou-se cuidadosamente o tubo digestivo que foi macerado, homogeneizado por 30 segundos e suspenso em água destilada estéril. Com diluições até 10^{-5} , (0,5 ml do macerado foi diluído na proporção de 1:10 a 10^5), de forma a permitir a contagem dos

esporos por plaqueamento. Parte da suspensão foi submetida a choque térmico conforme descrito no item 3.7.

Uma amostra da hemolinfa de 30 predadores de estágio adulto foi retirada para verificar a presença de *B. thuringiensis*. Para isto, os insetos foram fixados ainda vivos na região do protórax com estilete previamente flambado. Com o auxílio de tesoura de microcirurgia e bisturi, cortaram-se as pernas na inserção das coxas. Com alça de platina retirou-se uma alíquota da hemolinfa que foi suspensa em tubo de ensaio contendo 5,0 ml de água destilada. A amostra foi agitada por 30 segundos e plaqueada em seguida.

Foram realizadas contagens de esporos e células vegetativas com auxílio de microscópio ótico, a fresco (esporos e células vegetativas) através de coloração de esporos conforme metodologia sugerida por Smirnoff (1962), com adaptações. Na contagem a fresco a hemolinfa retirada com alça de platina foi friccionada em lâminas, que foram em seguida observadas ao microscópio.

3.10 Teste de preferência com *Podisus nigrispinus*

O teste de preferência alimentar foi realizado com o objetivo de verificar se o predador *P. nigrispinus* tem preferência por lagartas sadias ou infectadas com *B. thuringiensis*, como também avaliar ganho de peso e tempo de duração do período de alimentação em cada lagarta.

Dez machos e dez fêmeas adultos de *P. nigrispinus*, foram individualizados em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura), e mantidos sem água e alimento por um período de aproximadamente 24 h. Após este tempo, foram oferecidas a cada predador duas lagartas de quarto ínstar, sendo uma sadia e uma infectada. A infecção das lagartas foi promovida como indicado no item (3.5), sendo oferecidas aos predadores 1 hora, após o término de sua alimentação com os discos contaminados. Tanto os predadores quanto as lagartas foram pesadas antes e depois da alimentação. A preferência dos predadores foi avaliada por um período aproximado de 12 horas, pois nem todos atacavam a presa logo nas primeiras horas em que recebiam o alimento.

3.11 Análises estatísticas

Os parâmetros associados às tabelas de vida de fertilidade para os dois tratamentos foram comparadas pelo teste “t” de Student, utilizando o método “jackknife para estimar a variância. Para verificar a preferência alimentar de *P. nigrispinus* entre lagartas sadias ou infectadas foi utilizado o teste binomial. Na fase imatura foram avaliados o percentual de sobrevivência e a duração dos estágios imaturos. Foram também comparados o número médio de ovos por geração, oviposição diária das fêmeas e longevidade dos adultos. Os dados foram submetidos a análise de variância e aplicado o teste F.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Tabela de vida de fertilidade de *Podisus nigrispinus*

Verificou-se que nas duas gerações os valores de R_0 do tratamento controle (t1), foram superiores ao tratamento no qual utilizaram-se lagartas infectadas com *B. thuringiensis* (t2). Na primeira geração, cada fêmea de *P. nigrispinus* alimentada com lagarta de *B. mori* sadia produziu em média 243,96 fêmeas no curso de uma geração ($=R_0$), enquanto no tratamento em que os predadores foram alimentados com lagartas infectadas, o R_0 foi 94,6 ou seja 38, 8% menor em relação ao controle. Os valores de R_0 observados para a segunda geração foram de 223,96 para o tratamento (t1) e 53,34 para o tratamento (t2) (Figura 1).

Estes resultados indicam portanto que a dieta contaminada afetou a dinâmica populacional do predador sob condições controladas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Haverly (1982) que avaliou o efeito de inertes de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre todos os estágios de *H. convergens* e *C. carnea*, verificando aumento significativo na mortalidade de adultos destes predadores.

A razão infinitesimal de aumento populacional (r_m) para o tratamento (t1) e tratamento (t2) na primeira e segunda gerações foi 0,17 ; 0,12 e 0,14 ; 0,10, respectivamente. Isto significa que ao compararmos uma geração com a outra podemos perceber que, apesar de r_m ter sido positivo nas duas gerações indicando maior taxa de nascimento que de mortalidade, o crescimento foi significativamente maior para predadores alimentados com lagartas sadias que com lagartas infectadas, (Figura 2). Para Rabinovich (1978) r_m é um parâmetro geneticamente determinado, que reflete na capacidade potencial de multiplicação populacional. Desta forma, a expressão do potencial biótico da população de *P. nigrispinus* foi superior em (t1). Admitindo-se então que a dieta com a formulação de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* influenciou significativamente a

capacidade potencial de aumento populacional do predador, nas condições em que foram realizados os experimentos.

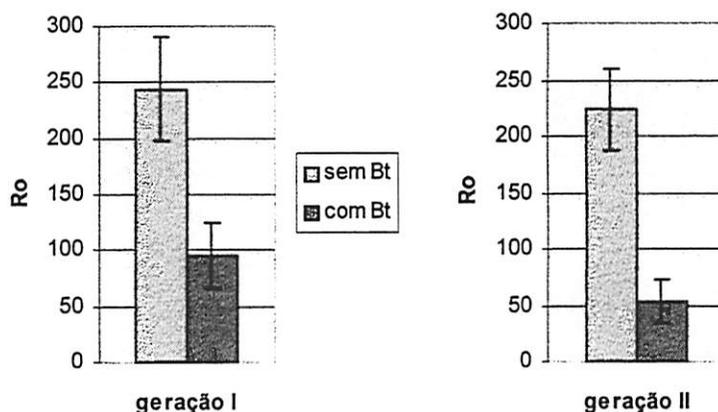


Figura 1. Taxa líquida de reprodução (R_0) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. As barras (\perp) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%.

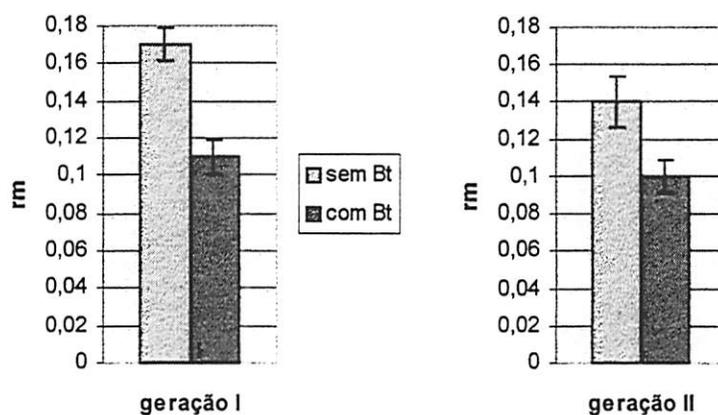


Figura 2. Razão infinitesimal de aumento populacional (r_m) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. As barras (\perp) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%.

Os valores do intervalo médio entre gerações (T), para *P. nigrispinus*, foram de 32,28 dias na primeira geração e 39,25 dias na segunda geração para o controle (t1). No tratamento com lagarta infectada (t2) os valores de (T) foram de 39,37 dias na primeira geração e 39,33 dias na segunda geração. Apesar da pequena diferença graficamente demonstrada, esses valores foram estatisticamente significativas para a primeira geração e não significativo para a segunda geração (Figura 3).

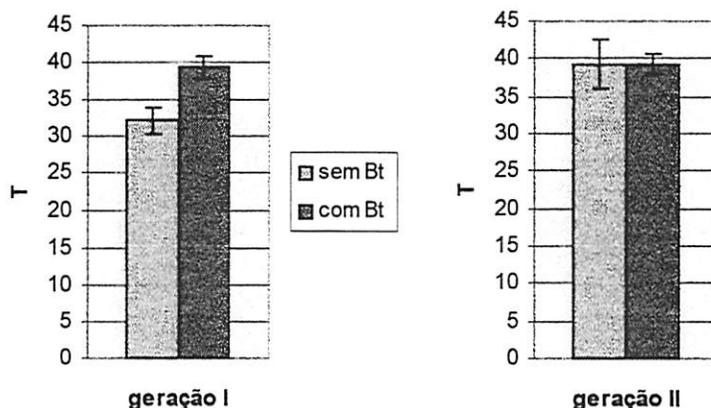


Figura 3. Intervalo médio entre gerações (T) de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* para a primeira e segunda geração. As barras (\perp \top) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%. Diferenças significativas para a geração I e não significativa para geração II.

