

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**INTERAÇÕES DE AGENTES NATURAIS
NO CONTROLE POPULACIONAL DE *Spodoptera frugiperda*
Smith (1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM MILHO
(*Zea mays*)**

Walter José Rodrigues Matrangolo

**SÃO CARLOS - SP
2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

INTERAÇÕES DE AGENTES NATURAIS

NO CONTROLE POPULACIONAL DE *Spodoptera frugiperda*

Smith (1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM MILHO

(*Zea mays*)

Walter José Rodrigues Matrangolo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS - SP

2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M433ia

Mantrangelo, Walter José Rodrigues.

Interações de agentes naturais no controle populacional de *Spodoptera frugiperda* Smith (1797) (Lepidoptera:Nocturidae) em milho (*Zea mays*)// Walter José Rodrigues Mantrangelo. -- São Carlos : UFSCar, 2003.
113 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Controle natural . 2. Milho. 3. Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN). 3. *Campoletis flavicincta*. 4. Zapalote Chico. 5. Doruluteipes. 6. Biodiversidade I. Título.

CDD: 574.87322 (20^a)

Orientadora:

Profa. Dra. Angélica M. Penteado-Dias

Co-orientador:

Prof. Dr. Ivan Cruz

Dedico**este trabalho:**

À minha companheira e
companheiros de caminhada Mônica,
Lucas e Gabriel, pelo
muito que já foi
e por tudo
que virá
...

"Dir-vos-ão que o Universo é um prodígio de sabedoria, de harmonia, de beleza, e que já na penetração das leis superiores se realiza a união da Ciência, da Arte e da Religião, pela visão de Deus na sua obra. Chegado a essas alturas, o estudo converte-se em contemplação e o pensamento em prece!"

(Ramatis)

Ofereço aos meu pai Walter e minha mãe Maria, pelo muito que fizeram e fazem.

Cultura é
tudo aquilo que a gente se
lembra após ter esquecido o que
leu. É uma atitude que se aperfeiçoa
no contato com a arte. Cultura
não é aquilo que
entra
pelos
olhos, é
o que modifica o olhar.

José Paulo Paes (1926-1998)

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela oportunidade de vivenciar através dos insetos, poucos belos momentos de algumas de suas infinitas criações.

À **Profa. Dra. Angélica Maria Penteado-Dias**, pela confiança, amizade, apoio, paciência e orientação.

Ao **Dr. Ivan Cruz** pela confiança, amizade, apoio, paciência e orientação.

Aos companheiros e companheiras Ivan, Angélica, Manoel, Carlão, Alaíde, Josué, Nivar, pela presença sempre positiva nos momentos-chave desse trabalho.

À **Profa. Dra. Michèle Sato**, pela amizade e pela clareza que a luz de seu candeeiro trouxe para minha casa mental.

À **Dra. Kátia Resende Netto Cirelli** pelo enorme e imprescindível apoio nos derradeiros momentos deste trabalho.

Ao **Dr. Antônio Carlos Oliveira** pelo apoio nas análises estatísticas.

Às **Dras. Denise Scatolini e Sandra Maria Pasenow Braga** pela amizade e colaboração nos árduos e belos meandros da taxonomia de Hymenópteros.

Aos amigos e técnicos da Embrapa Milho e Sorgo **Antônio Eustáquio Alves, Carla Moreira de Faria, Geraldo Magela da Fonseca, Gisela de Avellar, Ismael Moreira Maciel, Isaias Tadeu Barbosa Duarte, Mauro Paulinelli, Osmar Santana, Osni Alves da Silva, Márcio da Costa Teodoro, Paulo Roberto de Almeida, Tânia Mara Assunção Barbosa, Waldemar Maria da Silva e a todos amigos da Embrapa Milho e Sorgo**, pela ótima qualidade da convivência que cada um sempre proporcionou-me, nesse longo e agradável período de proximidade.

Aos amigos pós-graduandos **Luzinério, Fausto, Américo, Miguel, Lurdinha e Marilena** pelo estímulo que me deram ao demonstrarem dedicação e ética na condução dos trabalhos.

Aos **amigos e amigas estagiários e estagiárias**, pelo apoio sempre indispensável, e pela alegria renovadora.

Ao **Eng. Agrônomo Alessandro Gazzinelli** pela ajuda na condução dos trabalhos.

Ao **Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos**, e em especial, ao **Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais**, pelas condições oferecidas para a realização do curso.

À **Maria de Lourdes Figueiredo**, pela amizade e pela ajuda ao fotografar o material de laboratório.

À **Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro concedido através de bolsa de estudo.

À toda **Diretoria EMBRAPA Milho e Sorgo**, pelos préstimos dispensados no desenvolvimento dos trabalhos práticos.

Aos queridos amigos e filhotes **Lucas e Gabriel** pela infinita alegria e enorme estímulo que trouxeram aos tempos do doutoramento. Ao irmão e amigo **Carlos Augusto Rodrigues Matrangolo** pelo estímulo e pela ajuda na triagem do material entomológico. À minha mãe **Maria Rodrigues Garcia Matrangolo** e ao meu pai **Walter Matrangolo** pelo amor, carinho e exemplo de vida. Ao cunhado e amigo **Ailton de Castro** pelas incontáveis “forças” dispensadas, com a sempre incomum boa vontade.

À querida **Mônica**, pelo indispensável apoio técnico na revisão de textos e pelos exemplos de sabedoria para com a vida, que muito ampararam-me na conclusão do trabalho.

Enfim, todos que contribuíram diretas ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 Introdução geral	1
1.1 As inter-relações entre organismos no controle de pragas	1

1.2 O milho Zapalote Chico (<i>Zea mays</i>).....	2
1.3 O parasitóide <i>Campoletis flavicincta</i> (Ashmead).....	3
1.4 O Vírus da Poliedrose Nuclear de <i>Spodoptera frugiperda</i> Smith (Lepidoptera: Noctuidae).....	4
1.5 Objetivo do trabalho	4
1.6 Resumo dos capítulos.....	6

2 Capítulo I

Aspectos biológicos de <i>Campoletis flavicincta</i> (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e interações com o Vírus da Poliedrose Nuclear de <i>Spodoptera frugiperda</i> Smith (Lepidoptera: Noctuidae)	7
2.1 Abstract e Resumo.....	8
2.2 Introdução	9
2.3 Material e métodos	17
2.4 Resultados e Discussão	22

