

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Potencialidade de alguns fatores bióticos e abióticos na
regulação populacional de Spodoptera frugiperda (Abbot &
Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae).

MARIA ALICE GARCIA

Departamento de Zoologia

Orientador :

Prof. Assist. Doutor

Mohamed E. M. Habib

CAMPINAS

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho se deve à contribuição desinteressada de muitas pessoas. A ausência de citação nominal é falta imperdoável mas não significa, de forma alguma, esquecimento da colaboração prestada. A todos, os nossos mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Mohamed E.M. Habib sob cuja orientação foi realizada essa tese.

Ao Prof. Dr. Paulo F. Bührnheim, chefe do Departamento de Zoologia, UNICAMP, pela compreensão e apoio durante a realização desse trabalho.

Aos Professores Margarette Simões e Carlos F. Andrade pela assistência e apoio.

Aos Professores Drs. James A. Lauritis e Antonio F. Pestana pela assistência prestada.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Zoologia, UNICAMP, pela dedicação.

À minha família pela compreensão, estímulo e apoio durante este trabalho.

Índice

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO HISTÓRICA	3
2.1. <u>Spodoptera frugiperda</u>	3
2.2. Fatores abióticos de controle de <u>S. frugiperda</u>	5
2.3. Fatores bióticos de controle de <u>S. frugiperda</u>	8
2.3.1. Resistência de plantas a insetos	8
2.3.2. Inimigos naturais	8
2.3.3. Agentes patogênicos	11
2.3.3.1. Fungos	11
2.3.3.2. Bactérias	12
2.3.3.3. Virus	16
2.4. Controle integrado	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. <u>Spodoptera frugiperda</u>	21
3.2. Produtos utilizados	21
3.3. Testes de compatibilidade, Susceptibilidade e sinergismo	22
3.4. Fatores inibidores de <u>B. thuringiensis</u>	24
3.5. Doenças	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Estudos de compatibilidade	26
4.2. Susceptibilidade a <u>B. thuringiensis</u> e sensibilidade a inseticidas em larvas de <u>S. frugiperda</u>	32
4.2.1. Respostas de larvas de <u>S. frugiperda</u> a <u>B. thuringiensis</u>	32
4.2.2. Possíveis causas de inibição de <u>B. thuringi-</u> <u>giensis</u> em larvas de <u>S. frugiperda</u>	37
4.2.3. Respostas de larvas de <u>S. frugiperda</u> aos inseticidas químicos e <u>B. thuringiensis</u>	42
4.3. Ocorrência natural de doenças em populações de <u>S. frugiperda</u>	56
4.3.1. Virose causada por VPN	56
4.3.1.1. Sintomatologia externa	57
4.3.1.2. Identificação do vírus	57

4.3.1.3. Susceptibilidade	58
4.3.1.4. Histopatologia	65
4.3.1.5. Perspectivas de controle de <u>S.</u> <u>frugiperda</u> usando-se VPN.....	72
4.3.2. Micose causada por <u>Aspergillus parasiticus</u>	74
4.3.3. Bacteriose causada por <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>	76
5. CONCLUSÕES	79
6. RESUMO	81
7. SUMMARY	82
8. BIBLIOGRAFIA	83

POTENCIALIDADE DE ALGUNS FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA REGULAÇÃO POPULACIONAL DE Spodoptera frugiperda (ABBOT & SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE).

1 - Introdução

Spodoptera frugiperda (Abbot & Smith, 1797) é uma das espécies mais frequentes em campos cultivados da região Neotrópica. Embora seja uma espécie polífaga, manifesta nítida preferência por gramíneas, principalmente milho e é considerada praga de importância econômica significativa para as espécies hospedeiras preferidas.

A população de qualquer organismo sofre o efeito de fatores de mortalidade dependentes e independentes de densidade. No caso de populações de insetos praga, o homem tem direcionado o seu interesse para estudo dos fatores de mortalidade independentes de densidade, ou seja, abióticos, principalmente inseticidas químicos, que têm efeito imediato na redução da densidade populacional.

Nos últimos anos, diante dos efeitos colaterais desvantajosos provocados pelo uso intensivo de defensivos químicos, os fatores de mortalidade dependentes de densidade começaram a receber maior atenção nos estudos de métodos de controle de insetos praga.

Nas regiões tropicais, a riqueza em diversidade de espécies estimula a investigação dos complexos e interações populacionais, a fim de se detectar uma combinação natural efetiva que, apoiada pelo homem, seja capaz de reduzir densidades de populações de insetos consideradas daninhas às populações humanas.

O papel de fatores bióticos de regulação em populações de S. frugiperda tem sido pouco estudado, principalmente no campo de controle microbiano e integrado. Alguns pesquisadores chegaram a conclusões controvertidas a respeito do efeito regulador de Bacillus thuringiensis Berliner, 1915 em populações deste noctuídeo. Há os que consideram este

agente patogênico como efetivo (Creighton et al., 1972) e os que consideram S. frugiperda como espécie não suscetível a B. thuringiensis (Figueiredo ^{et al.} 1960, Janes & Greene, 1969). O vírus da poliedrose nuclear de S. frugiperda desempenha papel importante na regulação de populações deste lepidóptero (Allen, 1921, Young & Hamm, 1966, Hamm, 1968 e 1977), porém, este fator de mortalidade nem mesmo foi assinalado no Brasil.

No presente trabalho procurou-se determinar a suscetibilidade de S. frugiperda a B. thuringiensis, Parathion e Piretrina e avaliar a potencialidade do agente patogênico em combinação com os dois inseticidas químicos citados. Procurou-se também detectar a ocorrência e avaliar a potencialidade de outros fatores bióticos de controle natural deste noctuídeo, como vírus da poliedrose nuclear, fungos e bactérias.

2 - Revisão Histórica

2.1 - S. frugiperda

Spodoptera frugiperda é uma espécie de origem tropical (Goldey, 1921; Luginbill, 1928; Fonseca, 1937; Leiderman & Sauer, 1953 a) e a sua importância como depredadora de gramíneas já era reconhecida pelos seus autores, Abbot & Smith, em 1797, quando a descreveram (Luginbill, 1928). Por ser uma espécie de grande importância nas Américas do Sul e Central e sul da América do Norte, recebeu a atenção de muitos pesquisadores. Luginbill (1928) publicou uma monografia sobre a espécie, reunindo dados sobre a distribuição, ocorrência e surtos de S. frugiperda nos E.U.A. e estudou detalhadamente a bionomia desde noctuídeo, mencionando, inclusive, alguns aspectos de patologia neste inseto.

Fonseca (1937) mencionou a ocorrência de S. frugiperda em algodoais do Estado de São Paulo, principalmente nos meses de dezembro a abril; Mendes (1938) listou S. frugiperda entre os insetos encontrados sobre plantas de milho no Estado de São Paulo nos anos de 1936 e 1937.

Bertels & Rocha (1950) e Bertels (1956) associaram a maior densidade populacional de S. frugiperda com a incidência de anos de seca no Rio Grande do Sul. Almeida et al. (1964) citaram o longo período de estiagem que ocorreu em 1964 como provável fator determinante de um dos maiores surtos de S. frugiperda no Estado de São Paulo.

Leiderman & Sauer (1953 a) assinalaram a presença de S. frugiperda nos Estados de Pernambuco, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Goiás, S. Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e, baseados em observações na região de Campinas, S.P., levantaram a hipótese de que no Estado de S. Paulo devem ocorrer quatro a cinco gerações anuais, o que é confirmado por Mariconi (1963). Os mesmos autores (1953 b)

observaram a intensidade crescente de ataque de gramíneas por este noctuídeo verificada a cada ano.

Etcheverry (1957) relatou a incidência de S. frugiperda no Chile e descreveu os adultos e estágios imaturos da espécie, juntamente com levantamento de sessenta espécies de plantas como hospedeiras deste inseto.

Falanche & Dias Neto (1961) citaram a invasão de monoculturas de trigo na região sul do Estado de S. Paulo como uma das causas do aumento populacional de S. frugiperda nesta área.

Amante (1962) mencionou uma erupção populacional de lagartas de várias espécies no ano de 1961 que dizimaram plantações de trigo, arroz, milho, além de várias leguminosas no Estado de S. Paulo. Entre estas lagartas, S. frugiperda foi considerada pelo autor como uma das principais responsáveis pelo surto.

Pereira (1971) citou a ocorrência deste noctuídeo em campos de algodão no Estado do Paraná, cujas larvas foram encontradas alimentando-se de botões florais, flores e maçãs de algodoeiro.

Hichings & Rabinovich (1974) analisaram as variações populacionais de cinco espécies de noctuídeos, entre os quais, S. frugiperda, em seis fazenda de alfafa no Vale de Lluta (Chile). S. frugiperda ocorreu nos seis alfafais estudados e foi dominante em um deles durante os meses de verão e outono .

Rose et al. (1975) estudaram a migração de S. frugiperda e concluíram que, desde que levada pelo vento, esta espécie é capaz de deslocar-se por longas distâncias.

2.2 - Fatores abióticos de controle de S. frugiperda ⁻⁵⁻

Embora os fatores físicos ligados ao clima, como temperatura, umidade e pluviosidade exerçam papel fundamental na dinâmica populacional de um inseto na natureza (Burgess & Hussey, 1971), em agroecossistemas estes fatores físicos naturais passam a exercer papel de importância secundária, quando comparados com agentes químicos de controle de populações de insetos praga. Atualmente, este último é o método clássico de controle de S. frugiperda.

Dew (1913) sugeriu o uso de arsênico além de alguns métodos mecânicos para controle deste noctuídeo. Entre os métodos mecânicos de controle o autor citou a aração do solo na época da empupação e a construção de valas para barrar a migração das larvas e facilitar o extermínio das mesmas. O autor sugeriu, ainda, o uso de armadilhas luminosas que podem reduzir consideravelmente a população de adultos e mencionou o papel controlador do inverno e da antecipação das chuvas nas regiões tropicais e subtropicais.

O inseticida parathion, de acordo com Ditman (1950), foi mais eficiente do que DDT no controle de S. frugiperda em campos de milho em Maryland (EUA).

Almeida et al. (1964) mencionaram que, quando não há surtos de S. frugiperda, as primeiras chuvas são suficientes para reduzir a população deste noctuídeo a nível economicamente suportável e o agricultor normalmente espera que isto aconteça, porém, em anos secos, quando o controle natural é ineficiente, o controle químico aplicado tardiamente também torna-se ineficaz, resultando em grandes perdas.

Davidson (1966) propôs para o controle de populações de S. frugiperda, resistentes a inseticidas clorados e fosforados, no Estado de Pernambuco, Brasil, as seguintes técnicas, como medidas básicas:

- Interrupção do plantio de milho durante os meses de maio a outubro, deixando a terra nua ou com plantas que não sirvam de alimento para esta praga.
- Uso de inseticidas do tipo carbamato, com aplicação de técnicas que possibilitem a penetração do mesmo no cartucho de milho, onde se abriga a larva de S. frugiperda.

Newson ~~& Smith~~ (1946) mencionaram que S. frugiperda é controlada eficientemente nas regiões da América do Sul, Central e no México através do uso de inseticidas, granulados comuns, aplicados no cartucho da planta de milho, afirmando que esta técnica faz com que os inseticidas tenham efeito mínimo sobre os inimigos naturais da praga.

Cantu & Wolfenbarger (1970), em estudos sobre a possibilidade de utilização de piretróides contra pragas de algodão que mostraram resistência a inseticidas orgânicos sintéticos, na região de "Lower K.G. Valley", verificaram que SBP-1382 e SBP-1390 foram efetivos contra S. frugiperda.

Os mesmos autores, em 1972, analisaram o efeito de sessenta e sete piretróides contra S. frugiperda, Heliothis virescens e S. eridania e concluíram que o grupo dos ester benzílico monosubstituídos foram os mais efetivos contra larvas de S. frugiperda.

Brattsten & Wilkinson (1977) associaram o efeito altamente sinérgico do butóxido de piperonila, quando adicionado a piretrinas e aplicado em insetos, com o efeito inibidor que este sinergista possui sobre o sistema enzimático dos oxidases de função mista. Estas enzimas estão associados a mecanismos de detoxicação e são mais ativas em insetos polípagos, como S. frugiperda.

Além dos inseticidas químicos, outros fatores abióticos de natureza química têm sido utilizados contra S. frugiperda. Young & Cox (1965) testaram dois esterelizantes químicos ("Chemosterilants"), Apholate e Tapa em pupas e adultos de S. frugiperda e concluíram que ambos os produtos não são efetivos quando aplicados em pupas e que, em adultos alimentados com dieta tratada com Tapa a esterilização foi 96 vezes mais efetiva para machos e 64 vezes mais efetiva para fêmeas quando comparada com a esterilização provocada por Apholate. Young et al. (1967) observaram que o poder residual de Tapa é muito baixo, em 24 horas 90% do esterelizante químico ingerido por uma mariposa adulta de S. frugiperda desaparece totalmente.

Sekul & Sparks (1967) isolaram, identificaram e sintetizaram o feromônio sexual de S. frugiperda, visando a sua possível utilização em métodos modernos de controle deste noctuídeo.

Young et al. (1968) utilizaram armadilhas com fêmeas de S. frugiperda vivas, como técnica para cálculo de densidade populacional baseado no número de machos atraídos para as armadilhas em diferentes épocas do ano.

Entre os fatores físicos testados como controladores de S. frugiperda, a utilização de luz negra em armadilhas luminosas demonstrou ser ineficiente como técnica de controle (Stewart, 1970).

Snow et al. (1972) demonstraram que doses de radiação gama com cobalto 60 para esterelização de adultos não altera a sobrevivência de S. frugiperda e nem a habilidade da fêmea atrair machos ou ambos copularem, porém reduz significativamente a taxa de oviposição da fêmea estéril e a qualidade de esperma do macho estéril. Esses efeitos adversos reduzem a competitividade dos adultos irradiados.

2.3 - Fatores Bióticos de Controle de S. frugiperda

2.3.1 - Resistência de plantas a insetos.

Baseado no fato de existirem linhagens de milho resistentes ao ataque de alguns insetos mastigadores e sugadores, Horovitz (1960) propôs a seleção de uma variedade de milho que fosse resistente a S. frugiperda que, na Venezuela é a espécie que maior dano causa aos milharais. O autor sugere que se tente, através de cruzamentos, obter genótipos que apresentem os dois tipos de resistência mencionados acima em uma única planta.

McMillian & Starks (1966) forneceram um novo critério para o cruzamento de plantas, a fim de se obter linhagens que não apresentem o fator estimulante de alimentação para larvas depredadoras de milho. Os autores determinaram a ocorrência e concentração de substâncias estimulantes de alimentação em plantas com níveis diferentes de preferência para vários insetos e sugeriram a utilização destes dados em programas de seleção de variedades resistentes a insetos.

Wiseman et al. (1967) compararam a preferência de S. frugiperda por milho e por Tripsacum dactyloides L. e sugeriram a utilização de ancestrais silvestres como fonte de resistência ao ataque deste inseto. Painter (1968) sugere a hibridação com Tripsacum para obtenção de milho resistente através de teosinte.

2.3.2 - Inimigos Naturais

Dew (1913) citou trinta espécies de inimigos naturais de S. frugiperda, sendo vinte e uma predadoras e nove parasitas. Dos predadores, nove eram coleópteros, quatro hemípteros e seis himenópteros, sendo os dois besouros mais efetivos Tetracha carolina e

Calosoma calidum. Os dois hemípteros mais comuns eram reduvídeos. As vespas solitárias foram indicadas pelo autor como muito eficientes na predação, sendo Polistes canadensis e Pelopeus cementarius as espécies mais frequentes. Entre os nove parasitos, quatro eram dípteros, sendo os mais comuns Nemorea leucaniae (Tachinidae) e Sarcophaga georgiana (Sarcophagidae). Dos himenópteros, o mais comum foi o Ichneumonidae Eniscopilus purgatus.

Allen (1921) mencionou a ocorrência, em abundância, de um parasito de família Bombylidae, Antrax lucifer em S. frugiperda na região do Mississipi (EUA).

Luginbill (1928) analisou o papel dos inimigos naturais de S. frugiperda, principalmente no sul dos Estados Unidos e assinalou como mais importantes as seguintes espécies: Ophion bilineatus (Hym., Ichneumonidae), Chelonus texanus (Hym., Braconidae), Meteorus laphygmae (Hym., Braconidae), Winthemia gradupustulata (Diptera, Tachinidae), Calosoma calidum (Coléop., Carabidae) e Apateticus maculiventris (Hem., Pentatomidae).

Fonseca (1937) atribuiu a pássaros, como caracará (Bliborus plancus), Anu branco (Guira guira), anu prêto (Crotophaga ani) e carancho (Mivalgo chimachima), papel relevante no controle de S. frugiperda na região de S. Paulo.

Leiderman & Sauer (1953) citaram como inimigos naturais deste noctuídeo no Brasil as seguintes espécies: Pseudoichytas brasiliensis (Diptera, Tachinidae), no Rio Grande do Sul, Pseudokea sp (Hym., Ichneumonidae), Acroglossa sp (Diptera, Tachinidae), Polybia atra e Polybia occidentalis scutularis (Hym., Vespidae) no Estado de S. Paulo. Além de insetos parasitas e predadores, os autores mencionaram entre os importantes inimigos naturais de S. frugiperda em S. Paulo os pássaros: Anus branco e prêto e Caracará.

Lima (1950) citou vários himenópteros parasitos desta praga no Brasil, entre os quais encontramos: Amblyteles sp e Ophion flavidus (Ichneumonidae), Iphiaulax tucumanus, Chelonus texanus e Chelonus sp (Brachonidae), Trichogramma kaeheri (Trichogrammatidae), Euplectrus platyhypenae (Eulophidae) e Brachimeria ovata (Chalcididae). Entre os dípteros mencionados pelo autor, os que ocorrem no Brasil são: Archytas incasanus, Archytas incertus, Lespesia sp, Prophrino sp e Pseudokea sp (Tachinidae).

Entre os predadores citados por Lima (1950) encontramos, além dos himenópteros Vespidae mencionados por Leiderman & Sauer (1953), o dermáptero Labidura riparia (Labiduridae).

Na região de Campinas, S. Paulo, entre os inimigos naturais de S. frugiperda mais frequentes em 1976 a 1978 encontram-se Campoletis grioti (Hym., Ichneumonidae), Chelonus texanus (Hym., Braconidae), Patelloa, Archytas incertus (Diptera, Tachinidae), (Patel & Garcia, com. pessoal).