O número de fêmeas adicionadas à população, por fêmea por unidade de tempo ou seja a razão finita de aumento populacional (λ) para os tratamentos (t1) e (t2) na primeira geração foram de 1,19 e 1,12 fêmeas/fêmeas/dia, respectivamente. Os valores observados na segunda geração para (t1) e (t2) foram de 1,15 e 1,10 fêmeas/fêmeas/dia respectivamente (Figura 4). Portanto, no fim de 32,27 e 39,36 dias na primeira geração (duração média das gerações) em (t1) e (t2) esperavam-se 243,96 e 94,67 fêmeas resultante de cada fêmea em fase de reprodução, respectivamente. Na segunda geração, a estimativa da duração média das gerações foi de 39,25 (t1) e 39,33 (t2) com 223,96 e 53,34 fêmeas resultante de cada fêmea em fase de reprodução, respectivamente. Valores maiores que a unidade revelam que houve acréscimo populacional nos dois tratamentos e nas duas gerações estudadas. Como pode ser observado, pequenas diferenças

nos valores de λ mostram se significativos, podendo causar grandes variações no número total de uma população em estudo conforme citado por Silveira Neto *et al.* (1976). Dessa forma, pôde-se verificar uma superioridade nas gerações em que os predadores receberam alimento sadio em comparação com aqueles que receberam o alimento contaminado com *B. thuringiensis*.

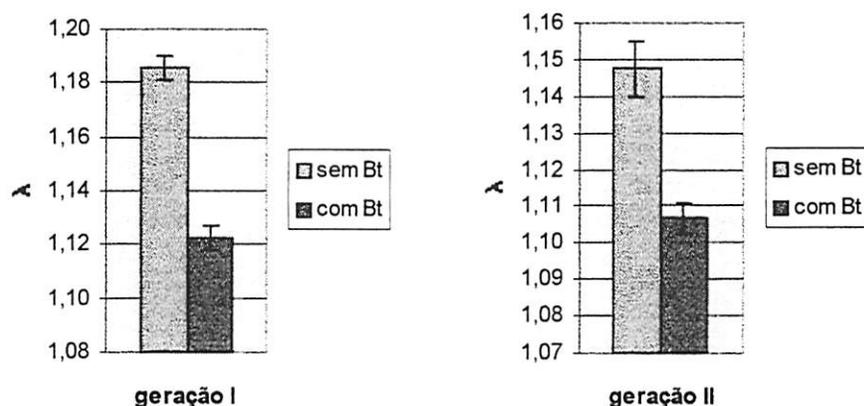


Figura 4. Razão finita de aumento populacional (λ) de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* para a primeira e segunda geração. As barras (\pm) representam os limites do intervalo de confiança de 95%.

O tempo de duplicação da geração (T_d) representa o tempo em que as fêmeas levaram para duplicar a quantidade de indivíduos da população inicial do experimento. O tempo de duplicação obtidos para as duas gerações no tratamento (t1) foram de 4,0 e 5,0 dias e para o tratamento (t2), 6,0 e 7,0 dias para a primeira e segunda gerações respectivamente. Isso indica que as fêmeas do tratamento (t1) levaram menos tempo para duplicar a população inicial nas duas gerações, quando comparado com as duas gerações do tratamento (t2) correspondente às fêmeas que receberam lagartas infectadas como alimento (Figura 5).

De acordo com os dados verificado na Figura 6, para o tratamento (t1) a oviposição de *P. nigrispinus* começou a partir da primeira semana em que foram acasaladas atingindo um pico máximo na segunda semana e decrescendo a partir de então até atingir o nível zero na nona

semana. No tratamento (t2) a oviposição iniciou na segunda semana e o pico máximo ocorreu na terceira semana, cessando totalmente na oitava semana (Figura 7).

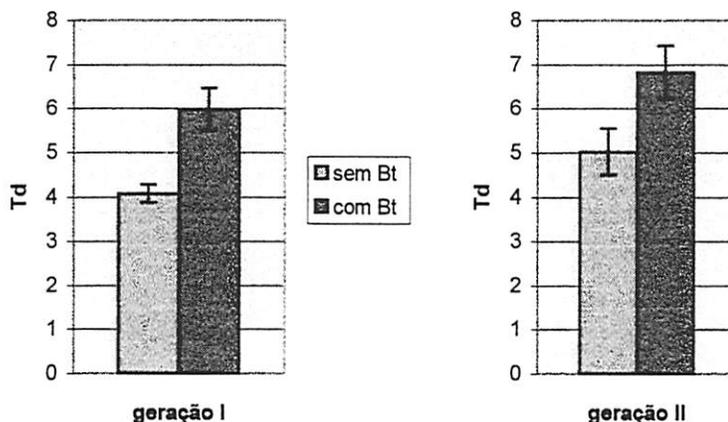


Figura 5. Tempo de duplicação de geração (Td) de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagarta de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis*. As barras (\pm) representam os limites do intervalo de confiança, de 95%.

Na segunda geração, a oviposição também foi iniciada na primeira semana para o tratamento (t1) e o pico máximo ocorreu na segunda semana (Figura 8). Entretanto, neste caso a oviposição se prolongou até a décima segunda semana. Os níveis de oviposição foram entretanto mais baixos que na primeira geração. Já a oviposição para o tratamento (t2) da segunda geração foi iniciada na segunda semana e o pico máximo ocorreu na terceira semana, à semelhança do verificado na primeira geração. Entretanto, a oviposição cessou totalmente na oitava semana e os níveis de oviposição foram menores que os observados na primeira geração (Figura 9). Isto explica os valores baixos de R_0 , nas duas gerações para *P. nigrispinus* alimentados com lagartas de *B. mori* infectada com *B. thuringiensis*.

Os resultados obtidos no presente trabalho assemelham-se aos obtidos por Salama *et al.* (1991) que também verificaram declínio na oviposição do predador *Xylocoris flavipes* após alimentá-los com presa infectada com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Os valores de oviposição para o tratamento controle (t1) nas duas gerações são comparáveis aos obtidos por Zanuncio *et al.* (1991b) para *P. nigrispinus* alimentado com *B. mori*.

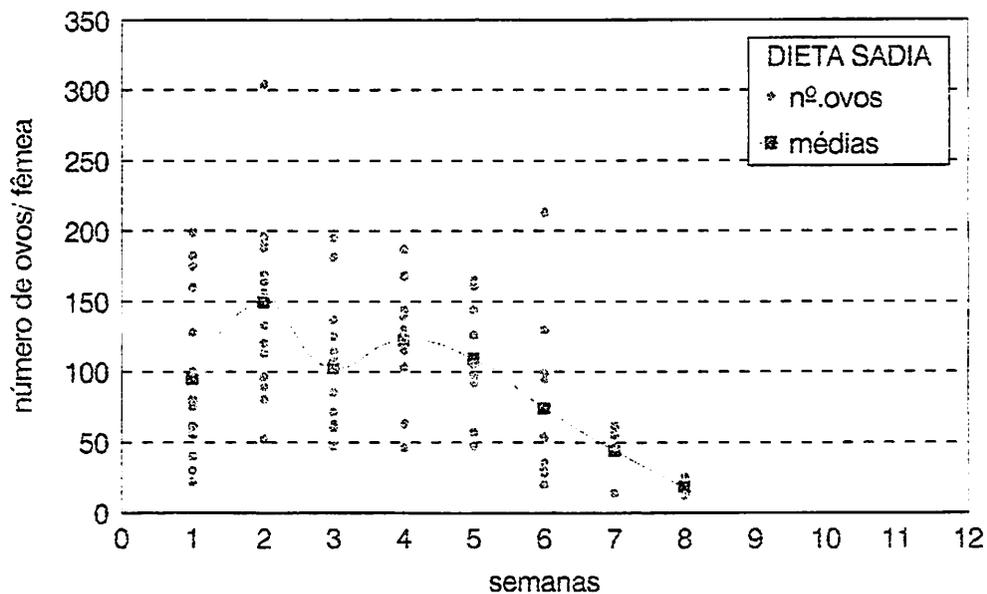


Figura 6. Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias, primeira geração, a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.