3 Capítulo II

Interações entre dois agentes de controle biológico da lagarta-do-cartucho <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae): o parasitóide <i>Campoletis flavicincta</i> (Hymenoptera: Ichneumonidae) e <i>Baculovirus S. frugiperda</i> (Baculoviridae)	39
3.1 Abstract e Resumo.....	40
3.2 Introdução	41
3.3 Material e Métodos	44
3.4 Resultados e Discussão	49

4 Capítulo III

Interações entre três agentes de controle biológico
da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith

(Lepidoptera: Noctuidae): o parasitóide <i>Campoletis flavicincta</i> (Hymenoptera: Ichneumonidae), o <i>Baculovirus Spodoptera</i> e o milho resistente Zapalote Chico (<i>Zea mays</i>).....	71
4.1 Abstract e Resumo	72
4.2 Introdução	73
4.3 Material e Métodos	75
4.4 Resultados e discussão	80
5 Conclusões	102
6 Referências Bibliográficas	104

RESUMO GERAL

Foram avaliadas interações existentes entre os seguintes agentes de controle natural de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae), o Vírus da Poliedrose de *Spodoptera frugiperda* (VPN - Sf) e diferentes materiais de milho [parental exótico Zapalote Chico (ZC) (*Zea mays*), o parental adaptado BR 105, e quatro populações semi-exóticas, com diferentes porcentagens de introgressão gênica: 50% de ZC + 50% de BR 105 (ou simplesmente F1),

25% de ZC + 75% de BR 105 (recombinação 1 ou simplesmente RC1), 12,5% de ZC + 87,5% de BR 105 (ou RC2) e 6,25% de ZC + 93,75% de BR 105 (ou RC3)]. O período de incubação dos ovos de *C. flavicincta* é de aproximadamente 48 h. A maioria das lagartas de *S. frugiperda* continha mais de um ovos do parasitóide. Após 24 h da eclosão dos ovos, foi possível observar apenas uma das larvas desenvolvida dentro de uma mesma lagarta. As larvas do parasitóide, presentes numa mesma lagarta, competem entre si provavelmente por ataque físico, por meio das mandíbulas que existem somente em larvas de 1º ínstar. Fêmeas do parasitóide depositaram mais ovos em lagartas sadias do que em infectadas, quando não tiveram opção de escolha. Estando em contato com lagartas sadias e infectadas pelo VPN - *Sf* ao mesmo tempo, não houve diferença no número de ovos depositados, provavelmente por não poderem discriminar os odores de lagartas sadias de infectadas. Em teste de olfâmetro, lagartas sadias e folhas de milho atraíram 50% das fêmeas. No tratamento com lagartas infectadas e folhas, foram atraídas 32,1% das fêmeas. Onde havia apenas folhas, esse valor foi de 14,3% e a testemunha, sem qualquer fonte de odor, atraiu apenas 3,5% das fêmeas. Discriminar hospedeiros sadios de infectados pode minimizar o impacto negativo do VPN - *Sf* sobre os parasitóides. Aumento do tamanho da lagarta implica numa redução na eficiência do vírus. A utilização conjunta de vírus e parasitóide aumentou a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* em laboratório, quando comparado com o tratamento onde foi utilizado apenas o vírus. Quanto maior o intervalo de tempo entre parasitismo e infecção, maior a sobrevivência de *C. flavicincta*. A infecção prévia com o VPN - *Sf* reduziu a emergência do parasitóide, principalmente em lagartas infectadas no 2º e 3º dias de vida. Não só fêmeas originadas de lagartas infectadas pelo vírus foram capazes de transmitir o patógeno para lagartas sadias, mas também aquelas fêmeas inicialmente isentas do vírus, mas que acasalaram-se com machos oriundos de lagartas infectadas. Em laboratório, os materiais genéticos não indicaram diferenças significativas nos parâmetros biológicos (eficiência de parasitismo, peso de lagartas sadias e parasitadas, peso das pupas, duração da fase pupal e razão sexual do hospedeiro e do parasitóide). No campo foi coletado o menor n.º de lagartas de tamanho 3 e nenhuma lagarta de tamanho 4 em ZC, além do menor n.º de lagartas de *S. frugiperda*, de pupas do parasitóide e onde o nível de dano foi menor, indicando que houve efeito daquele material.

GENERAL ABSTRACT

It was evaluated the possible interactions among the following agents of natural control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae), the Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV - *Sf*) and different maize genotypes with different levels of genetic resistance [Resistant exotic parental "Zapalote Chico" (ZC) (*Zea mays*), the adapted parental BR 105, and four semi-exotic populations, with different percentages of gene introgression: 50% of ZC + 50% of BR 105 (or

simply F1), 25% of ZC + 75% of BR 105 (backcross 1 or simply BC1), 12,5% of ZC + 87,5% of BR 105 (or BC2) and 6,25% of ZC + 93,75% of BR 105 (or BC3)]. The incubation period of the eggs of *C. flavicincta* was approximately 48 hours. Most of the caterpillars of *S. frugiperda* contained more than one eggs of the parasitoid. However, 24h after eggs eclosion, it was observed the presence of only one developed larvae in the same caterpillar. Probably there is a competition among newly hatched larvae and through physical attack only one survives. Females of the parasitoid laid more eggs in healthy caterpillar than in infected one, when they did not have choice option. When in contact with healthy caterpillars and infected by NPV - *Sf* at the same time, there was not difference in the number of deposited eggs, probably because the female could not discriminate between of healthy or NPV infected host. In olfactometer test, healthy *S. frugiperda* larva and corn leaf attracted 50% of the *C. flavicincta* females. In the treatment with infected caterpillars and your leaf, they were attracted 32,1% of the females. Where just had leaves, that value was of 14,3% and the witness, without any scent source, it attracted only 3,5% of the females. To discriminate healthy hosts of having infected can minimize the negative impact of NPV - *Sf* on the parasitoids. Increase of the size of the caterpillar implicates in a reduction in the efficiency of the virus. The united use of virus and parasitoid in laboratory increased the mortality of caterpillars of *S. frugiperda* in laboratory, when compared with the treatment where was just used the virus. As larger the interval of time between parasitism and infection, larger the survival of *C. flavicincta*. The previous infection with NPV - *Sf* reduced the emergency of the parasitoid, mainly in caterpillars infected in the 2nd and 3rd days of life. Not only originated females of caterpillars infected by the virus they were capable to transmit the pathogen for healthy caterpillars, but also those females initially exempt of the virus, but that were coupled with males originating from of infected caterpillars. In laboratory, the genetic materials didn't indicate significant differences in the biological parameters (efficiency of parasitism, weight of healthy caterpillars and sponged, weigh of the pupas, duration of the phase pupal and sexual reason of the host and of the parasitoid). In the field smallest number was collected of caterpillars of size 3 and any caterpillar of size 4 in ZC, besides smallest number of caterpillars of *S. frugiperda*, of pupae of the parasitoid and where the damage level was smaller, indicating that there was effect of that material.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 As inter-relações entre organismos no controle de pragas

