

**BIOATIVIDADE DO DIPEL® *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915)
PARA *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)
(Lepidoptera: Pyralidae) E ADULTOS DE *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**

DEODORO MAGNO BRIGHENTI

2003

56283

049992

DEODORO MAGNO BRIGHENTI

**BIOATIVIDADE DO DIPEL* *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915)
PARA *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) E ADULTOS
DE *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. César Freire Carvalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Brighenti, Deodoro Magno

Bioatividade do Dipel[®] *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) e adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) / Deodoro Magno Brighenti. -- Lavras : UFLA, 2003.

67 p. : il.

Orientador: César Freire Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Traça da cera. 2. Abelha. 3. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-595.799

1830

1830

1830

1830

DEODORO MAGNO BRIGHENTI

BIOATIVIDADE DO DIPEL^a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) PARA *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) E ADULTOS DE *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 21 de junho de 2003

Dra. Brígida Souza

UFLA

Dr. Geraldo Andrade Carvalho

UFLA

Dr. Luiz Onofre Salgado

Agroteste Pesquisa e Consultoria



Prof. César Freire Carvalho
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Francisco Chaves dos Santos e Haydée Brighenti dos Santos,
pelo amor, incentivo e exemplo.

Aos meus irmãos, Alexandre Magno Brighenti, Marcos Magno
Brighenti, Carlos Magno Brighenti e Esther Maria Brighenti por
estarem sempre presentes e compartilharem cada momento.

A meu sogro Eurico de Souza Guimarães e minha sogra
Zélia de Oliveira Guimarães pelo apoio, carinho e
compreensão.

DEDICO

À minha amada rainha Carla Regina Guimarães Brighenti, companheira, amiga
de todas as horas, cerne de todos os momentos e sucesso de minhas vitórias.

Ao nosso zangãozinho Lucas Guimarães Brighenti, que nos dá
sempre força para termos mais paciência.

“Apaixonar-se por Deus é o maior dos romances:
procurá-lo, a maior aventura;
encontrá-lo, a maior de todas as realizações”.

Santo Agostinho

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e força para enfrentar o dia-a-dia.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade de concretização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo financiamento de meus estudos.

Ao professor César Freire Carvalho pelas sugestões, críticas e ensinamentos durante o curso.

Aos professores Geraldo Andrade Carvalho, Brígida Souza, Alcides Moino Júnior pela competência, paciência e profissionalismo que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia, pela amizade e apoio, especialmente aos secretários Fábio Pereira Carriço e Liziane de Oliveira Orlandi.

Às amigas Nazaré de Moura e Elaine Aparecida Louzada pela ajuda sem medir esforços.

Ao professor Ricardo Magela de Souza, ao aluno Anderson Resende Almeida e à funcionária Ana Maria dos Santos Castro do Departamento de Fitopatologia pelo auxílio nos experimentos.

Aos professores da Universidade Federal de Viçosa, Alfredo Huertas e Dejair Message pelo incentivo e apoio.

Aos pesquisadores do CNPSO/Embrapa Alexandre Magno Brighenti e Flávio Moscardi pela amizade e colaboração.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação que compartilharam comigo as alegrias e conquistas.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Aspectos bioecológicos de <i>Galleria mellonella</i>	3
2.2 Prejuízos causados por <i>Galleria mellonella</i>	4
2.3 Controle de <i>Galleria mellonella</i>	5
2.4 O entomopatógeno <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
2.4.1 Modo de ação da proteína Cry	8
2.5 Utilização de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
2.6 O Inseticida Dipel®	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Criação e manutenção de <i>Galleria mellonella</i>	12
3.2 Bioatividade de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre lagartas de <i>Galleria mellonella</i>	13
3.2.1 Através da pulverização em favos	13
3.2.2 Através da imersão dos favos	14
3.2.3 Por meio de sua adição à dieta artificial	15
3.3 Isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em lagartas tratadas com Dipel®	15
3.4. Influência do Dipel® na mortalidade de adultos de <i>Apis mellifera</i>	17
3.4.1 Através da pulverização de adultos	17
3.4.2 Adicionado à pasta Candi	18
3.4.3 Adicionado à solução aquosa de mel a 50%	18
3.5 Isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em abelhas submetidas ao tratamento com Dipel®	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21

4.1 Bioatividade de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> sobre a traça da cera <i>Galleria mellonella</i>	21
4.1.1 Através da pulverização em favos	21
4.1.2 Através da imersão dos favos	23
4.1.3 Por meio de sua adição à dieta artificial	25
4.1.4 Comparação entre as metodologias de aplicação do Dipel® em lagartas	28
4.1.5 Sintomas de infecção em lagartas devido à aplicação do Dipel®	32
4.2 Isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em lagartas tratadas com Dipel®	33
4.3 Influência do Dipel® na mortalidade de adultos de <i>Apis mellifera</i>	35
4.3.1 Através da pulverização de adultos	35
4.3.2 Adicionado à pasta Cândi	38
4.3.3 Adicionado à solução aquosa de mel a 50%	43
4.3.4 Comparação entre as metodologias de aplicação do Dipel® em adultos de <i>Apis mellifera</i>	48
4.3.5 Sintomas de intoxicação de adultos de <i>Apis mellifera</i> pelo Dipel® ..	51
4.4 Isolamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em abelhas submetidas ao tratamento com Dipel®	54
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	64

RESUMO

BRIGHENTI, Deodoro Magno. **Bioatividade do Dipel[®] *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) para *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) e adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae).** 2003. 67p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Lavras – Lavras, MG.¹

O trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* no controle de *Galleria mellonella*, bem como sua influência na mortalidade de adultos de *Apis mellifera*. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, a 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. O Dipel[®] foi aplicado através de pulverização e imersão dos favos e também incorporado à dieta artificial fornecida às lagartas de terceiro instar da traça da cera. A influência do *B. thuringiensis* na mortalidade das abelhas foi verificada por meio da pulverização dos adultos, fornecimento através de solução aquosa de mel a 50% e via adição à pasta Cândi. A aplicação do Dipel[®] através da pulverização dos favos foi eficiente no controle de lagartas, atingindo níveis iguais ou superiores a 85% de mortalidade quando foram utilizados 5 g/100ml de água. Na aplicação por imersão dos favos, todas as dosagens testadas foram eficientes atingindo até 100% de mortalidade. Adicionada à dieta artificial, a concentração com maior porcentagem de mortalidade foi de 10 g/60 g de dieta. A mortalidade de adultos de *A. mellifera* também foi afetada pela aplicação do Dipel[®] nas três metodologias testadas. A única dosagem que não afetou a mortalidade de abelhas foi de 0,25 g de Dipel[®]/100ml de água adicionada à solução aquosa de mel a 50%. Sintomas de infecção pelo *B. thuringiensis* foram identificados tanto nas lagartas como nas abelhas adultas e o isolamento da bactéria, através de uma cultura de *Bacillus*, comprovou a “causa mortis” desses insetos em todas as dosagens de Dipel[®] utilizadas.

¹ Orientador: César Freire Carvalho – UFLA.

ABSTRACT

BRIGHENTI, Deodoro Magno. **Bioactivity of Dipel[®] *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) for *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) and adults of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae).** 2003. 67p. Dissertation (Master in Entomology) – Universidade Federal de Lavras – Lavras, MG.²

The work was intended to evaluate the efficiency of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in the control of *Galleria mellonella*, as well as its influence on the mortality of adults of *Apis mellifera*. The experiments were conducted in the Insect Biology Laboratory of the Entomology Department of the Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, Brazil, at 28 ± 2 °C, RH $70 \pm 10\%$ and 12-hour photophase. Dipel[®] was applied through spraying, comb soaking and also incorporated into the artificial diet fed to third instar caterpillars of the wax moth. The influence of *B. thuringiensis* on the mortality of bees was found by means of the spraying of adults, furnishing through the aqueous honey solution at 50% and via addition to the Candy paste. Application of Dipel[®] through the spraying of the combs was efficient in caterpillar control, reaching levels equal or larger than 85% of mortality when 5g/100ml of water were utilized. In the application by soaking of the combs all the dosages tested were efficient reaching up to 100% of mortality. Added to the artificial diet, the concentration with the greatest percentage of mortality was of 10 g/60 g of diet. Mortality of adults of *A. mellifera* was also affected by application of Dipel[®] in the three methodologies tested. The single dosage which did not affect bee mortality was of 0.25 g of Dipel[®]/100 ml of water added to the aqueous honey solution at 50%. Symptoms of infection by *B. thuringiensis* were identified both in the caterpillars and in the adult bees and the isolation of the bacterium through a culture of *Bacillus*, proved to be the “causa mortis” of those insects at all the dosages of Dipel[®] utilized.

² Adviser: César Freire Carvalho – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

As abelhas do gênero *Apis* são insetos sociais que vivem em colônias e são conhecidas há mais de 40 mil anos. Pertencem à Classe Insecta, Ordem Hymenoptera e Superfamília Apoidea sendo consideradas importantes agentes polinizadores (Damasceno, 1998).

Os himenópteros da família Apidae são insetos que se destacam pela produção de mel, própolis, pólen, geléia real, veneno, cera e polinização, contribuindo para o aumento da produção de frutas e sementes (Almeida, 2002).

O Brasil possui grande potencial apícola, especialmente em função de sua extensa área territorial e diversidade de plantas nectaríferas e poliníferas. O mercado brasileiro dos produtos apícolas está avaliado atualmente em 360 milhões de dólares anuais e com potencial, a curto prazo, de um bilhão. A estimativa anual para produção de mel é de 40 mil toneladas, sendo a tonelada avaliada pelo mercado internacional em até 2500 dólares (Kiss, 2002).

A abelha produz cera para construção dos favos, armazenamento de pólen, mel e local para desenvolvimento de ovos, larvas e pupas. A cera é composta de álcoois, ácidos graxos, ésteres, hidrocarbonetos e vitamina A. É utilizada pelo homem na indústria química, farmacêutica e na fabricação de produtos artesanais (Custódio et al., 1998).

Para o armazenamento dos favos de cera durante a entressafra é necessária a utilização de técnicas de conservação dos favos para evitar o aparecimento da traça *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae), encontrada no Brasil, em criações de abelhas, desde 1938 (Schenk, 1938). As lagartas fazem galerias nos favos, alimentando-se de cera, pólen e mel, podendo destruí-los totalmente, impedindo sua reutilização. Contudo, não existem estimativas dos danos provocados por esse piralídeo à apicultura brasileira. Essa espécie alimenta-se de favos presentes em enxames em

condições naturais ou daqueles quando em armazenamento, e os danos chegam a atingir milhões de dólares anualmente nos Estados Unidos (Vandenberg & Shimanuki, 1990b).

Os prejuízos causados pela traça da cera têm incentivado pesquisadores a buscarem métodos alternativos de controle, uma vez que a utilização de produtos químicos nas colmeias e em favos armazenados, pode provocar a mortalidade de abelhas, contaminação do mel e demais produtos apícolas. Assim, dentre os métodos de controle empregados, tem-se sugerido o térmico, sendo normalmente de alto custo e de pouca eficiência (Bollhalder, 1999). Dessa forma, outras técnicas de controle desse inseto-praga, utilizando produtos de origem biológica, podem ser empregadas, como, por exemplo, a utilização de entomopatógenos (Verma, 1995).

De modo geral, para o controle biológico, podem-se utilizar predadores, parasitóides e patógenos, os quais podem ser importantes reguladores populacionais de artrópodes-praga. Nesse contexto, dentre os produtos de origem microbiana comercializados no Brasil à base de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) destaca-se o Dipel[®], que poderá ser empregado no controle da traça da cera; contudo, ainda não foi registrado para proteção de favos contra essa praga (Dias, 2001).

Levando-se em consideração a importância que representa a traça da cera, tanto para colmeias em condições de campo como também para favos que normalmente são armazenados na entressafra, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, Dipel[®] 32 PM no controle da *G. mellonella* e seus efeitos sobre adultos de *Apis mellifera*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos bioecológicos de *Galleria mellonella*

Os ovos são brancos e elípticos medindo 1,2 mm por 0,83 mm, com período embrionário de dois a quatro dias. A fase larval com sete instares tem duração que pode variar de 34 a 48 dias. Dependendo da temperatura ou em caso de escassez de alimento, poderá ocorrer um período de repouso nessa fase, tendo sido constatadas variações de até seis meses. O tamanho e cor dos adultos podem variar consideravelmente, dependendo da composição e abundância de alimento. Em média, machos têm 21 mm de envergadura e as fêmeas são maiores com aproximadamente 32 mm, tendo um período de pré-oviposição de quatro a dez dias (Singh, 1962; Anderson & Mignot, 1970; Guerra, 1973; Morse, 1978; Paixão, 1983; Crane, 1990; Mangum, 2000; Imperatriz-Fonseca, 2001).

Ovos, lagartas e pupas de *G. mellonella* encontram-se nos favos, e ao completar o ciclo os adultos começam a ovipositar nos quadros da colmeia. Nesse local, as lagartas alimentam-se de pólen e cera, construindo galerias, estendendo sua seda no interior e na superfície, disseminando grande quantidade de fezes nos favos e inutilizando-os totalmente (Dadant & Hijos, 1975; Persano, 1980; Patetta & Manino, 1989; Biri, 1997; Wiese, 2000).

Esses insetos pertencem à família Pyralidae; têm vasta distribuição geográfica sendo encontrados em regiões onde temperaturas podem situar-se abaixo de 15 °C por períodos prolongados; contudo, os danos econômicos seriam desprezíveis. Os adultos caminham rapidamente de um lado para outro, fazendo apenas vôos curtos; não se alimentam, pois suas peças bucais são atrofiadas, mas são responsáveis pela transmissão de importantes patógenos para as larvas de abelhas, como a doença bacteriana conhecida como “cria pútrida” ou também “loque americana” (Hooper, 1976; Charrière & Imdorf, 1999).

A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à temperatura e ao suprimento alimentar, sendo que o ciclo total pode durar de cinco semanas a seis meses. Em condições ideais de temperatura e alimentação, o peso das lagartas pode dobrar diariamente nos primeiros dez dias. No final da fase de desenvolvimento a lagarta tece um casulo de seda muito resistente, transformando-se em pupa de coloração amarelo-avermelhada, medindo de 8 a 12 mm de comprimento por 2 a 4 mm de largura. Os adultos têm uma longevidade aproximada de uma semana e podem colocar de 200 a 1000 ovos (Charrière & Imdorf, 1999).

2.2 Prejuízos causados por *Galleria mellonella*

A traça da cera encontra-se disseminada em condições naturais, podendo-se afirmar que não existem colmeias ou enxames encontrados em condições de campo livres da presença dessa praga, ocorrendo invasão das colônias por mariposas que efetuam posturas em frestas das colmeias. Em colônias com população aproximada de 60 mil indivíduos adultos, os favos parecem não ser atacados, porque as abelhas repelem as mariposas e, mesmo quando surgem algumas lagartas da traça, as operárias prontamente realizam a limpeza do favo, impedindo seu desenvolvimento. Entretanto, se as colmeias possuírem baixa densidade populacional e não apresentarem pelo menos uma melgueira, danos por essas lagartas poderão ocorrer (Burgess, 1978). No caso de colmeias não populosas, deve-se realizar um manejo que mantenha, em cada uma, número suficiente de favos, sem adição de melgueira (Burgess & Bailey, 1968).