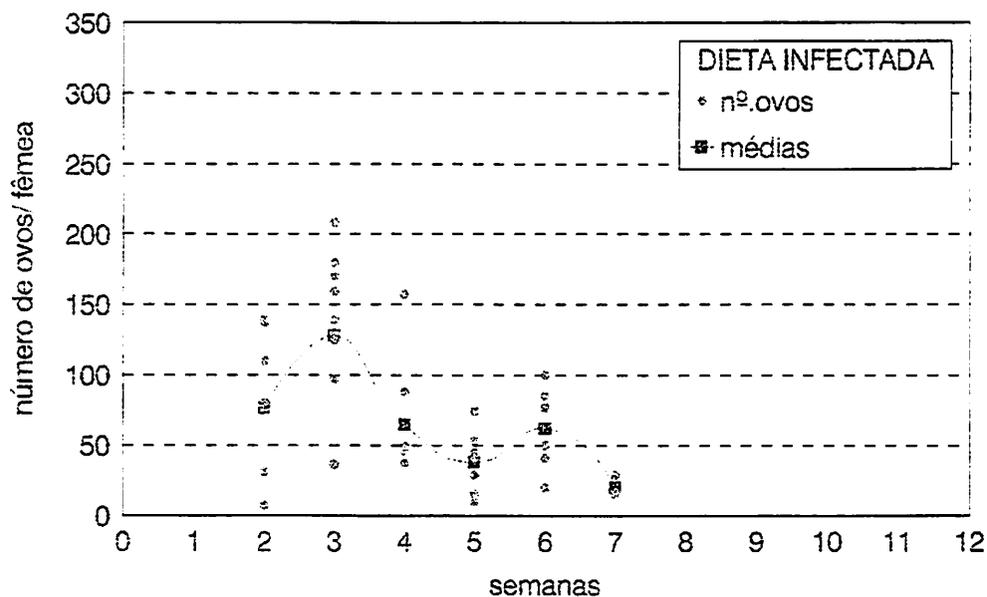


Figura 7 Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* infectadas com um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, primeira geração, a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.

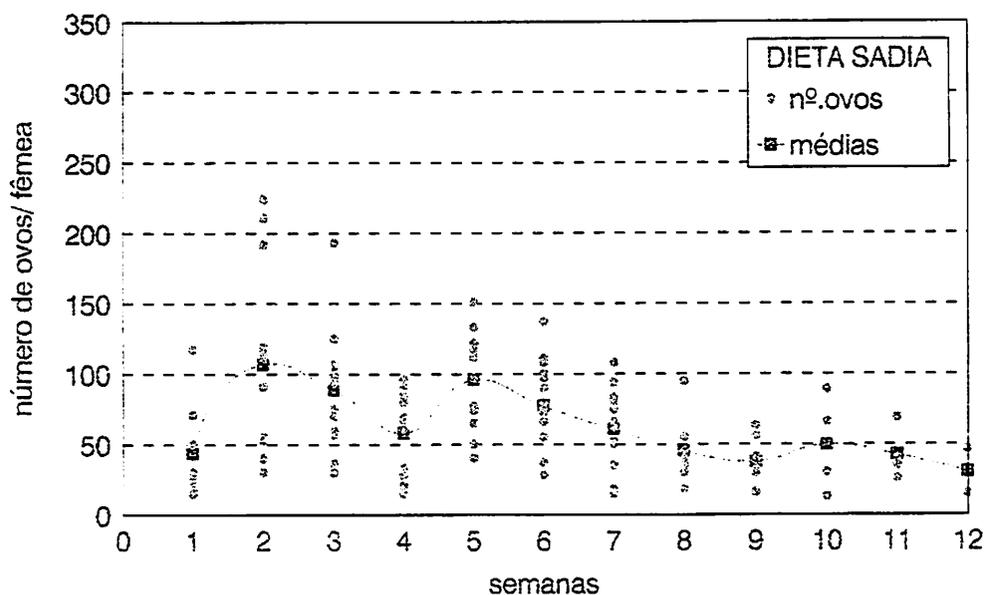


Figura 8. Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias, segunda geração a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.

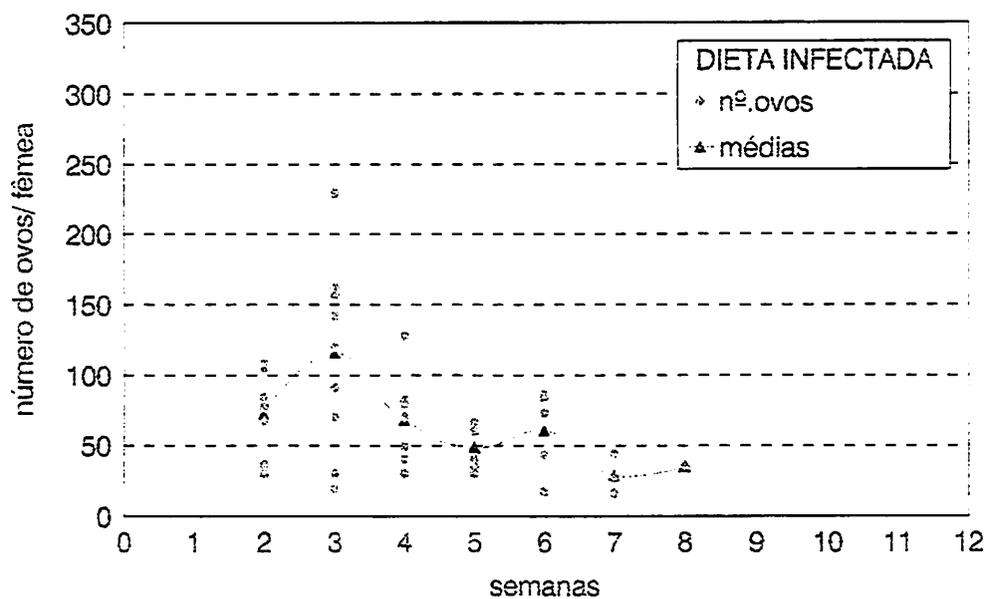


Figura 9. Oviposição de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* infectadas com um formulado à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, segunda geração a 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.

Foi elaborada uma análise para comparar o número de ovos produzidos por fêmea por tratamento por geração, para o grupo controle e tratado e os valores observados para o controle (t1) foi de $579,40 \pm 51,68$ ovos/fêmea e para o grupo tratado (t2) a média observada foi de $318 \pm 43,00$ ovos/ fêmea, dados referentes a primeira geração. Para a segunda geração o número médio do tratamento (t1) foi de $532 \pm 40,15$ ovos/fêmea e 300 ± 48 ovos/fêmea para (t2). A comparação do número médio de ovos produzidos por geração demonstrou superioridade nas duas gerações estudadas para o tratamento controle, (na Figura 10).

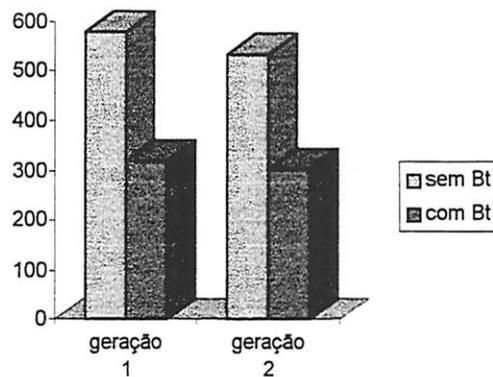


Figura 10. Número médio de ovos/ fêmea/tratamento/geração de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Significancia (P=0,0015).

De acordo com os dados obtidos registra-se que a dieta infectada com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* também afetou a capacidade de oviposição do predador nas condições do estudo.

4.2. Duração da fase imatura e percentual de sobrevivência

A duração média dos estágios imaturos de *P. nigrispinus* na primeira geração foi $18,4 \pm 0,9$ dias para o tratamento (t1) e $20,4 \pm 1,9$ dias para o tratamento (t2). A taxa de eclosão das ninfas nos dois tratamentos foi de 100% e o percentual de sobreviventes da fase imatura foi de 80% para (t1) e 56% para (t2), (Tabela 1).