O alerta dado por Rachel Carlson com sua obra "Primavera Silenciosa" de 1962, espalhou-se rapidamente por todos os cantos do mundo, alertando para a possibilidade dos impactos negativos de origem antrópica alcançarem níveis críticos para a rede de relações bióticas e abióticas que sustentam a vida em Gaia. Confiante por demais no poder ilimitado que seu intelecto sempre suscitou-lhe, a raça humana vem tomando atitudes que acabam repercutindo negativamente sobre sua morada e sobre sua própria espécie, como no caso do uso de agrotóxicos. Substâncias químicas criadas em laboratório (atualmente, grande parte tem como referência inicial os compostos naturais vindos de plantas), e que não tinham sido devidamente testadas quanto ao impacto a longo prazo para que fossem aprovados para uso comercial seguro. As conseqüências desse uso abusivo foram, estão sendo e serão sentidas por muitos anos, pois que a estreita interdependência entre os seres não deixará que esqueçamos essa etapa de nossa história da ciência, lembrados que seremos pelos dados que avaliam a bio-acumulação dos resíduos dos agrotóxicos.

Outra marca deixada pelo uso indiscriminado dos agrotóxicos, que ainda está presente com destaque em nossos dias é o grande desconhecimento dos agroecossistemas e suas inter-relações: pouco sabe-se de como interagem os inúmeros organismos envolvidos nesses complexos ambientes, sendo que esse tipo de estudo foi relegado a planos menos importantes. Dados restritos sobre a biologia do fitófago são

suficientes para saber onde aplicar o veneno e com que frequência. O uso abusivo demonstrou, de forma dramática (mortes, deformidades, redução na biodiversidade, doenças crônicas, etc.), a estreita ligação existente entre os organismos e o ambiente, que se entrelaçam formando um tecido delicado e harmônico, que pode romper-se, gerando abalos profundos no ecossistema como um todo.

1.2 O Milho Zapalote Chico

É mérito da ciência contemporânea o resgate de inúmeros organismos vivos que estiveram à beira da extinção. É o caso de Zapalote Chico, um milho com idade aproximada de 3.500 anos, que esteve próximo de desaparecer há 40 anos atrás. Como ele, outras plantas não tiveram a mesma sorte. Certamente nós é que tivemos o "azar" de perdê-las!. Esse milho foi selecionado pelo povo Zapotec, que lhe prestava homenagens como a uma divindade. A explicação para tal veneração? Eram as "tortilhas" (bolo típico do povo Ameríndio), feitas com a farinha do milho Zapalote, chamadas "totopos", que conservavam-se por mais de seis meses. Numa época onde não havia as formas atuais de conservação de alimentos, essa ferramenta dava enormes garantias de sobrevivência ao povo que a dominava. Certamente um trabalho minucioso de melhoramento vegetal, passado oralmente, geração após geração, foi o que conferiu as características específicas ao milho Zapalote. Ser resistente às lagartas que dele se alimentam é a sua principal característica, certamente também conferida pela laboriosa dedicação do povo Ameríndio, sendo atualmente,

grande fonte para o desenvolvimento de materiais resistente. Zapalote Chico é um dos focos dos estudos desenvolvidos neste trabalho.

1.3 O Parasitóide *Campoletis flavicineta*

Outro interesse dos estudos está no hymenoptera parasitóide *Campoletis flavicineta*, da família Ichneumonidae. LA SALLE & GAULD (1993) revelam o quanto essas pequenas vespas representam no equilíbrio dos ecossistemas, considerados parte essencial das forças que impulsionam a biodiversidade: ao limitarem o tamanho da população de fitófagos, que poderiam competir e eliminar outras espécies, os parasitóides podem ajudar a manter elevado o nível de diversidade de herbívoros, além de prevenir que esses herbívoros destruam sua própria planta hospedeira, mantendo assim, o equilíbrio entre as espécies.

A dimensão de sua importância na estabilidade da rede da vida da qual faz parte talvez seja tão grande quanto sua sensibilidade para alterações em seu ambiente. Por várias vezes, a sensibilidade de hymenóptera parasítica tem sido demonstrada, quando normalmente são eliminados por distúrbios provocados pelo homem, e que invariavelmente não eliminam a praga. O Brasil, país de mega- biodiversidade, certamente tem muito a oferecer em se tratando de ferramentas biológicas de controle populacional de fitófagos. Os himenópteros, essenciais para qualquer programa de controle biológico, dependem de ambientes relativamente estáveis para que possam continuar existindo e possam servir para aumentar a capacidade produtiva das lavouras sem comprometer o ambiente.

1.4 O Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda*

Por fim, os estudos tiveram como parte integrante, o Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (VPN -Sf), que tem enorme potencial de utilização, principalmente pela sua alta virulência, sendo considerado, teoricamente, específico para a lagarta-do-cartucho e por ter custo de produção relativamente baixo, apesar de exigir relativa capacitação tecnológica para ser produzido. Ao mesmo tempo, pouco sabe-se sobre os potenciais riscos do uso freqüente ou sobre o efeito de pulverizações repetitivas de patógenos nos outros elos da rede de relações que envolve a lagarta-do-cartucho e o milho.

1.5 Objetivos do trabalho

Será de grande valia no manejo ecológico de pragas em sistemas agrícolas se entendermos com maior profundidade até que ponto um organismo pode afetar os que com ele relacionam-se, de modo que tenhamos noção mais clara de como poderemos interferir o mínimo possível nesse complexo e pouco conhecido ambiente.