Os favos perfurados e ligados entre si por um emaranhado de fios de seda impedem o trânsito das abelhas, impossibilitando a proteção da colmeia e desenvolvimento das larvas, que morrem e apodrecem contaminando-a. As

abelhas que conseguem emergir apresentam pernas e asas defeituosas (Bailey, 1981; Vandenberg, 1990).

Além da destruição dos favos, lagartas e adultos da traça podem ser vetores de patógenos às abelhas. Por meio das fezes, os adultos podem disseminar esporos da bactéria *Paenibacillus larvae*, causadora da “cria pútrida americana”, doença que pode destruir a colônia (Anderson, 1990).

Message & Jong (1999) relataram que essa bactéria forma esporos altamente resistentes aos tratamentos químicos e físicos, podendo, inclusive, permanecer viável no solo e no interior da colmeia por um período superior a 30 anos. É encontrada causando graves danos às colmeias na Europa, China, Estados Unidos e Austrália. Nesses locais são gastos milhões de dólares por ano para fiscalização e manutenção de mão-de-obra especializada na tentativa de controlar a doença, sem contar as perdas diretas com colmeias improdutivas. Morse (1978) e Couto & Couto (1996), nos Estados Unidos, verificaram que os prejuízos causados pela cria pútrida americana podem chegar a cinco milhões de dólares e que os danos causados pela traça da cera é igual ou excede àqueles provocados por essa doença.

Oertel (1968) estimou os prejuízos causados pela traça da cera às colmeias no Estado de Luisiana, E.U.A., em 31 mil dólares por ano. Segundo Rodriguez & Trujillo (1991), no município de Tecomán no México, perdem-se 10% da produção de mel, pólen, cera e migrações de enxames devido a *G. mellonella*.

2.3 Controle de *Galleria mellonella*

Métodos químicos foram desenvolvidos utilizando-se os produtos paradiclorobenzeno, ácido cianídrico, brometo de metila, sulfureto de carbono, anidrido sulfuroso e fosfina. Embora esses compostos sejam utilizados para o

controle desse piralídeo, seu emprego apresenta inúmeros problemas, podendo-se destacar as intoxicações às abelhas nas diversas fases do seu desenvolvimento e também a contaminação do mel, cera, própolis, pólen e geléia real (Bollhalder, 1999).

Em análises de amostras de cera alveolada produzida na Alemanha e em outros países da Europa e Ásia, foram encontrados resíduos de aldrin, dieldrin, hexaclorobenzeno, pentaclorofenol, vinclozoline, clortalonile, DDT e lindane. Nenhuma delas estava livre de resíduos dos acaricidas tetradifon e fluvalinate, sendo que mais de 70% das amostras de cera alveolada continham paradiclorobenzeno empregado para o tratamento da traça da cera. Pesquisadores do Instituto de Apicultura da Universidade de Hohenheim na Alemanha, diante das evidências, reconheceram que além dos resíduos de paradiclorobenzeno em favos e outros produtos oriundos das abelhas, esse composto tem sido detectado em amostras de mel e também lhe é atribuído um possível efeito carcinogênico (Wallner, 1992; 1997).

O expurgo com fosfina, apesar de eficiente para o controle das lagartas presentes nos favos, não impede reinfestações. Muitos apicultores australianos utilizam a fosfina para o controle da traça da cera com grau de sucesso variável. Nos Estados Unidos a fosfina é usada no controle dessa praga, mas sua aplicação é controlada e os usuários devem possuir autorização estadual emitida por órgão competente (Goodman et al., 1990).

A prevenção da traça pode ser feita a partir de métodos físicos, sem riscos para a saúde e sem deixar qualquer espécie de resíduo. A conservação dos favos em câmaras frias apresenta ótimos resultados; contudo, é um processo caro. Os favos são mantidos em câmara de refrigeração à temperatura abaixo de 15 °C durante a entressafra. Esse procedimento é suficiente para provocar a mortalidade de ovos e lagartas da traça sem afetar a cera dos favos. Outro método consiste em submeter os favos, tanto no processo de reciclagem como

durante o armazenamento, a um tratamento de calor por via seca, utilizando estufa regulada a 49 °C durante 40 minutos. (Charrière & Imdorf, 1999).

2.4 O entomopatígeno *Bacillus thuringiensis*

O *B. thuringiensis*, uma bactéria entomopatogênica, se destaca em meio às demais, por produzir toxinas letais para muitos insetos-praga e/ou de importância epidemiológica humana. Devido a isso, tem merecido especial atenção por parte dos entomólogos, principalmente as linhagens dessa bactéria que são patogênicas a indivíduos pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Nematoda. A bactéria é comumente encontrada em solo em forma de bastonete de 3 a 5 µm de comprimento por 1 a 1,2 µm de largura. A temperatura ideal de crescimento pode variar de 28 a 35 °C; apresenta reprodução assexuada e seus esporos podem sobreviver em vários ambientes (Navon, 1993; Vidaurre, 1996).

É uma bactéria “gran” positiva que, após a fase acelerada de crescimento, passa por um processo de esporulação devido à exaustão de nutrientes, produzindo um esporângio que contém um endosporo e inclusões cristalinas de proteínas que são responsáveis por sua ação entomopatogênica. Esse cristal protéico é composto por um polipeptídeo denominado δ -endotoxina (Navon, 1993). Quando formas larvais de um inseto alimentam-se dessas proteínas, inicia-se uma série de reações que culminam com a morte das mesmas, caracterizando, assim, o efeito do controle biológico. Dessa forma, a proteína usada como bioinseticida tem participação importante nos modelos de sistemas de controle biológico, pois não possui nenhum grau de toxicidade para os seres humanos e o ecossistema em geral (Mendonça, 2002).

Algumas variedades de *B. thuringiensis* produzem, além da δ -endotoxina, a β -exotoxina, que é termoestável e solúvel em água, sendo

excretada desde o início da esporulação. Essa toxina afeta os insetos durante a metamorfose, impedindo a pupação e podendo também causar intoxicação de alguns insetos adultos (Sebesta & Horska, 1970¹ citados por Arantes, 1989).

2.4.1 Modo de ação da proteína Cry

Baseado na atividade biológica e características moleculares, as δ -endotoxinas podem ser agrupadas em: Cry I, tóxica a lepidópteros; Cry II, às larvas de dípteros; Cry III, às larvas de coleópteros; Cry IV, à fase jovem de dípteros e lepidópteros e Cry V tóxica a lepidópteros e coleópteros. E, ultimamente, foi reportada a Cry B, com atividade contra nematóides, além da Cry t (Vidaurre, 1996).

Gill et al. (1992)², citados por Valicente et al. (2000), descreveram os mecanismos de ação das endotoxinas, causando a morte de um grande número de insetos e especialmente lagartas de lepidópteros por intoxicação ou septicemia após a ingestão de esporos e de cristais. A eficiência de uma toxina é dependente da solubilidade do cristal e afinidade com os receptores disponíveis no trato digestivo das lagartas. Essas toxinas interagem com as células do epitélio do intestino de insetos susceptíveis, induzindo a formação de pequenos poros na membrana das células e provocando desequilíbrio osmótico.

A proteína cristalizada atinge o intestino médio do hospedeiro por ingestão, sendo que o cristal que contém as pró-toxinas se dissolve pela ação do pH alcalino que ocorre no mesêntero e se quebra por ação de proteases específicas para a liberação da toxina propriamente dita. Posteriormente, ocorre

¹ SEBESTA, K.; HORSKÁ, K. Mechanism of inhibition of DNA dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 209, p. 357-367, 1970.

² GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 615-636, 1992.

a ligação das moléculas de toxina a receptores específicos na membrana das células do intestino do inseto, criando canais ou poros de íons, que provocam a ruptura celular (Habib & Andrade, 1998). Os efeitos citolíticos são mediados pela ligação da toxina ativada em receptores especializados das células do intestino, onde pequenos poros são formados nas membranas das células procedendo a um influxo de íons e água, resultando num crescimento das células do tecido epitelial até a sua ruptura, e causando paralisação do intestino, término de alimentação e morte do hospedeiro (Knowles & Ellar, 1987).

Os esporos de *B. thuringiensis* podem ainda invadir outros tecidos do corpo do inseto e, multiplicando-se na hemolinfa, pode levá-lo à morte após algumas horas ou semanas da aplicação da bactéria, dependendo da espécie do inseto e da quantidade do entomopatógeno ingerida (Vanková et al., 1974).

2.5 Utilização de *Bacillus thuringiensis*

O emprego desse entomopatógeno é uma estratégia para o controle de lagartas por causa da sua especificidade, mas também por ser atóxico a seres humanos. Sua eficácia é maior quando ingerida pelas lagartas durante os primeiros instares, sendo ineficaz para adultos (Pereira et al., 1998).

A utilização do *B. thuringiensis* é muito difundida na China, Rússia, França, Itália, Inglaterra, Alemanha e América do Norte. No Extremo Oriente é registrado para o controle de lagartas que atacam olerícolas, pastagens, fumo, algodoeiro, citros, videira, macieira, feijoeiro, soja, plantas ornamentais, espécies florestais e produtos armazenados, perfazendo um total de 150 espécies de insetos susceptíveis em mais de 50 culturas (Marques, 1993).

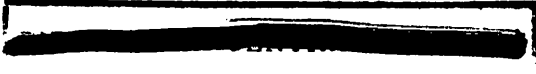
A bactéria *B. thuringiensis* foi eficiente no controle de lagartas de *Tuta absoluta* (Meirick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), da lagarta da soja nos Estados do sul do Brasil e, atualmente, o INPA (Instituto Nacional de Pesquisas

A bactéria *B. thuringiensis* foi eficiente no controle de lagartas de *Tuta absoluta* (Meirick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), da lagarta da soja nos Estados do sul do Brasil e, atualmente, o INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e a Funasa (Fundação Nacional de Saúde) estudam o uso da bactéria para eliminar larvas do culicídeo *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Roa & Jimenes, 1992; Marques & Alves, 1996).

Segundo Burges & Bailey (1968), formulações de *B. thuringiensis* incorporadas à cera alveolada durante o seu processamento, não causaram efeitos prejudiciais às abelhas. Charrière & Imdorf (1999) não encontraram resíduos na cera, mel, pólen e própolis, considerando a bactéria inócua para vertebrados e abelhas. Na Europa, alguns pesquisadores conseguiram resultados satisfatórios na conservação de favos, onde a incorporação de *B. thuringiensis* foi realizada durante o processo de fabricação da cera alveolada, permitindo o controle da traça da cera na entressafra (Vandenberg & Shimanuki, 1990a; Jyoti & Brewer, 1999).

O método que melhor resultado tem proporcionado no controle da traça da cera, apesar do aumento de mão-de-obra, é o emprego de *B. thuringiensis* por meio da pulverização de favos (Singh, 1962; Bailey, 1981; Szabo & Heikel, 1987; Oirsa, 1988).

Há algumas cepas de *B. thuringiensis* e cada uma apresenta toxicidade específica aos insetos: *B. thuringiensis aizawai* é usada no controle das lagartas da traça da cera nos favos de mel; *B. thuringiensis kurstaki* controla lagartas de várias espécies de lepidópteros, sendo que mais de 150 espécies são bastante suscetíveis (Navon, 1993); *B. thuringiensis israelensis* é eficaz no controle de larvas de dípteros (Becker & Margalit, 1993) e *B. thuringiensis tenebrionis* é eficaz para larvas de algumas espécies de coleópteros (Keller & Langenbruch, 1993).



A atividade inseticida de *B. thuringiensis* foi descoberta em 1911; entretanto, não estava comercialmente disponível até a década de 50. Foi registrado originalmente em 1961 como um produto fitossanitário de uso geral e pouco tóxico. Recentemente, houve interesse renovado pelo *B. thuringiensis* e diversos produtos foram desenvolvidos, a maioria por causa da segurança dos inseticidas à base dessa bactéria (Charrière & Imdorf, 1999). Comercialmente, são conhecidos os seguintes produtos: Acrobe, Bactospeine, Berliner, Certan, Dipel, Javelin, Leptox, Novabac, Teknar e Thuricide.

2.6 O Inseticida Dipel®

Os inseticidas biológicos produzidos a partir da bactéria *B. thuringiensis* são encontrados sob formulações de pó molhável ou mesmo géis com esporos. O desenvolvimento de inseticidas bacterianos é de custo inferior se comparado com o de um inseticida sintético. As aplicações podem ser feitas de modo tradicional, tal qual o usado para muitos outros produtos fitossanitários. O agente ativo do inseticida Dipel® 32 PM é uma proteína produzida pelas bactérias durante o processo de esporulação. Pelo fato da δ -endotoxina ser codificada por um único gene, as técnicas modernas de DNA recombinante podem ser usadas para isolar esse gene e transferi-lo para o genoma da planta de interesse, de modo que suas células passam a produzir as proteínas-inseticida dando origem às plantas transgênicas. Dentre os produtos mais utilizados no Brasil à base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* encontra-se o Dipel® que pode ser encontrado na formulação pó molhável (PM), concentração de 32 g/kg (16.000 unidades internacionais de potência por mg, contendo um mínimo de 25 bilhões de esporos viáveis por grama). É um inseticida biológico de ocorrência natural, atuando por ingestão e enquadrado na classe toxicológica IV (pouco tóxico). (Mickillup & Brown, 1991; Andrei, 1999).

O Dipel[®] 32 PM é usado em culturas sob a forma de pulverização mediante o emprego de equipamento convencional de aplicação aérea ou terrestre. O êxito no emprego desse produto para o controle de várias espécies de insetos-praga, está relacionado com a utilização de um volume de água adequado, assegurando a uniformidade de distribuição na superfície foliar. A conservação dos favos depois de vazios e limpos por meio de pulverização com Dipel[®] e armazenamento em local fresco e arejado, pode evitar reinfestações de *G. mellonella* (Dias, 2001).

Verma (1995) utilizou uma formulação comercial de Dipel[®] testada em Uttar Pradesh na Índia, em colônias de *Apis cerana* (Fabricius, 1793), infestadas experimentalmente com *G. mellonella*. Obteve-se mortalidade média de 98,7% das traças quando se aplicaram 10 g de Dipel[®] por litro de água em pulverização, e sua eficácia no controle desse inseto perdurou por 5,5 meses, sendo que as larvas das abelhas não foram afetadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação e manutenção de *Galleria mellonella*

Os adultos de *G. mellonella* foram obtidos da criação do Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, sendo mantidos a 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Foram acondicionados em gaiolas acrílicas, de 20 cm de largura por 20 cm de comprimento e 30 cm de altura, contendo, internamente, uma tira retangular de papel, de 2 cm de largura por 20 cm de comprimento, dobrado em cada lateral, onde as fêmeas realizaram postura (Figura 1 - página 20).

Os ovos coletados foram colocados em recipientes de alumínio de 10 cm de altura por 20 cm de diâmetro, juntamente com favo de cera com cerca de 60

gramas. Após eclosão, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial, preparada conforme metodologia proposta por Guerra (1973), sendo composta de 94 g de lêvedo de cerveja, 80,2 g de farinha de soja, 192,6 g de fubá, 48,2 g de leite em pó desnatado, 236 ml de mel, 208 ml de glicerina e água destilada (cerca de 20 ml).