2.3.3 - Agentes patogênicos

2.3.3.1 - Fungos

Várias espécies de fungos ocorrem em populações de insetos, porém, poucas, com ampla distribuição natural, são importantes como fatores bióticos de controle populacional em insetos. As espécies mais comuns pertencem aos gêneros Beauveria, Metarrhizium, Nomurae, Aspergillus, Cephalosporium, Hirsutella, Entomophthora e outros (Madelin, 1960; Steinhaus, 1963; Burges & Hussey, 1971).

Steinhaus & Marsh (1962) citaram a ocorrência do fungo Nomurae rilley em larvas de S. frugiperda na Colômbia e Thomas & Poinar (1973) listaram Metarrhizium anisophiae entre os patógenos de larvas de S. frugiperda neste mesmo país.

Box & Videla (1955), em experiência de laboratório, evidenciaram que o fungo Beauveria bassiana isolado de Diatraea sacharalis não infecta larvas de S. frugiperda quando aplicado por contacto.

Garcia & Habib (1978) detectaram a ocorrência do fungo de Aspergillus parasiticus em adultos de S. frugiperda em laboratório e analisaram o papel deste agente patogênico em populações de laboratório e na dinâmica de populações naturais, quando pode atuar em conjunto com outros fatores de controle.

Alguns himenópteros parasitos deste noctuídeo foram estudados como possíveis inoculadores de A. parasiticus em larvas de S. frugiperda no campo por Habib & Patel (1976) .

2.3.3.2 - Bactérias

Muitas bacterioses de insetos são caracterizadas por induzirem paralisia no organismo infectado (Steinhaus, 1963). Estudos desenvolvidos por Angus (1956) com Bacillus thuringiensis ishiwata revelaram que a paralisia típica observada não é causada pelo crescimento bacteriano nos tecidos do hospedeiro, mas sim por um princípio tóxico solúvel no suco gástrico e em álcalis e que está associado com inclusões cristalinas da bactéria. Esses resultados reforçam a idéia de Hanay (1953) sobre o papel das inclusões cristalinas encontradas em algumas bactérias patogênicas no desenvolvimento das doenças causadas por estes microorganismos.

Sutter et al. (1967), em estudos de histopatologia de larvas de Ostrinia nubilalis tratadas com Bacillus thuringiensis, constataram que o cristal tóxico da bactéria, quando ingerido, provoca desprendimento das células epiteliais que caem então no lúmen intestinal, expondo áreas da membrana basal ao ataque de células bacterianas, resultando em extravasamento do líquido intestinal para a hemolinfa e causando a morte da larva.

(apud Burges & Hussey, 1971)
Cooksey (1968) observou que os cristais proteicos de Bacillus thuringiensis são tóxicos para larvas suscetíveis apenas por ingestão, sendo neutros quando injetados na hemolinfa. Quando estes cristais são dissolvidos em suco gástrico de larvas, in vitro, e aplicados na hemolinfa, são altamente tóxicos. Baseado nestes resultados o autor concluiu que o cristal é uma protoxina que se converte em toxina quando digerida por enzimas do suco gástrico das larvas suscetíveis infectadas.

Faust et al. (1971) demonstraram que a dissolução inicial do cristal depende da ação de componentes alcalinos não enzimáticos

que possibilitem o posterior ataque por enzimas proteolíticos que liberam as unidades tóxicas.

Moore & Navon (1973) estudaram a suscetibilidade de larvas de S. litoralis a várias linhagens de B. thuringiensis e explicam que a não suscetibilidade da espécie a todas essas linhagens de bactéria pode ser devido à ausência de "enzimas de ativação" (proteolisinas) no intestino deste noctuídeo.

Narayanan et al. (1976a) reforçaram o papel do pH intestinal e da hemolinfa dos insetos na dissolução da gama endotoxina de B. thuringiensis e associaram estes aspectos com a patogenicidade de B. thuringiensis e Pseudomonas aeruginosa para várias espécies de lepidópteros.

Govindarajan et al. (1975) e Narayanan et al. (1976) atribuíram ao pH fracamente alcalino do intestino médio de S. litura o papel de fator responsável pela não suscetibilidade da espécie a B. thuringiensis.

Estudos in vitro, realizados por Faust (1968), sobre o efeito do cristal tóxico, sugerem que a gama endotoxina em contacto com as células epiteliais do intestino médio do inseto interage antagonisticamente com enzimas da membrana celular e penetra na célula, onde reagirá com outras enzimas essenciais, provocando inibição das mesmas e resultando em morte e desintegração celular e posterior morte do inseto por extravasamento do líquido intestinal alcalino para a hemolinfa, alterando o seu pH. Recentemente, Murphy (1976) demonstrou o efeito da proteína cristal de B. thuringiensis em células do intestino médio de Choristoneura fumiferana e observou que em sessenta minutos ocorre desintegração e descolamento celular.

Um outro fator que possivelmente está associado com o grau de suscetibilidade de insetos a bactérias cristalíferas é citado por Narayanan et al. (1976b); os autores atribuem ao ácido ascórbico papel primordial na quebra da ligação S-S do cristal proteico de

B. thuringiensis, possibilitando a sua solubilidade sob ação de proteases e liberação das frações tóxicas.

De acordo com Pristavko & Dovzhenot (1974) a carência de ácido ascórbico por deficiência alimentar está diretamente relacionada com elevados graus de suscetibilidade de larvas de insetos a infecções bacterianas. Estudos da hemolinfa revelaram que a redução de ácido ascórbico na dieta provoca uma redução do número de fagócitos e pode explicar o aumento da suscetibilidade da larva à infecção.

Kushner & Harvey (1962) demonstraram a existência de substâncias bactericidas em plantas hospedeiras de insetos e nos insetos que delas se alimentam, os autores basearam as suas conclusões em testes para determinação do efeito de extratos de dez espécies de plantas hospedeiras de insetos sobre o desenvolvimento de Bacillus coreus e Bacillus thuringiensis.

Govindarajan et al. (1975) realizaram experimentos para verificar o poder fitocida de extratos de folhas de plantas hospedeiras de S. litura sobre B. thuringiensis e concluíram não ser este o fator responsável pela não suscetibilidade da espécie ao agente patogênico.

Raun et al. (1966) citaram como um dos fatores ecológicos que afetam a patogenicidade de B. thuringiensis a Ostrinia nubilalis a ocorrência de um fago. Porém, estudos de laboratório indicaram que, embora fagos possam constituir fator imunogênico para algumas espécies, para O. nubilalis apenas retarda o efeito letal da bactéria. Estudos mais detalhados indicaram que colônias de B. thuringiensis resistentes ao fago desenvolveram-se em 24 a 48 horas.

O grau de parasitismo de larvas de S. litura por microporídeo do gênero Nosema é citado por Govindarajan et al. (1976) como um outro fator ecológico associado ao grau de suscetibilidade da população a B. thuringiensis.

Raun et al. (1966) analisaram também o papel de fatores ecológicos como radiação, temperatura e estocagem a que são submetidos esporos de B. thuringiensis na sua patogenicidade a Spodoptera frugiperda e Ostrinia nubilabis e concluíram que a radiação ultravioleta sobre esporos de B. thuringiensis durante setenta e duas horas elimina a sua patogenicidade para ambas as espécies de noctuídeos; a temperatura média de 32°C acelera a mortalidade das larvas infectadas, e suspensão de esporos estocada durante um a dez meses a 4°C são mais patogênicas do que suspensão frescas do mesmo produto.

Hitchings (1967) observou que, durante um período mínimo de quatro meses, a toxina de B. thuringiensis encontrada no produto Bacthane permanece ativa no solo e atua eficientemente sobre pupas de Prodenia eridania, causando inibição da reprodução.

De acordo com dados de Ignoffo & Graham (1967), aplicações de B. thuringiensis no solo reduziram populações de Pectinophora gossypiella em 45%.

Figueiredo et al. (1960) concluíram, baseados em testes de ³³⁰ resistentes a B. thuringiensis. Jones & Greene (1969) também utilizaram B. thuringiensis laboratório, que larvas de S. frugiperda na região central e sul da Flórida (E.U.A.) e não obtiveram controle satisfatório. Os mesmos autores, em 1972, constataram a baixa eficiência de B. thuringiensis variedade alesti e vírus da poliedrose nuclear contra Heliothis zea.

Creighton et al. (1972) obtiveram controle eficiente de larvas de S. frugiperda, Pieris rapae, Trichoplusia ni e Plutella xylostella utilizando B. thuringiensis.

2.3.3.3 - Vírus

A ocorrência de um tipo especial de doença em larvas de S. frugiperda, caracterizada pela formação de corpos poliédricos, angulosos e translúcidos ao microscópio, nos núcleos de células da matriz traqueal, da epiderme, do tecido adiposo e hemócitos, foi citada pela primeira vez por Chapman & Glaser em 1915. Os autores constataram a ocorrência da doença na natureza, tanto sob a forma crônica como sob a forma aguda.

Allen (1921) observou que, durante o período quente e úmido do mês de setembro, houve uma alta incidência de poliedrose em S. frugiperda, constatando um índice de 37% de mortalidade devido a este fator em larvas coletadas no campo.

Brown & Swaine (1965) enfatizaram o papel do vírus da poliedrose nuclear de S. exempta como controlador de surtos e como fator maléfico em populações de laboratório e citaram a ocorrência de erupções totalmente controladas em algumas regiões do Kenya, onde se observou em janeiro de 1962 que 90% das larvas morreram de virose e, em fevereiro, já não havia mais larvas. Os autores analisaram os métodos de transmissão da doença e associaram a variação individual quanto ao período de incubação com a temperatura e quantidade de vírus ingerido. Quanto à especificidade concluíram, baseados em experimentos, que as viroses do gênero Spodoptera são provavelmente específicas.

Young & Hamm (1966) compararam os efeitos da aplicação do vírus da poliedrose nuclear (VPN) de S. frugiperda e V.P.N. de H. zea com os efeitos de aplicação de diferentes dosagens de DDT e concluíram que concentrações de 100 a 200 larvas equivalentes por acre fornecem controle igual ao obtido pela aplicação de 2 libras por acre de DDT, sendo, portanto, no mínimo, tão efetivo quanto o inseticida químico.

Hamm (1968) comparou os efeitos histopatológicos causados pelos vírus da poliedrose nuclear com os da granulose de S. frugiperda; concluiu que o V.P.N. apresenta maior potencialidade para utilização em programas de controle biológico, pois ataca rapidamente uma grande variedade de tecidos larvais e causa morte em pouco tempo. O autor frisa, porém, a necessidade de estudos a respeito de influência das condições ambientais sobre esses agentes patogênicos.

Kaya & Anderson (1976) assinalaram V.P.N. como um dos fatores de mortalidade mais importantes no controle de populações de Dasychira basiflava em algumas regiões de Connecticut (E.U.A.) entre 1973 e 1975.

Hamm^{Younis}(1971) propõe o tratamento de campos de milho com V.P.N. no período anterior ao florescimento, pois esse tratamento eliminaria as larvas do colmo, proviria uma fonte de vírus para controle de larvas tardias e eliminaria larvas resistentes ao DDT.

2.4 Controle Integrado

A utilização de agentes microbianos em associação com inseticidas químicos para controle de insetos foi sugerido por Steinhaus (1956), Franz (1961) e Hall (1963); este último autor enfatizou a necessidade de se verificar a compatibilidade entre os inseticidas e os agentes microbianos para o estabelecimento de melhor combinação para cada espécie de inseto a ser controlado.

Herfs (1965) afirmou que B. thuringiensis é completamente compatível com DDT e outros inseticidas e fungicidas comuns exceto malation.

Ramaraje et al. (1967) observaram que malation tem maior efeito inibidor do que DDT na taxa de crescimento e esporulação de B. bassiana e Metarrhizium.

Sutter et al. (1971) concluíram in vitro, que B. thuringiensis é capaz de metabolizar inseticidas organofosforados. Altatawy & Abaless (1972) fizeram menção ao mesmo fenômeno e verificaram que alguns inseticidas estimulam o desenvolvimento de certos microorganismos e outros servem mesmo como fonte de energia para agentes patogênicos de insetos. Segundo os autores, o crescimento vigoroso de patógenos, quando na presença de inseticidas, pode estar associado com o aumento de virulência e pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento do efeito letal de B. thuringiensis quando associado com inseticidas químicos em programas de controle integrado de pragas.

Janes (1973) afirmou, baseado em testes de suscetibilidade, que os melhores controladores de S. frugiperda e H. zea em Flórida foram Dipel (HD-1-B. thuringiensis var. alesti) adicionado a óleo de milho, Leptophos, Methomil, Monocrotophos e Acephate.

Chen et al. (1974) observaram que, às vezes, o teste de compatibilidade in vitro não coaduna com o efeito da combinação dos métodos de controle in vivo, pois, em testes de laboratório, os autores demonstraram que, embora o inseticida carbaril seja deletéreo para esporos de B. thuringiensis in vitro, portanto incompatível, quando combinado com este patógeno in vivo demonstra efeito sinérgico.

Morris & Armstrong (1975) consideraram que os resultados da combinação de B. thuringiensis com inseticidas químicos indicavam que, com refinamentos futuros, este agente patogênico, associado a doses baixas de inseticidas, poderia ser usado contra Choristoneura fumiferana, como meio alternativo de controle, com a vantagem de manter-se por longo tempo na natureza.

Govindarajan et al. (1976) demonstraram o efeito altamente sinérgico do ácido bórico, quando misturado com B. thuringiensis, na mortalidade de S. litura e atribuíram a este ácido o papel de substituto do efeito tóxico do cristal em larvas que normalmente não são suscetíveis a B. thuringiensis.

Morris (1977) verificou a compatibilidade de 27 inseticidas com B. thuringiensis e concluiu que, entre os organofosforados, Dylox é o que tem menor efeito inibitório, sendo que Dursban, Cygon e Dylox estimulam a reprodução; os carbonatos são geralmente atóxicos para a bactéria, não afetando a taxa de reprodução; as Piretrinas inibem a reprodução a concentrações superiores a 1 ppm, porém a formulação TH. 6040 - Ec., a 1-4 ppm estimula o crescimento e não tem efeito inibitório. Dos 27 inseticidas testados, os mais compatíveis com B. thuringiensis foram: Ortene e Dylox (organofosforados), Lannate e Zictran (carbomato) e Dimilin (derivado de uréia).

Proteínas do tipo quitinase, às vezes, são combinados com B. thuringiensis para elevar o efeito letal do agente patogênico.

Smirnoff (1973) obteve como resultado de testes de laboratório que a hidrólise da camada de quitina, que reveste o intestino da larva, aumenta consideravelmente a patogenicidade de B. thuringiensis para larvas de Choristoneura fumiferana.

O mesmo autor, em 1974, constatou que a adição de quitinase aos tratamentos com B. thuringiensis provocou aumento significativo de mortalidade para todos os estádios larvais de Lambdina fiscellaria fiscellaria (Lep. Geometridae) em várias condições de temperatura. Em 1977, constatou que a adição de quitinase em proporções mínimas, em tratamento de Choristoneura fumiferana com B. thuringiensis var. kurstaki, acelerou a septicemia, provocando morte de praticamente 100% da população em 9 a 27 dias.

Fast (1978) analisou o efeito da adição de quitinase a doses de B. thuringiensis em quatro combinações, com concentrações diferentes de quitinase. O autor concluiu que a adição da enzima não provoca qualquer alteração no nível da LC_{50} ou inclinação da curva de regressão da mortalidade por dose em Choristoneura fumiferana.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Spodoptera frugiperda :

Durante o período de estudo, foram utilizadas populações de S. frugiperda, criadas em laboratório, sob condições normais de temperatura e umidade relativa, a partir de espécimes coletados em milharais na região de Campinas, São Paulo.

Como substrato para oviposição usou-se plantas jovens de milho mantidas vivas em frascos com água. As plântulas, nestes pequenos vasos, eram colocadas em cristalizadores de 20 cm de diâmetro e 20 cm de altura, cobertos com gaze. Sobre a gaze colocava-se pedaços de algodão embebido em solução açucarada 20% para alimentação dos adultos.

As massas de ovos eram separadas diariamente e acondicionadas em frascos cobertos com papel alumínio perfurado e contendo folhas frescas e tenras de milho. Os frascos de criação eram limpos e a alimentação renovada diariamente. As larvas de S. frugiperda eram assim criadas até o início do 4º estágio, quando o seu comportamento canibalístico acentuava-se. Nesta fase procedia-se a individualização das larvas em frascos com 8 cm de altura e 3,5 cm de diâmetro, tampados com chumaço de algodão. Nesse frasco o inseto permanecia até metamorfosear-se em adulto, quando era transferido para cristalizador. Esse procedimento foi adotado tanto para a criação geral como para os experimentos.

3.2 - Produtos utilizados :

O produto comercial THURICIDE -HP (pó molhável) foi utilizado como fonte de Bacillus thuringiensis var. kurstaki, serotipo III-a e III-b. Este produto foi fornecido pela SANDOZ LTD Agro. Division, EUA; contendo 30×10^6 a 52×10^6 esporos viáveis por miligrama, e potência de 16.000 Unidades Internacionais por miligrama.

A viabilidade dos esporos do produto foi constatada, utilizando-se técnica de contagem de colônias em placas de Petri, adaptada de Habib e Garcia (1976).

Quanto aos inseticidas testados, tem-se uma formulação experimental de piretrina, fornecida pela FMC (FMC corporation, agricultural, chemical division, Middleport, NY 14105), sob código FMC 33.297 - 3.2 EC, com a seguinte composição:

3 fenoxibenzil (+) cis-trans-3- (2,2 diclorovinil)-2,2- dimetil ciclo-propanocarboxilato	40,67 %
Xilol	51,83 %
Ingrediente inerte	7,50 %

O inseticida à base de paration metílico (Trifosfato de dimetil paranitrofenil folidol) também foi utilizado nos testes de sensibilidade e sinergismo. Este inseticida tem 60 % de ingrediente ativo. Este produto foi fornecido, também, pela FMC

3.3 - Testes de compatibilidade, susceptibilidade e sinergismo:

Para os testes de compatibilidade foram utilizadas 4 dosagens de piretrina e 4 de paration metílico, representando doses letais e subletais para larvas de S. frugiperda; a essas dosagens foram adicionadas esporos de B. thuringiensis. Em cada placa de Petri com Agar Nutriente espalhou-se 25 µl da mistura contendo cerca de 30 a 300 esporos viáveis. Para cada tratamento fez-se 5 repetições a dois níveis de pH (6,5 e 8,6) que correspondem respectivamente aos pH da hemolinfa e do intestino médio de larvas de S. frugiperda. As placas foram mantidas em estufa a 27°C e após 18 horas procedeu-se a contagem e mensuração dos diâmetros das colônias. O grau de compatibilidade foi avaliado utilizando-se testes estatísticos de distribuição normal.