Um parênteses para confirmar o nível do nosso desconhecimento: foi feito um levantamento de insetos, com intuito de acompanhar a flutuação populacional de *C. flavicincta* por meio de dois tipos de armadilhas: a armadilha Malaise (captura insetos voadores), instalada em borda de mata primária de Cerrado (floresta semi-caducifólia, com grandes árvores de *Copaifera* spp. - o Paud'óleo), ao lado de uma área de plantio de milho. Esse local, utilizado para trabalhos de melhoramento de milho, chamado tecnicamente de "campo isolado", tem como característica principal

estar rodeado por mata com árvores altas, e que ainda é contornado por cadeia montanhosa, para impedir a vinda de grãos de pólen indesejáveis de campos próximos de produção e avaliação de material melhorado. O outro tipo de armadilha utilizado foram as bandejas amarelas com água, localizadas dentro da área da lavoura de milho. As coletas foram feitas durante um ano consecutivo, com substituições semanais para as bandejas e quinzenais para a Malaise. O volume e a diversidade do material é impressionante, principalmente pela diversidade de lepidópteros, coleópteros e himenópteros, muitos deles, certamente, completos desconhecidos para a ciência. Pois nessa infinidade de insetos coletados, nem um único exemplar de *C. flavicincta* foi encontrado. Isso faz-nos supor que a espécie não existe originalmente naquele local, sendo proveniente de outra região, não tendo chegado a ocupar nichos em áreas naturais mais isoladas, como é o caso do local onde foi feito o levantamento.

O controle natural de pragas pode ser estimulado a ponto de evitar danos econômicos nas lavouras, mas para isso é indispensável o conhecimento das inter-relações existentes no ambiente natural. Como interagem entomopatógenos, parasitóides, predadores e plantas resistentes? De que forma cada um pode ter sua atuação complementada pelo ação do outro agente, sem que tornem-se excludentes ou criem situações que alterem por demais a estabilidade do agroecossistema?

Em nosso trabalho, a meta principal foi lançar luz sobre alguns aspectos do agroecossistema do milho, em especial para as inter-relações existentes entre a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e alguns de seus principais agentes naturais de controle populacional: o parasitóide

Campoletis flavicincta, o Vírus da Poliedrose Nuclear de *S. frugiperda* (VPN - Sf), o material resistente Zapalote Chico e os materiais resultantes de seus cruzamentos com o milho BR 105.

1.6 Resumo dos capítulos

Primeiro capítulo - Foi avaliada a capacidade do parasitóide diferenciar lagartas sadias e infectadas pelo VPN - Sf, o período de incubação dos ovos de *C. flavicincta* e a competição das larvas do parasitóide dentro das lagartas hospedeiras.

Segundo capítulo - Avaliou-se a eficiência do vírus e parasitóide isoladamente e a utilização conjunta, com a infecção prévia pelo VPN - Sf com posterior parasitismo e vice-versa, além detectar a capacidade de parasitóides originados de lagartas infectadas têm de transmitir o patógeno para lagartas inicialmente sadias.

Terceiro capítulo. Avaliou-se em laboratório e no campo, o impacto de material de milho resistente à praga em relação à ação do VPN - Sf e sobre o parasitóide.

2 Capítulo I

Aspectos Biológicos de *Campoletis flavicincta* (Ashmead)
(Hymenoptera: Ichneumonidae) e Interações com o Vírus da Poliedrose
Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

2.1

ABSTRACT

The Nuclear Polyhedrosis Virus of *S. frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (NPV - Sf) and the parasitoid *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) compete for the same resource, that is, first instars of *S. frugiperda*. Biological aspects and capacity of the parasitoid to differentiate between healthy host larvae and infected by NPV - Sf was studied under laboratory conditions. More than one parasitoid egg was found inside the great majority of *S. frugiperda* larvae (incubation period was approximately 48 hours). However, only one developed larva could be observed 24 hours after the parasitoid hatching. Probably, due to competition (physical attack) among first stadium larvae (presence of jaws, that does not exist at the subsequent stadiums), only one survived. Parasitoid females did not discriminate between healthy and NPV infected host larvae. In a non-choice test, more eggs were laid in healthy caterpillars. In an olfactometer test, it was found that: (i) healthy *S. frugiperda* larvae together with corn leaf attracted 50% of parasitoid females. That value was of 32.1%, 14.3% and 3.5% in the treatments with (ii) infected NPV - Sf larvae and leaves, (iii) only leaves and (iv) no odor source, respectively. The female parasitoid discrimination between healthy and infected host larvae can minimize the negative impact of the virus on the parasitoid. The relative data to the interactions of those two organisms, that maintain narrow relationships to each other, should direct the decisions that guarantee a larger biodiversity in the agroecosystem of the corn crop.

RESUMO

O Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (VPN - Sf) e o parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) competem pelo mesmo recurso: lagartas de *S. frugiperda* nos estádios iniciais. Foram estudados alguns aspectos biológicos do parasitóide e avaliada a capacidade do parasitóide diferenciar lagartas sadias e infectadas. A duração da incubação dos ovos de *C. flavicincta* é de aproximadamente 48 horas. Os dados sugerem que, na competição intraespecífica, a eliminação das larvas concorrentes do parasitóide dentro de uma mesma lagarta acontece pelo ataque físico, dada à morfologia das larvas de primeiro estágio (presença de mandíbulas, que inexistem nos estádios posteriores). Cerca de 24 horas após a eclosão das larvas do parasitóide, foi possível notar que apenas uma das larvas cresceu. Quando as fêmeas do parasitóide foram confinadas com lagartas sadias e infectadas, não houve discriminação. Quando não puderam

escolher, mais ovos foram depositados em lagartas sadias. Em teste com olfatômetro, (i) lagartas sadias e com pedaços de folhas de milho atraíram 50% das fêmeas do parasitóide para dentro dos recipientes. Esse valor foi de 32,1%, 14,3% e 3,5 % nos tratamentos com (ii) lagartas infectadas pelo VPN - *Sf* e com folhas, (iii) apenas com folhas e na (iv) testemunha, respectivamente, não havendo diferença significativa apenas entre os maiores valores. A existência de discriminação entre lagartas sadias e infectadas pode minimizar o impacto negativo do vírus sobre o parasitóide. Os dados relativos às interações desses dois organismos, que mantêm relações estreitas entre si, devem nortear as decisões que garantam uma maior biodiversidade no agroecossistema do milho.