3.2 Bioatividade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre lagartas de *Galleria mellonella*

3.2.1 Através da pulverização em favos

Esse experimento teve como objetivo avaliar a ação do Dipel® em sete concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g por 100 ml de água) no controle da traça, por meio da pulverização de favos. Foram utilizados recipientes de alumínio de 10 cm de altura x 20 cm de diâmetro (Figura 2A – página 20) contendo um favo de 10 cm de comprimento e 10 cm de largura de aproximadamente 60 g. O produto foi diluído em 100 ml de água destilada, homogeneizado e colocado em pulverizador manual com capacidade para 1000 ml e, em seguida, os favos foram pulverizados até o ponto de escorrimento, quando foram colocados nos recipientes de alumínio e transferidos para sala climatizada a 28 ± 2 °C, UR 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas (Figura 2B – página 20). Após 12 horas, introduziram-se 10 lagartas de terceiro instar em cada favo que constituiu o alimento dessas até a fase de pupa. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos e dez repetições. O tratamento testemunha foi constituído somente de água.

Fez-se o acompanhamento do desenvolvimento das lagartas até a obtenção dos adultos, avaliando-se a mortalidade em cada tratamento, a qual foi corrigida, para comparação através da fórmula de Abbott (1925), expressa por:

$$\%E = \frac{T-I}{T} \times 100$$

sendo:

E = eficiência do produto;

T = número de insetos vivos na testemunha;

I = número de insetos vivos no tratamento com inseticida.

Os dados foram transformados em $\sqrt{(x+1)}$ antes de se proceder à análise de variância, seguida do teste de agrupamento de médias de Scott & Knott (1974) ($P \leq 0,05$) e também realizou-se análise de regressão.

Lagartas mortas foram retiradas dos favos, colocadas em placas de Petri e armazenadas em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior isolamento da bactéria e confirmação da “causa mortis”.

3.2.2 Através da imersão dos favos

Avaliou-se Dipel® em sete concentrações (0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g/100 ml de água) no controle da traça, por meio da imersão dos favos. A metodologia utilizada inicialmente foi a mesma descrita no item 3.2.1. O produto foi diluído em água destilada, homogeneizado e colocado em recipiente de alumínio de 10 cm de altura x 20 cm de diâmetro. A quantidade de água utilizada no preparo da suspensão foi maior para permitir a imersão homogênea dos favos. Os favos foram imersos nas respectivas suspensões durante cinco segundos; foi eliminado o excesso da calda por escorrimento, sendo colocados nos recipientes de alumínio em sala climatizada a $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas (Figura 2B – página 20). Após 12 horas, introduziram-se

10 lagartas de terceiro instar em cada favo que constituiu a dieta alimentar ao longo de todo seu desenvolvimento.

As avaliações e as análises foram as mesmas descritas no subitem 3.2.1.

3.2.3 Por meio de sua adição à dieta artificial

Foram avaliadas as mesmas dosagens do Dipel® no controle da traça, através da adição desse produto à dieta artificial. A metodologia usada inicialmente foi a mesma descrita no item 3.2.1. Cada parcela foi constituída de 60 g de dieta artificial preparada conforme descrição feita no item 3.1, sendo adicionada a respectiva dosagem do Dipel®, seguida de homogeneização. Cada tratamento foi preparado empregando-se aproximadamente 600 g de dieta artificial distribuídos para as dez repetições, sendo que em cada uma inocularam-se 10 lagartas de terceiro instar (Figura 2C – página 20). O bioensaio foi mantido em sala climatizada a 28 ± 2 °C, UR 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

As avaliações e as análises foram semelhantes às realizadas no subitem 3.2.1.

3.3 Isolamento de *Bacillus thuringiensis* em lagartas tratadas com Dipel®

Lagartas com sintomas de doença foram retiradas de cada experimento e transferidas em placas de Petri para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

O isolamento de *B. thuringiensis* das lagartas foi realizado conforme metodologia proposta por Chaves et al. (1973)³ citados por Zanuncio (1976). Em

³ CHAVES, G.; CARVALHO, M.G.; CRUZ-FILHO, J.; ROMEIRO, R. S. **Roteiro de aulas de fitopatologia**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1973. 58p.

câmara de fluxo laminar adicionou-se uma placa de Petri contendo uma alíquota de cinco lagartas de cada tratamento, incluindo a testemunha. Acrescentou-se álcool a 70% até a completa imersão das lagartas por 30 segundos, quando foram transportadas com pinça para outra placa com solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos. Após esse período, foram novamente colocados em outra placa com água destilada, para retirar o excesso de hipoclorito de sódio, sendo, em seguida, maceradas e colocadas em tubos de vidro de 2.5 cm de diâmetro x 8 cm de altura.

Para eliminação de possíveis organismos saprófitos, os tubos de vidro foram colocados em banho-maria a 80 °C por 20 minutos, uma vez que as bactérias do gênero *Bacillus* são resistentes a maiores temperaturas. Em seguida, foram feitas duas placas por tratamento (repicagens) para meio de cultura (Meio Básico I) composto de 10 g de sacarose, 4 g de extrato de lêvedo, 8 g de caseína ácida hidrolisada, 2 g de K₂HPO₄ (anidro), 0,3 g de MgSO₄, 20 g de agar e 1000 ml de água destilada (Kado & Heskett, 1970).

Ao término, as placas foram levadas para câmara climatizada em ausência de luz, regulada a 30 ± 2 °C por 24 horas, período suficiente para o crescimento da cultura de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Figura 3).

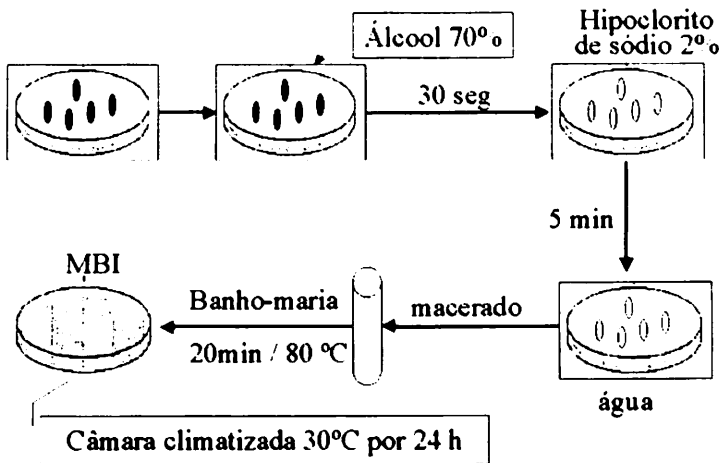


FIGURA 3. Processo de isolamento de culturas.

O produto comercial Dipel® também foi diluído em água esterilizada e transferido para tubo de vidro. Em seguida, foram feitas as repicagens para o meio de cultura MBI para caracterização da cultura e realizada a comparação das culturas nas placas.

3.4 Influência do Dipel® na mortalidade de adultos de *Apis mellifera*

3.4.1 Através da pulverização de adultos

Foram coletadas abelhas dos favos do ninho em colmeias do apiário experimental da UFLA, e transportadas em gaiolas teladas para o laboratório. Posteriormente, foram anestesiadas com dióxido de carbono por 120 segundos e pulverizadas com Dipel® nas mesmas dosagens utilizadas nos experimentos descritos anteriormente. Cada dosagem foi diluída em 100 ml de água destilada, homogeneizada, colocada em pulverizador manual com capacidade para 1000 ml e aplicada nas abelhas. Em seguida, individualizaram-se dez indivíduos

de cada tratamento em gaiola de PVC de 15 cm de altura x 10 cm de diâmetro com a parte superior fechada com filó e a inferior com organza, sendo mantida em sala climatizada a 28 ± 2 °C, UR 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas. Nas gaiolas contendo dez abelhas foi oferecido um chumaço de algodão embebido em água destilada e aproximadamente 6 g de pasta Cândi preparada com açúcar de confeiteiro e mel (Figura 4A – página 20).

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos e dez repetições. Avaliou-se a mortalidade das abelhas 1, 3 e 6 h após a pulverização e posteriormente a cada 6 h até completar 96 h da liberação dos insetos. As abelhas mortas foram distribuídas em placas de Petri e conservadas em freezer a -18 °C para posterior isolamento do *Bacillus* e confirmação da presença da bactéria como a responsável pela mortalidade dos adultos. Os dados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ antes de se proceder à análise de variância, seguida do teste de agrupamento de médias de Scott-Knott ($P \leq 0,05$) (Scott & Knott, 1974) e também realizou-se análise de regressão.

Os valores de mortalidade foram corrigidos através da fórmula de Abbott (1925).

3.4.2 Adicionado à pasta Cândi

Foi adotada a mesma metodologia descrita no subitem 3.4.1. O bioensaio constou de oito tratamentos e dez repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Cada parcela foi constituída de uma gaiola de PVC contendo dez abelhas alimentadas com uma porção de 6g de pasta Cândi preparada com Dipel®. Essa dieta foi colocada em recipientes plásticos de 25 mm de diâmetro x 5 mm de altura e mantidos em posição invertida sobre a cobertura de cada gaiola para que as abelhas pudessem se alimentar. Colocou-se

também chumaço de algodão embebido em água destilada, a qual foi repostada sempre que necessário (Figura 4A).

As avaliações e as análises foram realizadas conforme descrição feita no subitem 3.4.1.

3.4.3 Adicionado à solução aquosa de mel a 50%

Seguiu-se a mesma metodologia descrita no subitem 3.4.1. A unidade experimental foi a gaiola de PVC com 10 abelhas. Essa gaiola continha um recipiente de vidro com capacidade para 20 ml contendo solução aquosa de mel a 50% preparada com Dipel[®], nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente. Os recipientes possuíam tampa perfurada por onde foi inserido rolo dentário umedecido na solução para alimentação das abelhas (Figura 4B).

As avaliações e as análises foram realizadas conforme descrito no subitem 3.4.1.

3.5 Isolamento de *Bacillus thuringiensis* em abelhas submetidas ao tratamento com Dipel[®]

Placas de Petri contendo uma alíquota de cinco abelhas mortas retiradas de cada experimento foram transferidas para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da UFLA, sendo que a metodologia de isolamento de *B. thuringiensis* foi a mesma descrita no subitem 3.3.

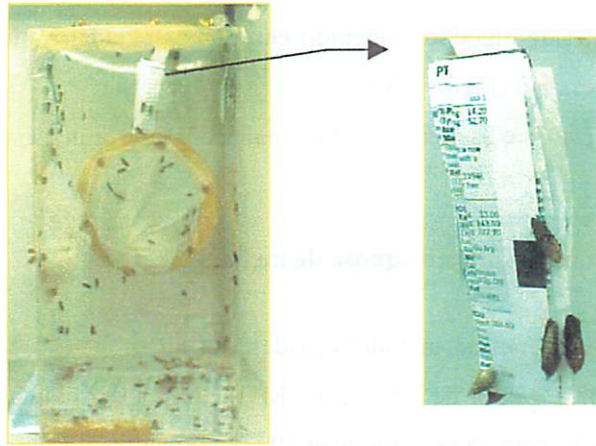


FIGURA 1. Gaiola acrílica empregada na criação de *Galleria mellonella* em laboratório.

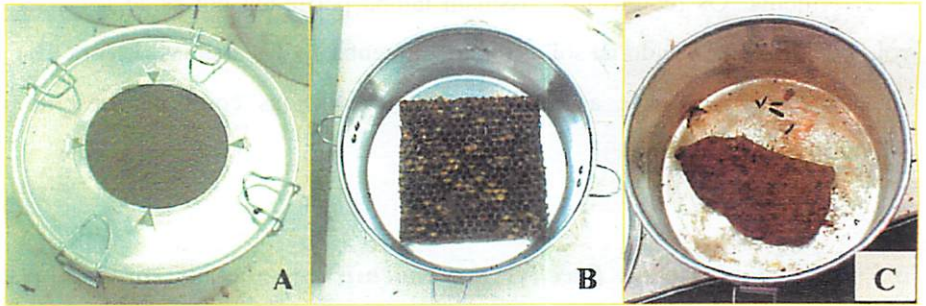


FIGURA 2. A - Recipiente de alumínio para confinamento de lagartas de *Galleria mellonella*; B - Favo para pulverização e imersão; C - Dieta artificial.

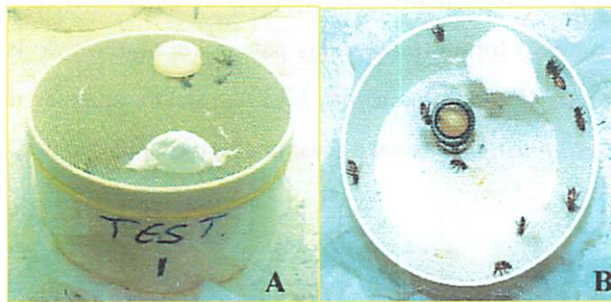


FIGURA 4. Gaiola de PVC utilizada para confinamento de adultos de *Apis mellifera*. A - Adultos de abelhas alimentados com pasta Cândi; B - Adultos alimentados com solução aquosa de mel a 50%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioatividade de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre a traça da cera *Galleria mellonella*

4.1.1 Através da pulverização dos favos

Foi verificado que à medida que se aumentaram as dosagens do Dipel[®], ocorreram aumentos significativos de mortalidade, sendo que a 5, 10 e 20 g/ 100 ml, esse produto provocou os maiores valores com médias de 87,8%, 82,9% e 84,2%, respectivamente. O Dipel[®] nas dosagens de 1,0 e 2,5 g / 100 ml de água apresentou toxicidade intermediária com médias de 47,6% e 54,9%, respectivamente, e nas duas menores dosagens observou-se mortalidade abaixo de 29,3% (Tabela 1 e Figura 5).

TABELA 1. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes concentrações de Dipel[®] 32 PM pulverizadas nos favos. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

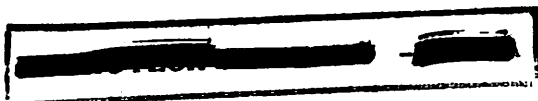
Dipel [®] (g/100 ml de água)	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ²
0,00	18,0 \pm 0,5	0,0 a
0,25	35,0 \pm 0,7	20,7 b
0,50	42,0 \pm 0,5	29,3 b
1,00	58,0 \pm 0,5	47,6 c
2,50	73,0 \pm 0,4	54,9 c
5,00	90,0 \pm 0,4	87,8 d
10,0	86,0 \pm 0,5	82,9 d
20,0	87,0 \pm 0,5	84,2 d
C.V. ³ (%)	12,6	-

Médias seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Mortalidade corrigida pela formula de Abbott (1925).

³Coefficiente de Variação.



Constatou-se um crescente aumento do número de lagartas mortas em função do incremento das dosagens do Dipel® até 5 g/100ml. Após esse valor, o aumento na dosagem não provocou aumento significativo na mortalidade.

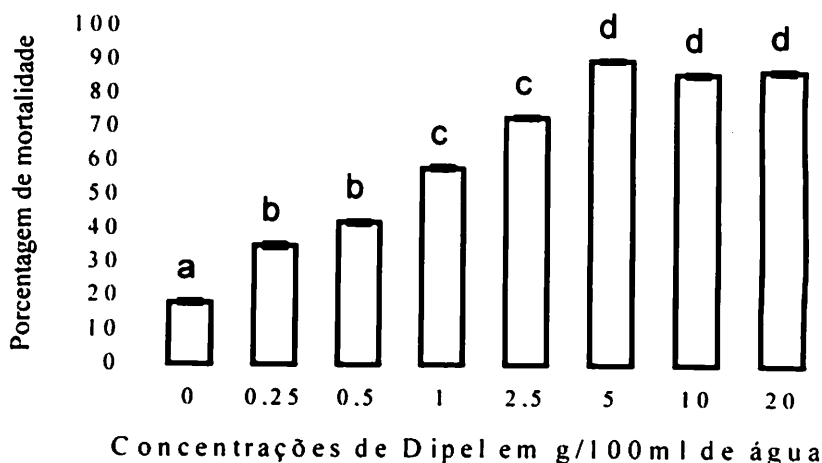


FIGURA 5. Mortalidade (%) (\pm EP) de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM pulverizadas nos favos. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Os resultados evidenciaram a existência de um efeito crescente e significativo ($P \leq 0,05$) das dosagens do Dipel® na mortalidade das lagartas da traça da cera, sendo que os dados se ajustaram ao modelo em cerca de 80,6%. O ponto máximo da curva foi obtido por derivação de primeira ordem da função $y = -0,41x^2 + 10,64x + 36,41$ obtendo valor correspondente à dosagem de 9,43 g de Dipel®/ 100 ml de água que provocou média de 100,0% de mortalidade (Figura 6).