Para a segunda geração as médias observadas foram de $19,68 \pm 1,5$ para o controle (t1) e $21,24 \pm 1,0$ para o tratamento contaminado (t2), a taxa de eclosão foi de 100% para (t1) e 64% para (t2). No tratamento controle o percentual de sobreviventes da fase imatura foi 64 % para (t1) e apenas 42 % em (t2) conseguiram atingir a fase adulta (Tabela 2).

Como pode ser verificado nas duas gerações os predadores do tratamento controle (t1) apresentaram duração menor dos estágios imaturos quando comparado com (t2), no qual os predadores tiveram como alimento lagartas contaminadas. A taxa de eclosão das ninfas para a primeira geração foi igual nos dois tratamentos, isso pode ser explicado pelo fato dos insetos serem provenientes de pais alimentados com lagartas de *B. mori* sadias. O mesmo não aconteceu com os predadores provenientes de pais infectados (t2) na segunda geração em que a taxa de eclosão mostrou-se significativamente inferior em relação ao controle (t1), (Tabelas 1 e 2).

Os resultados para *P. nigrispinus* no tratamento controle (t1) nas duas gerações, são comparáveis aos obtidos por Batalha et al. (1993) para *P. nigrolimbatus* alimentados com lagartas de *B. mori* sadias.

Tabela 1. Duração dos estágios imaturos e percentual de sobrevivência de *Podisus nigrispinus* em cada estágio, alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis*, primeira geração.

Instar	Duração (dias)		Sobrevivência (%)	
	(t1)	(t2)	(t1)	(t2)
I	3,5	3,7	100	100
II	3,4	3,9	100	98
III	3,3	3,8	94	92
IV	3,8	4,1	88	80
V	4,4	4,9	80	56
Total	$18,4 \pm 0,9a$	$20,4 \pm 1,9b$	80a	56b

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste F ao nível de 5 % (P = 0,0001)

Tabela 2. Duração dos estágios imaturos e percentual de sobreviventes de *Podisus nigrispinus* alimentado com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis*, segunda geração.

Ínstar	Duração (dias)		sobrevivência (%)	
	(t1)	(t2)	(t1)	(t2)
I	3,4	4,4	100	64
II	3,6	3,7	86	60
III	3,3	3,5	74	54
IV	4,3	4,3	68	48
V	5,0	5,2	64	42
Total	19,7 ± 1,5a	21,2 ± 1,0b	64a	42b

Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste F ao nível de 5 % (P = 0,0003)

4.3 Longevidade dos adultos

A longevidade média das fêmeas na primeira geração foi de $39,8 \pm 15,4$ dias no tratamento (t1) e $38,3 \pm 11,8$ dias no tratamento (t2). Na segunda geração, a longevidade média das fêmeas foi de $57,3 \pm 15,0$ (t1) e $35,1 \pm 14,6$ (t2). Verificou-se que na primeira geração os machos alimentados com lagartas infectadas (t2) tiveram longevidade média de $16,7 \pm 07,3$ dias (P=003); e $49,5 \pm 16,0$ dias para o tratamento com lagartas sadias (t1). Na segunda geração, a longevidade dos machos foi $18,5 \pm 05,9$ dias para (t2) e $51,8 \pm 16,1$ dias para (t1) (P=0,008). Não houve diferença estatisticamente significativa para a longevidade de fêmeas na primeira geração. Na segunda geração, a longevidade média das fêmeas apresentou diferenças estatisticamente significativas (P=0,001). Com esses resultados admite-se que a alimentação contaminada apresentou efeito cumulativo, que se mostrou significativos na segunda geração. Os machos apresentaram maior sensibilidade a dieta contaminada. A longevidade foi significativamente inferior quando o alimento foi lagartas contaminadas, (Tabela 3). O efeito de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre as lagartas de *B. mori* provocou mortalidade rápido pelo fato da dose conter um

número maior de esporos e isso pode ter influenciado nos processos biológicos do predador, com o aparecimento de outras bactérias não identificadas o que foi verificado através de plaqueamento do tubo digestivo.

Estes resultados concordam em parte aos obtidos por Barcelos e Zanuncio (1989), que mostraram que a longevidade de fêmeas e machos de *P. nigrolimbatus* alimentados com lagartas de *B. mori* sadias foi de $28,5 \pm 21,0$ e $25,5 \pm 21,0$ dias respectivamente e também com resultados de Zanuncio *et al.* (1991a). Silveira Neto *et al.* (1976) mencionaram que o alimento pode afetar a longevidade e desenvolvimento dos insetos.

Tabela 3. Longevidade de adultos de *Podisus nigrispinus* alimentados com lagartas de *Bombyx mori* sadias e infectadas com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em duas gerações consecutivas, temperatura: 25 ± 2 °C, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas.

Lagartas		
	Sadias	Infectadas
Geração I		
Fêmeas	$39,8 \pm 15,4$ a	$38,3 \pm 11,8$ a
Machos	$49,5 \pm 16,0$ a	$16,7 \pm 7,3$ b
Geração II		
Fêmeas	$57,3 \pm 15,0$ a	$35,1 \pm 14,6$ b
Machos	$51,8 \pm 16,1$ a	$18,5 \pm 5,9$ b

Médias seguidas da mesma letra nas linhas não apresentam diferenças significativas entre si ($P = 0,001$).

4.4 Teste de preferência alimentar de *Podisus nigrispinus*

Machos e fêmeas de *P. nigrispinus* no momento em que foram colocados em contato com as lagartas se dirigiram primeiro para a lagarta sadia, aparentemente pelo movimento constante destas. Entretanto a agressividade da presa os afastavam e em muitos casos havia

desistência do predador, que então se dirigia à presa infectada, que não oferecia resistência. Do total de machos observados 40% insistiram e conseguiram dominar a presa sadia. O restante dos machos se alimentaram da presa contaminada. Das fêmeas observadas, 30% dominaram a presa sadia. Entretanto, não foi observada entre machos e fêmeas preferência estatisticamente significativa por lagartas sadias ou infectadas através do Teste binomial, ($P = 0,2632$). Estes resultados assemelham-se aos obtidos por Nardo, Nascimento e Marigo (1996) em testes de aceitação do predador *P. nigrispinus* por lagartas de *Anticarsia gemmatalis* sadias ou infectadas com *Baculovirus anticarsia*, em que o predador não apresentou preferência entre lagartas sadias e infectadas.

Foi verificada uma correlação positiva ($R^2 = 68\%$) entre o ganho de peso e o tempo de alimentação, ou seja as fêmeas se alimentaram por períodos maiores, consumindo maiores quantidades de alimento que os machos. Isso pode ser explicado pelo fato das fêmeas serem maiores do que os machos e necessitarem de mais nutrientes para a oviposição. Segundo Parra (1991) a produção de ovos nos insetos, envolve acúmulo de energia e nutrientes pela fêmea, o que faz com que elas consumam mais e ganhem mais peso que os machos.

Garcia (1991), sugeriu que a aceitação da presa pelos predadores é determinada por sinais visuais, químicos e respostas ao contato. Hagen (1987) citado por Garcia (1991) mencionou que a aceitação e o consumo da presa pelos predadores não garantem porém, que a dieta seja adequada ao desenvolvimento e reprodução. Esse fato portanto, esclarece as diferenças significativas observadas nos parâmetros de tabelas de vida avaliados anteriormente, uma vez que o predador não distingue entre alimento saudável e infectado.

4.4.1 Contagem de esporos dos discos foliares e total de esporos ingeridos pelas lagartas

A contagem média das amostras provenientes do plaqueamento com choque térmico foi de $1,0 \times 10^8$ esporos/discos amostrados. Como cada lagarta consumiu uma média de três discos, a média de esporos ingeridos ficou em torno de $3,0 \times 10^8$. A média de consumo por lagartas de terceiro ínstar foi de um disco e meio, o tempo de consumo foi de 08 min e para as de quarto e quinto ínstars foi de 16 min. Após este período de tempo as lagartas permaneceram vivas, mas

totalmente paralizadas e morreram cerca de duas horas após ingerirem o alimento contaminado. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por Habib e Andrade (1991), que mencionam que a morte do inseto após ingerirem a bactéria *B. thuringiensis* é normalmente detectada três horas após a ingestão do patógeno. A morte das lagartas no presente estudo foi mais cedo em relação aos resultados destes autores e isso pode ser explicado pelo fato da dose ser maior.