2.2 INTRODUÇÃO

Histórico

Os agrotóxicos têm sua relação custo-benefício cada vez mais questionada (WARE, 1980), não só pela comunidade científica, mas também por produtores rurais e consumidores. O mesmo autor atesta que quando a população do inseto fitófago é drasticamente diminuída pelo uso dos pesticidas, a de seus inimigos naturais também é afetada, e que uma ressurgência na população da praga geralmente ocorre, aumentando o dano à lavouram. Dosagens maiores ou novos produtos são utilizados para eliminar os fitófagos ressurgentes, gerando um ciclo de dependência em torno dos agrotóxicos. Isso é uma parte do desequilíbrio do ambiente agropecuário gerado pelo uso intensivo de produtos estranhos ao agroecossistema.

Mudança de paradigma: a importância da biodiversidade

O controle biológico de pragas é um dos importantes segmentos precursores da mudança de paradigmas na pesquisa agrícola, e sucede o período do uso indiscriminado de agrotóxicos por parte dos produtores rurais. É bastante promissora a utilização de agentes biológicos na redução do prejuízo provocado por insetos fitófagos e, nesse aspecto, o Brasil tem especial relevância no quadro mundial, não só pela qualidade de sua pesquisa agropecuária e biológica, mas também pela imensa biodiversidade que possui, potencialmente rica em agentes de controle populacional de fitófagos.

Impacto dos agentes bióticos

Os agentes bióticos utilizados no controle de fitófagos, por seu turno, não estão isentos de causarem impacto negativo no equilíbrio das cadeias tróficas de um agroecossistema. Para CAPALBO & DE NARDO, (2000), a adoção de um Agente Microbiano de Controle (AMC) implica na possibilidade de sua ampla distribuição ambiental e, conseqüentemente, na exposição de outros organismos não-alvo, além da própria praga que se deseja controlar. As mesmas autoras afirmam que embora o AMC seja de ocorrência natural na região de utilização do produto, ele possivelmente estará disponível durante a aplicação de forma numérica, espacial e temporal diferente da usual, surgindo daí a necessidade de uma avaliação de risco do uso desses agentes. Para se estimar o risco da liberação de qualquer AMC

no ambiente, é importante conhecer a forma como ele interage com o meio ao seu redor, incluindo outros organismos presentes (MEADOWS, 1993).

Indicador de impacto

Para mensurar o impacto da introdução de um organismo é necessária uma avaliação de custo-benefício, usada para determinar a utilização ou não de um determinado material (JEPSON *et al.*, 1994). Essa análise é definida por LANDIS *et al.* (1994) como uma forma de extrapolar, à partir de informações diretas, o efeito tóxico de um composto ou agente de controle para um organismo específico e como um complexo de organismos responderá a isso em seu ambiente natural. O alcance dessa análise deve incluir custos ambientais, econômicos e sociais associados à liberação do novo agente (ROYAL SOCIETY, 1992).

Os insetos são particularmente efetivos para o uso em avaliação de impacto ambiental por apresentarem alta diversidade de espécies, ampla ocorrência e importância no funcionamento do ecossistema natural (ROSENBERG *et al.*, 1986). LASALLE & GAULD (1991) qualificam os himenópteros parasitóides como essenciais na preservação do equilíbrio ecológico e na manutenção da diversidade nos ecossistema terrestres.

A fitófago

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) impõe grandes perdas à produção de milho (*Zea mays* L.) no Brasil, sendo considerada praga chave (CRUZ *et al.*, 1997a). Lagartas de primeiro ínstar alimentam-se do tecido de um dos lados da folha, deixando o lado oposto intacto, enquanto que as lagartas mais desenvolvidas fazem perfurações, podendo destruir completamente plantas pequenas e danificar todo o limbo foliar em plantas maiores (CRUZ & TURPIN, 1982). Uma complexa relação entre infestação de lagartas e produção foi apresentada por CRUZ & TURPIN (1983), quando mostraram que o dano foliar e peso da espiga apresentaram uma relação inversamente linear, gerada pela redução no número de grãos nas espigas de plantas infestadas.

O VPN - Sf E *C. flavicincta*

Dois agentes promissores no controle biológico da lagarta-do-cartucho são o Vírus da Poliedrose Nuclear de *S. frugiperda* (VPN - Sf) e o parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae).

Tipos selvagens de baculovírus têm sido freqüentemente utilizados como bioinseticidas e atualmente são empregados em várias partes do mundo (MOSCARDI, 1999). Uma cepa de VPN - Sf identificada e purificada no Brasil (VALICENTE *et al.*, 1989), é considerada como tendo grande potencial para controlar esse inseto fitófago, pois além de possuir

elevada virulência, é específico para a lagarta do cartucho (VALICENTE & CRUZ, 1991). *C. flavicincta* também tem se mostrado promissor como agente de controle biológico dessa espécie (CRUZ *et al.*, 1997b, PATEL & HABIB, 1986). É o himenóptero de grande ocorrência (53%) em campos de milho em Sete Lagoas, MG, seguida por *Chelonus insularis* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) (31,3%) e *Eiphosoma* spp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) (15,6%) (CRUZ *et al.*, 1997b).

As características dos ciclos biológicos de VPN - *Sf* e de *C. flavicincta*, que dependem de lagartas de *S. frugiperda* em fase inicial de crescimento para sua manutenção, sugeriram a necessidade do presente estudo.

O parasitóide

Fêmeas de *C. flavicincta*, por meio do seu ovipositor, depositam seus ovos no interior das lagartas, obtendo maior sucesso em lagartas menores (CRUZ *et al.*, 1997b). Durante o desenvolvimento larval do parasitóide, os tecidos internos da lagarta servem de alimento para o hospedeiro, que ao atingir o final do último instar, rompe a cutícula da lagarta e em seguida tece seu casulo, onde ocorre a metamorfose que gerará invariavelmente um adulto da vespa. Quando da oviposição, existe a

possibilidade das fêmeas deparam-se com hospedeiros já infectados pelo VPN - *Sf*.

O vírus

No trato digestivo das lagartas, o pH alcalino provoca o rompimento do corpo de inclusão protéico do vírus, permitindo a liberação do material genético do patógeno, que a partir de então, utiliza as células hospedeiras para sua multiplicação (MILTENBURGER & KRIEG, 1984). Esse processo acaba por destruir os tecidos internos da lagarta, que morre com o corpo enegrecido pela decomposição dos tecidos e flácido, incapaz de reter o conteúdo interno. Nesse estágio final da doença, o menor atrito extravasa e libera no ambiente os recém-gerados poliedros. Sua virulência para um determinado hospedeiro é diretamente proporcional ao número de poliedros ingeridos e inversamente proporcional ao tamanho da lagarta.