A determinação do pH da hemolinfa e do conteúdo intestinal foi feita usando-se larvas de 4º e 6º estádios de S. frugiperda. A larva anestesiada com éter era segurada manualmente pelas extremidades e, com uma tesoura de ponta fina, decepava-se uma ^{perna} do 3º par torácico. As gotas de hemolinfa eram recolhidas diretamente em papel indicador de pH (MERCK).

A determinação do pH do conteúdo intestinal foi feita expondo-se o trato digestivo através de uma insisão longitudinal

ventral no corpo da larva anestesiada, presa com alfinetes pela região cefálica e do pseudo-pódio posterior em placas de Petri com parafina. Após toda a hemolinfa ser retirada com papel de filtro, o trato digestivo era lavado com água destilada. A região do intestino médio era então retirada, seccionando-se transversalmente a sua região anterior e posterior. Esta operação era suficientemente rápida para possibilitar o recolhimento do líquido intestinal sobre o papel indicador de pH citado acima.

Para investigar o efeito de alteração do pH normal do intestino de larvas de S. frugiperda no grau de susceptibilidade a B. thuringiensis, aplicou-se dosagens do patógeno em questão em tampão borato (pH 9,5) e em suspensão em água destilada. Em cada larva aplicou-se, usando-se microseringa, 1 µl de suspensão do respectivo tratamento. Para cada tratamento usou-se 25 larvas. Os dados de mortalidade foram tomados diariamente até a fase de pupa e a avaliação dos efeitos foi baseada em comparação das doses letais.

Para os testes de susceptibilidade, sensibilidade e sinergismo foram utilizadas larvas de 4º estágio. Todos os experimentos com participação de B. thuringiensis foram feitos, usando-se a técnica de infecção via oral, oferecendo-se 25 µl de defensivo, espalhado com alça de platina sobre 10 cm² de folha de milho, para cada larva. Nos testes de sinergismo entre os dois inseticidas, paration e piretrina, além de se utilizar a técnica de infecção via oral usou-se também a infecção por contato, aplicando-se, com auxílio de microseringa, 1 µl do defensivo na região dorsal mediana da larva.

As dosagens (ppm) dos três produtos empregados nos experimentos foram calculadas em função do peso médio das larvas utilizadas.

As mortalidades foram corrigidas de acordo com a fórmula de Henderson e Tilton (1955). Os dados foram apresentados em gráficos, em escala Log-Probit. Todos os tratamentos foram realizados durante os meses de verão (1977 - 1978).

3.4 - Fatores inibidores de B. thuringiensis :

Para avaliar os possíveis efeitos de inibição de crescimento ou germinação de B. thuringiensis em larvas de S. frugiperda, utilizou-se extrato de folha de milho, hemolinfa, macerado de intestino e regurgitado de larvas de S. frugiperda que foram filtrados com membrana (Milipore) malha de $0,45 \mu$ para se evitar contaminação do meio por outras bactérias.

Cada um desses componentes foi testado em placas de Petri com Agar Nutriente semeadas com B. thuringiensis à concentração de 15 a 25×10^7 esporos viáveis por placa ou, seja, 75 a 125 esporos por cm^3 de meio.

A aplicação desses componentes foi feita, utilizando-se sistema de anéis em placas de Petri (Fig.1), inoculando-se 6 μl do componente na área limitada pelo anel. Em um dos anéis foi inoculado igual volume de água destilada estéril, como controle.

3.5 - Doenças :

Em relação à virose, micose e bacteriose que ocorreram no insetário durante a realização do presente trabalho, foram feitos isolamentos, purificações e reinfecções, adotando-se as técnicas de Habib & Andrade (1977), Habib (1977), Harrap et alii (1977) e Garcia & Habib (1978), objetivando-se a aplicação dos postulados de Koch.

Para o estudo de sintomatologia seguiu-se os parâmetros indicados por Steinhaus (1963) e Habib (1977).

O vírus, isolado e purificado segundo técnicas de Harrap et alii (1977), foi utilizado, em suspensões de $1,8 \times 10^3$ a $1,8 \times 10^7$ poliedros /ml, em testes de susceptibilidade, adotando-se as mesmas técnicas utilizadas para os testes com B. thuringiensis, já mencionadas. Os dados foram plotados em gráficos (Log-probit) para determinação das doses letais e tempos letais.

Larvas de 6º estágio foram infectadas oralmente com 2,5 µl de suspensão de poliedros a 1×10^8 / ml, usando-se microseringa. Após 24 horas o tecido adiposo foi fixado e procedeu-se as técnicas de Harrap et alii (1977) e Hamm (1968) para estudos histopatológicos em microscopia óptica e eletrônica.

No caso da micose, a identificação do fungo entomopatógeno que ocorreu na população de S. frugiperda foi feita com auxílio de chaves taxonômicas de Thom & Raper (1945) e Raper & Fennell (1965). Os estudos morfológicos foram feitos a partir de culturas puras do fungo isolado de adultos mortos pela micose. Dois meios de cultura foram utilizados com essa finalidade, Agar Nutriente e Czapeck. As cores das colônias do fungo foram determinadas com auxílio do catálogo de Kornerup & Wanscher (1963).

Adultos de S. frugiperda foram infectados por contato e dois blocos de 20 larvas foram submetidos a infecção via oral e por contato respectivamente, a fim de se detectar a infecciosidade do fungo. A concentração de esporos utilizada foi $1,1 \times 10^8$ conídios / ml de suspensão em tween 80. Culturas em lâminas foram examinadas ao microscópio óptico, com auxílio de câmara clara para os estudos morfológicos e elaboração das ilustrações.

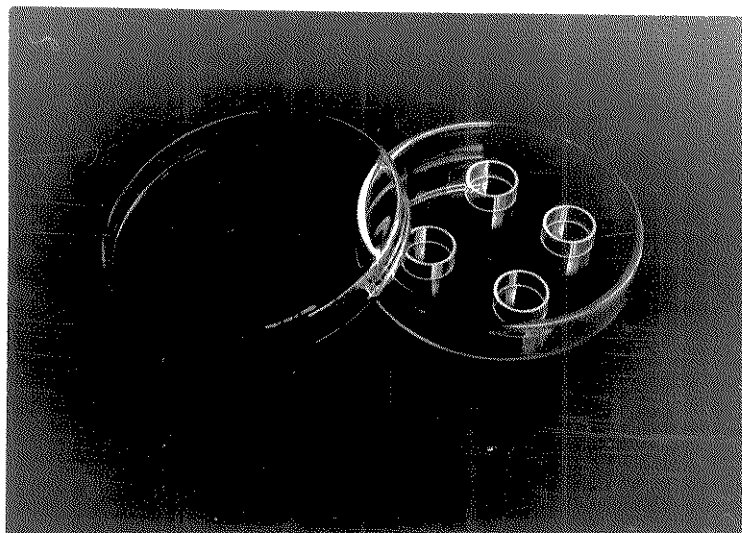


Fig. 1: Sistema de anéis em placas de Petri para testes de inibição.

4. RESULTADOS E DISCUSÃO

4.1 - Estudos de compatibilidade :

Há evidência de que alguns inseticidas químicos, quando em doses subletais, podem atuar como estressores em insetos e são frequentemente sinérgicos, nesses níveis de dosagem, quando combinados com microorganismos entomopatogênicos como B. thuringiensis (Chen et alii, 1974). Segundo Herfs (1965), entre 36 agentes químicos de controle (fungicidas, herbicidas e inseticidas) analisados, 26 são compatíveis com B. thuringiensis. Entretanto, Hall^{et alii} (1961) e Morris (1975) enfatizam que a verificação do grau de compatibilidade entre os agentes biológicos e os inseticidas impõe-se como etapa indispensável, anterior à adoção de técnicas mistas de controle.

O grau de compatibilidade de B. thuringiensis com diferentes dosagens dos inseticidas usados (Paratiom metílico e piretrina), avaliado no presente trabalho, em função da germinação e desenvolvimento bacteriano, a dois níveis de pH, pode ser inferido a partir das tabelas 1 e 2.

As tabelas 1 e 2 indicam que a diferença entre tratamentos, independentemente do inseticida, nos dois níveis de pH estudados, é altamente significativa para germinação ($\chi^2 = 23,42$) e significativa para diâmetro de colônia ($\chi^2 = 1,72$). Entretanto, a análise do efeito de diferentes dosagens de cada um dos inseticidas, isoladamente, sobre a germinação de esporos, sem discriminação de pH, demonstra que não há diferença significativa entre tratamentos, o que revela que as diferenças acusadas pelo teste de χ^2 devem ser devidas ao efeito de pH, observando-se uma nítida tendência para maior germinação e crescimento a pH 6,5, tanto nos tratamentos com paration como nos tratamentos com piretrina.

Tabela 1 : Efeito de Paration Metílico na germinação e diâmetro de colônias de B. thuringiensis,
 média de cinco repetições.

pH	Aspecto	Controle	Dosagens de inseticida (ppm)				L.S.D.		
			3,75	1,88	0,94	0,47	5%	1%	1%
6,5	Nº col.	192 ± 39,96	75,8 ± 18,28	120,4 ± 41,5	141,8 ± 37,78	152,0 ± 36	-	-	-
	Diâmetro	3,05 ± 0,14	4,55 ± 0,13	4,31 ± 0,16	3,09 ± 0,11	3,46 ± 0,12	-	-	-
8,6	Nº col.	94,5 ± 9,97	33,8 ± 3,84	37,4 ± 3,75	90,4 ± 31,41	58,6 ± 26,21	-	-	-
	Diâmetro	3,05 ± 0,09	3,94 ± 0,05	4,18 ± 0,06	2,77 ± 0,08	2,98 ± 0,09	0,706	0,989	0,989

Tabela 2 : Efeito de Piretrina na germinação e diâmetro de colônias de *B. thuringiensis*, média de cinco repetições.

pH	Aspecto	Controle	Dosagem de inseticida (ppm)				L.S.D.	
			2,89	1,44	0,72	0,36	5%	1%
6,5	Nº Col.	192,2 ± 39,76	153,6 ± 46,0	237,0 ± 51,42	75,8 ± 21,08	107 ± 60,89	-	-
	Diâmetro	3,05 ± 0,14	2,11 ± 0,13	2,75 ± 0,15	3,91 ± 0,13	4 ± 0,14	1,36	1,91
8,6	Nº Col.	94,5 ± 9,97	115,8 ± 43,32	58,0 ± 10,98	42,6 ± 4,09	79,8 ± 25,22	-	-
	Diâmetro	3,05 ± 0,09	2,8 ± 0,13	2,99 ± 0,10	3,85 ± 0,07	2,77 ± 0,13	-	-

Este efeito significativo de pH, que se manifesta para os dois inseticidas testados, provavelmente está relacionado, de acordo com Steinhaus (1963), com a maior capacidade germinativa dos esporos de B. thuringiensis em pH mais próximo ao neutro, característica da hemolinfa de muitos insetos. Por outro lado, Morris (1975) sugere que o pH, como fator, não deve alterar a germinação e desenvolvimento de B. thuringiensis.

Ainda e pelas tabelas 1 e 2 tem-se que a variabilidade dos efeitos das diferentes dosagens de inseticida sobre o diâmetro das colônias de B. thuringiensis manifesta-se apenas a nível de pH 8,6 nos tratamentos com paration e em pH 6,5 no caso de piretrina. De acordo com esses dados, as doses altas de paration (1,88e3,75 ppm) parecem ter efeito potencializador de replicação sobre a bactéria, resultando em maior diâmetro médio de colônias, enquanto que as doses mais fracas não induzem alterações significativas deste caráter, quando comparadas com o controle.

Esse efeito estimulante sobre B. thuringiensis foi observado por muitos pesquisadores, para um grande número de inseticidas organofosforados, a diferentes dosagens. Sutter et alii (1971) evidenciaram que este patógeno pode metabolizar Diazinome e Malatiome e utilizá-los como fonte de energia, quando em dosagens inferiores à concentração inibidora mínima. Morris (1975) obteve, para Fenitrotiom, uma inversão de efeito inibidor de replicações que ocorre na presença de doses baixas de inseticida (4 ppm), para efeito ativador a dosagens altas

(100 ppm). Algumas concentrações de inseticida, segundo Morris (1977), podem ter efeito bacteriostático, mas não bactericida, pois esporos de B. thuringiensis transferidos para meios de cultura sem inseticida germinaram normalmente. Este efeito parece estar relacionado com aditivos das formulações comerciais, pois o mesmo inseticida, com ingrediente ativo puro, apresenta efeito bacteriostático muito menor. Entre os organofosforados testados por Morris (1977), Dilox, que não contém aditivos, foi o inseticida de maior concentração inibidora mínima (100.000 ppm). Chen et alii (1974) observaram que, embora, na maioria dos casos, o inseticida químico não tenha efeito significativo para a sobrevivência de esporos de B. thuringiensis do produto Biotrol BTB, especificamente ^{alguns} inseticidas carbamatos e clo-rofosforados reduzem a viabilidade de esporos de Biotrol XK. Altahtawy & Abaless (1972) demonstraram que B. thuringiensis é compatível com paration metílico, sendo a sua dosagem inibidora mínima de 120 a 180 ppm.

As piretrinas, em geral, são altamente bacteriostáticas (Morris, 1977). Porém, e de acordo com os dados obtidos neste trabalho, nenhuma das dosagens aplicadas provocou efeito ativador ou inibidor de germinação ou crescimento de B. thuringiensis, quando comparado com o controle. Entretanto, são detectáveis diferenças significativas para diâmetro de colônias entre tratamentos, notando-se que a taxa de replicação tende a ser maior quando as dosagens de inseticida são fracas (menores de 1 ppm). Esses resultados divergem dos obtidos por Morris (1977), que obteve efeito estimulante para crescimento em B. thuringiensis com dosagens de piretrina entre 1 e 10 ppm de ingrediente ativo. Esta divergência provavelmente está

relacionada com o fato dos produtos utilizados por Morris, tanto a Piretrina como a linhagem de B. thuringiensis serem diferentes dos utilizados no presente trabalho.

Os resultados obtidos indicam que B. thuringiensis é compatível com Paration e Piretrina nos níveis de dosagem utilizados. Porém, deve-se também considerar que, para efeitos práticos, B. thuringiensis, metabolizando organofosforados, reduz o efeito residual e a estabilidade do inseticida químico. Entretanto, esse efeito negativo, em alguns casos, pode ser compensado pelo estresse fisiológico que muitos inseticidas podem provocar em insetos, facilitando o desenvolvimento da septicemia pela bactéria entomopatogênica.

Altahtawy & Abaless (1972) sugerem que a evidência de um crescimento vigoroso de B. thuringiensis, na presença de inseticidas, deve estar associado com aumento de virulência; e reforçam a idéia de Steinhaus (1963) de que este pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da eficácia de aplicações de agentes patogênicos associados com inseticidas químicos.

As dosagens de inseticidas químicos utilizadas neste experimento foram obtidas a partir de doses letais e subletais para larvas de S. frugiperda previamente determinadas em laboratório, sendo essas doses cerca de quarenta vezes menores do que as recomendadas para aplicação no campo. Dessa forma, os efeitos da combinação de inseticidas com B. thuringiensis certamente serão mais acentuados em condições de campo.

4.2. Susceptibilidade a B. thuringiensis e sensibilidade a inseticidas em larvas de S. frugiperda.

4.2.1. Respostas de larvas de S. frugiperda a B. thuringiensis :

As larvas de S. frugiperda, como indicam os dados, são pouco susceptíveis ou mesmo resistentes a B. thuringiensis, pois índices significativos de mortalidade ocorrem apenas para níveis elevados de dosagem, correspondendo a diluição do produto Thuricide - HP em água, nas proporções de 1/100, 1/50 e 1/10, que equivalem a valores entre 10^5 e 10^7 esporos viáveis por miligrama de larva.

A não susceptibilidade a B. thuringiensis tem sido atribuída, no caso de muitos noctuídeos, à inadequação do pH intestinal para iniciar o desenvolvimento da septicemia (Govindarajan et alii, 1975 ; Narayanan et alii, 1976). O pH do mesenteron de larvas de 4º estágio de S. frugiperda obtido nesse trabalho, para larvas de laboratório, foi em média 8,6 , valor próximo ao detectado por Raun et alii (1966) ou seja, 8,71. Esse nível de pH não seria suficientemente alcalino para provocar a dissolução do cristal tóxico de B. thuringiensis, pois esta ocorre a pH acima de 9,5. Sendo a dissolução do cristal etapa primordial para o desencadeamento da doença, a larva de S. frugiperda não sofreu o efeito da infecção.

Além do grau de acidez ou alcalinidade das diferentes partes do tubo digestivo, a condição do epitélio intestinal corresponde uma característica associada ao grau de susceptibilidade dos insetos a B. thuringiensis (Stephens, 1963 , apud Burges & Hussey, 1971).

Briggs (1964, apud Burges & Hussey, 1971) afirma que, em muitos lepidopteros, ocorre um tipo de imunidade inespecífica que pode ser atribuída a um princípio antibacteriano que varia de espécie para espécie e em um mesmo indivíduo em diferentes fases de desenvolvimento. Govindarajan et alii (1975) e Narayanan et alii (1976) sugerem que, além dessa, outros fatores como agentes redutores, fenóis, enzimas proteolíticas e substâncias antibacterianas do intestino podem ser responsáveis pela não susceptibilidade de S. litura a B. thuringiensis. Entretanto, Raun et alii (1966) obtiveram 95% de mortalidade em larvas de 4º estágio de S. frugiperda tratadas com B. thuringiensis a concentrações de 5×10^6 esporos viáveis por larva. Considerando-se o peso médio de larvas de 4º estágio como $100 \mu\text{g}$, teríamos uma dosagem de 5×10^4 esporos viáveis por μg de peso, ou seja, cerca de 100 vezes menor do que a dosagem média (10^6 esporos / μg) utilizada no presente trabalho, onde se obteve índices de mortalidade ao redor de 30%. Esta discordância nos resultados provavelmente está associada ao fato das variedades de B. thuringiensis serem diferentes, pois Raun et alii usaram B. thuringiensis var. thuringiensis enquanto que no presente trabalho usou-se a variedade kurstaki. Estas variedades podem diferir quanto à virulência, provocando índices diferentes de mortalidade quando aplicadas à mesma dosagem. Além disso deve-se considerar que S. frugiperda, no presente trabalho, foi alimentada com dieta natural enquanto que Raun et alii (1966) utilizaram dieta artificial, que tende a aumentar a susceptibilidade do inseto a patógenos. Trata-se, também, de populações diferentes, em ambientes diferentes e certamente, geneticamente diferentes. Todos esses fatores devem afetar diretamente a resposta à infecção com B. thuringiensis.