O efeito da bactéria nas lagartas se apresentou rápido devido ao alto número de esporos presente nos discos.

4.4.2 Plaqueamento do tubo digestivo de *Bombyx mori*

Os resultados obtidos do plaqueamento do tubo digestivo de *B. mori* indicaram que as células vegetativas de *B. thuringiensis* tem multiplicação considerável nas primeiras 5 horas, enquanto o número de esporos tende a aumentar com o passar do tempo, (Tabela 4). Foi verificada também a presença de outras bactérias não identificadas, esse fato já era de se esperar uma vez que o rompimento da membrana peritrófica acarretou o vazamento de outras bactérias do tubo digestivo para toda a cavidade do corpo e conseqüentemente para hemolinfa.

Tabela 4. Número de esporos e células vegetativas do tubo digestivo de *Bombyx mori* alimentados com discos de amoreira contaminados com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Período pós tratamento (h)	Contagem de esporos/tubo digestivo com choque térmico	Contagem total de células vegetativas sem choque térmico
1	$4,9 \times 10^5$	$0,1 \times 10^4$
3	$1,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$
5	$2,8 \times 10^6$	$8,0 \times 10^7$
8	$3,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^8$
24	$2,9 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8$

*presença de outras bactérias não identificadas

Segundo Burges (1981), Habib e Andrade (1991) *B. mori* é um inseto tipo I, minutos depois de ingerir esporos, cristais e células vegetativas de *B. thuringiensis*, sofre paralisia intestinal, com morte rápida, causada por toxemia, ação das toxinas. Esse fato concorda com os resultados obtidos no presente trabalho, em que as lagartas por terem apresentado mortalidade rápida, tornaram-se propensas a proliferação de outros microrganismos não identificado que podem ter ocasionado os efeitos adversos nos predadores.

4.4.3 Plaqueamento do tubo digestivo, fezes e hemolinfa de *Podisus nigrispinus*.

Os resultados obtidos do plaqueamento do tubo digestivo de *P. nigrispinus* indicaram a presença de *B. thuringiensis* neste órgão. A média de contagem de esporos de 20 tubos digestivos do predador foi de $1,0 \times 10^4$ esporos por tubo digestivo. Foi detectada a presença de esporos viáveis também nas fezes (Tabela 5).

Estes resultados concordam em parte com os obtidos por Abbas e Boucias (1984) que observaram a presença de muitos poliedros viáveis do vírus *Baculovirus anticarsia* no mesêntero e fezes do predador *Podisus maculiventris* (Say), após ter sido alimentado com lagartas de *Anticarsia gemmatilis* infectadas com o vírus.

Não foi detectada a presença de esporos na hemolinfa de *P. nigrispinus*, através de plaqueamento, contagem em lâmina a fresco e coloração de esporos da hemolinfa de 30 predadores (Tabela 5). Esse fato pode ser explicado pela acidez da região ventricular posterior deste predador, em torno de 4,5 a 5,0 House (1974) citado por Terra (1991) no qual o complexo esporo-cristal de *B. thuringiensis* é estável (Deacon, 1983). Assim, quando ingeridos por *P. nigrispinus* os esporos foram eliminados pelas fezes totalmente inalterados, não atingindo a hemolinfa.

Estudos complementares são necessários a fim de se conhecer mais sobre o processo de digestão dos predadores que se alimentam de presas infectadas por *B. thuringiensis*. Parra (1991) relatou o consumo e utilização de alimento por insetos, mencionando que o processo de absorção do alimento em proporções balanceadas é fator fundamental para o desenvolvimento e multiplicação das espécies. Com base nessa premissa, admite-se que os fatores de alteração dos parâmetros

associados à biologia de *P. nigrispinus* tenham sido ou a qualidade nutricional do alimento ingerido pelos predadores em t2 (lagartas infectadas, com potencial septicemia), ou a ação de adjuvantes e/ou inertes que compõem o produto formulado, ou ainda a presença de metabólitos tóxicos a *P. nigrispinus* no produto utilizado em t2. Esta última hipótese se baseia nos comentários de Dulmage et al. (1981) sobre a possibilidade de produtos à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* conterem outras toxinas além do complexo esporo-cristal; estas toxinas, denominadas em seu trabalho “louse-factor”, foram ativas contra piolhos que afetam mamíferos.

Tabela 5. Observações microbiológicas do tubo digestivo, hemolinfa e fezes de *Podisus nigrispinus*

	Tubo digestivo (UFC)	Hemolinfa	Fezes
Esporos	$0,8 \times 10^2 - 1,0 \times 10^4$	-	+
Contagem total	$0,1 \times 10^4 - 2,0 \times 10^{5*}$	-	+
Obs. ao microscópio	+	-	+

UFC= Unidades formadoras de colônias

*Presença de outras bactérias não identificadas

+ presença de Bt

- ausência de Bt

Os resultados do presente estudo podem não representar exatamente os efeitos esperados em condições de campo. Os testes realizados estão de acordo com protocolos de avaliação em fases (Nardo *et al.* 1995b), em que testes iniciais são conduzidos submetendo-se organismos não visados a altas doses do biopesticida, oferecendo ao patógeno maiores possibilidades de expressarem possíveis atividades deletérias. Os protocolos prevêm a necessidade da condução de testes adicionais caso efeitos adversos significativos sejam observados, como ocorrido no presente estudo. Desta forma, estudos mais detalhados, em condições mais semelhantes às de campo, poderão indicar nas fases posteriores a segurança de uso dos biopesticidas avaliados.

Por ser *B. thuringiensis* uma bactéria largamente empregada para controle de diversas pragas em várias culturas no Brasil e no mundo, estudos de avaliação de risco são necessários para que se possa conhecer um pouco mais sobre este entomopatógeno, pois segundo afirmativas de

Lambert ; Peferoen (1992) e Addison (1993), pouco se conhece sobre sua ecologia e seu papel na natureza. Estes estudos são primordiais para se maximizar o uso deste agente microbiano de controle biológico com segurança no país.

Existe hoje uma tendência mundial de se avaliar com maior rigor o uso de agentes microbianos de controle biológico e seus efeitos em parasitóides e predadores e outros organismos benéficos que povoam as culturas onde esses organismos serão pulverizados. A crescente preocupação com a qualidade ambiental desencadearam a necessidade de se estabelecerem estudos de avaliação de risco através de protocolos internacionalmente aceitos. Empresas multinacionais estão investindo cada vez mais em pesquisas com produtos biológicos. Diante disto, poderá haver no futuro um volume maior de produtos biológicos a serem lançados no mercado, que exigirão maior eficiência dos testes de avaliação de risco, e o presente trabalho vem a colaborar neste sentido abrindo margem pra uma série de questionamentos e outros itens que precisam ser estudados para o registro de um determinado produto biológico.

Apesar da esperada segurança no uso de agentes de controle biológico, os impactos positivos e negativos dessa alternativa de controle de praga carece ser minuciosamente estudado e divulgado, de forma a permitir segurança de uso destes organismos no ambiente.