A interface de inimigos naturais de um mesmo hospedeiro

O fato de tanto o VPN - *Sf* como o *C. flavicineta* terem maior eficiência em lagartas de *S. frugiperda* que encontram-se nos estádios iniciais de desenvolvimento larval caracteriza uma possibilidade de competição entre esses dois organismos por um mesmo hospedeiro. A pulverização do VPN - *Sf* no início do ciclo da cultura do milho aumenta a

eficácia do controle. Ao mesmo tempo, esse procedimento, teoricamente, pode reduzir a disponibilidade de hospedeiros para os parasitóides.

Liberações periódicas de vírus entomopatogênicos podem indiretamente, causar danos a organismos não-alvo como parasitóides e predadores, por deslocamento de competição ou por redução do recurso comum, que é o inseto hospedeiro (CAPALBO & DE NARDO, 2000). OATMAN & PLATNER (1969) admitiram que classicamente, parasitóides em lagartas infectadas não têm sido incluídos no cálculo da taxa de parasitismo. Ao reduzir a possibilidade de desenvolvimento de larvas de parasitóides, significantes taxas de parasitismo podem ser obscurecidas pela presença de VPN e outros patógenos (VAIL, 1981). ELSEY & RABB (1970) consideram que o Vírus da Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) é o principal, embora indireto, causador de mortalidade da população de larvas do parasitóide *Voria ruralis* (Fallen) (Diptera: Tachinidae). A utilização do Vírus da Poliedrose Nuclear e do Vírus da Granulose para o controle de lepidópteros é considerada seletiva, pois aparentemente os vírus não se reproduzem nos tecidos de himenópteros (BEEGLE & OATMAN, 1975 e IRABAGON & BROOKS, 1974). No entanto, podem afetar os parasitóides indiretamente pela produção de substâncias tóxicas para as suas larvas, pela redução do número de hospedeiros disponíveis ou pela morte do hospedeiros antes do parasitóide haver completado seu desenvolvimento (LEVIN *et al.*, 1981). Uma lagarta de *S. frugiperda* infectada pelo VPN - *Sf* ingere apenas 7% do alimento

normalmente ingerido por uma lagarta sadia (VALICENTE, 1988), o que pode afetar a disponibilidade de alimento para a larva de um possível parasitóide hospedeiro. Para PICKETT *et al.* (1989), um distúrbio em um nível particular pode afetar funções em outros níveis.

Parasitóides e vírus competem pelos recursos quando presentes no mesmo hospedeiro, e isso freqüentemente, é altamente negativo tanto para o vírus como para o parasitóide (ESCRIBANO *et al.*, 2000 b). Quando da presença conjunta do VPN e de larvas de *Campoletis sonorensis* Cameron (Hymenoptera: Ichneumonidae) em lagartas de *S. frugiperda* em 2^o e 3^o estádios, o vírus foi um competidor superior e dominou os recursos do hospedeiro (ESCRIBANO *et al.*, 2000 a). CRUZ *et al.* (1997a) encontraram efeito depressivo na porcentagem de parasitismo em lagartas de *S. frugiperda* tratadas com VPN - Sf.

A coexistência desses organismos num mesmo hospedeiro gera competição pelo recurso lagarta. Em himenópteros, o olfato é considerado como a ferramenta sensorial mais importante (VAN ALPHEN & VET, 1985), que está associado com substâncias químicas geradas a partir da planta hospedeira ou do próprio hospedeiro (KINIPLING, 1992.), o que sugere que também *C. flavicincta* possa utilizar-se dos odores provenientes de *S. frugiperda* e de seu entorno para minimizar o impacto do VPN sobre sua progênie. Dando preferência para lagartas sadias, sua progênie terá maiores chances de sobreviver, e por sua vez, retransmitirá essa patrimônio genético acumulado às proles seguintes.

A capacidade de utilização dos compostos voláteis foi analisada qualitativamente num teste de olfâmetro, além de algumas relações existentes entre o hospedeiro (*S. frugiperda*) e seus inimigos naturais (VPN - *Sf* e parasitóide *C. flavicincta*).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, em sala climatizada (temperatura de 25 ± 2 °C, UR de 70 ± 10 % e 12 horas de luz). As lagartas e os parasitóides utilizados nos experimentos provieram das criações mantidas em laboratório. Foi utilizada a cepa do vírus de nome “Sertaneja”, que faz parte do banco de VPN - *Sf*.

As lagartas - Quando expostas ao vírus, as lagartas tinham idade entre três e cinco dias (segundo e terceiro ínstar), considerada a melhor fase para a produção do parasitóide (CRUZ *et al.*, 1997b).

Os parasitóides - Após a emergência, os adultos foram mantidos em lotes de cinco casais até o momento do parasitismo, quando estavam com cinco dias de idade, sem qualquer contato prévio com lagartas.

A infecção com o VPN - *Sf* - Cada lagarta permaneceu por 24 h alimentando-se de discos de folhas de milho (2,5 cm de diâmetro), umedecidas com o vírus na concentração de 6×10^6 poliedros/ml. Foram

feitas diluições a partir de um material purificado, de concentração inicial conhecida, caracterizadas em Câmara de Newbauer.

Lagartas que não tiveram contato com o vírus também se alimentaram com discos de folha de milho por 24 h.

2.3.1 Teste de confinamento com fêmeas de *C. flavicineta* sem possibilidade de escolha (lagartas sadias ou infectadas pelo VPN - *Sf*)

Após alimentadas com folhas de milho infectadas ou não, 50 lagartas sadias ou 50 infectadas pelo VPN - *Sf* foram colocadas em frascos

de vidro de boca larga, de 2,5 l, onde permaneceram em contato com três fêmeas de *C. flavicineta* por uma hora. Foram utilizadas cinco repetições. Findo o período de exposição aos parasitóides, as lagartas foram individualizadas em copos plásticos de 50 ml e alimentadas com dieta artificial à base de feijão e germe de trigo, conforme metodologia descrita por CRUZ *et. al* (2000), exceto pelo fato de não ser colocada a dieta dentro do frasco de parasitismo. Trinta minutos após o término do período de parasitismo, dez lagartas de cada tratamento foram mortas e conservadas em álcool 70%. A partir de então, a cada intervalo de oito horas, novas amostras de dez lagartas foram retiradas e processadas como anteriormente. A contagem do número de ovos e larvas do parasitóide foi feita pela dissecação de todas as lagartas amostradas. O diminuto tamanho

dos ovos e larvas do parasitóide exigiu que o procedimento fosse realizado com o auxílio de um microscópio estereoscópico (10 x).