Lecadet & Martouret (1967, apud Cooksey, 1971) observaram que, in vitro, as enzimas do intestino médio de Bombyx mori em tampão borato a pH 10 hidrolizam cristais de B. thuringiensis.

No presente trabalho, o fornecimento de tampão borato 0,2 M a pH 10 para larvas de S. frugiperda logo antes da ingestão de folhas de milho tratadas com B. thuringiensis foi capaz de manter o pH do intestino médio das larvas ao redor de 9,5 durante um período máximo de 30 minutos. A rápida recuperação do pH original do intestino médio pelo sistema de tamponamento normal provavelmente não possibilitou a dissolução do cristal e assim, impediu o desenvolvimento do processo septicêmico.

O mesmo tampão, quando utilizado na preparação de suspensão de esporos de B. thuringiensis que foi aplicado sobre folhas de milho oferecidas para larvas de S. frugiperda, não provocou efeito diferente do observado nos tratamentos com B. thuringiensis em suspensão preparada com água destilada.

Os resultados da tabela 3 indicam que não houve diferença significativa de mortalidade entre tratamentos com tampão e tratamentos com água, o que demonstra que outros fatores além do pH devem estar atuando como inibidores da dissolução do cristal tóxico e ou impedindo a germinação da bactéria no tubo digestivo de S. frugiperda.

Smirnoff (1973) observou que o desenvolvimento da doença e a mortalidade produzida pela bactéria são acelerados quando os esporos de B. thuringiensis penetram na hemolinfa

Tabela 3 : Mortalidade em larvas de S. frugiperda devido a tratamentos com B. thuringiensis em suspensões em água e em tampão borato.

Dose / larva	em	% de mortalidade corrigida		
		1 dia	9 dias	17 dias
4,1 x 10 ³	água	-	26,67	23,33
	tampão	-	20,00	31,00
4,1 x 10 ⁴	água	6,67	20,00	31,00
	tampão	-	26,67	31,00
4,1 x 10 ⁵	água	-	6,67	23,33
	tampão	-	6,67	23,33

através da transposição da parede intestinal. Esta penetração é facilitada quando o inseto suporta uma infecção por microsporídeos (Protozoa) e quando se provoca, artificialmente, hidrólise da camada de quitina que reveste o intestino em larvas de Choristoneura fumiferana. Entretanto, Fast (1978) constatou que a adição da enzima quitinase a suspensão de B. thuringiensis utilizada em bioensaios com larvas de C. fumiferana não provoca qualquer alteração a nível de DL₅₀ ou inclinação da curva de regressão (mortalidade / dose). Desta forma, pode-se supor que, embora a parede intestinal possa constituir uma barreira mecânica para atuação de B. thuringiensis, outros fatores como enzimas proteolíticas, agentes redutores, infecção tolerada por

microsporídeos, ou mesmo a possível presença de bacteriófagos, como ocorre em Ostrinia nubilalis (Raun et alii, 1966), podem atuar como mecanismos de defesa da larva contra infecção por B. thuringiensis.

Murphy et alii (1976) afirmam que o cristal é atóxico até que seja dissolvido por enzimas proteolíticas do intestino de larvas susceptíveis. As frações tóxicas, de acordo com Sutter et alii (1967) provocam, em pouco tempo, desintegração e descolamento das células epiteliais do intestino médio. Esta desintegração da parede intestinal possibilitaria a passagem de líquidos intestinais e células vegetativas de B. thuringiensis para a hemolinfa, resultando em morte do inseto.

Moore & Navon (1973) sugerem que S. littoralis não teria proteolisinas que atuariam como enzimas de ativação de B. thuringiensis no intestino médio, e que este seria o fator responsável pela não susceptibilidade da espécie a este patógeno. É possível que este fator apontado por Moore & Navon (1973) também seja de extrema importância no caso de S. frugiperda, desde que ambas as espécies pertencem ao mesmo gênero.

4.2.2. Possíveis causas de inibição de B. thuringiensis em larvas de S. frugiperda :

De acordo com os resultados do presente trabalho, já mencionados, as larvas de S. frugiperda podem ser consideradas como pouco susceptíveis ou mesmo resistentes a infecção por B. thuringiensis.

Testes in vitro para verificação das possíveis causas dessa resistência, realizados com extrato de folha de milho, hemolinfa, conteúdo do mesêntero e regurgitado de larvas de quarto estágio de S. frugiperda indicaram que o extrato de folha de milho não altera a capacidade germinativa de B. thuringiensis, evidenciando que o alimento da larva não tem propriedade bactericida. Estes resultados coincidem com os obtidos por Govindarajan et alii (1975) para extrato de Recinus communis L., planta de alimentação de Spodoptera litura. Entretanto, Morris (1969) observou que a elevada acidez de certos extratos foliares pode reduzir a alcalinidade, normalmente elevada, do intestino médio de larvas de Lepidoptera, impedindo a dissolução do cristal tóxico de B. thuringiensis. Ainda Morris (1969) mencionou que, mesmo que os cristais se dissolvam, na presença de extratos foliares de elevada acidez, o crescimento bacteriano no intestino pode ser inibido, levando o inseto a sobreviver. Diante dos resultados obtidos, no presente trabalho, passou-se a repetir os testes apenas para verificação dos possíveis efeitos inibidores provocados por fatores inerentes à própria larva, ou seja, hemolinfa, regurgitado e conteúdo do intestino médio.

A figura 2 demonstra que ocorre uma nítida inibição de germinação de esporos de B. thuringiensis nos aneis tratados com regurgitado (R) e conteúdo de intestino médio (IM). Enquanto que a germinação e crescimento bacterianos no tratamento com hemolinfa (H) são equiparáveis ao que se observa no anel controle (C). De acordo com esses dados pode-se dizer que a hemolinfa, da mesma forma que o extrato da planta de alimentação da larva, não altera a germinação e desenvolvimento bacterianos.

O pH fracamente alcalino (8,6) do regurgitado e do conteúdo do intestino médio, embora não favoreça a dissolução do cristal tóxico, possibilitaria a germinação dos esporos de B. thuringiensis, como foi constatado nos testes de compatibilidade. Nesses testes não houve diferença significativa para germinação e crescimento de B. thuringiensis entre placas de controle com meio a pH 6,8 (pH da hemolinfa) e a pH 8,6 (pH do intestino médio). Portanto, o fator responsável pela inibição observada nos aneis R e IM da figura 2 deve ser outro que não o pH. Na mesma figura 2 nota-se que o grau de inibição na área tratada com regurgitado é maior do que o observado para tratamento com o líquido do intestino médio. Este fato foi constatado em todas as repetições do teste. Assim, cabe sugerir aqui que, um fator inibidor, seja bactericida ou bacteriostático, deve estar presente no suco gástrico e que, no intestino médio, apresenta-se diluído pelo alimento. Govindarajan et alii (1975) constataram a atividade inibidora do conteúdo intestinal de larvas de S. litura sobre B. thuringiensis e sugerem que esta inibição esteja associada à presença de alguma



Fig. 2 : Efeito de hemolinfa (H), regurgitado (R) e macerado de intestino médio (IM) e água (C) na germinação de esporos de B. thuringiensis.

substância química capaz de inibir a germinação e crescimento bacterianos. Narayanan et alii (1976) indicaram a possibilidade de substâncias redutoras, fenóis, enzimas proteolíticas, e outras substâncias antibacterianas presentes no intestino de larvas de S. litura atuarem como fatores responsáveis pela não susceptibilidade desta espécie a B. thuringiensis.

Arescaldino (1969) (apud Burges e Hussey, 1971) afirma que o esporângio de B. thuringiensis não se rompe na presença de antibióticos. Desta forma, tanto o cristal tóxico como o esporo não são liberados e passam intatos pelo tubo digestivo do inseto. Entretanto, outros fatores podem provocar este efeito, desde que tornem o microhabitat adverso para B. thuringiensis.

Raun et alii (1966) isolaram bacteriófago de B. thuringiensis em larvas de Ostrinia nubilalis e afirmaram que, embora este possa atuar como mecanismo bacteriostático, reduzindo a patogenicidade de B. thuringiensis, os testes de laboratório indicaram que os índices de mortalidade do inseto não foram alterados significativamente pelo bacteriófago, que apenas retardará o efeito da bactéria. Os autores sugerem que o tempo letal (TL) maior para larvas de O. nubilalis tratadas com Bacteriófago + B. thuringiensis é devido ao tempo necessário para o desenvolvimento e reprodução de uma linhagem de B. thuringiensis fago-resistente, que causaria, então, a morte do inseto. Esses autores observaram que linhagens resistentes desenvolvem-se em 24 a 48 horas. Outros pesquisadores isolaram bacteriófagos de B. thuringiensis (Steinhaus, 1963 ; Raun et alii, 1966). Afrikian (1960) (apud Raun et alii, 1966) sugeriu que o bacteriófago pode ser

um importante fator imunogênico para resistência de Bombyx mori a bactérias patogênicas. Entretanto, estudos de laboratório revelaram uma rápida seleção de linhagem de bactéria fagoresistente.

A determinação da natureza real do fator de inibição de B. thuringiensis em larvas de S. frugiperda envolveria estudos mais profundos de isolamento e purificação dos componentes diversos do suco gástrico. Entretanto, os dados obtidos indicam que há grande possibilidade desse fator ser de natureza química. Porém, as informações dos trabalhos de Raun et alii (1966) e Afrikian (1960), sobre bacteriófagos em lepidópteros, não são suficientes para se anular a hipótese do papel bacteriostático desses virus que podem ocorrer no tubo digestivo de S. frugiperda.

4.2.3. Respostas de larvas de S. frugiperda aos inseticidas químicos e B. thuringiensis :

Os inseticidas químicos, em doses subletais, podem atuar como estressores e causar distúrbios fisiológicos, o que facilitaria a ação bacteriana através de uma redução do grau de resistência do inseto à infecção por patógenos. Porém, nem sempre o efeito de combinação de inseticidas químicos com microbianos é maior do que a soma dos efeitos de cada um dos inseticidas isoladamente, ou seja, nem sempre ocorre sinergismo.

Os resultados obtidos, representados na figura 3, indicam que, tanto em populações homogêneas como em heterogêneas, o efeito do inseticida, isoladamente é maior do que o efeito do complexo inseticida-patógeno, quando se utiliza, como em todos os casos de combinação inseticida patógeno aqui mencionados, uma dosagem fixa de B. thuringiensis de $3,7 \times 10^6$ esporos viáveis / mg de larva e dosagens variáveis de inseticida químico. Este fato é comprovado pelos valores das DL_{50} correspondentes a 25,3 ppm para paratiom metílico e 27,2 ppm para a combinação paratiom metílico + patógeno em população heterogênea e 8,7 ppm para paratiom metílico e 10,6 ppm para a combinação paratiom metílico + patógeno em população homogênea. Este conjunto de valores também evidencia que o grau de sensibilidade ao inseticida e à combinação inseticida + patógeno foi maior nas populações homogêneas do que nas heterogêneas, indicando uma seleção, em laboratório, para indivíduos mais sensíveis a estes inseticidas.

Em populações heterogêneas, a diferença entre os valores de inclinação (b) das curvas dose/mortalidade dos trata-

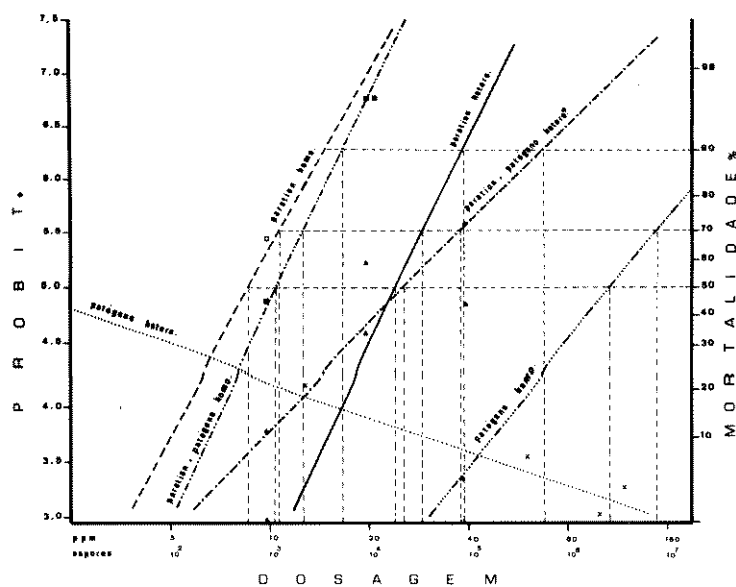


Fig.3: Efeitos de dosagens de B. thuringiensis (esporos viáveis / mg de larva) e parathion metílico (ppm) aplicadas isoladamente e combinadas em larvas de populações homogêneas e heterogêneas de S. frugiperda .

mentos foi relativamente grande. No caso de paratiom metílico, b foi de 2,0625; enquanto que b no caso da combinação paratiom metílico + patógeno foi de 0,95. Essa diferença indica que as respostas obtidas neste tipo de população não seguem um padrão normal de deslocamento paralelo das curvas dose/mortalidade. Os valores das DL_{50} , DL_{70} , e DL_{90} (Figura 3) correspondentes a 25,3 ppm, 30,7 ppm e 39 ppm para paratiom metílico e 27,2 ppm, 38,4 ppm e 70,5 ppm para a combinação paratiom metílico + patógeno reforçam a idéia de deslocamento irregular das curvas, o que provavelmente é devido à heterogeneidade de respostas nas populações.

Para os tratamentos com populações homogêneas, a pequena diferença de inclinação nas curvas dose/mortalidade, onde $b = 1,8063$ para paratiom e $b = 2,125$ para a combinação de paratiom + patógeno, indica maior uniformidade de resposta das populações.

Os testes para verificação da resposta de larvas de S. frugiperda a tratamentos com piretrina (Figura 4) e combinação piretrina + patógeno mostraram respostas semelhantes às obtidas com paratiom e paratiom + patógeno, tanto para populações homogêneas como para populações heterogêneas.

Observa-se que a combinação do inseticida com B. thuringiensis resulta em índices de mortalidade inferiores aos obtidos quando se aplica o inseticida isoladamente. Este efeito é mais acentuado para dosagens mais baixas de inseticida, indicando um certo grau de antagonismo. Estes dados demonstram

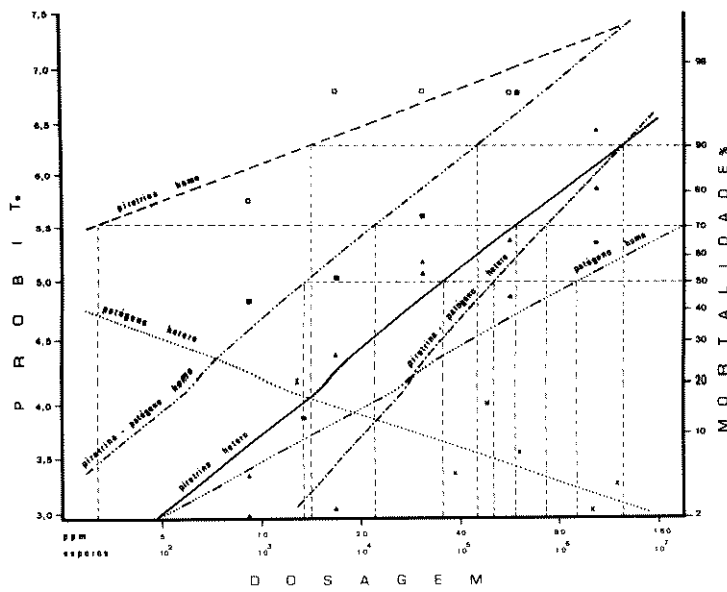


Fig. 4: Efeitos de dosagens de B. thuringiensis (esporos viáveis / mg de larva) e piretrina (ppm) aplicadas isoladamente e combinadas em larvas de populações homogêneas e heterogêneas de S. frugiperda.

que o efeito in vivo, às vezes, difere marcadamente do observado em testes de compatibilidade in vitro, pois outros fatores inerentes ao inseto atuam sobre a sensibilidade e susceptibilidade.

À semelhança do observado no caso de tratamentos com paratiom, tem-se que as populações homogêneas demonstraram maior sensibilidade à piretrina e às combinações de piretrina + patógeno do que as heterogêneas. Os valores 62 ppm e 3,38 ppm para DL₇₀ de piretrina em população heterogênea e homogênea respectivamente, e 74 ppm e 22,7 ppm para DL₇₀ de piretrina + patógeno em população heterogênea e homogênea respectivamente reforçam esta afirmação.

As diferenças de respostas entre os tratamentos com inseticida somente e combinação inseticida + patógeno são mais acentuadas para as dosagens mais baixas de piretrina. À medida que as doses de inseticida aumentam, nota-se uma nítida aproximação das curvas dose/mortalidade e, no caso de população heterogênea, há mesmo uma inversão de posição porém, já a nível de DL₉₀. Provavelmente esse tipo de resposta, que ocorre em ambas populações, está associado com o possível efeito de doses elevadas de inseticida, capazes de inativar totalmente a bactéria, eliminando o efeito antagônico. Entretanto, no caso de piretrinas, não se tem dados a respeito da possível degradação do inseticida por ação bacteriana, o que já é comprovado para organofosforados (Sutter et alii, 1971 ; Morris, 1977; Altahtawy & Abaless, 1972) e que poderia ajudar a explicar a convergência das curvas dose/mortalidade nos níveis elevados de inseticida.

As repetições dos testes de sensibilidade e susceptibilidade de S. frugiperda à piretrina e à combinação piretrina + patógeno (Figura 5), em populações homogêneas, mostraram praticamente os mesmos efeitos básicos já descritos, com deslocamento das curvas para dosagens mais fracas. Entretanto, nota-se que este deslocamento é bem menor do que o demonstrado na figura 4.