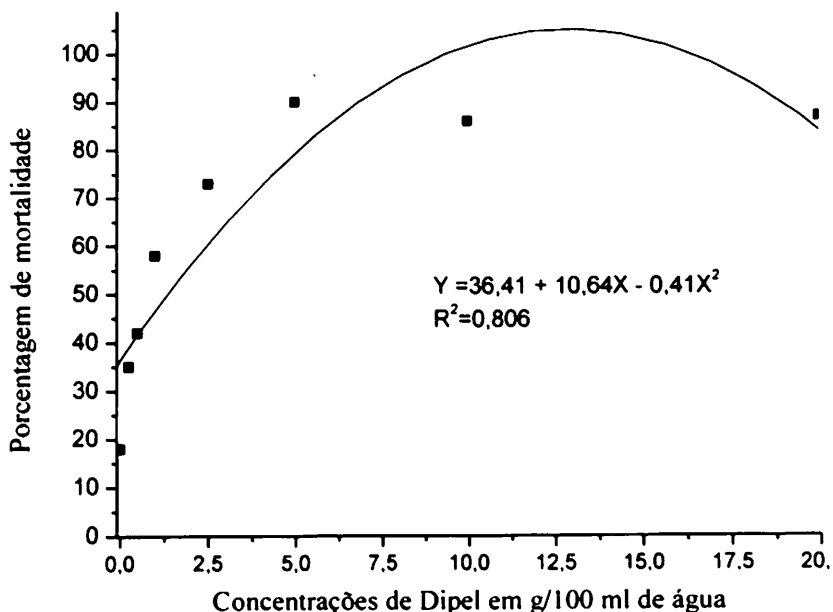


FIGURA 6. Curva de regressão ajustada para a mortalidade (%) de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM pulverizadas nos favos. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

4.1.2 Através da imersão dos favos

Verificou-se que não ocorreram diferenças significativas entre as concentrações avaliadas, as quais diferiram significativamente da testemunha. A mortalidade corrigida para as dosagens de Dipel® variou de 85,2 % a 100,0 %. Notou-se que todas as concentrações testadas de Dipel® foram tóxicas para lagartas de *G. mellonella* (Tabela 2 e Figura 7).

TABELA 2. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM aplicado por imersão dos favos. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/100 ml de água)	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ²
0,00	19,0 \pm 0,5	0,0 a
0,25	88,0 \pm 0,6	85,2 b
0,50	99,0 \pm 0,1	98,8 b
1,00	97,0 \pm 0,2	96,3 b
2,50	100,0 \pm 0,0	100,0 b
5,00	93,0 \pm 0,2	91,4 b
10,0	98,0 \pm 0,1	97,5 b
20,0	91,0 \pm 0,3	88,9 b
C.V. ³ (%)	7,5	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

³Coefficiente de Variação.

Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que a metodologia de aplicação foi um fator importante sobre a eficiência desse produto fitossanitário na mortalidade das lagartas da traça da cera. Pesquisas futuras envolvendo dosagens menores e método de aplicação, devem ser desenvolvidas visando ao aprimoramento dessa técnica de controle de *G. mellonella*.

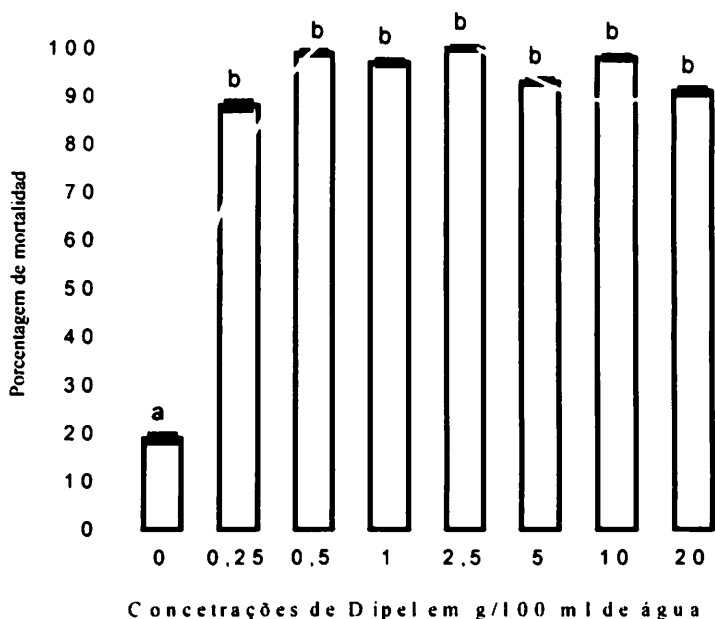


FIGURA 7. Mortalidade (%) (\pm EP) de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes concentrações de Dipel[®] 32 PM aplicado por imersão dos favos. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

4.1.3 Por meio de sua adição à dieta artificial

A mortalidade foi afetada significativamente pela adição de Dipel[®] à dieta artificial, observando-se crescente aumento do número de lagartas mortas em razão do incremento das dosagens utilizadas, com mortalidades variando de 8,8 a 85,7%. A testemunha diferiu de todos os tratamentos (Tabela 3 e Figura 8).

TABELA 3. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à dieta artificial. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/60g de dieta)	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ²
0,00	16,0 \pm 0,4	0,00 a
0,25	34,0 \pm 0,5	8,8 b
0,50	43,0 \pm 0,4	17,6 b
1,00	48,0 \pm 0,7	31,9 b
2,50	61,0 \pm 0,8	42,9 c
5,00	76,0 \pm 0,6	56,0 c
10,0	94,0 \pm 0,3	83,8 d
20,0	95,0 \pm 0,3	85,7 d
C.V. ³ (%)	14,7	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

³Coefficiente de Variação.

A mortalidade causada pelo Dipel® foi agrupada em três classes distintas. Nas dosagens de 0,25; 0,5 e 1,0 g/100 ml causou mortalidades entre 8,8 e 31,9%. Na segunda classe registraram-se valores de 42,9% e 56%, respectivamente, para as dosagens de 2,5 e 5,0 g do produto. No terceiro caso, verificaram-se mortalidades de 83,8% e 85,7%, para 10,0 e 20,0 g do produto, respectivamente, sendo as mais tóxicas às lagartas de *G. mellonella*.

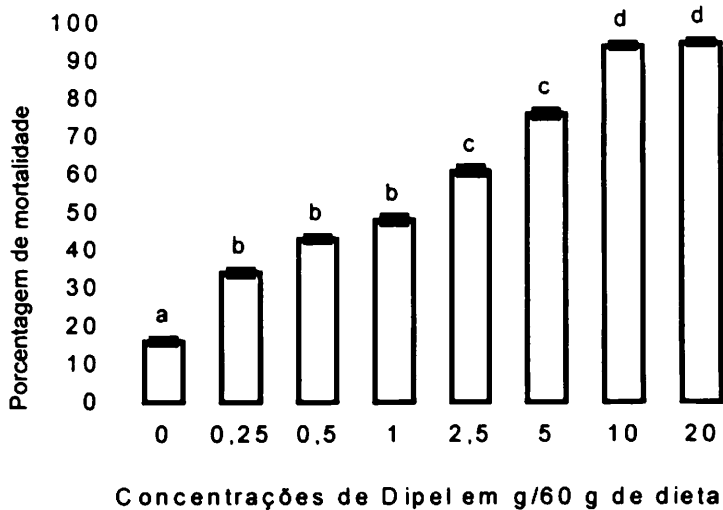


FIGURA 8. Mortalidade de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de dosagens crescentes de Dipel® 32 PM adicionados à dieta artificial. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Os resultados evidenciaram que existe efeito significativo ($P \leq 0.05$) com coeficiente de determinação de 93,2%, quando foi avaliado o efeito do aumento da dosagem do composto adicionado à dieta sobre a mortalidade das lagartas. A dosagem que causou maior mortalidade foi obtida por derivação da equação de regressão, sendo encontrados 14,24 g de Dipel®/ 60 g de dieta, correspondendo a uma mortalidade de 100% das lagartas (Figura 9).

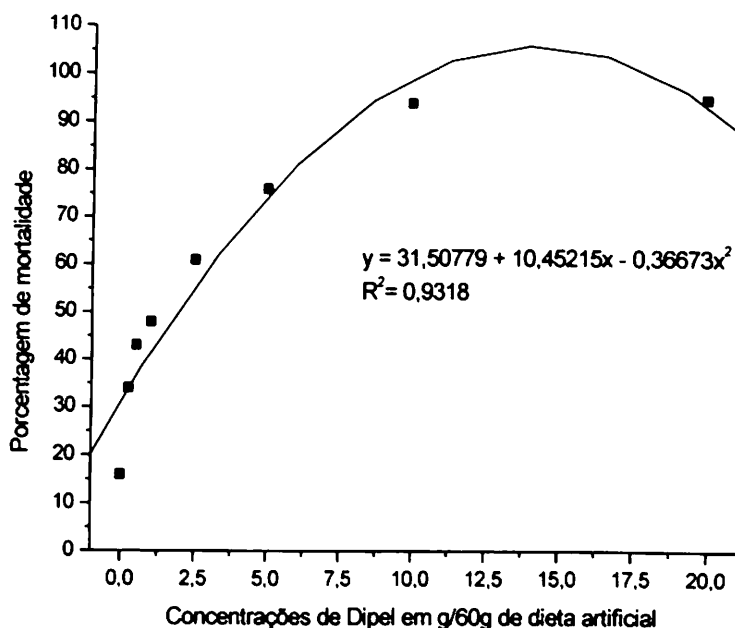


FIGURA 9. Curva de regressão ajustada para a mortalidade (%) de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à dieta artificial. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

4.1.4 Comparação entre as metodologias de aplicação do Dipel® em lagartas

As dosagens de 0,25 e 0,5 g de Dipel® provocaram mortalidade superior no método de aplicação por imersão, não diferindo nas metodologias de pulverização e adição à dieta. Para 1,0 e 2,5 g do produto observaram-se diferenças significativas na mortalidade entre as três metodologias, aumentando gradativamente na imersão, pulverização e dieta, respectivamente. Na dosagem de 5,0 g não houve diferença na mortalidade entre a aplicação por pulverização e imersão, mas foi maior nessas do que na dieta. Quando foram utilizados 10,0 e

20.0 g do produto não ocorreram diferenças significativas nas mortalidades ocorridas entre as três metodologias de aplicação (Tabela 4).

TABELA 4. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes métodos de aplicação de Dipel®32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g)	Método de aplicação / Mortalidade (%)		
	Pulverização	Imersão	Dieta
0,00	18,0 \pm 0,5 aA	19,0 \pm 0,5 aA	16,0 \pm 0,4 aA
0,25	35,0 \pm 0,7 bA	88,0 \pm 0,6 bB	34,0 \pm 0,5 bA
0,50	42,0 \pm 0,5 bA	99,0 \pm 0,1 bB	43,0 \pm 0,4 bA
1,00	58,0 \pm 0,5 cB	97,0 \pm 0,2 bC	48,0 \pm 0,7 bA
2,50	73,0 \pm 0,4 cB	100,0 \pm 0,0 bC	61,0 \pm 0,8 cA
5,00	90,0 \pm 0,4 dB	93,0 \pm 0,2 bB	76,0 \pm 0,6 cA
10,0	86,0 \pm 0,5 dA	98,0 \pm 0,1 bA	94,0 \pm 0,3 dA
20,0	87,0 \pm 0,5 dA	91,0 \pm 0,3 bA	95,0 \pm 0,3 dA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

Pode-se notar que a mortalidade ocorrida, quando utilizada a metodologia por imersão dos favos, foi maior do que nas demais formas de aplicação. Nessa metodologia, houve maior contato do favo com o produto ocasionando mortalidade superior que na pulverização e dieta artificial, independente da concentração utilizada (Tabela 4 e Figura 10).

Em relação à dieta artificial, a baixa mortalidade pode estar relacionada ao fato da adição do inseticida ter alterado algumas propriedades organolépticas.

causando rejeição ao alimento, quando comparado com o consumo da dieta na testemunha, principalmente quando em concentrações mais elevadas.

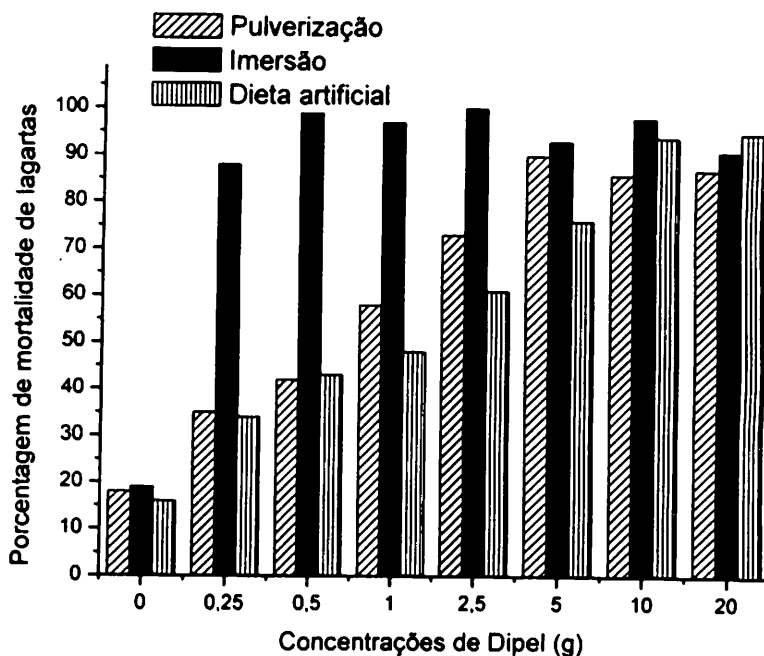


FIGURA 10. Mortalidade (%) de lagartas de terceiro instar de *Galleria mellonella* em função de diferentes métodos de aplicação do Dipel® 32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Nos levantamentos bibliográficos realizados, não foram encontradas pesquisas sobre o efeito do inseticida *B. thuringiensis* var. *kurstaki* sobre lagartas *G. mellonella* por meio de adição à dieta artificial e imersão, apenas por pulverização realizada por Verma (1995). Outros trabalhos encontrados sobre a bioatividade do *B. thuringiensis* para *G. mellonella* como Singh (1962), Bailey (1981), Szabo & Heikel (1987), Oirsa (1988), não utilizam a mesma variedade.

No presente trabalho obteve-se mortalidade de 86% utilizando 10 g de Dipel /100 ml de água pulverizado em favos de *A. mellifera*, sendo que Verma (1995) obteve 98,7% de mortalidade das lagartas com a mesma concentração do produto.