2.3.2 Teste de livre escolha com fêmeas de *C. flavicincta* em lagartas infectadas pelo VPN - *Sf* ou sadias

Dez lagartas de *S. frugiperda*, infectadas pelo VPN - *Sf* (conforme detalhado anteriormente) e dez lagartas sadias foram colocadas juntas, em um mesmo frasco de 2,5 l, com uma fêmea de *C. flavicincta*, por uma hora. As lagartas tinham três dias e a as fêmeas cinco dias. O procedimento foi repetido por dez vezes. Após o parasitismo, as lagartas foram individualizadas em copo de plástico de 50 ml e alimentadas com dieta artificial à base de feijão e germe de trigo. Quatro dias após o parasitismo, todas as lagartas foram mortas em álcool 70%. Cada lagarta foi então medida e em seguida dissecada para a contagem dos ovos e larvas do parasitóide. Foi feita a determinação da presença ou não do VPN - *Sf* em cada lagarta. O diagnóstico da infecção causada pelo vírus foi baseado em sintomas típicos de infecção de *S. frugiperda* pelo VPN - *Sf* (aparência rósea no início e mais escurecida com o passar do tempo). Do mesmo modo como observou CRUZ (2000), as lagartas infectadas têm a mobilidade reduzida, e por fim tornam-se escuras devido a desintegração do tecido interno, que rompe-se ao menor contato, quando ocorre o extravasamento do conteúdo

corporal. No caso de alguma dúvida quanto à presença ou não de poliedros do VPN - *Sf* nas lagartas, o diagnóstico foi feito em microscópio ótico (80x).

2.3.3 Preferência de fêmeas de *C. flavicincta* por diferentes fontes de odores.

Para determinar se fêmeas do parasitóide são capazes de distinguir lagartas sadias de infectadas por meio de odores no processo parasitário, foi utilizado um olfatômetro com possibilidade de múltipla escolha. Em um tubo de PVC (policloreto de vinila) de 20 cm de diâmetro e 20 cm de altura, foram feitas quatro perfurações eqüidistantes, de cinco cm cada (Figura 1).

O fundo do tubo foi vedado com filme plástico e a parte superior com tecido organza. Em cada uma das quatro perfurações foi colocado um copo plástico de 50 ml de capacidade, com o seu fundo voltado para dentro do tubo de PVC. No fundo de cada copo, foi aberto um orifício de um cm de diâmetro, para dar acesso à parte interna do tubo de PVC. As arestas que resultaram da abertura desse orifício foram direcionadas para o lado de dentro do copo, de forma que não oferecesse resistência à entrada das fêmeas no copo que continha as fontes de odor. Por outro lado, essas mesmas arestas dificultaram o retorno das fêmeas para o tubo de PVC.

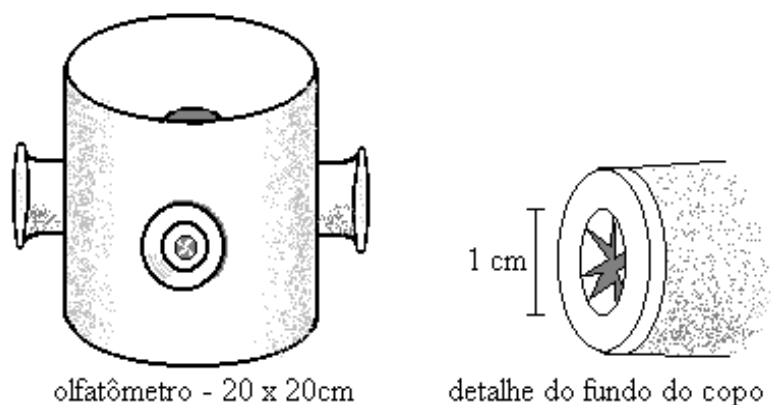


Figura 1. Olfatômetro de múltipla escolha utilizado para avaliar a capacidade de fêmeas de *C. flavicincta* distinguirem lagartas de *S. frugiperda* sadias de lagartas infectadas pelo VPN - Sf. Desenho do autor.

As fontes de odor [apenas folha de milho(i), folha e uma lagarta sadia (ii) e folha e uma lagarta infectada(iii)] foram colocadas dentro de cada copo, que teve sua boca fechada por tecido de organza. A testemunha (iv) foi representada por um copo vazio, também fechado pelo tecido de organza. A permeabilidade desse tecido é essencial para que se dê a formação do fluxo de ar, que irá conduzir os compostos voláteis até à câmara principal, após atravessar os copos com as fontes de odor.

Foram utilizadas cinco repetições, e em cada uma delas foram liberadas 07 fêmeas do parasitóide, número esse condicionado à disponibilidade de fêmeas na criação. A cada 60 minutos foi feita a contagem do número de fêmeas dentro dos copos que continham as diferentes fontes de odores.

As fêmeas do parasitóide, após contato prévio de 05 dias com os machos, não haviam ovipositado até o momento do experimento. As lagartas ofertadas tinham entre cinco e seis dias de idade. Um dia antes dos testes, as lagartas infectadas permaneceram em folhas de milho umedecidas com o VPN - Sf (6×10^6 poliedros/ml), enquanto que as lagartas sadias alimentaram-se das folhas de milho sem o vírus. Como utilizou-se as mesmas fêmeas em observações feitas em dois dias consecutivos, foi oferecido mel puro, pincelado nas paredes internas do tubo de PVC e água, borrifada sobre o tecido que vedava o olfatômetro. Lagartas e as folhas foram substituídas no segundo dia de avaliação.

A análise estatística - Foi feita análise de variância nos Experimentos 1 e 2, e Teste de X^2 no Experimento 3, para detecção de diferenças estatísticas entre os tratamentos. O elevado número de valores nulos exigiu que nos dois primeiros experimentos os dados fossem transformados em $Vx + 0,5$.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Teste de confinamento com fêmeas de *C. flavicincta* sem possibilidade de escolha (lagartas sadias ou infectadas pelo VPN - Sf)

Número de ovos por lagarta - O canibalismo ocorrido durante o período de parasitismo, comum durante o estágio larval dessa espécie de lepidóptero, reduziu o número de lagartas dissecadas de 250 para 230 nos

dois tratamentos (Tabela 1). Independente de estarem ou não infectadas, 75,7 % das lagartas dissecadas continha mais de um ovo. FLETCHER *et al.* (1994) afirmaram que o superparasitismo (oviposição em um hospedeiro já parasitado) já foi considerado como sendo um "engano", mas atualmente é aceito como sendo parte do comportamento adaptativo das fêmeas. Esses autores diferenciaram os fatores que influenciam o superparasitismo, que foram descritos em duas categorias: (i) variáveis externas, incluindo disponibilidade de hospedeiros, risco de mortalidade e densidade local de conspecíficos e (ii) variáveis internas, incluindo o número de ovos que a fêmea dispõe para ovipositar e sua expectativa de vida.