Um efeito aparentemente sinérgico foi observado para os tratamentos com paratiom e combinações de paratiom com B. thuringiensis (Figura 6) durante a repetição do teste em população homogênea. Os valores das DL₅₀, DL₇₀ e DL₉₀ correspondentes a 15,7 ppm, 17,3 ppm e 19,8 ppm para paratiom e 10,5 ppm, 12,6 ppm e 15,4 ppm para combinação paratiom + patógeno, mostraram que o efeito aparentemente sinérgico é tal que a DL₅₀ do inseticida isoladamente é praticamente igual à DL₉₀ da combinação inseticida + patógeno. Entretanto, comparando-se a dosagem de B. thuringiensis utilizada ($3,7 \times 10^6$ esporos viáveis / mg de larva) com sua DL correspondente no teste controle (Figura 6), observa-se que esta dosagem causaria mais de 98 % de mortalidade. Desta forma, o índice de mortalidade mínimo esperado para a menor dosagem de paratiom utilizada seria próxima a 100 %, caso os inseticidas, químico e biológico, utilizados apresentassem ação independente. Portanto, as curvas representadas na figura 6 demonstram que a combinação paratiom + B. thuringiensis, quando aplicada em larvas de S. frugiperda, resulta em antagonismo, ou seja, o efeito final, em termos de mortalidade é menor do que a soma dos efeitos individuais dos

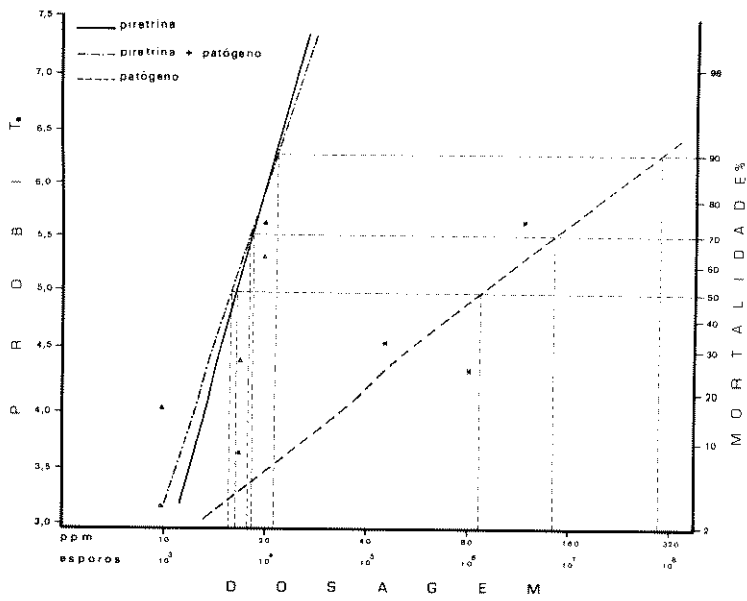


Fig. 5: Efeito antagônico da combinação de diferentes dosagens de piretrina com dosagem fixa de B. thuringiensis ($3,7 \times 10^6$ esporos viáveis / mg de larva).

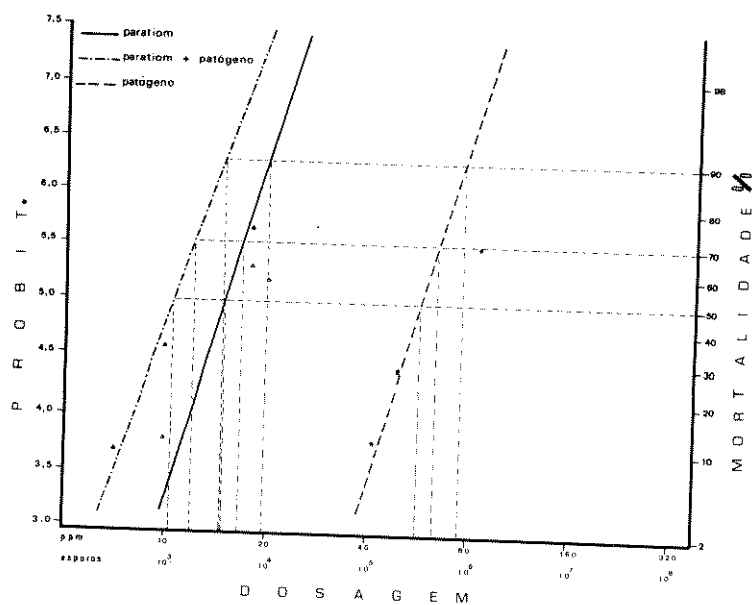


Fig. 6: Efeito aparentemente sinérgico da combinação de diferentes dosagens de paratium com dosagem fixa de *B. thuringiensis* ($3,7 \times 10^6$ esporos viáveis / mg de larva).

agentes de controle.

A figura 5 demonstra que o efeito da combinação de piretrina + patógeno é semelhante ao observado para paratiom + patógeno quando se considera a DL correspondente à dosagem de B. thuringiensis utilizada no teste em questão. Porém, o grau de antagonismo é menos acentuado. Observa-se que as curvas de regressão (dose/mortalidade) para os tratamentos com piretrina isoladamente e piretrina + patógeno são semelhantes quanto às inclinações, onde b para piretrina corresponde a 3,665 e b para piretrina + patógeno a 3,149. Também, há semelhança quanto às DL₅₀ e DL₇₀ respectivamente 17,1 ppm e 18,6 ppm para piretrina e 16,5 ppm e 18,3 ppm para piretrina + B. thuringiensis. E ainda, os valores das DL₉₀ coincidem. Dessa forma, novamente se observa que, para os níveis elevados de inseticida, há uma tendência à uniformização de respostas a tratamentos com inseticida isoladamente e combinado com bactéria, indicando mais uma vez a possibilidade do inseticida inativar o patógeno quando a nível elevado de dosagem.

O antagonismo obtido com as combinações inseticida + patógeno demonstra a ineficiência desse tipo de combinação, embora, in vitro, tenha-se constatado a compatibilidade de B. thuringiensis tanto com paratiom metílico como com piretrina.

Benz (1971; apud Burgues e Hussey, 1972) afirma que esse tipo de reação antagônica é comum entre microorganismos e inseticidas, em consequência da incompatibilidade entre ambos in vivo, mesmo quando são compatíveis in vitro. Entretanto, se o inseto for mais sensível do que o microorganismo ao elemento

tóxico, pode-se obter efeito independente com mortalidade significativa ou mesmo sinergismo real quando se utiliza dosagens subletais de inseticida.

Um conjunto de mecanismos deve ser responsável pela resposta de larvas de S. frugiperda à combinação inseticida + B. thuringiensis que reflete um antagonismo mesmo para dosagens subletais de inseticida. O fato das curvas tenderem à convergência aos níveis de dosagens mais elevadas sugere uma possível degradação do inseticida pela bactéria quando este se encontra a níveis baixos de dosagem e uma possível inibição total de B. thuringiensis por dosagens elevadas de inseticida. Esta interpretação é reforçada, no caso de piretrina, pelos dados do teste de compatibilidade. Porém, estes mesmos testes para paratiom in dicam alto grau de compatibilidade mesmo para dosagens elevadas de inseticida, o que não coaduna com os resultados in vivo.

A combinação de doses de piretrina com a dose subletal 3,189 ppm de paratiom metílico, quando aplicada oralmente em larvas de quarto estágio de S. frugiperda resultou em fraca potencialização de efeito (Figura 7), onde as DL_{70} correspondiam a 11,02 ppm para a combinação piretrina + paratiom e 12,28 ppm para piretrina isoladamente. A DL_{90} obedece o mesmo padrão, com 16,20 ppm para a combinação piretrina + paratiom e 19,85 ppm para piretrina isoladamente. Estes valores indicam o papel potencializador de doses fracas de paratiom quando associadas a piretrina. Talvez este fenômeno esteja relacionado com o fato dos mecanismos de ação dos organofosforados e piretrinas serem diferentes, embora ambos atuem, direta ou indiretamente, no

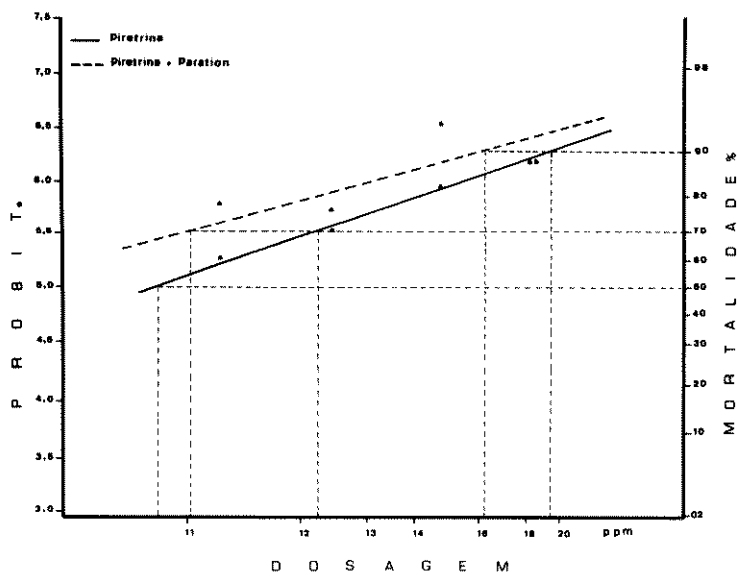


Fig. 7: Efeito da combinação de diferentes dosagens de piretrina com dose subletal de paration aplicadas via oral.

sistema nervoso do inseto. Enquanto paratiom metílico atua como bloqueador da enzima acetilcolinesterase, provocando acúmulo de acetil colina e tetania nos insetos (Rockstein , 1974 ; Mariconi, 1976) as piretrinas atuam de forma mais direta no sistema nervoso, interferindo nas correntes de sódio e potássio a nível de membrana celular, levando a um bloqueio nervoso que resulta em paralisia (Casida, 1973).

Hã também a possibilidade de degradação tanto de paratiom (Rockstein, 1974) como de piretrina (Casida, 1973) por um sistema enzimático que envolve a atuação de oxidases de função mista. Porém, o fato de cada um desses componentes tóxicos ter locus de ação diferente, provavelmente provoca um desvio do mecanismo de defesa para uma direção única, ou divisão do mecanismo nas duas direções, ou ainda pode ocorrer perturbação da função enzimática e conseqüentemente redução da eficiência do mecanismo de detoxicação, o que resulta em potencialização do efeito da aplicação conjunta dos inseticidas.

As respostas das larvas de S. frugiperda submetidas a tratamento por contato com dosagens relativamente altas de piretrina, ou seja, acima de 6 ppm (Figura 8) são semelhantes às obtidas para os mesmos tratamentos, quando aplicados via oral (Figura 7), com aparente potencialização de efeito. Entretanto, ainda na figura 8, observa-se que as respostas aos tratamentos com dosagens baixas de piretrina, tanto na repetição 1 como na 2, são invertidas, notando-se que o efeito da piretrina aplicada isoladamente é maior do que quando aplicada em associação com a dose subletal de paratiom. Nesse aspecto,

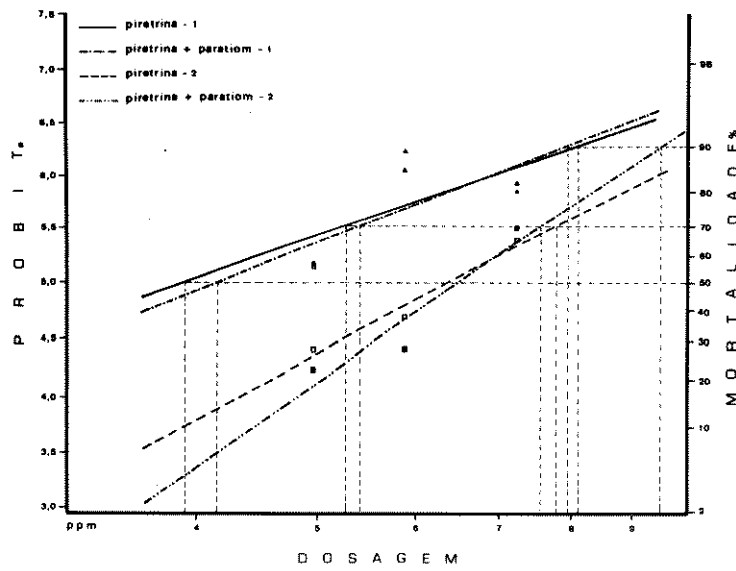


Fig. 8: Efeito da combinação de diferentes dosagens de piretrina com dose subletal de parathion aplicadas por contato, com duas repetições (1,2).

as respostas assemelham-se mais com as obtidas para combinações inseticida + patógeno.

É possível que as doses baixas de piretrina não ativem o mecanismo enzimático de detoxicação nas larvas de S. frugiperda de maneira tão efetiva quanto quando apresentam-se associadas com paratiom em dose subletal. Dessa forma, a mortalidade provocada por uma dose de piretrina aplicada isoladamente pode ser maior do que a obtida para a mesma dosagem quando associada com o organofosforado. À medida que a dosagem de piretrina aumenta, a eficiência do mecanismo enzimático de detoxicação pode sofrer uma queda nos tratamentos onde existe a associação com paratiom, o que resulta na inversão de posições das curvas de piretrina e piretrina + paratiom ilustradas na figura 8.

4.3. Ocorrência natural de doenças em populações de S. frugiperda :

Durante o desenvolvimento do presente trabalho , notou-se que larvas e adultos de S. frugiperda, tanto no campo, como no laboratório, morriam, não completando o ciclo de desenvolvimento.

Através de técnicas de isolamento, purificação e reinfecção (aplicação dos postulados de Koch) conseguiu-se detectar os agentes responsáveis por essas mortalidades precoces que ocorriam nas populações de S. frugiperda.

Cada um dos agentes patogênicos detectados caracterizou pequenos surtos de doença em determinadas épocas e condições.

4.3.1. Virose causada por vírus poliédrico nuclear (VPN) :

Durante os meses de verão de 1977-1978, a ocorrência de virose em larvas de S. frugiperda provocou uma sensível redução na densidade populacional da espécie em laboratório. No campo, durante essa mesma época, embora não se tenha estimado o índice de mortalidade causada por esse fator, constatou-se, com frequência, a ocorrência de virose.

Tanto no laboratório como no campo, a ocorrência dessa virose manifestou-se quando as condições de temperatura e umidade relativa eram sensivelmente altas (27°C e 74 %).

4.3.1.1. Sintomatologia externa :

No laboratório, o desencadeamento da virose foi detectado através dos seguintes sintomas :

- A larva doente começou a perder o apetite até parar totalmente de alimentar-se.
- O tegumento adquiriu cor opaca e o inseto passou a reagir e locomover-se lentamente, até o estado de paralisia total.
- Devido à destruição de alguns tecidos internos, principalmente o adiposo, notou-se uma progressiva flacidez dos tecidos , culminando com a sua liquefação.
- O tegumento permaneceu aparentemente intato, distendido e envolvendo os tecidos já liquefeitos. Este estado correspondeu ao pré-mortal. Qualquer toque era suficiente para provocar a ruptura do tegumento e o extravasamento do conteúdo liquefeito.
- Desde os primeiros sintomas até a morte do inseto transcorreram, em média, 4 a 6 dias.

Essa sintomatologia coincide com as descritas por Steinhaus (1963) e Hamm (1968).

4.3.1.2. Identificação do vírus :

As larvas doentes recolhidas foram utilizadas como fonte de vírus. O exame ao microscópio de contraste de fase e eletrônico revelou que o agente etiológico, tanto para a virose no campo, como em laboratório, foi o vírus causador da poliedrose nuclear. De acordo com as recentes classificações

de virus entomopatogênicos de Wildy (1971) e Summers (1975) , ambos apud Maramorosch (1977), trata-se do gênero Baculovirus, família Baculoviridae. Com base nesses autores e nas observações do presente trabalho, pode-se caracterizar o vírus da poliedrose nuclear de S. frugiperda pelos seguintes aspectos: Os nucleocapsídios, em forma de bastonetes, apresentam-se envoltos em uma membrana dupla e arranjados em feixes imersos em um cristal proteico poliédrico (Figura 9). Em alguns casos, observa-se, no interior de um mesmo poliedro, os morfotipos citados por Maramorosch (1977) como mono e multi-imersos, sendo 11 o número máximo de nucleocapsídios encontrados por feixe, no presente trabalho. Observa-se que há uma grande variação quanto ao diâmetro dos poliedros de um mesmo núcleo, que podem medir cerca de 4,4 μ a 12,53 μ . Entretanto, o tamanho médio está ao redor de 7,862 μ e o da partícula viral 332,4 m μ . Estes dados coadunam com os de Steinhaus (1963).

4.3.1.3. Susecptibilidade

A partir de vírus purificado, foram feitas infecções artificiais, usando-se folhas de milho, com área determinada , contaminadas com diferentes dosagens de vírus e oferecidas para larvas de S. frugiperda. Os tratamentos preliminares resultaram em morte das larvas, com a sintomatologia descrita anteriormente.

Nos estudos de susceptibilidade, as larvas de 4º estágio de S. frugiperda mostraram respostas significativas à infecção por vírus a partir da dosagem 4,5 x 10⁴ poliedros por larva (detalhes na tabela 4). Dosagens inferiores a essa podem provocar

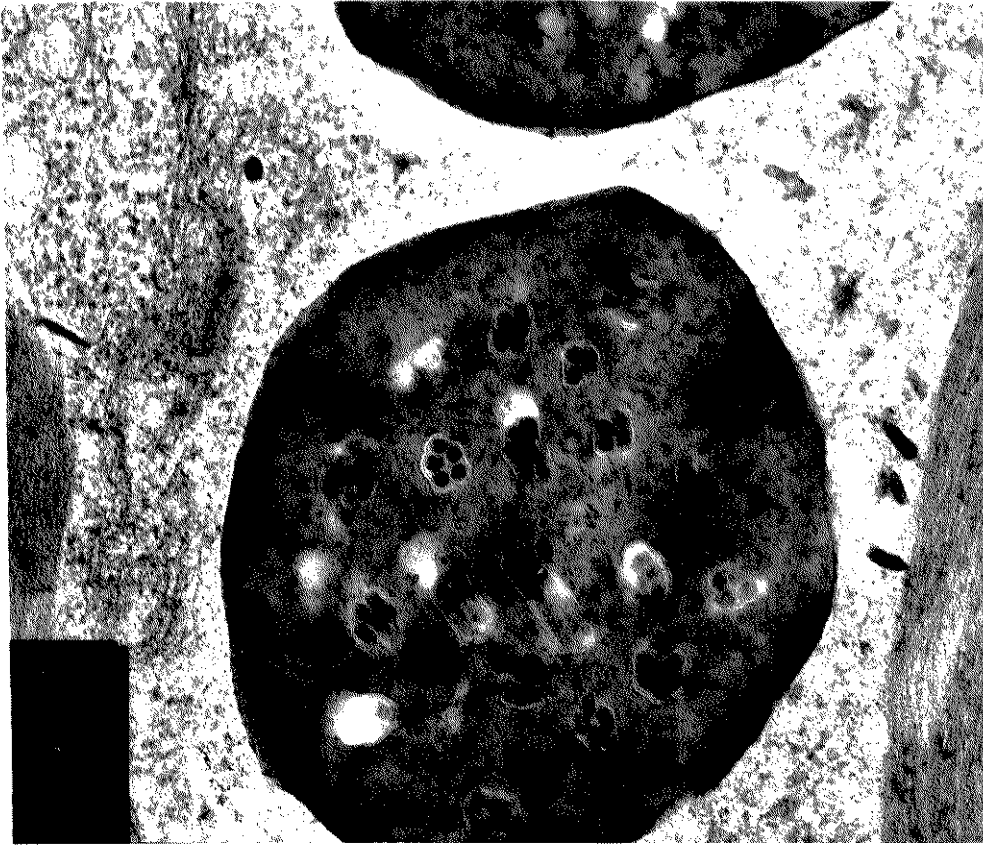


Fig. 9: Ultraestrutura do pliedro de VPN (7.200 x).