Na aplicação por pulverização dos favos a dosagem de 9,43 g de Dipel®/100 ml de água foi a que provocou 100,0% de mortalidade (Figura 6). Utilizando esse resultado e considerando que o gasto para pulverização dos 10 favos do respectivo experimento foi, em média, de 25 ml de suspensão, ou seja, restaram 75 ml da suspensão no pulverizador, pode-se concluir que houve um consumo aproximado de 0,236 g do produto por favo de 10 cm x 10 cm. Os favos de melgueira das colmeias do tipo Langstroth têm 45 cm de comprimento por 13,5 cm de largura com área de 607,5 cm²; então, com 500 g do Dipel® seria possível pulverizar cerca de 349 quadros de melgueiras. Contendo cada quadro aproximadamente 60 g de cera alveolada, através da pulverização, evitar-se-ia a destruição de 21 kg de cera. Ressalte-se que o quilograma de cera alveolada custa US\$ 7.00 e o preço de 500 g de Dipel® é US\$ 10.00; a economia seria de 137 dólares, não incluindo os custos da mão-de-obra.

Quando se utilizou aplicação do Dipel® por imersão dos favos de abelhas, constatou-se mortalidade de 85,2% com a concentração de 0,25 g/100 ml de água, sendo que todas as outras dosagens superiores a essa não diferiram significativamente (Tabela 2). Com essa dosagem ocorreu um consumo de 0,048 g do produto por favo de 10 cm x 10 cm. Um favo de melgueira consumiria 0,291 g do produto. Então, com 500 g do produto comercial seria possível realizar a imersão de aproximadamente 1715 quadros de melgueiras, equivalendo a 103 kg de cera, ou seja, uma economia de US\$ 711.00.

Das três formas de aplicação, a pulverização seria aconselhável apenas para os apicultores de pequeno porte; para apicultores de grande porte o manejo

dos favos, que devem ser pulverizados em ambas as faces, dificultaria a implantação da metodologia. A imersão é a mais prática pela facilidade de aplicação do produto, em que os favos são mergulhados inteiramente na suspensão, reduzindo a mão-de-obra e tempo de execução, sendo a metodologia apropriada para qualquer tipo de apicultor.

4.1.5 Sintomas de infecção em lagartas devido à aplicação do Dipel®

Sintomas de infecção nas lagartas de *G. mellonella* pela ação do *B. thuringiensis* foram observados em todas as metodologias de aplicação desse produto, sendo mais pronunciados nas maiores dosagens. O tegumento infectado perdeu o brilho, adquirindo coloração marrom-escura, as lagartas diminuíram a agilidade, tornando-se flácidas e parando de se movimentarem a partir de 48 horas do contato com o Dipel®, quando algumas delas abandonaram a dieta artificial. Logo após a morte adquiriram sintomas externos como coloração preta iniciando-se a deterioração de seus tecidos acompanhada de odor fétido, o que já foi relatado por Habib & Andrade (1998) em lagartas do noctuídeo *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) e o brassolideo *Brassolis sophorae* (Linnaeus, 1758) infectadas por *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Figura 11).

Sintomas relacionados ao abandono do alimento foram visualizados quando Dipel® foi incorporado à dieta artificial, pois tanto na imersão quanto na pulverização dos favos, as lagartas permaneceram no interior das galerias, dificultando a identificação. O comportamento anormal das lagartas em se afastarem do alimento ocorreu devido à ingestão da proteína Cry, presente na bactéria, que, uma vez no intestino médio, causa intumescimento das células epiteliais por desequilíbrio osmótico, conduzindo à paralisação do intestino e provocando a morte do indivíduo (Mendonça, 2002).

4.2 Isolamento de *Bacillus thuringiensis* em lagartas tratadas com Dipel®

O isolamento pelo Método Básico I nas lagartas dos três experimentos, após 24 horas, evidenciou a presença do *B. thuringiensis* através do crescimento de cultura nas placas de Petri, não excluindo a causa da mortalidade por essa bactéria. Os isolados apresentaram colônias de 3 a 5 mm de diâmetro, formato circular, borda ondulada, superfície granulosa, opaca, branca e de consistência úmida. Os resultados para os isolados obtidos dos tratamentos com as diferentes dosagens foram idênticos quando comparados com isolamento da cultura de *B. thuringiensis* feito com o produto comercial Dipel®, comprovando ser o mesmo microorganismo patogênico para o grupo de lagartas dos três experimentos, diferindo apenas dos isolados obtidos com as lagartas isentas da aplicação do produto (testemunha) (Figura 12).

Pelos resultados obtidos, evidenciou-se que *G. mellonella* apresentou susceptibilidade a *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. A maior ou menor porcentagem de mortalidade ocorrida nos experimentos pode estar relacionada com o método de aplicação do produto e a possibilidade da lagarta se alimentar.

Com o desenvolvimento de pesquisas para o aprimoramento das técnicas de aplicação do produto, associado aos avanços científicos sobre método de aplicação dessa bactéria, é provável que, num futuro próximo, seja viável o emprego de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* no controle da *G. mellonella*, especialmente em favos armazenados durante o período de escassez de mel ou quando se fizer necessária à estocagem de quadros de ninhos e melgueiras com cera.

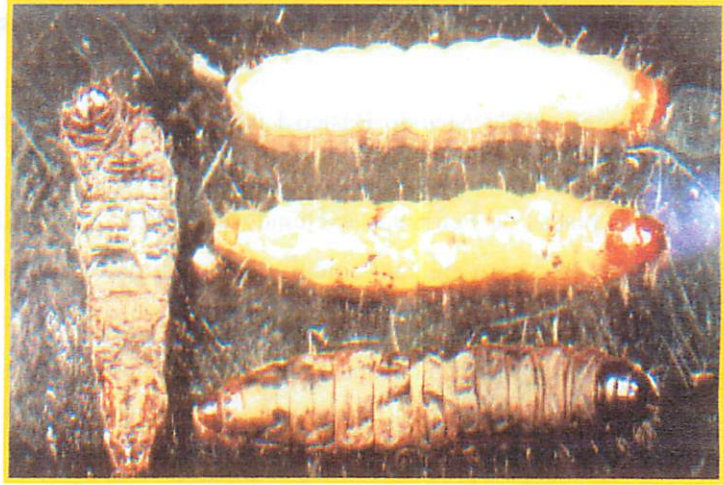


FIGURA 11. Lagartas de *Galleria mellonella* com sintomas de infecção por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. UFLA, Lavras-MG, 2003.

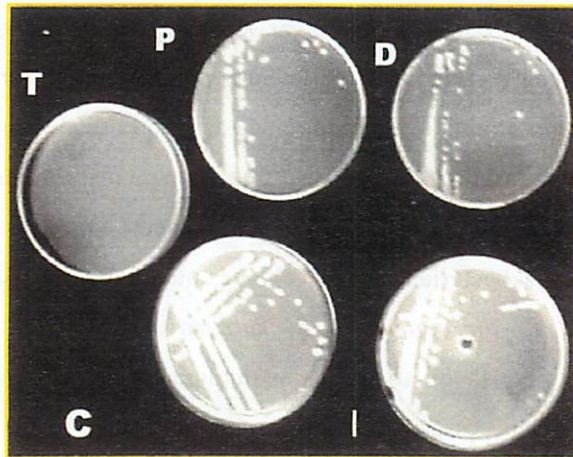


FIGURA 12. Placas com culturas de *Bacillus thuringiensis* isolados dos experimento de lagartas tratadas com Dipel® 32 PM. T - testemunha (isenta de aplicação), P - favos pulverizados, D - dieta artificial, I - favos imersos e C - produto comercial Dipel® 32 PM. UFLA, Lavras - MG, 2003.

Nos isolados de lagartas do tratamento testemunha (sem adição de Dipel®), não houve nenhum crescimento da cultura bacteriana ou outros organismos, mantendo somente o meio MBI. Nas placas P, D e I houve crescimento da cultura bacteriana. Em todos os tratamentos onde se utilizou Dipel® e nos três métodos de aplicação independente da dosagem aplicada, ocorreu crescimento da cultura bacteriana sendo idênticas ao obtido com o isolamento do produto comercial em C.

4.3 Influência do Dipel® na mortalidade de adultos de *Apis mellifera*

4.3.1 Através da pulverização de adultos

Constatou-se que as diferentes dosagens de Dipel® utilizadas influenciaram significativamente o número de abelhas mortas. Assim, esse produto fitossanitário, quando aplicado por pulverização, provocou mortalidade significativa em relação ao tratamento testemunha. Foi observado que os maiores índices de mortalidade ocorreram nas dosagens de 0,25; 0,5; 1,0 e 10,0 g/100 ml, com média de 62,2%; 52,4%; 54,1% e 45,9%, respectivamente. Apesar do aumento na dosagem, ocorreu diminuição de mortalidade nas dosagens de 2,5; 5,0 e 20,0 g/100 ml de água (Tabela 5 e Figura 13).

TABELA 5. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* pulverizados com Dipel® 32 PM em diferentes concentrações. Temperatura 28 \pm 2 °C, UR 70 \pm 10% e fotofase de 12 horas, UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/100 ml de água)	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ²
0.00	39.0 \pm 0.4	0.0 a
0.25	77.0 \pm 1.1	62.2 c
0.50	71.0 \pm 1.4	52.4 c
1.00	72.0 \pm 0.7	54.1 c
2.50	57.0 \pm 0.5	29.5 b
5.00	53.0 \pm 0.6	22.9 b
10.0	67.0 \pm 0.4	45.9 c
20.0	56.0 \pm 0.3	27.9 b
C.V. ³ (%)	17.7	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

³Coefficiente de Variação.

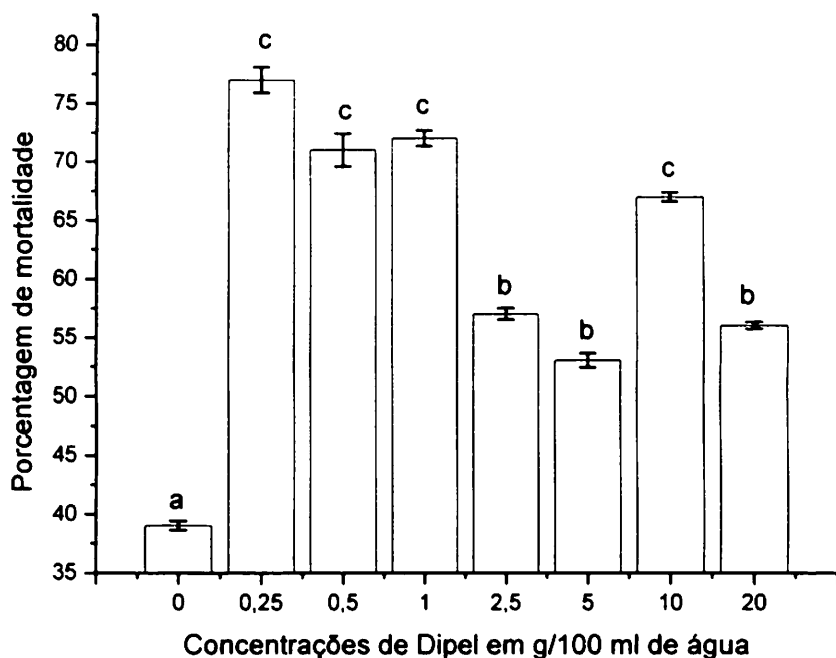


FIGURA 13. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* pulverizadas com diferentes concentrações de Dipel[®]32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003. Médias seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Como o tempo exato de sobrevivência das abelhas após a aplicação do *B. thuringiensis* não pode ser observado, as mortes foram registradas, para análise de tempo médio de vida, como ocorrendo no meio do intervalo, seguindo a metodologia proposta por Colosimo (2001). Assim, mortes registradas no intervalo entre 6 e 12 horas da aplicação, por exemplo, foram consideradas ocorridas, em média, às 9 horas. Para indivíduos que sobreviveram foi incluído o período de 96 horas de vida (Tabela 6). O número de indivíduos mortos em cada intervalo de tempo encontra-se no anexo (Tabela A – página 65).

TABELA 6. Tempo médio de vida (horas) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* pulverizados com diferentes concentrações de Dipel®32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/100 ml de água)	Tempo médio de vida
0,00	82,4 \pm 4,5 a
0,25	68,6 \pm 5,2 b
0,50	69,9 \pm 4,9 b
1,00	69,4 \pm 5,1 b
2,50	72,3 \pm 5,2 b
5,00	71,6 \pm 5,4 b
10,0	64,1 \pm 5,9 b
20,0	67,9 \pm 5,8 b
C.V. ²	7,9 %

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Coefficiente de Variação.

Todas as dosagens diferiram significativamente do tempo médio de vida da testemunha, mas não diferiram entre si, indicando que as abelhas que sofreram aplicação do produto sobreviveram, em média, por um período de tempo entre 64,1 e 72,3 horas após a aplicação, independente da concentração, enquanto que aquelas da testemunha viveram em média 82,4 horas, aproximadamente 3,4 dias (Tabela 6).

4.3.2 Adicionado à pasta Cândi

Observaram-se, além da testemunha, dois grupos distintos de porcentagem de mortalidade. As dosagens entre 0,25 e 1,0 g/ 60 g da pasta

Cândi causaram mortalidade entre 54 e 68%. No segundo grupo registrou-se mortalidade superior a 94%, chegando a 100% nas dosagens de 10.0 e 20.0 g, indicando influência do produto na mortalidade das abelhas (Tabela 7 e Figura 14).

TABELA 7. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* alimentados com pasta Cândi com adição de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/60 g de pasta Cândi)	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ²
0,00	41,0 \pm 0,9	0,0 a
0,25	73,0 \pm 0,4	54,2 b
0,50	75,0 \pm 0,5	57,6 b
1,00	81,0 \pm 0,3	67,8 b
2,50	97,0 \pm 0,2	94,9 c
5,00	98,0 \pm 0,1	96,6 c
10,0	100,0 \pm 0,0	100,0 c
20,0	100,0 \pm 0,0	100,0 c
C.V. ³ (%)	9,4	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

³Coefficiente de Variação.

Verificou-se uma diferenciação significativa entre os tratamentos de acordo com o aumento na dosagem do Dipel® aplicada à pasta Cândi, sendo que a mortalidade apresentou crescimento proporcional ao aumento da concentração.