5 CONCLUSÕES

- 1). Os parâmetros de tabelas de vida avaliados, indicaram efeito adverso significativo de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre a população de laboratório de *P. nigripinus* nas condições do estudo.
- 2). O predador pode contribuir na disseminação de *B. Thuringiensis* no campo uma vez que excreta esporos viáveis pelas fezes.
- 3). Os adjuvantes e inertes que compõem o produto formulado e outros microorganismos associados ou a presença de metabólitos tóxicos podem ser responsáveis pelos efeitos adversos observados na população de laboratório de *P. nigripinus*, dada a característica de especificidade de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.
- 4). Machos de *P. nigripinus* alimentados com dieta infectada com *B. Thuringiensis* var. *kurstaki* apresentaram menor longevidade, sugerindo-se que estes apresentam maior sensibilidade aos componentes do produto formulado.
- 5). *P. nigripinus* não apresenta preferência entre lagartas sadias ou infectadas com o formulado a base de *B. thuringiensis* em condições de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, M. S. T.; BOUCIAS, D. Interaction between nuclear polyedrosis virus-infected *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and predator *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, Gainesville, v. 13, n. 2, p. 599-602, apr. 1984.
- ABBOTT. **Dipel, el insecticida biológico con 21 años de uso en America Latina**. Chicago: Abbott laboratories, 1991a. 16p.
- ABBOTT. **Dipel, o inseticida biológico: informações técnicas**. São Paulo: MSD-AGUET, 1991b. 15p.
- ADDISON, J. A. Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: a review. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 23, p. 2329-2342, 1993.
- ALI, ABDUL-SATTAR. A.; WATSON, T. F. Efficacy of Dipel and *Geocoris punctipes* (Hemiptera: Lygaeidae) against the Tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 75, n.6, p.1002-1004, Dec. 1982.
- ALVES, J. B.; ZANUNCIO, J. C.; MAIA LEITE, J. E.; SILVA, N. R. Desenvolvimento ninfal do predador *Podisus connexivus* Bergroth, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae) alimentado em diferentes proporções de larvas de mosca doméstica e bicho-da-seda. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13, Recife, 1991. **Resumo...** Recife: SEB, 1991. p.266.

- AMSHHEEV, R. M. Ecological problems of the maintenance and protection of sea buckthorn in the Buryat SSR. *Sibirskii Biologicheskii Zhurnal*, n.2, p.42-45, 1991. In: **REVIEW OF AGRICULTURAL ENTOMOLOGY**, Wallinford, v. 81, n.3, p.314, 1993. (abst. 2832).
- ARANTES, G. M. N. **Caracterização molecular de genes da delta - endotoxina, sua clonagem e transformação em *Bacillus thuringiensis***. Piracicaba, ESALQ 1989. 124p. (Tese-Doutorado em Ciências) 1989.
- ARCAS, J. A. Producción de bacterias entomopatógenas. In: LECUONA, R. E. (ed). **Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga**. Buenos Aires: Talleres Gráficos Mariano Mas 1996. cap. 18, p. 207-222,
- ASSIS JÚNIOR, S. L. de ***Eucalyptus urophylla* como alimento suplementar do predador *Supputius cinticeps* Stal, 1860 (Heteroptera: Pentatomidae)**. Viçosa: UFV, 1995. 73p. (Tese - Mestrado em Entomologia) 1995.
- BARCELOS, J. A. : ZANUNCIO, J. C. ; NASCIMENTO, E. C. ; ZANUNCIO, T. C. Caracterização dos estádios imaturos de *Podisus nigrolimbatus* (Spinola, 1852) (Hemiptera: Pentatomidae) **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 37, n. 3, p. 537-543, set. 1993.
- BATALHA, V. C.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, G. P.; DIDONET, J. Efeito da alimentação com lagartas de *Bombyx mori* e larvas de *Musca domestica* no desenvolvimento de *Podisus nigrolimbatus* (Hemiptera: Pentatomidae). In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14, Piracicaba, 1993 **Resumos...** São Paulo: Sociedade Entomológica do Brasil, 1993. p. 293.
- BENINTENDE, A. e MARQUEZ, A. Bactérias entomopatógenas. In: LECUONA, R. E. (ed.) **Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga**. Buenos Aires: Talles Gráficos Mariano Mas, 1996. cap. 4, p.61-72,.
- BIRCH, L. C. The intrinsic rate of natural increase of an insect populations. **Journal Animal Ecology**, Lanham, v.17, p.15-26,1948.

- BURGES, H. D. **Microbial control of pests and plant diseases 1970/1980**. London: Academic Press, 1981. p.494-500.
- CANNON, R. J. C. Prospects and progress for *Bacillus thuringiensis*- based pesticides. **Pesticide Science**, v.37, n.4, p.331-335, Mar. 1993.
- CANTWEL, G. E. ; CANTELO, W. W. Control of the Colorado Potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on tomatoes with *Bacillus thuringiensis*. **The Great Lakes Entomologist**. East Lansing, v.17, n.3, p.145-150, July. 1984.
- CAPALBO, D. M. F. Estudo de casos: o caso do *Bacillus thuringiensis*. In CURSO DE FERMENTAÇÃO SEMI - SÓLIDA PARA O CONTROLE BIOLÓGICO, Jaguariúna: EMBRAPA/CNPDA,1991. p. 48-69.
- CARVALHO, R. S. da; VILELA, E. F.; BORGES, M.; ZANUNCIO, J. C. Comportamento de acasalamento do predador *Podisus nigispinus* (DALLAS), em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 24, n.1, p.165-171, abr. 1995.
- CASTINERA, A. ; CALDERON, A. Suscetibilidade de *Pheidole megacephala* a três inseticidas microbianos: Dipel, Bitoxibacilin 202 y *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. **Ciência y Técnica en la Agricultura, Protección de Plantas**, Havana, (supl.): p 61-66, 1985. In **REVIEW OF APPLIED ENTOMOLOGY**, Series A, Farnham Royal, v. 73, n.4, p.278, Apr. 1985.
- CHAPMAN, M. H. and HOY, M. A. Relative toxicity *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* to the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) and its predator *Metaseiulus occidentalis* (Nesbitt) (Acari: Tetranychidae and Phytoseiidae). **Journal Applied Entomology**, Hamburg, v.111, n. 2, p.147-154, Feb. 1991.
- COPPEL, H. C. ; MERTINS, J. W. **Biological insect pest suppression**. New York: Springer-Verlag, 1977. 314p.

- DAOUST, R. Development of novel *B. thuringiensis* based bioinsecticides. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4, Gramado, 1994. **Anais...: Pelotas: EMBRAPA-CPACT, 1994.** p.175-176.
- DAVIDSON, N. A.; KINSEY, M. G.; EHLER, L. E.; FRANKIE, G. W. Tobacco budworm, pest of petunias can be managed with Bt. **California Agriculture** Berkeley, v.46, n.4, p.7-9, July/Aug. 1992.
- DEACON, J. W. Microbial control of pests: use of bacteria. In: DEACON, J. W. **Microbial control of plant pests and diseases**. Berkshire: Van Nostand Reinhold, 1983. p. 8-18 (Aspects of Microbiology, 7).
- DROBNIEWSKI, F. A. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. A review, **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.101-109, 1994.
- DULMAGE, H. T. and COOPERATORS. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. In: BURGESS, H. D. **Microbial control of pests and plant diseases 1970/1980**. London: Academic Press, 1981. Cap. 11, p.193-222.
- DUNBAR, J. P. and JOHNSON, A. W. *Bacillus thuringiensis*: Effects on the Survival of Tobacco Budworm Parastoid and Predator in the Laboratory. **Environmental Entomology**, Lanham, v.4, n.2, Apr. 1975.
- FALCON, L. A. Use of bacteria for microbial control. In: BURGESS, H. D. ; HUSSEY, N. W. **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1971. Cap. 3, p.67-95.
- FAST, P.G. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS H.D., (ed). **Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p.223-248.
- FAUST, R. M. ; BULLA, Jr. L. A. Bacteria and their toxins as insecticides. In KURSTAK, E. (ed.). **Microbial and Viral Pesticides**. New York: Marcel Dekker. 1982. Cap. 3, p. 75-208, 1982

- FERRO, D. N.; GELERNTER, W. D. Toxicity of a new strain of *Bacillus thuringiensis* to colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v.82, n. 3, p.750-775, June. 1989.
- FLEXNER, J. L.; LIGHTHART, B. and CROFT, B. A. The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropodes **Agriculture Ecosystems and Environment**. Amsterdam, v.16, n.3-4, p. 203-254, July 1986.
- GARCIA, M. A. Ecologia nutricional de parasitóides e predadores terrestres. In: PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R. (eds). **Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. Cap. 8, p. 289-311.
- GILL, S. S.; COWLESS, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.37, p.615-636, 1992.
- GIROUX, S.; CÔTÉ, J. C.; VINCENT, C.; MARTEL, P. and CODERRE, D. Bacteriological Insecticide M-One Effects on Predation Efficiency and Mortality of Adult *Coleomegilla maculata lengi* (Coleoptera: Coccinellidae) **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.87, n.1, p.39-43, Feb. 1994.
- GONÇALVES, L. **Biologia e capacidade predatória de *Podisus nigrolimbatus* Spinola, 1832 e *Podisus connexivus* 1891 (Hemiptera: Pentatomidae: Asopinae) em condições de laboratório**. Lavras: ESAL, 1990. 87p. (Tese-Mestrado em Fitossanidade).
- GRAVENA, S.; CAMPOS, R. R.; MATA, O. S.; PAULA NETO, G. T. Eficiência de *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Bacillus thuringiensis* + Methomil, no controle de lepidópteros no tomateiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v.9, n.2, p.243-248, 1980.
- HABIB, M. E. M. e ANDRADE, C. F. S. Bactérias Entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p.127-170.

- IIABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Controle Microbiano de Insetos com uso de Bactérias. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.15, n.167, p.26-32, 1991.
- HAVERTY, M. I. Sensitivity of selected nontarget insects to the carrier of Dipel 4L® in the laboratory. **Environmental Entomology**, College Park v.11, n.2, p.337-338, Apr. 1982.
- HORN, D. J. **Ecological approach to pest management**. New York : Guilford Press,1988. 285p.
- HULTING, F.; ORR, D. B.; OBRYCKY, J. J. A computer program for calculation and statistical comparison of intrinsic rates of increase and associated life table parameters. **Florida Entomologist**, v. 73, n. 4, Dec. 1990.
- JACKSON, T. A. Utilização de Bacterias para el Control de insectos Plaga de la Agricultura. In: LECUONA, R. L. **Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insetos Plaga**. Buenos Aires: Talleres Graficos Mariano Mas. Cap. 22. p.255-260, 1996.
- KURSTAKI, E. (ed). **Microbial and viral pesticides**. New York: Marcel Dekker, 1982. 480p.
- LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **Bioscience**, Washington, v.42, n.2, p.112-122. Feb. 1992.
- LEITE, J. E. M. **Características biológicas de *Podisus connexivus* Bergrot, 1891 (Hemiptera:Pentatomidae) e desenvolvimento de três metodologias de criação**. Viçosa :UFV, 1994. 51p. (Tese de Mestrado em Entomologia).
- LEITE, J. E. M.; ALVES J. B.; ZANUNCIO, J. C.; JUSSELINO FILHO, P. Desenvolvimento ninfal de *Podisus connexivus*, Bergrot, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae), em tres hospedeiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13, Recife,1991. **Resumos...** Recife: Sociedade Entomológica do Brasil, 1991b. v.1, p.295.

- LEITE, J. E. M.; ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; JUSSELINO FILHO, P. Fecundidade das fêmeas do predador *Podisus connexivus*, Bergrot, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae) segundo as diferentes características morfológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 13, Recife, 1991. **Resumos...** Recife: Sociedade Entomológica do Brasil, 1991a. v.1, p.294.
- LOPES, E. D.; ZANUNCIO, J. C.; TORRES, J. B. e ZANUNCIO, T. V. Resposta numérica de ninfas de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5, Foz do Iguaçu, 1996. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPSO, COBRAFI 1996a, p.109.
- LOPES, E. D.; ZANUNCIO, T. V.; ZANUNCIO, J. C.; PESSOTTI, J. P. Desenvolvimento de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) com *Zophobas confusa* (Coleoptera: Tenebrionidae) comparado a duas outras presas. In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5 Foz do Iguaçu, 1996. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPSO, COBRAFI 1996b. p.108.
- MARQUES, I. M. R. Ação de *Bacillus* Berliner var. *kurstaki* sobre *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua interação com o parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Piracicaba: ESALQ, 1993. 75p. (Tese - Doutorado em Entomologia).
- McDONALD, R. C.; KOK, L. T.; YOUSSEM, A. A. Response of fourth instar *Pieris rapae* parasitized by the Braconid *Cotesia rubecula* to *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* endotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.56, n.3, p.422-423, Nov. 1990.
- MEADOWS, M. P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment in *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. **An Environmental Biopesticide: theory and practice**. New York: John Wiley, 1993. p.193-220.

- MELIN, B. E.; COZZI, E. M. Safety to nontarget invertebrates of Lepidopteran strains of *Bacillus thuringiensis* and their β -exotoxins. In: LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, E. W. **Safety of Microbial Insecticides**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.149-167.
- MEYER, J. S.; INGERSOLL, C. G.; McDONALD, L. L. and BOYCE, M. S. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. **Ecology**, Belgrade, v. 67, n. p.1156-1166, Oct. 1986.
- MORAIS, I. O. ; CAPALBO, D. M. F. Brasil cria novo inseticida não tóxico. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.7, n.41, p.12-13, abr. 1988.
- MOSCARDI, F.; POLLATO, S. L. B. e CORREA FERREIRA, B. S. Atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) após sua passagem pelo trato digestivo de insetos predadores. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Piracicaba, v. 25, n. 2, p.315-320, ago. 1996.
- MUMMIGATTI, S. G. and RAGHUNATHAN, A. N. Influence of media composition on the production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v.55, n.2, p.147-151, Mar. 1990.
- NARDO, E. A. B.; NASCIMENTO, R. dos S.; MARIGO, A. L. S. Efeito de *Baculovirus anticarsia* na aceitação de *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae) por diferentes por diferentes predadores. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5. 1996, Foz do Iguaçu. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPSo, COBRAFI, 1996. P.102.
- NARDO, E. A. B. De; CAPALBO, D. M. F.; MORAES, G. J. de; OLIVEIRA, M. C. B., coords. Requisitos para análise de risco de produtos contendo agentes microbianos de controle de organismos nocivos: uma proposta para os órgãos federais registrantes. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPMA, 1995b. 42p. (Documentos, 2).

- NARDO, E. A. B. De; CAPALBO, D. M. F.; OLIVEIRA, M. C. B. de; MORAES, G. J. de, eds. Análise de risco e avaliação do impacto ambiental decorrente do uso de agentes de controle biológico: memória do Workshop. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995a. 127p. (Documentos,1).
- NASCIMENTO, E. C. do; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, G. P.; ARAÚJO, F. Aspectos biológicos do predador *Podisus connexivos* Bergrot, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae). In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12, Belo Horizonte, 1989. **Resumos...** Belo horizonte: Sociedade Entomológica do Brasil, 1991. p.466.
- NIWA, C. G.; STELZER, M. J. and BECKWITH, R. C. Effects of *Bacillus thuringiensis* on parasites of western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, v.80, n. 4, p.750-753, Aug. 1987.
- NORRIS, J. R. Sporeform as insecticides. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.33, p.192-206, 1970.
- PARRA, J. R. P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PARRA, J. R. P.; PANIZZI, A. R. **Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole 1991. Cap. 2, p. 9-65.
- PESTICIDE ASSESSMENT GUIDELINES - Subdivision M. Microbial pest control agents and biochemical pest control agents. Washington: EPA, Office of Pesticides and Toxic Substances, 1989. 192p.
- PRICE, P. W. **Insect Ecology**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1984. 607p.
- RABINOVICH, J. E. **Ecología de poblaciones animales**. Washington: Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1978. 114p.

- SAAVEDRA, J. L. D.; ZANUNCIO, J.C.; DELLA LUCIA, T. M. C. e REIS, F. P. Efeito da dieta artificial na fecundidade e fertilidade do predador *Podisus connexivus* Bergrot, 1891. (Hemiptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Porto Alegre, v.21, n. 2, p. 69-76, Set. 1992.
- SALAMA, H. S.; EL MOURSE, H.; ABOUL-ELA, R.; ABDEL- RAZEK, A. Potency of different varieties of *Bacillus thuringiensis* (Berl.) against some lepidopterous stored product pests. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v.112, n.1, p. 19-26, July. 1991a.
- SALAMA, H .S.; MOURSY, A.; ZAKI, F.; ABOUL-ELA, R.; ABDEL-RAZAKA, A. Parasites and predators of *Plodia interpunctella* as affected by *Bacillus thuringiensis*. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 12., 1991, Rio de Janeiro. **Contributed papers: oral and poster sessions**. Rio de Janeiro, 1991. Section F. Microbial and pest control.
- SALAMA, H. S.; SALEN, M. R.; MOHWED, S.; SHAMS EL-DIN, A. Sprays and dust applications of *Bacillus thuringiensis* Berliner and lannate against *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lep. Noctuidae) on soybean plants in Egipt. **Journal of Applied Entomology**, College Park, v.109, n.2, p.194-199, Fev. 1990.
- SAS Institute INC. SAS/STAT™ users Guide, Version 6.3 edition. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1988, 1029p..
- SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA NOVA, N. A. **Manual de Ecologia dos Insetos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 419p.
- SMIRNOFF, W. A. A staining method for differentiating spores, cristals, and cells of *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Journal Insect Pathology**, v. 4, p.384-386, 1962.
- SOUTHWOOD, T. R. E. **Ecological methods with particular reference to the study of insects populations**. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1978. 500p.