Tabela 4: Percentagem de mortalidade corrigida em larvas de S. frugiperda tratadas com folhas contaminadas por VPN.

Concentração poliedro/ml	Dosagem poliedro/larva	mortalidade %			
		5	8	12	20
$1,8 \times 10^3$	$4,5 \times 10$	-	-	--	--
$1,8 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$	-	34	34	47
$1,8 \times 10^5$	$4,5 \times 10^3$	27,2	40	46	79
$1,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^4$	68,8	88	94	100
$1,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$	74	100	100	100

desencadeamento lento da doença na população.

Fixando-se o tempo de observação em 5 dias após o tratamento, a DL_{50} corresponderia a $2,3 \times 10^4$ poliedros por larva, enquanto que a DL_{70} seria $1,41 \times 10^5$ e, finalmente, a DL_{90} equivaleria a $2,48 \times 10^6$ poliedros por larva (detalhes na tabela 5).

Os dados do presente trabalho, quando comparados com os obtidos por Allen & Ignoffo (1969) mostram grande semelhança para os níveis de susceptibilidade das larvas. Embora esses autores tenham trabalhado com vírus poliédrico nuclear em larvas de Heliothis zea, utilizaram critérios para a avaliação da susceptibilidade desse noctuídeo a VPN iguais aos utilizados no presente trabalho, possibilitando a comparação. Os dados de doses letais apresentados por Allen & Ignoffo (1969) referem-se ao tempo pós-tratamento de 8 dias. De acordo com os dois autores, as DL_{50} , DL_{70} e DL_{90} de VPN em larvas de 8 dias de idade de H. zea (com peso de corpo próximo ao de larvas de S. frugiperda utilizadas no presente trabalho) foram de $2,29 \times 10^3$, $1,23 \times 10^4$ e $1,39 \times 10^5$ poliedros por larva respectivamente; semelhantes às obtidas no presente trabalho, com larvas de S. frugiperda (Tabela 5).

Dulmage & Burgerjon (1977) sugerem que, no caso de bioensaios com vírus, deve-se, simplesmente, fornecer o vírus com o alimento do inseto e analisar a mortalidade após diferentes períodos de tempo, comparando-se os tempos letais (TL_s) para cada dosagem. Aplicando-se o critério desses autores para os dados obtidos no presente trabalho consegue-se determinar o

Tabela 5 : DL₅₀, DL₇₀ e DL₉₀ de VPN para larvas de S. frugiperda tratadas com folhas de milho contaminadas.

Dose	Poliedros / larva			
	5	8	12	20
DL ₅₀	$2,3 \times 10^4$	$3,28 \times 10^3$	$2,48 \times 10^3$	$5,85 \times 10^2$
DL ₇₀	$1,4 \times 10^5$	$1,01 \times 10^4$	$7,43 \times 10^3$	$1,88 \times 10^3$
DL ₉₀	$2,48 \times 10^6$	$1,21 \times 10^5$	$3,70 \times 10^4$	$9,23 \times 10^3$

TL₅₀ para a dosagem $4,5 \times 10^5$ poliedros por larva, ou seja, $1,8 \times 10^7$ poliedros/ml, como 4,3 dias (Figura 10). Por outro lado, para a dosagem mais fraca utilizada nos testes de susceptibilidade ($4,5 \times 10^2$ poliedros/larva, ou seja, $1,8 \times 10^4$ poliedros/ml), o tempo letal médio seria de 29 dias.

O valor da utilização do critério de tempo letal sugerido por Dulmage & Burgerjon (1977) está associado com o modo de ação do vírus e o tempo necessário para provocar a morte na população do inseto. No presente trabalho cabe analisar a vantagem da utilização desse critério quando se trata de insetos de ciclo curto. Os noctuídeos em geral e S. frugiperda, em particular, têm fase larval de curta duração, variando entre 10 e 20 dias (Luginbill, 1928 ; Leiderman & Sauer, 1953; Habib, 1977 ; Habib & Patel, 1977) o que justifica, no caso de utilização de vírus como defensivo, a determinação da dose letal correspondente a um tempo letal que não ultrapasse o período de desenvolvimento larval. Além disso, a análise do tempo letal possibilita a localização da dosagem mais efetiva, pois dosagens muito altas podem não ter efeito significativamente melhor do que dosagens um pouco mais baixas, com TL₅₀ próximo, como é o caso das dosagens $1,8 \times 10^7$ e $1,8 \times 10^6$ poliedros/ml, representados na figura 10. Porém, para casos de controle preventivo, ou seja, estimulação lenta de epizootias, pode-se recomendar a utilização de dosagens fracas, com elevado TL₅₀, pois serão suficientes para introduzir e dispersar a virose de maneira efetiva para controlar erupções.

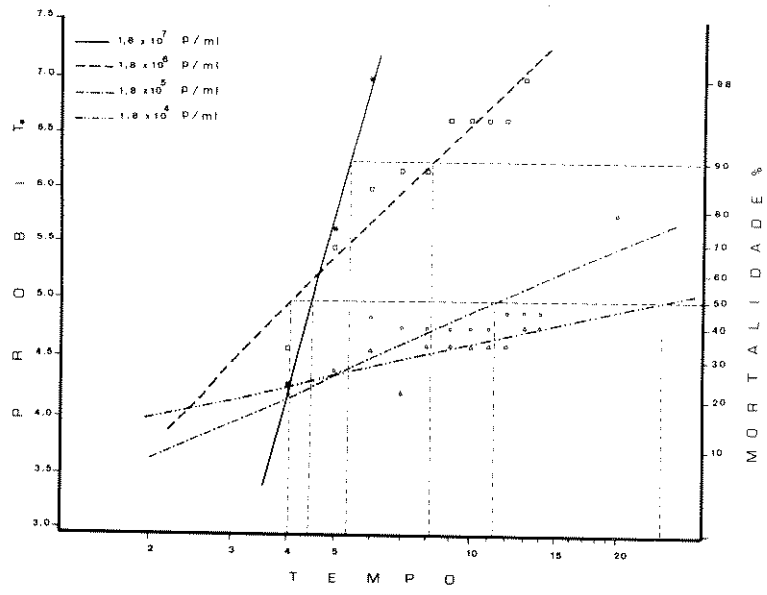


Fig. 10: Mortalidade / tempo (escala log-probit.) em larvas de S. frugiperda tratadas com diferentes dosagens de VPN com indicação para TL₅₀ e TL₉₀.

4.3.1.4. Histopatologia

De acordo com as observações do presente trabalho , as inclusões poliédricas de VPN são nítidas no tecido adiposo, epiderme, matriz traqueal e hemócitos.

A nível citológico, nota-se que, de maneira geral, ocorre, inicialmente, nítida hipertrofia nuclear e citoplasmática. Quando os poliedros começam a aparecer nos núcleos, constata-se também a condensação de cromatina (Figura 11). À medida que a infecção evolui, o número de poliedros aumenta, podendo atingir a cifra de mais de 100 poliedros / núcleo. Em fase mais avançada da infecção nota-se a abundância de fibrilas no citoplasma (Figura 12). Finalmente, devido à replicação do vírus com utilização do material genético da célula, ocorrem distúrbios histoquímicos, resultando em ruptura da estrutura citoplasmática. Após a degradação celular devido ao vírus , seguem-se processos autolíticos, culminando com a ruptura da carioteca, da membrana celular e liberação dos poliedros.

Ao nível tissular, o tecido adiposo (Figura 13) representa o maior sítio de replicação e, portanto, formação de poliedros. Tal fato prende-se à natureza multinucleada das células deste tecido e à sua peculiar potencialidade energética. Devido à hipertrofia celular, nota-se também aumento no volume deste tecido. A ruptura das membranas nuclear e celular e a degradação das membranas conectivas, que envolvem os corpos adiposos, permitem a liberação dos restos celulares liquefeitos e dos poliedros para a cavidade do corpo do inseto.

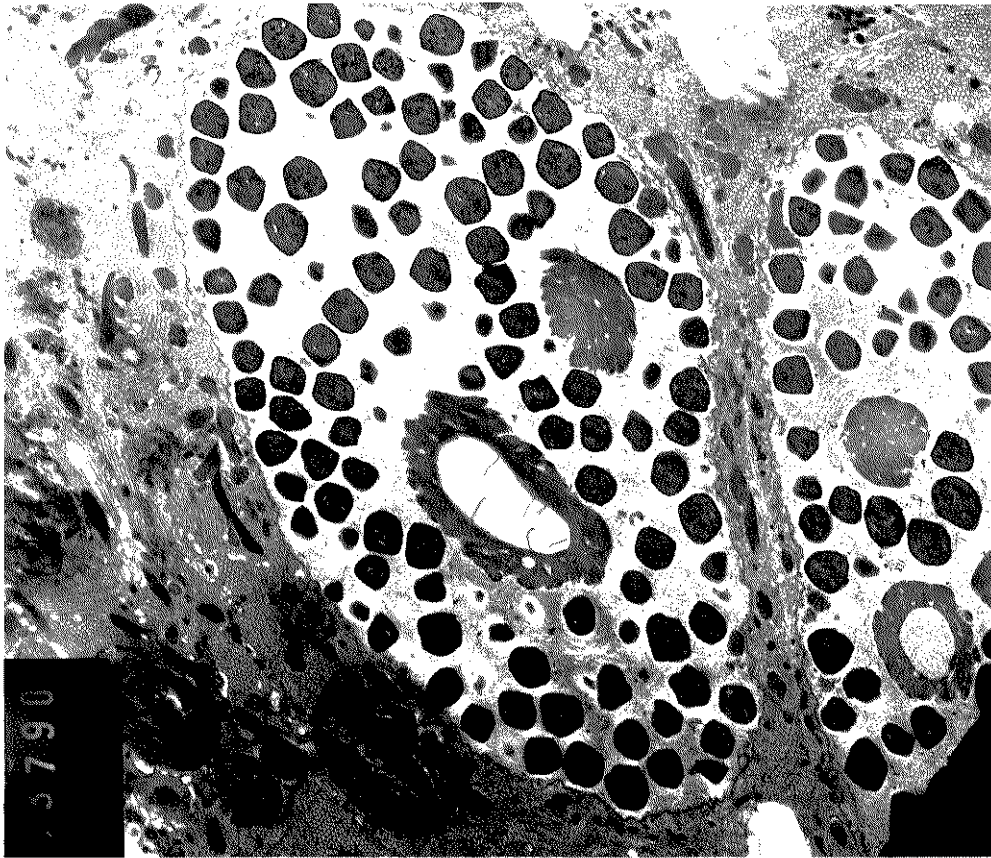


Fig. 11: Núcleo de célula adiposa de larva de S. frugiperda infectada com VPN.
(7.200 x)

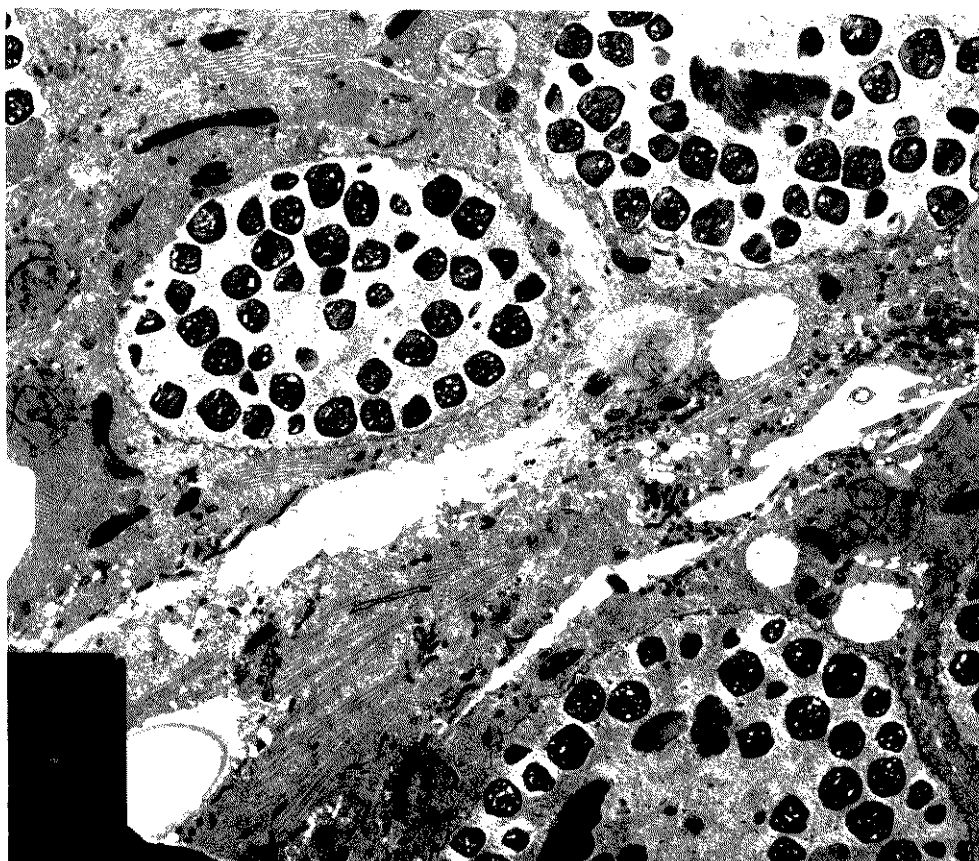


Fig. 12: Célula do tecido adiposo de larva de S.
frugiperda infectada com VPN; com citoplasma
apresentando rupturas e microfibrilas.
(7.200 x)

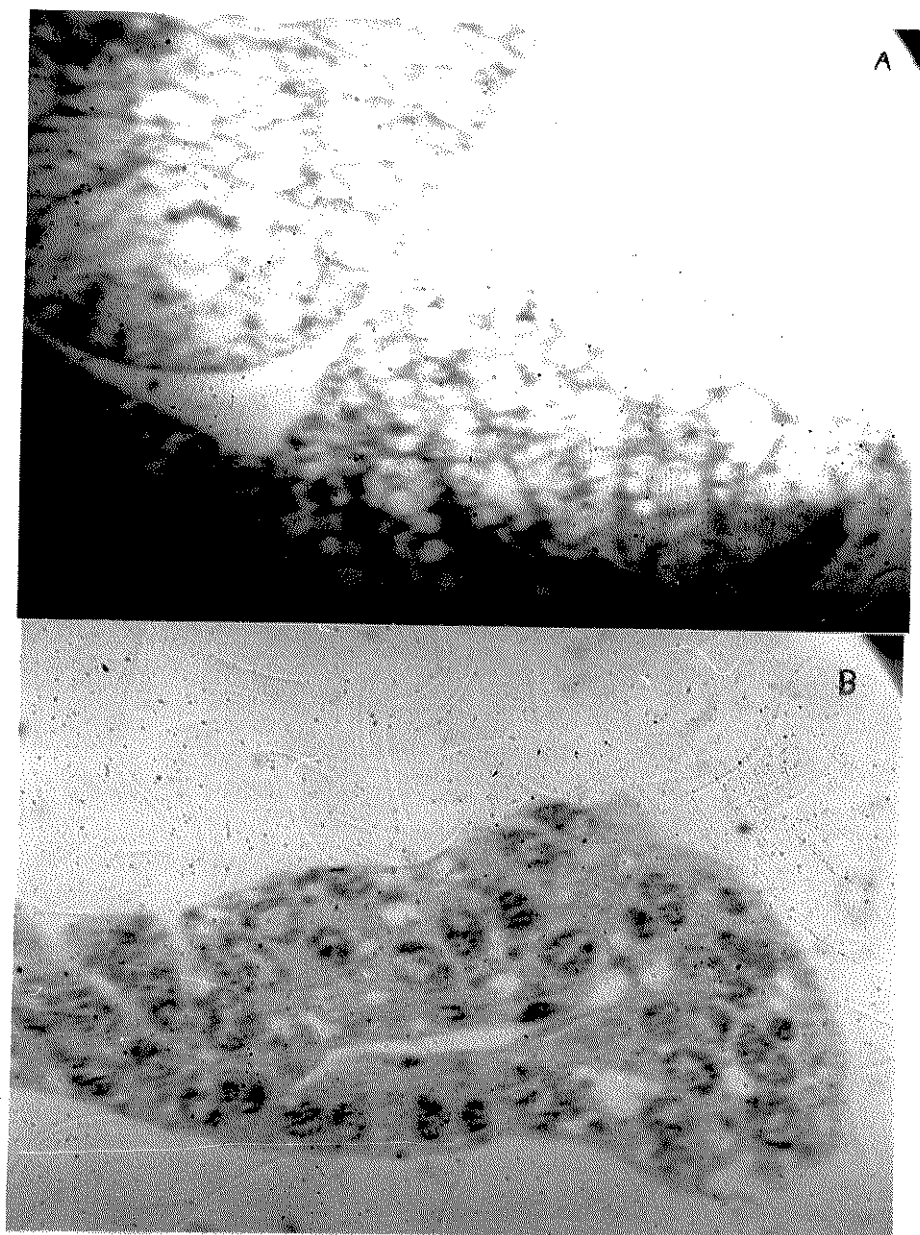


Fig. 13: Tecido adiposo de S. frugiperda

A. sadio

B. infectado por VPN

O processo histopatológico descrito para tecido adiposo é análogo para a epiderme, matriz traqueal, hemócitos e músculos (Figuras 14 e 15). Desta forma o quadro sintomológico típico, descrito como flacidez, é explicado, a nível tissular, pela perda de integridade devido à liquefação dos tecidos de sustentação como musculatura, epiderme e tecido adiposo.

Embora não se tenha determinado a sequência de ataque dos tecidos pelo vírus, os dados do presente trabalho demonstram que, 18 horas após a ingestão de alimento contaminado com elevada dosagem de VPN, já se observa poliedros nos núcleos do tecido adiposo, matriz traqueal e células de epiderme (Figuras 13, 14 e 15). Nesta fase a larva doente ainda não demonstrava paralisia. Este fato indica que os tecidos são atacados pelo vírus bem antes da manifestação dos sintomas clássicos de virose e demonstra a rapidez com que a partícula viral atravessa o intestino médio e atinge os tecidos mais susceptíveis do inseto.