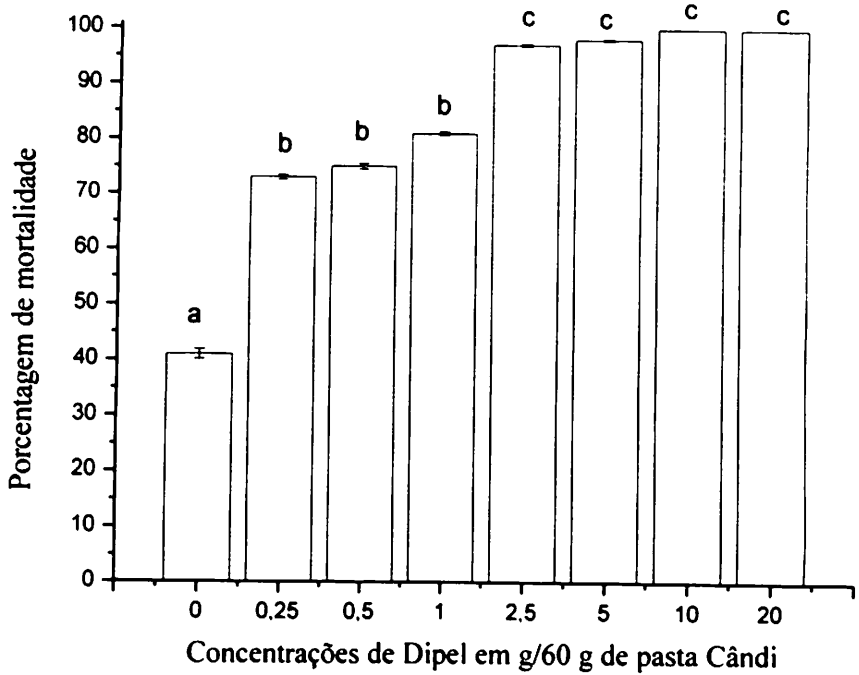


FIGURA 14. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à pasta Cândi. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003. Médias seguidas de mesma letra, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foi observada significância ($P \leq 0.05$), com um coeficiente de determinação R^2 de 73.3%, quando se avaliou o efeito da dosagem do inseticida adicionado à pasta Cândi na mortalidade das abelhas. O valor 6.15 g de Dipel[®]/60 g de pasta Cândi corresponde à concentração que provoca 100% de mortalidade de abelhas (Figura 15).

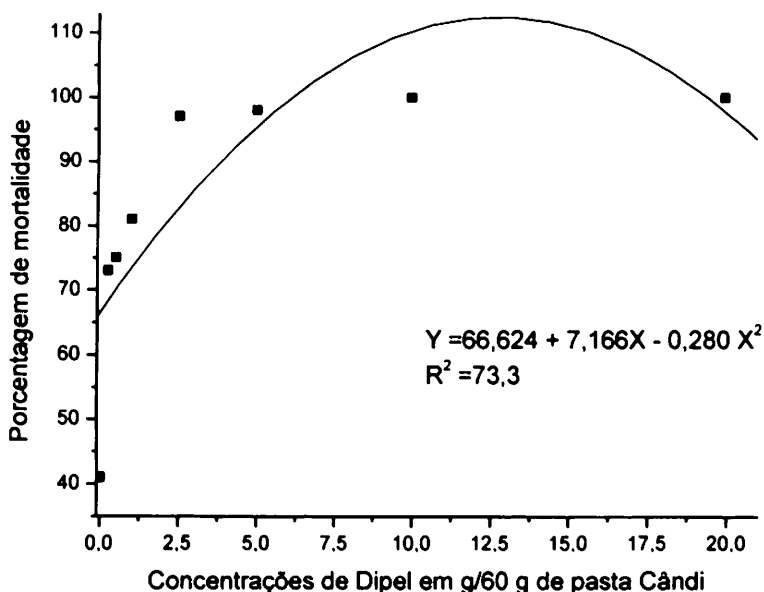


FIGURA 15. Curva de regressão ajustada para a mortalidade (%) de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel[®]32 PM adicionadas à pasta Cândi. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Evidenciou-se que as diferentes dosagens de Dipel[®] adicionadas à pasta Cândi influenciaram significativamente o tempo médio de vida dos adultos de abelhas. Com as dosagens 0,25; 0,5 e 1,0 g/100 ml obtiveram-se os maiores tempos de vida, com média de 72,5; 71,9 e 72,9 horas, respectivamente. Quando adicionada a dosagem de 2,5 g, o tempo de vida foi intermediário com média de 57,1 horas; e nas três maiores dosagens observou-se tempo médio de vida abaixo de 44,2 horas (Tabela 8). O número de indivíduos mortos em cada intervalo de tempo encontra-se no anexo (Tabela B – página 66).

TABELA 8. Tempo médio de vida (horas) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel®32 PM adicionadas à pasta Cândi. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/60 g de pasta Cândi)	Tempo médio de vida
0,00	83,3 \pm 4,5 a
0,25	72,5 \pm 4,7 b
0,50	71,9 \pm 4,7 b
1,00	72,9 \pm 4,7 b
2,50	57,1 \pm 4,2 c
5,00	44,2 \pm 4,0 d
10,0	40,2 \pm 3,6 d
20,0	35,5 \pm 3,1 d
C.V. ²	11,4 %

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Coefficiente de Variação.

Constatou-se que existe efeito significativo ($P \leq 0,05$) e um coeficiente de determinação R^2 de 93,3%, quando se avaliou o efeito da dosagem do inseticida adicionado à pasta Cândi sobre o tempo médio de vida de adultos das abelhas. O ponto mínimo foi obtido por derivação, ocorrendo na dosagem de 14,5 g de Dipel®/60 g de dieta e correspondendo ao tempo médio de vida para as abelhas de 29,7 horas (Figura 16).

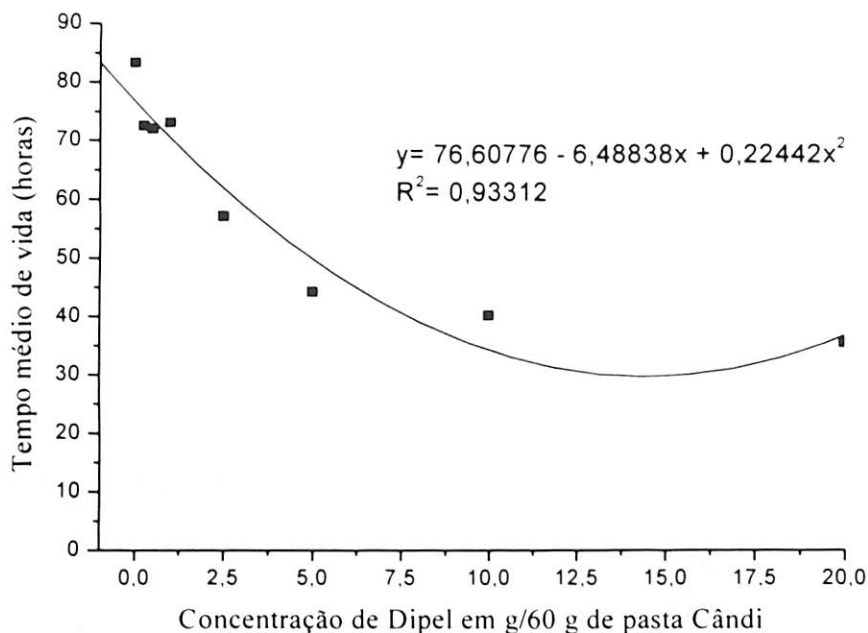
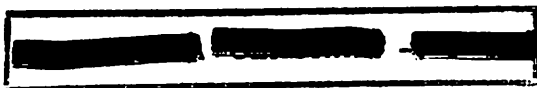


FIGURA 16. Curva de regressão ajustada para o tempo médio de vida (horas) para adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à pasta Cândi. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

4.3.3 Adicionado à solução aquosa de mel a 50%

Observou-se que as diferentes dosagens de Dipel® adicionadas à solução aquosa de mel a 50% influenciaram significativamente no número de abelhas mortas, sendo que a mortalidade, quando se adicionaram 0,25 g de Dipel®/100ml de solução aquosa de mel a 50%, não diferiu da testemunha. O Dipel® apresentou os maiores valores de mortalidade a 10,0 e 20,0 g/100ml, com médias de 94,7% e 98,2%, respectivamente; e a 2,5 e 5,0 g apresentou toxicidade, com média de 73,7% e 75,4%, respectivamente. Nas dosagens de 0,5



e 1.0 g observou-se mortalidade de 33,3% (Tabela 9). Assim, esse produto fitossanitário, quando adicionado à solução aquosa de mel a 50% na dosagem de 0,25 g, não afetou a mortalidade de abelhas, apresentando comportamento semelhante à testemunha.

TABELA 9. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* pulverizados com diferentes concentrações de Dipel®32 PM. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/100 ml de solução aquosa de mel a 50%)	Mortalidade (%)	Mortalidade corrigida (%) ²
0,00	43,0 \pm 0,4	0,0 a
0,25	44,0 \pm 0,5	1,8 a
0,50	62,0 \pm 0,5	33,3 b
1,00	62,0 \pm 0,5	33,3 b
2,50	85,0 \pm 0,2	73,7 c
5,00	86,0 \pm 0,3	75,4 c
10,0	97,0 \pm 0,2	94,7 d
20,0	99,0 \pm 0,1	98,2 d
C.V. ³ (%)	11,2	-

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão

²Mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

³Coefficiente de Variação.

O aumento na mortalidade ocorreu principalmente nas dosagens mais altas aplicadas à solução aquosa de mel a 50%, sendo que na dosagem mais baixa o Dipel® não diferiu da testemunha (Figura 17).

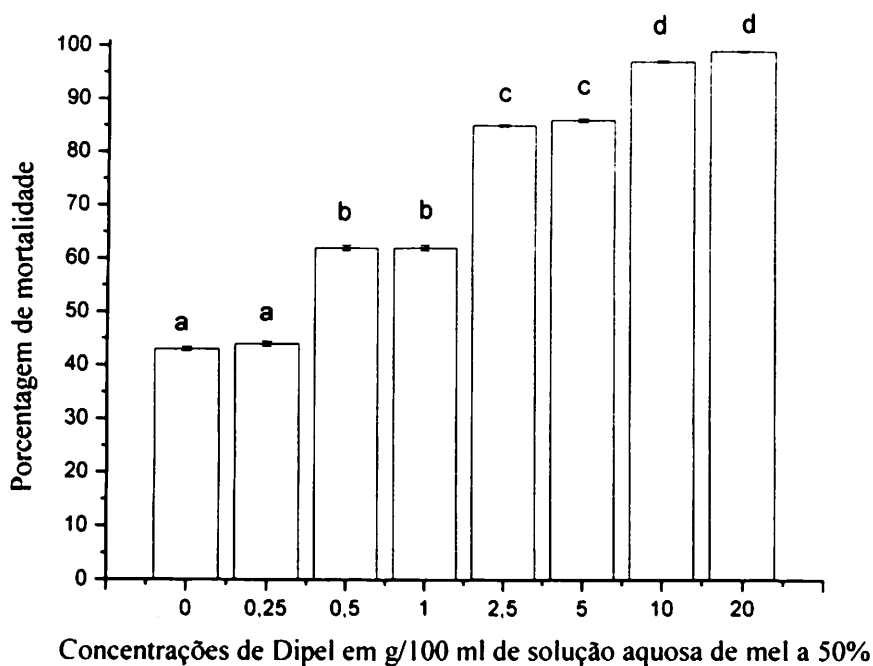


FIGURA 17. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ adultos de *Apis mellifera* em função da diferentes concentrações de Dipel®32 PM adicionadas à solução aquosa de mel a 50%. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pela análise dos resultados verificou-se que existe efeito significativo ($P \leq 0.05$) e coeficiente de determinação R^2 de 86,3%, quando se avaliou o efeito da dosagem do inseticida adicionado à solução aquosa de mel a 50% sobre a mortalidade das abelhas. A dosagem 8,46 g de Dipel^x/100 ml de solução aquosa de mel a 50% corresponde a 100% de mortalidade (Figura 18).

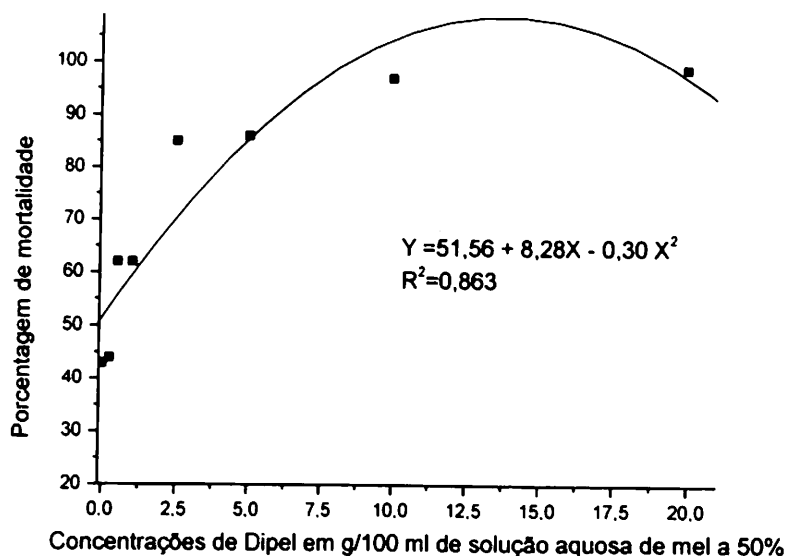


FIGURA 18. Curva de regressão ajustada para a mortalidade (%) de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à solução aquosa de mel a 50%. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

A dosagem igual ou superior a 2.5 g de Dipel® influenciou significativamente no tempo médio de vida das abelhas quando adicionada à solução aquosa de mel a 50%, reduzindo o período de vida das abelhas, principalmente nas dosagens de 10.0 e 20.0 g. Dosagens inferiores não diferiram da testemunha (Tabela 10).

TABELA 10. Tempo de vida médio (horas) (\pm EP)¹ para adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel® adicionadas à solução aquosa de mel a 50%. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g/100 ml de água)	Tempo médio de vida
0,00	73,6 \pm 4,3 a
0,25	75,6 \pm 4,2 a
0,50	68,8 \pm 4,9 a
1,00	72,9 \pm 4,7 a
2,50	60,8 \pm 4,1 b
5,00	67,4 \pm 4,2 b
10,0	51,2 \pm 4,0 c
20,0	51,4 \pm 3,9c
C.V. ²	7,9 %

Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

²Coefficiente de Variação.

O tempo médio de vida das abelhas diminuiu com o aumento das dosagens de Dipel® (Figura 19). Dias (2001) sugeriu a conservação dos favos, pulverizando-os com Dipel®; entretanto, não eram conhecidos os efeitos deletérios desse produto para larvas e/ou adultos de *A. mellifera*. Constatou-se que quanto maior a dosagem do produto menor o tempo de vida dos adultos, evidenciando efeito tóxico para esses indivíduos quando alimentados com dieta contaminada. O ponto de mínimo foi obtido por derivação da função, correspondendo à dosagem de 16,3 g de Dipel®/100 ml da solução aquosa de mel a 50% com tempo médio de vida das abelhas de 49,9 horas. O número de indivíduos mortos em cada intervalo de tempo encontra-se no anexo (Tabela C- página 67).