- TERRA, W. R. Digestão do alimento e suas implicações na biologia dos insetos. In: PARRA, J. R. P. ; PANIZZI, A. R. **Ecologia Nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. Cap. 3, p. 67-99.
- THOMPSON, P. J.; STEVENSON, K. E. Mesophilic sporeforming aerobes. In: SPECK, M. (ed). **compedium of methods for the microbiological examination of foods**. Cap.19, p.211-220, 2. ed. Washington, **American Public Health Association**. 1984.
- THOMAS, E. and WATSON, T., Effect of Dipel (*Bacillus thuringiensis*) on the survival of immature and adult *Hyposoter exiguae* (Hymenoptera: Ichneuminidae), **Journal of Invertebrate Pathology**, Orlando, v.47, n.2, p.178-183, Mar. 1986.
- TICEHURST, M.; FUSCO, R. A.; BLUMENTHAL, E. M. Effects of reduced rates of Dipel 4L, Dylox 1.5, and Dimilin w-25 on *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Limantriidae), parasitism and defoliation. **Environmental Entomology**, Belgrade v. 11, n. 5, p. 1058-1062, Oct. 1982.
- TORRES, J. B.; ZANUNCIO, J. C. e OLIVEIRA, M. C. Efeito do múltiplo acasalamento na história de vida de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). In: SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 5 Foz do Iguaçu, 1996. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPSO, COBRAFI, 1996, p.84.
- VAN DEN BOSCH, R.; MESSENGER, P. S.; GUTIERREZ, A. P. Life table analysis in population ecology. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982. Cap. 7, p. 95-115.
- WATANABE, M. A.; NARDO, E. A. B. De; MORAES, G. J. de ; MAIA, A. de H. N. e MARIGO, A. L. S. Avaliação de risco de biopesticidas sobre insetos benéficos: *Baculovirus anticarsia* X *Podisus nigrispinus*. In: Simposio de controle biológico, 5 Foz do Iguaçu, 1996. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA-CNPSO, COBRAFI, 1996, p. 270.

- ZANUNCIO, J. C.; FREITAS, M. F. De ; ALVES, J. B. e LEITE, J. E. M. - Fecundidade de fêmeas de *Podisus connexivus* Bergroth, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae) em diferentes tipos de hospedeiros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Porto Alegre, v. 20, n.2; p. 369-378, dec. 1991a.
- ZANUNCIO, J. C. ;NASCIMENTO, E. C. ; SANTOS, G. P. ; SARTÓRIO, R. C. ; ARAÚJO, F. S. Aspectos biológicos do percevejo predador *Podisus connexivus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Porto Alegre, v.20, n. 2, p. 243-249, dec. 1991b.
- ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; SARTÓRIO, R. C. e LEITE, J. E. M. Métodos para criação de hemípteros predadores de lagartas. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. Porto Alegre, v.21, n. 2, p. 245-251, set. 1992a.
- ZANUNCIO, J. C.; BRAGANÇA, M. A. L.; DÍAS, J.L.S.; SARTÓRIO, R. C. Avaliação dos parâmetros de fecundidade em fêmeas de *Podisus connexivus* (Hemiptera: Pentatomidae) de diferentes pesos. **Revista Ceres**, Viçosa, n. 226, v.39, p.560-596, nov/dez. 1992b.
- ZANUNCIO, J. C., (coord.) **Manual de pragas em florestas - Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle**. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993. 140p.
- ZANUNCIO, T. V.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, G. C. G. de; SARTÓRIO, R. C. Influência da densidade populacional na criação, em laboratório, de ninfas de *Podisus connexivus* Bergrot, 1891 (Hemiptera: Pentatomidae). **Revista Ceres**, Viçosa, n.227, v.40, p.94-103, jan/fev. 1993.

ANEXOS

Anexo 1. Análise de covariância de ganho de peso de *P. nigrispinus* submetido a teste de preferência com lagarta sadia e infectada com *B. thuringiensis*.

Fonte de variação	GL	Quadrado Médio	F	Valor P
Preferência	1	122,9206	2,26	0,1535
Sexo	1	1129,7926	20,77	0,0004
Pref. x sexo (interaç.)	1	95,2562	1,75	0,2055
Peso 1	1	344,4799	6,33	0,0237
Resíduo	15			
C.V. = 53,82917		-	-	-

Anexo 2. Análise de variância do tempo de alimentação de *Podisus nigrispinus* submetido a teste de preferência com lagarta sadia e infectada com *Bacillus thuringiensis*.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Valor P
Preferência	1	93009465	1,90	0,1876
Sexo	1	577488057	11,77	0,0034
Pref. x sexo (interaç.)	1	42125369	0,86	0,3680
Resíduo	16	490075854	-	-
C.V. = 40,50544				

Anexo 3. Análise de variância da longevidade de *P. nigrispinus* alimentados com dieta sadia e infectada com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, geração 1.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Valor P
Tratamento	1	3522,61333	18,62	0,001
Sexo	1	427,21333	2,26	0,1397
Trat*Sexo	1	2932,81333	15,51	0,0003
Resíduo	46	189,1376	-	-
C.V. = 36,4021	-	-	-	-

Anexo 4. Análise de variância da longevidade de *P. nigrispinus* alimentados com dieta sadia e infectada com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, geração 2.

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	F	Valor P
Tratamento	1	9464,8889	47,74	0,0001
Sexo	1	1494,3120	7,54	0,0085
Trat*Sexo	1	383,3889	1,93	0,1708
Resíduo	48	198,2674	-	-
C.V. = 32,0999	-	-	-	-

Anexo 5. Análise de variância das fases imaturas de *P. nigrispinus* alimentado com lagartas de *B. mori* sadias e infectadas com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* geração 1.

Fonte de Variação	GL	Soma de quadrados	F	Valor P
Grupo	1	63,7960	31,40	0,0001
Pais	4	14,2989	1,76	0,1485
Resíduo	62	125,9795	-	-
C.V. = 7,4163				

Anexo 6. Análise de variância das fases imaturas de *P. nigrispinus* alimentado com lagartas de *B. mori* sadias e infectadas com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* geração 2.

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	F	Valor P
Grupo	1	32,6579	21,89	0,0001
Pais	8	38,9109	3,26	0,0047
Resíduo	49	73,1091	-	-
C.V. = 6,0358				

Anexo 7. Teste de preferência alimentar de *P. nigrispinus* com lagartas de *B. mori* sadia e infectada com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Sexo	Prefer.	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Início alimentação	Fim alimentação
f	sadia	50	88	9:44	19:00
f	infectada	41	60	16:30	19:00
f	sadia	40	61	12:30	16:00
f	infectada	50	54	11:23	17:30
f	infectada	64	73	11:00	18:00
f	infectada	41	67	12:13	18:50
f	sadia	51	69	11:30	19:00
f	infectada	50	53	13:00	15:00
f	infectada	35	61	9:45	15:30
f	infectada	33	65	9:56	18:50
m	infectada	41	44	15:30	18:30
m	infectada	42	51	9:40	12:06
m	infectada	30	33	13:15	16:30
m	infectada	42	48	12:30	15:45
m	sadia	40	44	15:10	17:00
m	sadia	43	52	9:50	16:50
m	infectada	38	50	11:45	15:30
m	sadia	31	42	12:00	16:00
m	sadia	30	43	15:40	17:30
m	infectada	42	50	12:40	16:30