Não se detectou a presença de poliedros nas células epiteliais do intestino médio de S. frugiperda na fase inicial de ataque dos tecidos por VPN. Esta observação está de acordo com a de Hamm (1968). Porém, sabe-se que, a nível desse epitélio, ocorre a replicação da partícula viral, antes que essa atravesse as células e comecem a atacar os tecidos. Harrap et al. (1977) e Harrap (1970) constataram que o vírus da poliedrose nuclear inicia o seu ciclo de replicação nas células do intestino médio, apenas algumas horas depois da ingestão de

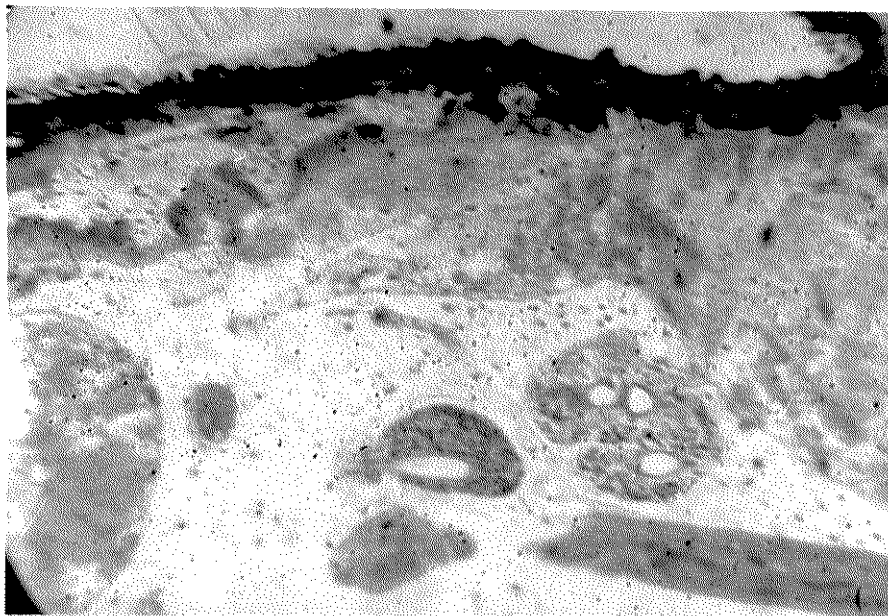


Fig. 14: Epiderme de larvas de S. frugiperda já com epitêlio destruído por ação de VPN

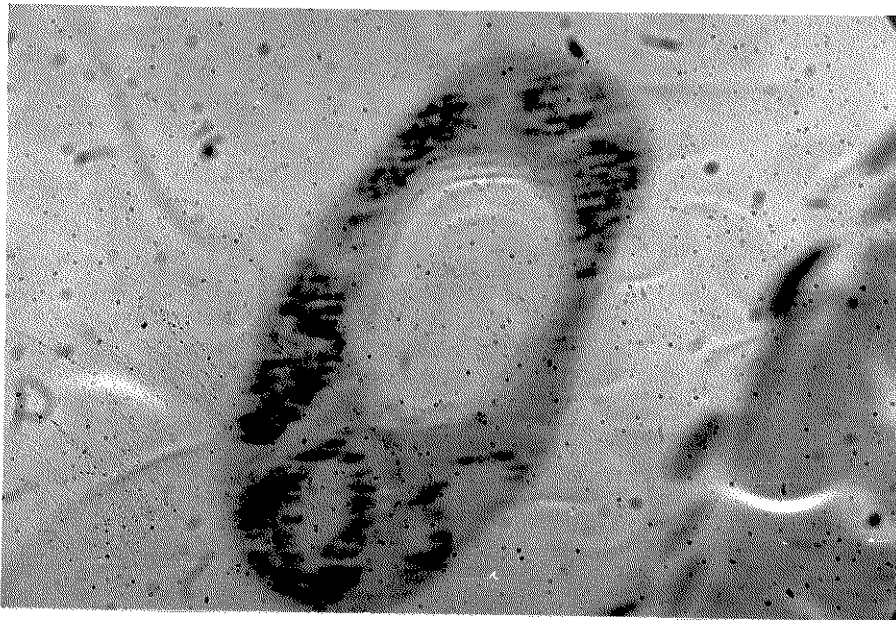


Fig. 15: Matriz traqueal de larvas de S. frugiperda
18 horas após infecção com VPN

poliedros pela larva e, após o que atravessa o epitélio e passa a infiltrar-se e a atacar os tecidos levando à degeneração dos mesmos e morte do inseto.

4.3.1.5. Perspectivas de controle de S. frugiperda usando-se VPN :

Atualmente, e em vista do rápido progresso das ciências ligadas à agropecuária em geral, e do controle de pragas, em particular, o homem busca meios de controle que sejam mais efetivos, econômicos e que menos alterem o ambiente e, com base nessa filosofia, procura montar sistemas de controle integrado para o manejo de pragas.

Dentro da perspectiva de controle integrado, nota-se um interesse crescente na utilização de vírus para o controle de insetos e ácaros. Esse interesse, de acordo com Falcon (1976) é consequência de pesquisas que demonstraram que os vírus são agentes patogênicos altamente seletivos, que não afetam o equilíbrio natural, são capazes de se automanter no ambiente e, portanto, ideais para o controle de insetos praga. Além disso, Steinhaus (1957), Brown^{J Swaine} (1965) e Kaya^{A Anderson} (1976) reforçam o papel da alta especificidade do grupo das VPN no controle de insetos.

Falcon (1976) também aponta, como causa importante do interesse na utilização de viroses, a possibilidade de obtenção de resultado efetivo de controle de espécies resistentes a inseticidas químicos. Os resultados obtidos por Girardeaux & Mitchell (1968), demonstrando que doses subletais

de VPN reduzem a DL_{50} de inseticida necessária para controlar Trichoplusia ni acrescentam à idéia de Falcon (1976) uma nova dimensão, indicando que a utilização de viroses, de maneira integrada com doses de inseticidas mais fracas do que as normalmente usadas, pode reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência a inseticidas químicos nas espécies alvo.

O valor da utilização do VPN para controle de larvas de S. frugiperda é mencionado por Hamm & Young (1977) em função da capacidade do vírus reduzir, de maneira efetiva, a densidade populacional de larvas jovens deste noctuídeo. Estas larvas mortas seriam uma fonte de vírus para larvas posteriores que poderiam contaminar o cartucho e espigas. Além disso, se o vírus for aplicado em combinação com doses moderadas de DDT, eliminaria as larvas resistentes ao inseticida químico, aumentando a efetividade do controle.

De acordo com os dados do presente trabalho, pode-se supor que, no Brasil, diante da constatação da ocorrência natural de virose no campo e das condições climáticas adequadas durante as safras do milho, há grande possibilidade de sucesso na utilização de VPN para o controle de larvas de S. frugiperda.

O fato de S. frugiperda demonstrar ser altamente resistente a B. thuringiensis, tanto quando aplicado isoladamente, como em combinação com inseticidas químicos, somado ao considerado baixo valor econômico da plantação, que, normalmente, não recebe nem mesmo tratamento químico, indica que a aplicação de VPN, de forma simples e econômica, com finalidade de provocar

epizootias nas populações de S. frugiperda pode constituir um método satisfatório de controle. Esta aplicação de VPN no campo, ao contrário das aplicações de defensivos químicos, não afetaria negativamente a fauna em geral e os inimigos naturais de S. frugiperda em particular.

Enfim, diante dos resultados obtidos no presente trabalho, para tentativas de controle microbiano e integrado, observa-se a elevada potencialidade de VPN na perspectiva de métodos modernos de controle de S. frugiperda.

4.3.2. Micose causada por Aspergillus parasiticus :

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foi detectada a ocorrência de micose em populações de S. frugiperda, caracterizando-se por mortalidade precoce de indivíduos no estágio adulto e posterior emergência de conidióforos sobre o corpo das mariposas.

Esta micose foi estudada paralelamente (Garcia & Habib, 1978) revelando as condições que favoreciam a sua ocorrência, juntamente com observações sobre a sintomatologia, isolamento, purificação e identificação do fungo entomopatogênico.

Garcia & Habib (1978) concluíram que o fungo responsável pela doença é Aspergillus parasiticus e que a morte manifesta-se apenas nos adultos sendo a única via de infecção do fungo, capaz de provocar esse efeito, a infecção de larvas via oral.

Embora A. parasiticus tenha se manifestado em baixa incidência como parasita de S. frugiperda, o que indica a sua baixa potencialidade como fator capaz de alterar significativamente a densidade populacional da espécie, deve-se lembrar que, sob condições favoráveis para o desenvolvimento do fungo, A. parasiticus pode tornar-se um fator de mortalidade de real importância.

Na natureza, A. parasiticus ocorre em populações de S. frugiperda e certamente, de alguma forma, influi na densidade populacional deste noctuídeo, juntamente com outros fatores que, por serem pouco visíveis, normalmente passam despercebidos, como por exemplo bacterioses, protozooses, viroses enzoóticas, etc., que atuam juntamente com fatores mais evidentes como parasitos e predadores na dinâmica populacional de S. frugiperda.

Habib & Patel (1979) demonstraram o papel de dois himenópteros parasitos, Campoletis grioti e Chelonus texanus, como inoculadores e dispersores de A. parasiticus em populações de S. frugiperda no campo. Nesse caso, o fungo causa morte às larvas e não aos adultos de S. frugiperda. Os mesmos autores mencionam ainda que o fungo em questão não representa uma ameaça aos parasitos mencionados, pois apenas 12,3 % de larvas parasitadas por C. texanus e 30,7 % das parasitadas por C. grioti sofreram o efeito da micose. Pode-se portanto, considerar que, este conjunto de fatores bióticos de mortalidade, atuando de maneira integrada, com ou sem interdependência, afetam significativamente a dinâmica populacional de S. frugiperda no campo.

4.3.3. Bacteriose causada por Pseudomonas aeruginosa :

Durante os meses em que as condições de temperatura e umidade relativa eram sensivelmente elevadas, notou-se a incidência de bacteriose, causando um índice de mortalidade ao redor de 10 % em larvas de 5ª e 6ª estádios de S. frugiperda.

As larvas com bacteriose apresentavam-se opacas , com o abdome branco, enquanto que as regiões intersegmentares e ao redor dos espiráculos eram marrom escuras. Dorsalmente, notava-se um tom róseo. A ocorrência de diarreia nas larvas doentes evidenciou sintomas de distúrbio intestinal e destruição das células epiteliais do intestino médio, possibilitando assim, a invasão da cavidade do corpo pelo patógeno. Com o desenvolvimento da septicemia, o corpo tornava-se flácido , indicando a destruição dos tecidos. A resposta ao toque e o deslocamento eram lentos, evidenciando o início da paralisia. No estágio pré-mortal notou-se uma acentuação na flacidez e escurecimento do tegumento. A hemolinfa tornou-se viscosa e de cor creme opaco, diferente do verde claro cristalino da hemolinfa de larvas sadias. Após a morte, que ocorria entre 3 a 4 dias, o inseto adquiriu cor marrom escura.

A inoculação de hemolinfa de larvas moribundas em placas de Petri com agar nutriente, usando-se a técnica do esgotamento, resultou, após 24 horas de incubação a 27°C, em crescimento bacteriano abundante de colônias branco amareladas, brilhantes e lisas .

Esfregaços de amostras dessas colônias demonstraram que tratava-se de uma bactéria bastoniforme, Gram negativa que apresenta-se, geralmente, aos pares ou em pequenas cadeias lineares.

A análise comparativa da sintomatologia da doença e afinidade cromática da bactéria com a descrição do quadro septicêmico citado por Steinhaus (1963), Burgues & Hussey (1971) e Habib (1978) indicam tratar-se de uma bactéria do gênero Pseudomonas provavelmente a espécie Pseudomonas aeruginosa.

Esta bactéria que não forma esporo, é considerada potencialmente patogênica, pois não possui poder invasivo que lhe possibilite a penetração da membrana peritrófica do intestino médio e é encontrada frequentemente como comensal no intestino médio de muitos insetos. A membrana peritrófica normalmente funciona como barreira mecânica eficiente para bactérias. Entretanto, a integridade do epitélio intestinal pode ser rompida por uma série de outros fatores que não a atividade de P. aeruginosa, como por exemplo, infecções com gregarinas, nematodas, microsporídeos, vírus, etc. As atividades desses organismos possibilitariam a passagem da bactéria do intestino para a hemolinfa, onde provocaria septicemia resultando em morte do inseto.

A textura do alimento e a ingestão acidental de abrasivos podem facilmente causar traumatismos na parede do intestino, funcionando, assim, como fatores mecânicos que facilitariam a septicemia por P. aeruginosa.

P. aeruginosa produz proteases extracelulares altamente tóxicas. A septicemia e morte do inseto, de acordo com Lysenko & Kúcera (1971) ^{apud Borges & Hussey (1970)} podem ocorrer devido ao efeito da proteína tóxica de função enzimática que, atuando na hemolinfa, degradaria as proteínas sensíveis à sua atividade. A ausência dessas proteínas vitais na hemolinfa do inseto resultaria em morte do mesmo. E também possível que os produtos tóxicos resultantes das atividades proteolíticas da enzima estranha sejam responsáveis pela morte do inseto.

No caso observado no presente trabalho, não se detectou, com exatidão, o fator indutor da septicemia. Entretanto, em nenhum dos esfregaços constatou-se a presença de outro agente estranho que não a bactéria em questão. Porém, esse fato não anula a hipótese de qualquer infecção leve por algum dos agentes já citados, ou de qualquer outro agente estressor não biótico ter funcionado como indutor de septicemia por P. aeruginosa em larvas de S. frugiperda.

No laboratório, onde se procurava manter as condições de assepsia no sentido de se evitar a ocorrência de doenças, o índice de mortalidade por bacteriose foi relativamente baixo. Porém, pode-se supor que, em condições naturais, P. aeruginosa, associada com outros fatores bióticos e ou abióticos, pode causar um índice significativo de mortalidade, atuando, assim, de maneira efetiva sobre a dinâmica populacional de S. frugiperda.

5. CONCLUSÕES

1. Bacillus thuringiensis é compatível com paratiom metílico e piretrina nas dosagens recomendadas quando combinados in vitro.
2. As larvas de Spodoptera frugiperda são pouco susceptíveis ou mesmo resistentes a B. thuringiensis.
3. Há grande possibilidade do fator responsável pela inibição de B. thuringiensis em S. frugiperda ser de natureza química e estar presente no suco gástrico do inseto.
4. O antagonismo observado como efeito das combinações de B. thuringiensis com paratiom e piretrina demonstra a ineficiência desse tipo de combinação, embora, in vitro, tenha-se constatado o elevado grau de compatibilidade entre os inseticidas químicos e o patógeno em questão.
5. A combinação do inseticida piretrina com dosagens subletais de paratiom metílico resulta em fraca potencialização de efeito.
6. As populações de S. frugiperda, tanto no campo como no laboratório, sofrem doenças infecciosas.

7. A virose causada por VPN ocorreu com incidência relativamente alta na população, indicando susceptibilidade das larvas de S. frugiperda a esse patógeno.
8. Pode-se recomendar a aplicação de VPN para o controle de S. frugiperda no campo; ou em dosagens baixas capazes de provocar epizootias a longo prazo, ou combinado com inseticidas químicos, ambos em dosagens baixas.
9. É importante que os métodos de controle de insetos no campo não perturbem o equilíbrio natural e possibilitem a atuação dos vários fatores bióticos de mortalidade.
10. Aspergillus parasiticus é um patógeno que atinge as populações de S. frugiperda tanto no estágio adulto como no estágio larval. Cada caso com determinados pré-requisitos.
11. Pseudomonas aeruginosa representa um fator de mortalidade nas criações de laboratório de S. frugiperda.

6. RESUMO

Larvas de S. frugiperda, no presente trabalho, foram submetidas a vários testes para avaliação de suas respostas a inseticidas microbianos e químicos.

As larvas de S. frugiperda podem ser consideradas resistentes à ação de B. thuringiensis, tanto quando aplicado isoladamente, como quando em combinações com paratiom metílico e piretrina.

As possíveis razões da resistência de larvas de S. frugiperda a B. thuringiensis concentram-se em fatores inerentes ao suco gástrico do inseto. Não se deve aconselhar o controle desse noctuídeo por B. thuringiensis. A combinação de piretrina com dosagens subletais de paratiom metílico tem efeito potencializador de mortalidade sobre larvas de S. frugiperda.

Populações de S. frugiperda, tanto no campo, como no laboratório, foram afetadas por algumas doenças infecciosas. Essas doenças foram causadas por vírus (VPN), fungo (A. parasiticus) e bactéria (P. aeruginosa). Este fato estimula a recomendação da utilização de vírus no controle e revela a importância de não se perturbar a manifestação natural de fatores bióticos de controle.

7. SUMMARY

Larvae of Spodoptera frugiperda, in the present work , were tested to evaluate their responses to some microbial and chemical insecticides.

The larvae of this insect species can be considered as resistant to the action of Bacillus thuringiensis, when applied alone as well as in combinations with parathion or pyrethrum.

The resistance of S. frugiperda to B. thuringiensis may be caused by some reasons, all associated with the gastric juice of the insect. B. thuringiensis can not be recommended to the control of S. frugiperda larvae.

The combination of pyrethrum with sublethal doses of parathion showed potentiation effect on the larvae.

In the field, as well as in the laboratory, populations of S. frugiperda suffered some infectious diseases. These diseases were caused by virus (NPV), fungi (A. parasiticus) and bacteria (P. aeruginosa). This fact stimulates the recommendation to utilize this virus in the control of this insect species, and also shows the importance in protecting the natural biotic mortality factors.

7. SUMMARY

Larvae of Spodoptera frugiperda, in the present work , were tested to evaluate their responses to some microbial and chemical insecticides.

The larvae of this insect species can be considered as resistant to the action of Bacillus thuringiensis, when applied alone as well as in combinations with parathion or pyrethrum.

The resistance of S. frugiperda to B. thuringiensis may be caused by some reasons, all associated with the gastric juice of the insect. B. thuringiensis can not be recommended to the control of S. frugiperda larvae.

The combination of pyrethrum with sublethal doses of parathion showed potentiation effect on the larvae.

In the field, as well as in the laboratory, populations of S. frugiperda suffered some infectious diseases. These diseases were caused by virus (NPV), fungi (A. parasiticus) and bacteria (P. aeruginosa). This fact stimulates the recommendation to utilize this virus in the control of this insect species, and also shows the importance in protecting the natural biotic mortality factors.

8. BIBLIOGRAFIA

ALLEN, H.W. - 1921

Notes on a bombylid and a polyhedral disease of the southern grass worm, Laphygma frugiperda.