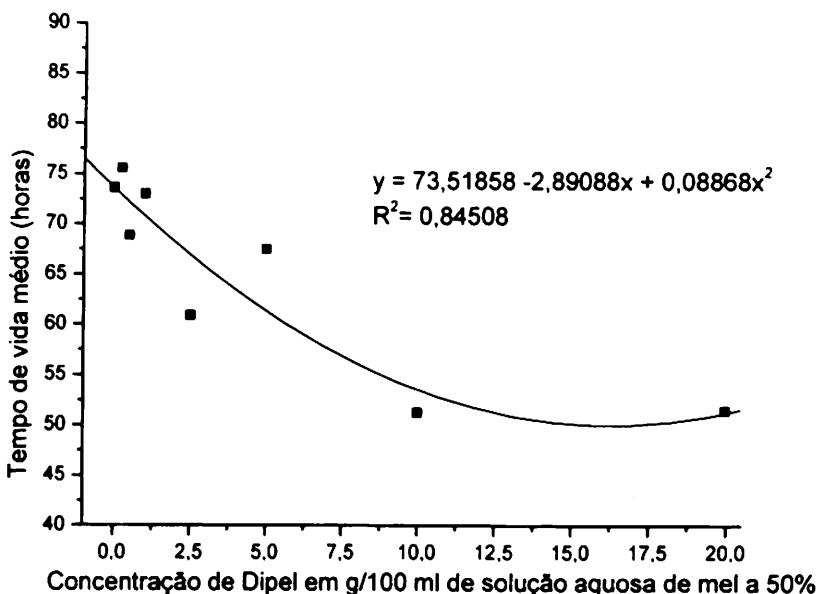


FIGURA 19. Curva de regressão ajustada para o tempo médio de vida (horas) para adultos de abelhas *Apis mellifera* em função de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM adicionadas à solução aquosa de mel a 50%. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

4.3.4 Comparação entre as metodologias de aplicação do Dipel® em adultos de *Apis mellifera*

Comparando-se as três metodologias de aplicação, constatou-se uma mortalidade menor através da aplicação em solução aquosa de mel a 50% até a dosagem de 1.0 g do produto; acima dessa dosagem, o método onde se constatou menor porcentagem de mortalidade foi a de pulverização. Nas três metodologias, a mortalidade causada pela aplicação de 0.5 g de Dipel não diferiu significativamente. A partir da dosagem de 2.5 g não houve diferença

significativa entre os resultados da metodologia de adição em pasta Cândi e solução aquosa de mel a 50% (Tabela 11 e Figura 20).

TABELA 11. Mortalidade (%) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes modos de aplicação de Dipel® 32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g)	Método de aplicação/Mortalidade (%)		
	Pulverização	Pasta Cândi	Solução aquosa de mel a 50%
0,00	39,0 \pm 0,4 aA	41,0 \pm 0,9 aA	43,0 \pm 0,4 aA
0,25	77,0 \pm 1,1 cB	73,0 \pm 0,4 bB	44,0 \pm 0,5 aA
0,50	71,0 \pm 1,4 cA	75,0 \pm 0,5 bA	62,0 \pm 0,5 bA
1,00	72,0 \pm 0,7 cA	81,0 \pm 0,3 bB	62,0 \pm 0,5 bA
2,50	57,0 \pm 0,5 bA	97,0 \pm 0,2 cB	85,0 \pm 0,2 cB
5,00	53,0 \pm 0,6 bA	98,0 \pm 0,1 cB	86,0 \pm 0,3 cB
10,0	67,0 \pm 0,4 cA	100,0 \pm 0,0 cB	97,0 \pm 0,2 dB
20,0	56,0 \pm 0,3 bA	100,0 \pm 0,0 cB	99,0 \pm 0,1 dB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

Com relação à testemunha, a mortalidade foi significativamente mais baixa e não diferiu entre as três metodologias empregadas. Considerando que os experimentos foram realizados com insetos onde não é possível ter uniformidade na idade dos indivíduos, pode ter ocorrido mortalidade que não tenha sido provocada pelo Dipel® e, sendo assim, a testemunha tornou-se parâmetro eficaz para confirmação dos resultados experimentais.

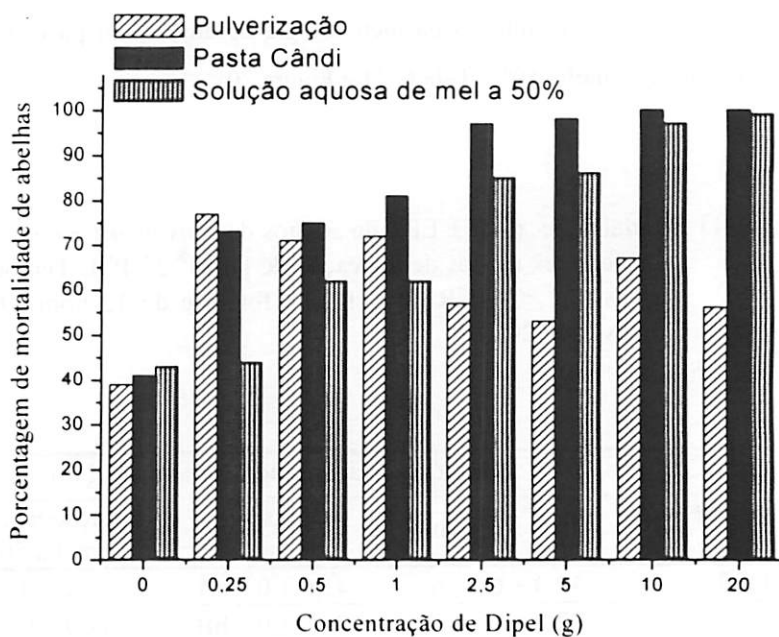


FIGURA 20. Comparação entre porcentagens de mortalidade de adultos de *Apis mellifera* submetidos a diferentes metodologias de aplicação do Dipel® 32 PM. Temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003

Quanto ao tempo médio de vida, observou-se que as porcentagens de mortalidade de abelhas nas três metodologias foram semelhantes para as dosagens de 0.5 e 1.0 g de Dipel®. Acima dessas dosagens o tempo médio de vida foi significativamente diferente entre as metodologias, observando-se que o produto adicionado à pasta Cândia foi o que provocou menor tempo médio de vida das abelhas, seguida da solução aquosa e da pulverização (Tabela 12).

Na pulverização, provavelmente as abelhas apresentaram menor ingestão de Dipel®, conseqüentemente houve prolongamento do tempo de vida. A diferença entre as metodologias de aplicação deve estar relacionada com a própria dieta, tendo ocorrido consumo maior da pasta Cândia.

TABELA 12. Tempo médio de vida (horas) (\pm EP)¹ de adultos de *Apis mellifera* em função de diferentes métodos de aplicação de Dipel® 32 PM. Temperatura de 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.

Dipel® (g)	Método de aplicação/ Tempo médio de vida		
	Pulverização	Pasta Cândia	Solução aquosa de mel a 50%
0,00	82,4 \pm 4,5 a B	83,3 \pm 4,5 aB	73,6 \pm 4,3 a A
0,25	68,6 \pm 5,2 bA	72,5 \pm 4,7 bB	75,6 \pm 4,2 aC
0,50	69,9 \pm 4,9 bA	71,9 \pm 4,7 bA	68,8 \pm 4,9 aA
1,00	69,4 \pm 5,1 bA	72,9 \pm 4,7 bA	72,9 \pm 4,7 aA
2,50	72,3 \pm 5,2 bC	57,1 \pm 4,2 cA	60,9 \pm 4,1 bB
5,00	71,6 \pm 5,4 bC	44,2 \pm 4,0 dA	67,4 \pm 4,2 bB
10,0	61,4 \pm 5,9 bC	40,2 \pm 3,6 dA	51,2 \pm 4,0 cB
20,0g	67,9 \pm 5,75 bC	35,5 \pm 3,1dA	51,4 \pm 3,9cB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula, nas colunas, e maiúscula, nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

¹Erro Padrão.

4.3.5 Sintomas de intoxicação de adultos de *Apis mellifera* pelo Dipel®

Os sintomas externos provocados pelo *B. thuringiensis* em adultos de *A. mellifera* não são conhecidos, uma vez que esse produto é indicado para a fase jovem de lepidópteros, coleópteros e dípteros. Foi observado que o comportamento de limpeza do corpo e de agregação noturna das abelhas adultas foi alterado. Nas primeiras horas após o fornecimento do produto na pasta Cândia e solução aquosa de mel a 50%, percebeu-se rejeição do alimento, principalmente quando utilizadas dosagens mais altas do Dipel®. Comparando-se com o consumo do alimento da testemunha, ocorreu diminuição da alimentação nos diferentes

tratamentos com Dipel[®], revelando uma possível disfunção e paralisia intestinal. Distúrbios intestinais passaram a ocorrer e um grande fluxo de fezes líquidas foi encontrado nas paredes da gaiola, aspecto não presente no tratamento testemunha. Quando os adultos foram pulverizados, notou-se a presença de fezes das abelhas na dieta posicionada na parte superior da gaiola (Figura 21).

Morfologicamente observou-se um aumento de 20 a 30% do volume do abdome de abelhas que foram submetidas aos tratamentos com Dipel[®], independente da concentração e método de aplicação utilizado (Figura 22). Houve perda de agilidade, observando-se a presença de abelhas caminhando lentamente, com posterior paralisia geral antes de morrerem.

Indivíduos vivos tentavam retirar, do fundo do recipiente, as abelhas mortas nas primeiras 48 horas da aplicação do produto, caminhando com o adulto morto para a lateral da gaiola, preso em suas mandíbulas, comportamento característico das abelhas, como descrito por Gramacho (2002). Após esse período não foi observado o hábito de limpeza, aumentando o número de indivíduos que se mantinham isolados durante a noite, o que não ocorreu no tratamento testemunha, onde se mantiveram sempre agregados.

Nas abelhas adultas não deveria ter ocorrido nenhum efeito em virtude da aplicação do *B. thuringiensis*, já que o produto é um larvicida, mas como observado anteriormente, houve modificações evidentes no comportamento sobrevivência e longevidade em todos os experimentos para todas as concentrações empregadas. Verma (1995), na Índia, relatou que não houve mortalidade de larvas e adultos de *A. cerana* em trabalhos com pulverização de Dipel[®], provavelmente por se tratar de uma outra espécie de abelha. Brighenti et al. (2002) e Carvalho et al. (2002) pesquisando adultos de *A. mellifera*, no Brasil, mencionaram que o Dipel[®] foi inócuo para as abelhas com dosagens inferiores às utilizadas neste trabalho.

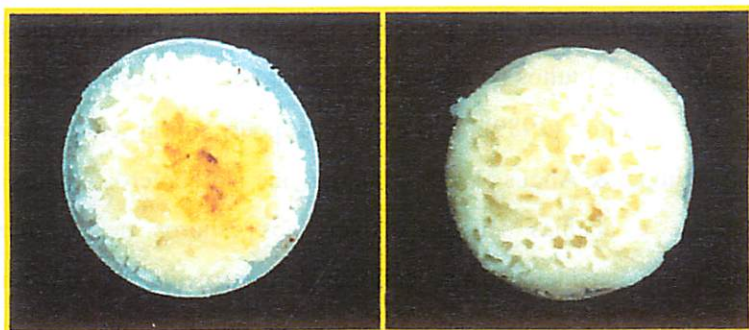


FIGURA 21. Pasta Candi com resíduos de fezes de coloração amarelada encontrados em gaiolas contendo dieta tratada com Dipel® 32 PM (esquerda) e pasta Candi da testemunha (direita).



FIGURA 22. Adultos de *Apis mellifera* evidenciando intumescimento abdominal após o tratamento com Dipel® 32 PM (abaixo) e acima adultos da testemunha.

Foi confirmado na presente pesquisa o efeito deletério do *B. thuringiensis* para adultos de abelhas. De acordo com Sebesta & Horska (1970), citados por Arantes (1989), a β -exotoxina pode causar envenenamento nos adultos. Heimpel & Angus (1960) relataram que lepidópteros adultos da família Geometridae e abelhas são susceptíveis aos esporos de *B. thuringiensis*. Levando-se em consideração a necessidade de controle da traça dos favos, torna-se necessário o desenvolvimento de outras pesquisas, como, por exemplo, o efeito dessa bactéria sobre adultos de *A. mellifera* após o período de armazenamento dos favos tratados na entressafra, ou mesmo no mel e outros derivados. Burges & Bailey (1968) e Charrière & Imdorf (1999), em suas pesquisas, não encontram resíduos de *B. thuringiensis aizawai* na cera, pólen e própolis e consideraram o produto inócuo às abelhas.

4.4 Isolamento de *Bacillus thuringiensis* em abelhas submetidas ao tratamento com Dipel®

No total foram realizados 24 procedimentos de isolamento através do Método Básico I para adultos de *A. mellifera*, sendo oito de cada metodologia. Os resultados para a cultura isolada foram idênticos ao isolamento realizado com o produto comercial Dipel®, comprovando-se ser o mesmo microorganismo patogênico para todos os grupos de abelhas utilizados, com exceção das testemunhas, isentas do produto, nas três metodologias de aplicação.

Após 24 horas da realização do procedimento MBI, a presença da bactéria foi confirmada por meio do crescimento de cultura, não excluindo a causa da mortalidade das abelhas por *B. thuringiensis* (Figura 23).

Os isolados apresentaram colônias idênticas àquelas descritas no subitem 4.2 (Figura 24).

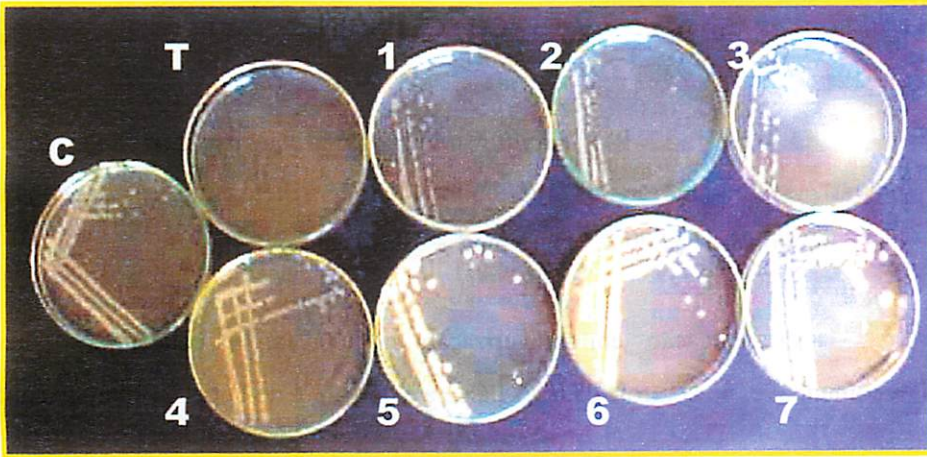


FIGURA 23. Placas com culturas de *Bacillus thuringiensis* isolados de adultos de *Apis mellifera* tratados com diferentes dosagens de Dipel® 32 PM em 100 ml da solução aquosa de mel a 50%. C - produto comercial; T - testemunha; 1 - 0,25 g; 2 - 0,5 g; 3 - 1,0 g; 4 - 2,0 g; 5 - 5,0 g; 6 - 10,0 g e 7 - 20,0 g de Dipel®.

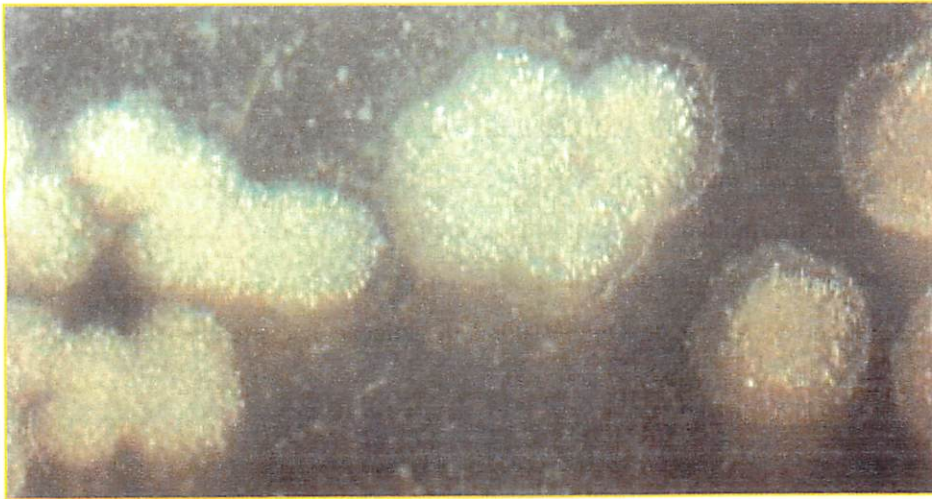


FIGURA 24. Colônias de *Bacillus thuringiensis* isoladas de adultos de *Apis mellifera*.