J. Econ. Ent., 14 : 510 - 511.

ALLEN, G.E. & IGNOFFO, C.M. - 1969

The nucleopolyhedrosis virus of Heliothis ;
Quantitative In Vivo estimates of virulence.

J. Invert. Pathol., 13 : 378 - 381.

ALMEIDA, P.R.; CAVALCANTE, R.D. & SORDI, G. - 1964

Ensaio com inseticidas modernos no controle ã lagarta dos
milharais, Laphygma frugiperda (Smith, Abbot, 1797) e
técnica de aplicação.

O Biológico, 30 : 111 - 114.

ALTAHTAWY, M.M. & ABALESS, I. M. - 1972

Compatibility of the bioinsecticide Thuricide 90-TS flowable
with insecticides used in the chemical control of Spodoptera
littoralis (Boisd.)

Bull. Ent. Soc. Egypt, 6 : 239 - 245.

AMANTE, E. 1962

Indicação para o controle das lagartas dos trigais.

O Biológico, 28 (8): 236 - 237.

ANGUS, T.A. 1956

Association of toxicity with protein crystalline Inclusions
of Bacillus sotto Ishiwata.

Can. Jour. Micro., 2 : 122 - 131

BERTELS, A.M. 1956

Fragas de milho, métodos de defesa.

Bol. Tec. Inst. Agron. Sul., 16 : 1 - 18.

BERTELS, A.M. & ROCHA, M.A.B. 1950

Observações preliminares sobre pragas de milho.

Agros. Pelotas. R. Grande Sul., 3 (3): 160 - 183.

BRATTSTEN, L.B. & WILKINSON, C.F.- 1977

Herbivore - plant interactions: Mixed function oxidases
and secondary plant substances.
Science, 196 : 1349 - 1352.

BOX, H.E. & VIDELA, R.P. - 1952

Apuntes sobre el hongo entomogeno Beauveria bassiana
(Mont)Vuill., parasito de Diatraea en Venezuela.
Agron. Tropical, 1, (3): 233 - 236.

BROWN, E.S. & SWAINE, G. - 1965

Virus disease of the african armyworm, Spodoptera exempta.
Bull. Entomol. Research, 56 : 95 - 116.

BURGUES, H.D. & HUSSEY, N.W. - 1971

Microbial control of insects and mites.
Academic Press, NY, 861 pp.

CANIU, E. & WOLFERIBARGER, D.A. - 1970

Toxicity of three pyrethroids to several insect pests
of cotton.
J. Econ. Ent., 63 (4): 1373 - 1374.

----- - 1972

Toxicity of esters of cis-trans-(+)-2,2-Dimethyl-3-(2-
methyl propenyl)cyclo propanecarboxylic acid to the
tobacco budworm, fall armyworm and bollworm.
J. Econ. Ent., 65 (2): 615 . 617.

CASIDA, J.E. - 1973

Pyrethrum, the natural insecticide.
Academic Press, NY & London, 329 pp.

CHAPMAN, J.W. & GLASER, R.W. - 1915

A preliminary list of insects which have wilt, with a
comparative study of their polyhedra.
J. Econ. Ent., 8 (2): 140 - 150.

CHEN, K.S.; FUNKE, B.R. ; SCHULTZ, J.T.; CARLSON, R.B. & PROSHOLD, F.I. 1974

Effect of certain organophosphate and carbamate insecticides
on Bacillus thuringiensis .
J. Econ. Ent., 67 (4): 471 - 473.

- FAUST, R.M. - 1968
In vitro chemical reaction of the δ endotoxin produced by Bacillus thuringiensis var. dendrolimus with other proteins.
J. Invert. Pathol., 11 : 465 - 475.
- FAUST, R.M.; DOUGHERTY, E.M.; HEIMPEL, A.M. & REICHELDERFER, C.F. 1971
Standardization of the δ endotoxin produced by several varieties of Bacillus thuringiensis. I. Enzyme kinetics of the trypsin - azoalbumin - δ endotoxin system.
J. Econ. Ent., 64 (3): 610 - 615.
- FIGUEIREDO, M.B.; COUTINHO, J.M. & ORLANDO, A. - 1960
Novas perspectivas para o controle biológico de algumas pragas com Bacillus thuringiensis.
Arq. Inst. Biol, 27 : 78 - 86.
- FONSECA, J.P. - 1937
Lagartas nocivas aos milharaes, capinzaes, alfafaes e algodoaes.
O Biológico, 3 (2): 45 - 50.
- FRANZ, J.M. - 1961
Biological control of pests insects in Europe.
Ann. Rev. Entomol., 6 : 183 - 200.
- GARCIA, M.A. & HABIB, M.E.M. - 1978
Ocorrência do fungo entomógeno Aspergillus parasiticus em adultos de S. frugiperda
Anais da S.E.B. 7(1): 15-19.
- GIRARDEAUX, J.H. & MITCHELL, E.R. - 1968
The influence of a sub-acute infection of polyhedrosis virus in the cabbage looper on susceptibility to chemical insecticides
J. Econ. Ent. 61 (1): 312 - 313.
- GOLDEY, C.C. - 1921
The fall armyworm Laphygma frugiperda (S & A).
Ent.Circ. Jamaica. Dept. Agric. (Kingston) nº4, 4pp.
- GOVINDARAJAN, R.; JAYARAJ, S. & NARAYANAN, K. - 1975
Observations on the nature of resistance in Spodoptera litura (Lepidoptera, Noctuidae) to infection by Bacillus thuringiensis Berliner.
Indian J. of Exp. Biology. 13 : 548 -550.

- GOVINDARAJAN, R.; JAYARAJ, S. & NARAYANAN, K. - 1976
Mortality of the tobacco caterpillar, Spodoptera litura
when treated with Bacillus thuringiensis combinations
with boric acid and insecticides.
Phytoparasitica 4 (3) : 193 - 196 .
- HABIB, M.E.M. - 1977
Contribution to the biology of Alabama argillacea
(Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae).
Z. ang. Ent. 84, 412 -418.
- HABIB, M.E.M. - 1978
A bacterial disease of the american cotton leafworm,
Alabama argillacea (Hübner, 1818) (Lepidoptera, Noctuidae).
Z. ang. Ent. 85, 76 - 81 .
- HABIB, M.E.M. & GARCIA - 1976
Susceptibility tests of the house fly adults,
Musca domestica to Bacillus thuringiensis.
Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 5 (2) : 194 -199.
- HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. - 1977
Epizootia em larvas de Brassolis sophorae causada por
Beauveria bassiana, com estudos de sintomatologia e identi-
ficação.
Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 6 (2) : 230- 237.
- HABIB, M.E.M. & PATEL, P.N. - 1977
Biology of Heliothis virescens (F. ,1781)
(Lepidoptera, Noctuidae) on two host plants in the
laboratory.
Indian J. Agric. Sci. 47 (11) ; 537 - 539.
- HABIB, M.E.M. & PATEL, P.N. - 1979
Two hymenopterous parasites, as inoculators and dispersal
agents of Aspergillus parasiticus in populations of
Spodoptera frugiperda (Abbot & Smith, 1797) (Lepidoptera,
Noctuidae).
R. Biol. Tropical (no prelo).

- HALL, I.N.; HALE, R.L.; SHOREY, H.H. & ARAKAWA, K.Y. - 1961
Evaluation of chemical and microbial materials for control of cabbage looper.
J. Econ. Ent. 54 , 141 -146 .
- HAMM, J.J. - 1968
Comparative histopathology of a granulosis and a nuclear polyhedrosis of Spodoptera frugiperda
J. Invertebrate Pathol. 10 : 320 - 326.
- HAMM, J.J. & YOUNG, J.R. - 1971
Value of viruses Presilk treatment for corn earworm and fall armyworm control in sweet corn.
J. Econ. Ent. 64 (1) : 144
- HANNAY, C.C. - 1953
The protein crystals of Bacillus thuringiensis Berliner.
Can. J. Microbiol. 1 : 694 - 710 .
- HARRAP, K.A. - 1970
Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus.
Virology, 42 : 311 - 318.
- HARRAP, K.A.; PAINE, C.C.; & ROBERTSON, J.S. - 1977
The properties of three baculoviruses from closely related hosts.
Virology, 79 : 14 - 31 .
- HENDERSON, C.F. & TILTON, E.W. - 1955
Tests with acaricides against the brown wheat mite.
J. Econ. Ent. 48 (2) : 157 -161 .
- HEPFS, V.W. - 1965
Die verträglichkeit von Bacillus thuringiensis preparaten mit chemischen Pflanzenschutzmitteln und beinstoffen
Zeit. fur Pflanzenkrankheiten, Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz. 72 : 584 - 599.

HICHINS, N.O. & RABINOVICH, J.E. - 1974

Fluctuaciones de la población de larvas de cinco especies de noctuidos de importancia económica asociada a alfafa en el Valle de Lluta.

Idesia, 3 : 36 -79 .

HITCHINGS, D.L. - 1967

Bacillus thuringiensis : A reproduction inhibitor for southern armyworm.

J. Econ. Ent. (Scientific notes) April, 596 - 597.

HOROVITZ, S. - 1960

Trabajos en marcha sobre resistencia a insectos en el maize.

Agron. Tropical (Maracay), 10 (3) : 107 -114 .

IGNOFFO, C.M. & GRAHAM, H.M. - 1967

Laboratory and field cage tests with Bacillus thuringiensis against pink bollworm larvae.

J. Invertebrate Pathology 9 : 390 - 394 .

JANES, M.J. -1973

Corn earworm and fall armyworm occurrence and control on sweet corn ears in South Florida.

J. Econ. Ent. 66 (4) : 973-974

JANES, M.J. & GREEN, G.L. - 1969

Control of fall armyworms and corn earworms on sweet corn ears in central and south Florida.

J. Econ. Ent., 62 (5): 1031 - 1033

1972

Corn earworm control on sweet corn in Central and South Florida, 1969 - 1970.

J. Econ. Ent., 65 (2): 521 - 522.

KAYA, H.K. & ANDERSON, J.F. - 1976

Biotic mortality factors in Dark Tussock Moth populations in Connecticut.

Environ. Entomol., 5 (6): 1141 - 1145.

KUSHNER, D.J. & HARVEY, G.T. - 1962

Antibacterial substances in leaves; their possible
role in insect resistance to disease.

J. Insect Pathol., 4 : 155 - 184.

LEIDERMAN, L. & SAUER, H.F.G. - 1953a

A lagarta dos milharaes (Laphygma frugiperda (Abbot
& Smith, 1797)

O Biológico, 19 (6): 105 - 113.

1953b

Resultados preliminares do controle à Laphygma frugiperda
no milho.

O Biológico, 19 (7): 121 - 126.

LIMA, A.M. DA COSTA -1950

Insetos do Brasil

6ª tomo. Lepidópteros. 2a. parte.

E.N.A.M.A. 420 pp.

LUGINBILL, P. - 1928

The fall armyworm

U.S.D.A. Washington Tech. Bull., 34 : 1 - 91.

MADELIN, M.F. - 1960

Internal fungal parasites of insects.

Endeavour, 19 : 181 - 190.

MARANOSCH, K. - 1977

The atlas of insect and plant virus.

Academic Press, NY & London, 478 pp.

MARICONI, F.A.M. - 1963

Inseticidas e seu emprego no combate às pragas.

Aditora Agronômica Ceres, S.Paulo, 607 pp.

1976

Inseticidas e seu emprego no controle às pragas.

(com uma introdução ao estudo dos insetos)

Tomo 1: Defensivos. 3a. edição. Livraria Nobel SA, 305pp.

- McMILLIAN, W.W. & STARKS, K.J. - 1966
Feeding responses of some noctuid larvae (Lepidoptera)
to plants extracts.
Ann. Ent. Soc. Amer., 59 (3): 516 - 519.
- MOORE, I. & NAVON, A. - 1973
Studies of the susceptibility of the cotton leafworm
Spodoptera littoralis (Boisduval), to various strains
of Bacillus thuringiensis .
Agric. Res. Org., 1 (1): 23 - 32.
- MORRIS, O.N. - 1969
Susceptibility of several forest insects of British
Columbia to commercially produced Bacillus thuringiensis.
II. Laboratory and field pathogenicity tests.
J. Invert. Pathol., 13: 285 - 295.
- 1975
Effect of some chemical insecticides on the germination
and replication of commercial Bacillus thuringiensis.
J. Invert. Pathol., 26 (2): 199 - 204.
- 1977
Compatibility of 27 chemical insecticides with Bacillus
thuringiensis var. kurstaki.
Can Ent., 109: 855 - 864.
- MORRIS, O.N. & ARMSTRONG, J.A. - 1975
Preliminary field trials with Bacillus thuringiensis
- chemical insecticides combinations in the integrated
control of the spruce budworm, Choristoneura fumiferana
(Lepid., Tortricidae).
Can. Ent., 107 : 1281 - 1288.
- MURPHY, D.W. - 1976
Bacillus thuringiensis enzyme digested delta endotoxin:
Effect on cultured insect cells.
Science, 194 : 954 - 956.

- NARAYANAN, K.; GOVINDARAJAN, R.; SUBRAMANIAN, T.R. & JAYARAJ, J - 1976a
pH of blood and gut contents of lepidopterous insects
and its relation to pathogenicity of two bacterial
pathogens.
Ind. J. Micro., 73 : 65 - 69.
- NARAYANAN, K.; JAYARAJ, S. & GOVINDARAJAN, R. - 1976b
Further observations on the mode of action of Bacillus
thuringiensis on Papilio demoleus and Spodoptera litura.
J. Invert. Pathol., 28 : 269 - 270.
- NEWSON, L.D. & SMITH, C.E. - 1949
Destruction of certain insect predators by applications
of insecticides to control cotton pests.
J. Econ. Ent., 42 (5): 904 - 908.
- PAINTER, R.H. - 1968
Insect resistance in crop plants.
The University Press of Kansas. Lawrence & London, 520 pp.
- PEREIRA, H.L. - 1971
A lagarta - Spodoptera frugiperda (Smith & Abbot, 1797)
nos algodões do Paraná.
Arg. Biol. Tecnol. S. Paulo, 14 (1): 6 - 7.
- PRISTAVKO, V.P. & DOVZHENOK, N.V. - 1974
Ascorbic acid influence on larval blood cell number and
susceptibility to bacterial and fungal infection in the
codling moth, Laspeyresia pomonella (Lepidoptera, Tortri
cidae).
J. Invert. Pathol., 24 : 165 - 168.
- RAJARAJE, U.N.V.; GOVINDU, H.L. & SHASTRY, K.S.S. - 1976
The effects of certain insecticides on the entomogenous
fungi, Beauveria bassiana and Metarrhizium anisopliae.
J. Invert. Pathol., 9: 398 - 403.

- RAUN, E.S.; SUITER, E.R. & REVELO, M.A. - 1966
Ecological factors affecting the pathogenicity of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis to the European corn borer and fall armyworm.
J. Invert. Pathol., 8: 365 - 375.
- ROCKSTEIN, M. - 1974
The physiology of insecta.
Vol. 6. 2nd. edition.
Academic Press. NY & London, 548 pp.
- POSE, A.H.; SILVERSIDE, R.H. & LINDQUIST, O.H. 1975
Migration flight by an aphid Rhopalosiphum maidis (Homoptera, Aphidae) and a noctuid Spodoptera frugiperda (Lepidoptera, Noctuidae).
Can. Ent., 107 (6): 567 - 576.
- SEKUL, A.A. & SPARKS, A.N. - 1967
Sex pheromone of the fall armyworm moth: Isolation and synthesis.
J. Econ. Ent., 60 (5): 1270 - 1272.
- SMIRNOFF, W.A. - 1973
The possible use of Bacillus thuringiensis plus chitinase formulation for the control of spruce budworm outbreaks.
J. NY. Entomol. Soc., 81 (4): 196 - 200.
- 1974
Sensibilité de Lambdina fiscellaria (Lepid., Geometridae) à l'infection par Bacillus thuringiensis Berliner seul ou en présence de chitinase.
Can. Ent., 106 : 429 - 432.
- 1977
Confirmations expérimentales du potentiel du complexe Bacillus thuringiensis et chitinase pour la répression de la tordeuse bourgeons de l'épinette, Choristoneura fumiferana (Lepid., Tortricidae).
Can Ent., 109 : 351 - 358.

- SNOW, J. W. ; YOUNG . J. R. LEWS, W.J. & JONES R. L. - 1972
Sterilization of adult fall armyworm by gamma irradiation
and its effect on competitiveness.
J. Econ. Ent. 65 (5) : 1431 -1433.
- STEINHAUS, E. A. - 1956
Microbial control - the emergence of an idea.
Hilgardia, 26 , 107 - 160 .
- - 1957
New records of insect-virus diseases .
Hilgardia, 26 (7) : 417 -430
- - 1963
Insect Pathology . An advanced treatise
vol. 1 - 661 pp , vol. 2 - 689 pp
Academic Press, New York and London .
- STEINHAUS, E.A. & MARSH, G.A. - 1962
Report of diagnoses of diseased insects 1951 - 1961.
Hilgardia, 33 : 349 - 490.
- STEWART, P.A. - 1970
Effect of traps equipped with black light lamps on infestations
of lepidopteran larvae in field corn ears.
J. Econ. Ent., 63 (6): 1974
- SUTTER, G.R. & RAUN, E.S. -1967
Histopathology of European borer larvae treated with
Bacillus thuringiensis .
J. Invert. Pathol., 9 : 90 - 103.
- SUTTER, G.R.; ABBRAHAMSON, M.D.; HAMILTON, E.W. & VICK, I.D. - 1971
Compatibility of Bacillus thuringiensis and chemical
insecticides. 1. Effect of insecticides doses on bacterial
replication rate.
J. Econ. Ent., 64 (6): 1348 - 1350.
- THOMAS, G.M. & POINAR, G.O. - 1973
Report of diagnosis of diseased insects 1962 - 1972.
Hilgardia , 42 : 261 - 360.

YOUNG, J.R. & COX, H.C. - 1965

Evaluation of apholate and tepa as chemosterilants
for the fall armyworm.

J. Econ. Ent., 58 (3): 883 - 888.

YOUNG, J.R. & HAMM, J.J. - 1966

Nuclear polyhedrosis virus in control of corn earworm
and fall armyworm in sweet corn.

J. Econ. Ent., 59 (2): 382 - 384.

YOUNG, J.R.; SNOW, J.W. & SPARKS, A.N. - 1968

Mating of untreated and tepa chemosterilized fall
armyworm moth.

J. Econ. Ent., 61 (3): 657 - 661.

WISEMAN, B.R.; McMILLIAN, W.W. & BOWMAN, M.C. - 1970

Retention of laboratory diets containing corn kernels
or leaves of different ages by larvae of the corn earworm
and the fall armyworm.

J. Econ. Ent., 63 (3): 731 - 732.