5 CONCLUSÕES

O Dipel® 32 PM *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* aplicado via pulverização ou imersão dos favos ou incorporado à dieta é eficiente no controle da *G. mellonella*, sendo a “causa mortis” das lagartas.

Na aplicação em pulverização nos favos, a concentração mais recomendável no controle da traça da cera é de 9,43 g de Dipel®/100ml de água.

O *B. thuringiensis* aplicado por imersão dos favos é tóxico para *G. mellonella* em todas as dosagens testadas, com média superior a 80% de mortalidade.

Na metodologia de adição à dieta artificial, a concentração com maior porcentagem de mortalidade de *G. mellonella* é de 14,24 g de Dipel®/60g de dieta artificial.

O Dipel® 32 PM *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* aplicado via pulverização, incorporado à pasta Cândi ou à solução aquosa de mel a 50%, provoca mortalidade de adultos de *A. mellifera* em todas as dosagens utilizadas, com exceção da metodologia de adição à solução aquosa de mel a 50%, onde a dosagem de 0,25 g de Dipel®/100ml de solução não afetou a mortalidade de adultos de *A. mellifera*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, p. 265-267, 1925.

ALMEIDA, D. **Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, Estado de São Paulo**, 2002. 103 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

ANDERSON, D. L. Pest and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v. 29, n. 1, p. 53-59, 1990.

ANDERSON, M. A.; MIGNOT, E. C. The number of larval instars of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), with characters for the identification of instars. **Journal of Georgia Entomological Society**, Georgia, v. 5, n. 2, p. 65-68, Apr./June 1970.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produto fitossanitário para uso agrícola**. São Paulo: Organização Andrei, 1999. 672 p.

ARANTES, O. M. N. **Caracterização molecular do gene da delta-endotoxina, sua clonagem e transformação em *Bacillus thuringiensis* Berliner**. 1989. 124 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

BAILEY, L. **Honey bee pathology**, New York: Academic Press, 1981. 124 p.

BECKER, N.; MARGALIT, J. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against Mosquitoes and Blackflies In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, na environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: Wiley, 1993. 311 p.

BIRI, M. **Le grand livre des abeilles**. Paris: Editions De Vecchis, 1997. 260 p.

BOLLHALDER, F. *Trichogramma* for wax moth control. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 139, n. 9, p. 711-712, Sept. 1999.

BRIGHENTI, D. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; GUIMARÃES, C. R.; CARVALHO, S. M. Longevidade de adultos *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) pulverizados com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915). In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 11., 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2002. CD-ROM.

BURGES, H. D. Control of wax moths: physical, chemical and biological methods. **Bee World**, Cardiff, v. 59, n. 4, p. 129-138, 1978.

BURGES, H. D.; BAILEY, L. Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 11, n. 2, p. 184-195, 1968.

CARVALHO, E. M.; CARVALHO, S. M.; CARVALHO, C. F.; CARVALHO, G. A.; SOUZA, B. Impacto de inseticidas fornecidos a adultos de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) por meio de pasta Cândi contaminada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBA, 2002. p. 114.

CHARRIÈRE, J. D.; IMDORF, A. Protecion of honey combs from wax moth damage. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 139, n. 8, p. 627-630, Aug. 1999.

COLOSIMO, E. A. **Análise de sobrevivência aplicada**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2001. 145 p.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 154 p.

CRANE, E. **Bees and beekeeping: science, practice and world resources**. Heinemann Newnes, 1990. 614 p.

CUSTÓDIO, A. R.; NEGRI, G.; FERREIRA, M. M. C. Análise multivariada da composição química das ceras da própolis e ceras do favo da colméia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12., 1998, Salvador. **Anais...** Salvador: CBA/FAABA, 1998. 207 p.

DADANT, C. C.; HIJOS. **La colmena y la abeja melifera**. Uruguai: Editorial Hemisferio Sur, 1975. 936 p.

DAMASCENO, A. G. Abelhas (Hymenoptera: Apoidea) visitantes das inflorescências da sucupira-branca, *Pterodon emarginatus* Vogel (Leguminosae: Papilionoideae) e do Baru, *Dipteryx alata* Vogel (Leguminosae: Papilionoideae) em área de cerrado em Brasilândia de Minas – MG, 1998. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DIAS, L. F. Controle biológico da traça da cera. **Informativo Zum Zum**, Florianópolis, v. 35, n. 301, p. 7, mar./abr. 2001.

GOODMAN, R. D.; WILLIAMS, P.; OLDROYD, B. P.; HOFFMAN, J. Studies on the use of phosphine gas for the control of greater wax moth (*Galleria mellonella*) in stored honey bee comb. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 130, n. 7, p. 473-477, July 1990.

GRAMACHO, K. P. Fatores que interferem no comportamento higiênico das abelhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: CBA, 2002. p. 170.

GUERRA, M. S. **Bionomia das traças de cera *Galleria mellonella* L. e *Achroia grisella* F. (Lepidoptera, Galleridae) no Município de Piracicaba.** 1973. 133 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. S. Bacterial insecticides. **Bacteriological Reviews**. Baltimore, v. 29, n. 3, p. 266-288, Sept. 1960.

HOOPER, T. **Guia do apicultor**. Publicações Europa-America, 1976. 269 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A traça pequena da cera: *Achroia grisella*, (Lepidoptera: Pyralidae) encontrada em colônias de abelhas sem ferrão. Noções gerais. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 60, p. 16-18, mar. 2001.

JYOTI, J. L.; BREWER, G. J. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) as vectors of *Bacillus thuringiensis* for control of banded sunflower moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 28, n. 6, p. 1172-1176, Dec. 1999.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, n. 6, p. 969-976, June 1970.

KELLER, B.; LANGENBRUCH, G. A. Control of Coleopteran Pests by *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: Wiley, 1993. 311 p.

KISS, J. Mel para viagem. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 206, p. 30-37, dez. 2002.

KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificities. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 924, n. 3, p. 509-518, June 1987.

MANGUM, W. A. Honey bee biology. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 140, n. 6, p. 431-433, June 2000.

MARQUES, I. M. R. **Ação de *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* sobre *Scrobipalpuloides absoluta* Meyer. (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua interação com parasitóide *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae)**. 1993. 75 p. Dissertação (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

MARQUES, I. M. R.; ALVES, S. B. Efeito de *Bacillus thuringiensis* Berl. var. *kurstaki* sobre *Scrobipalpuloides absoluta* Meyer. (Lepidoptera: Gelechiidae) **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 147-153, abr. 1996.

MENDONÇA, P. C. **Caracterização e sequenciamento dos plasmídeos pMC1 e pMC2 de *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* isolado T01 328**. 2002. 53p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

MESSAGE, D.; JONG, D. Dispersão internacional da bactéria *Paenibacillus larvae*, causadora da doença de abelhas cria pútrida americana através da comercialização de mel. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 50, p. 8-12, mar. 1999.

MICKILLUP, S. C.; BROWN, D. G. Evaluation of a formulation of *Bacillus thuringiensis* against waxmoths in stored honeycombs. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 31, n. 5, p. 709-711, 1991.

MORSE, R. A. **Honey bee pests, predators, and diseases**. Cornell University Press, 1978. 430 p.

NAVON, A. Control of Lepidopteran Pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis*, na environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: Wiley, 1993. 311 p.

OERTEL, E. Losses caused by the greater wax moth. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 190, n. 4, p. 145, Apr. 1968.

OIRSA, B. **Manejo y control de la abeja africanizada Programa Regional para el Manejo y Control de la Abeja Africanizada**. El Salvador, 1988. 229 p.

PAIXÃO, V. C. **Apicultura**. Lisboa: Livraria Popular Francisco Franco, 1983. 304 p.

PATETTA, A.; MANINO, A. Wax moths. **Apicoltore Moderno**, Torino, v. 80, n. 6, p. 265-274, 1989.

PEREIRA, R. M.; ALVES, S. B.; REIS, P. R. Segurança no emprego de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

PERSANO, A. L. **Apicultura practica**. Bueno Aires: Editorial Hemisferio Sur, 1980. 297 p.

ROA, F. G.; JÍMENES, V. J. Manejo y produccion de *Trichogramma* spp. In Colombia. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Água de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: EMBRAPA/CNPDA, 1992. 138 p.

RODRIGUEZ, C.; TRUJILLO, H. Control of the greater wax moth *Galleria mellonella* by strains of *Bacillus thuringiensis* in municipality of Tecoman, Colima, Mexico. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, Colima, v. 33, n. 2/3, p. 203-207, 1991.

SCHENK, E. **O apicultor brasileiro: guia completo de apicultura no Brasil**. 7. ed. 1938. 320 p.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SINGH, S. **Beekeeping in India**. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research, 1962. 214 p.

SZABO, T. I.; HEIKEL, D. T. Fumigation with SO₂ to control dried fruit moth in honeybee combs. **Bee World**, Cardiff, v. 68, n. 01, p 37-38, 1987.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 145-153, mar. 2000.

VANDENBERG, J. D. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 3, p. 755-759, July 1990.

VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Application methods for *Bacillus thuringiensis* used to control larvae of the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) on stored beeswax combs. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 3, p. 766-771, July 1990a.

VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Viability of *Bacillus thuringiensis* and its efficacy for larvae of the greater wax moth (Lepidoptera:Pyralidae) following storage of treated combs. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 3, p. 760-765, July 1990b.

VANKOVÁ, J.; HORSKÁ, K.; SEBESTA, K. The fate of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 23, n. 2, p. 209-212, 1974.

VERMA, S. K. Studies on the control of greater wax moth, *Galleria mellonella* L. in *Apis cerana* F. colonies with the biological insecticide, Dipel. **Indian Bee Journal**, Nainital, v. 57, n. 3, p. 121-123, 1995.

VIDAURRE, T. J. C. Estudos de otimização da produção de bioinseticida bacteriano a partir do isolamento de nova linhagem de *Bacillus thuringiensis*. 1996. 136 p. Tese (Doutorado Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

WALLNER, K. The actual beeswax quality in foundations from the market. *Apidologie*, Stuttgart, v. 28, n. 3/4, p. 168-171, 1997.

WALLNER, K. The residues of p-dichlorobenzene in wax and honey. *American Bee Journal*, Hamilton, v. 132, n. 8, p. 538-541, Aug. 1992.

WIESE, H. *Apicultura - novos tempos*. Guaíba: Agropecuária, 2000. 424 p.

ZANUNCIO, J. C. Efeito do controle químico e microbiológico sobre três pragas de eucalipto e outros insetos. 1976. 76 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

ANEXOS

	Página
TABELA A	
Número de adultos de <i>Apis mellifera</i> mortos em função do intervalo de tempo em horas, pulverizados com Dipel® 32 PM em diferentes concentrações. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras-MG, 2003.....	65
TABELA B	
Número de adultos de <i>Apis mellifera</i> mortos em função do intervalo de tempo em horas, alimentados com pasta Cândi com adição de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras - MG, 2003.....	66
TABELA C	
Número de adultos de <i>Apis mellifera</i> mortos em função do intervalo de tempo em horas, alimentados com solução aquosa de mel a 50% com adição de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras - MG, 2003.....	67

TABELA A. Número de adultos de *Apis mellifera* mortos em função do intervalo de tempo em horas, pulverizados com Dipel® 32 PM em diferentes concentrações. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, UFLA, Lavras - MG, 2003.

Intervalo de tempo (h)	Concentração (g/ 100 ml de água)							
	0,0	0,25	0,50	1,00	2,50	5,00	10,0	20,0
(1,3]	1	1	0	0	0	2	7	0
(3,6]	0	0	1	1	0	3	0	0
(6,12]	2	0	2	0	2	4	0	0
(12,18]	2	3	5	5	6	16	10	0
(18,24]	1	0	2	3	1	0	1	0
(24,30]	9	7	3	0	0	1	2	4
(30,36]	3	0	2	2	5	3	3	0
(36,42]	2	1	1	2	6	0	3	0
(42,48]	0	2	0	4	7	5	0	0
(48,54]	11	17	12	12	4	7	3	12
(54,60]	6	6	4	8	4	4	5	5
(60,66]	5	4	3	2	7	3	1	0
(66,72]	4	0	4	1	1	2	2	2
(72,78]	8	15	21	8	1	3	14	12
(78,84]	5	9	5	4	4	8	4	2
(84,90]	5	4	2	3	0	3	0	1
(90,96]	13	2	5	2	5	3	1	1
(96, ∞)	23	29	28	43	47	33	44	61

TABELA B. Número de adultos de *Apis mellifera* mortos em função do intervalo de tempo em horas, alimentados com pasta Cândi com adição de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras - MG, 2003.

Intervalo de tempo (h)	Concentração (g/60 g de pasta Cândi)							
	0,0	0,25	0,50	1,00	2,50	5,00	10,0	20,0
(1,3]	1	2	1	0	0	1	1	0
(3,6]	0	0	0	0	0	1	0	0
(6,12]	0	0	0	0	0	1	2	1
(12,18]	0	0	2	4	3	6	0	3
(18,24]	0	3	0	1	2	2	4	6
(24,30]	1	1	2	1	5	6	19	22
(30,36]	2	1	2	2	2	7	10	17
(36,42]	1	2	3	4	4	15	18	21
(42,48]	6	3	3	3	8	22	22	26
(48,54]	1	7	7	3	17	12	7	1
(54,60]	0	7	4	5	14	18	9	2
(60,66]	6	4	13	4	21	3	7	1
(66,72]	0	17	8	7	4	3	1	0
(72,78]	12	9	14	15	9	1	0	0
(78,84]	7	9	3	17	3	0	0	0
(84,90]	1	2	11	10	5	0	0	0
(90,96]	3	6	2	5	0	0	0	0
(96,∞)	59	27	25	19	3	2	0	0

TABELA C. Número de adultos de *Apis mellifera* mortos em função do intervalo de tempo em horas, alimentados com solução aquosa de mel a 50% com adição de diferentes concentrações de Dipel® 32 PM. Temperatura 28 ± 2 °C, UR $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. UFLA, Lavras -MG, 2003.

Intervalo de tempo (h)	Concentração (g/100 ml de solução aquosa de mel a 50%)							
	0,0	0,25	0,50	1,00	2,50	5,00	10,0	20,0
(1,3]	0	0	0	0	0	0	1	0
(3,6]	1	0	0	0	0	1	0	0
(6,12]	0	1	0	2	0	3	1	3
(12,18]	5	5	1	1	1	1	3	5
(18,24]	4	4	4	4	3	5	2	2
(24,30]	6	14	11	19	11	12	13	9
(30,36]	2	2	0	2	1	4	1	1
(36,42]	2	1	5	4	5	2	4	1
(42,48]	3	2	5	6	4	19	16	8
(48,54]	2	6	3	6	7	9	16	0
(54,60]	2	0	1	3	2	9	10	3
(60,66]	3	1	3	4	9	13	11	1
(66,72]	2	5	6	4	5	6	6	1
(72,78]	2	4	2	4	8	2	8	1
(78,84]	3	6	2	9	5	5	3	3
(84,90]	2	5	10	15	16	4	3	3
(90,96]	5	6	9	2	9	2	1	2
(96,∞)	56	38	38	15	14	3	1	57