A Figura 2 apresenta uma lagarta do cartucho morta pelo VPN - *Sf*, tendo no detalhe, ovo do parasitóide *C. flavicincta*. Nos experimentos de laboratório, as arenas são freqüentemente pequenas e completamente fechadas, prevenindo a migração do parasitóide e forçando-o a ovipositar no local (VAN LENTEREN & BAKKER, 1979, citados por STUJINO, 1987). O mesmo autor (1987) observou que em 100% dos casos, as lagartas que sofreram um parasitismo múltiplo produziram ovos em quantidades significativas. Em 100% dos casos onde a probabilidade de



Figura 2. Lagarta de *Spodoptera frugiperda* com 04 dias de idade, morta pelo VPN - *Sf*, apresentando no detalhe, ovo do parasitóide *Campoletis flavicincta*.

GODFRAY (1994) reconhece que em experimentos de laboratório, parasitóides confinados com seus hospedeiros recorram ao superparasitismo depois que todos hospedeiros não parasitados já tiverem recebido pelo menos um ovo. PRICE (1974) descobriu que parasitóides que parasitam os primeiros estádios de desenvolvimento larval têm muito mais ovariolos do que aqueles que parasitam os últimos estádios larvais. A alta capacidade reprodutiva é uma estratégia necessária para superar a alta taxa de mortalidade que ocorre nas progênes de espécies que parasitam ínstares iniciais dos hospedeiros, causadas por doenças e predação do hospedeiro (SANDLAN, 1979).

Tabela 1. Frequência de ovos de *Campoletis flavicincta* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* sadias ou infectadas pelo VPN - *Sf* em teste de confinamento.

Classe de frequência (nº ovos/lagarta)	Lagartas sadias (n=230) %	Lagartas infectadas (n=230) %
0	2,61	1,74
1	16,09	28,26
2	23,48	33,91
3	16,96	23,48

4	15,22	6,52
5	13,91	3,91
6	5,22	1,3
7	3,91	0
8	0,87	0,44
9	1,3	0,44
10	0	0
11	0	0
12	0,43	0

Total	100	100
-------	-----	-----

A proximidade entre as três fêmeas de *C. flavicincta* presentes em cada gaiola pode ter estimulado uma maior oviposição, independentemente da ocorrência prévia de ovos nos hospedeiros, gerando uma elevada densidade de ovos/lagarta.

Efeito do VPN - *Sf* sobre o n.º de ovos depositados - Foram encontrados um total de 752 ovos nas lagartas sadias e 523 nas infectadas, o que gerou um valor médio de ovos/lagarta igual a 3,365 (erro padrão da média = 0,13) e 2,274 (epm = 0,09), respectivamente. Feita a análise de variância, houve diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade, com um coeficiente de variação de 25,5%.

Para VERSOL & YENDOL (1982), é possível que os parasitóides evitem hospedeiros infectados com microrganismos, como faz *Apanteles melanoscelus* (Hymenoptera: Braconidae), que prefere lagartas sadias, fazendo pouco esforço para parasitar indivíduos infectados pelo vírus

da poliedrose nuclear de *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). A possibilidade de discriminar um hospedeiro sadio de um hospedeiro infectado pode ser um ponto positivo para o uso dos VPN - *Sf* e do parasitóide em um programa de manejo integrado. A probabilidade dessa discriminação ocorrer no campo é grande, já que vírus e parasitóide participam de um processo evolutivo em que ocorrem interações que podem ser negativas para ambos (HOCHBERG 1991).

Muitos dos fatores que conduzem o parasitóide até o hospedeiro são compostos químicos originados no hospedeiro (caiomônios) ou na planta hospedeira (sinomônios) (POWELL, 1985). Uma hipótese que explica a diferença entre os tratamentos está associada à presença de compostos químicos liberados pelas lagartas infectadas e percebidos pelas fêmeas do parasitóide, que gastam menos tempo e ovos em um hospedeiro que propiciaria menor probabilidade de sobrevivência da prole. Devido à estreita ligação entre o sucesso da procura por hospedeiro e a produção de descendentes, podemos esperar que o comportamento de procura por hospedeiros seja fortemente influenciado pela seleção natural ALPHEN & VET (1985). A estratégia de discriminação de hospedeiro sadio e infectado sugere uma resposta evolutiva encontrada pelo parasitóide para minimizar o impacto negativo da presença do VPN - *Sf* sobre a sua descendência.

Na Tabela 1 observa-se a freqüência de ocorrência de ovos do parasitóide nas lagartas sadias e infectadas, com os valores extremos apresentando as menores freqüências. Para VISSER (1993), um parasitóide

procurando por um hospedeiro num local onde também encontram-se outros da mesma espécie, pode inicialmente evitar aqueles previamente

parasitados, para concentrar seus esforços na localização de hospedeiros

não parasitados antes de seus competidores. Mais tarde, quando a

qualidade do ambiente cair (falta de hospedeiros não parasitados), pode ser

favorável gastar tempo e recurso adicionando ovos em um hospedeiro já parasitado.

Localização dos ovos e larvas do parasitóide - Independentemente do tratamento, foi possível observar na primeira amostra de lagartas dissecadas (30 minutos após o parasitismo) que os ovos do parasitóide posicionavam-se na extremidade anterior (14 ovos), parte mediana (12 ovos) e extremidade posterior (30 ovos) das lagartas. Em todas as dissecções posteriores a esse período, poucos foram os ovos encontrados em outros locais que não na extremidade posterior das lagartas. Isso sugere que entre o parasitismo e a morte da primeira amostra de lagartas, não houve tempo suficiente para que os ovos fossem deslocados para a porção terminal. Esse deslocamento passivo dos ovos deve-se provavelmente aos movimentos do aparelho digestivo das lagartas, que conduzem o alimento para a extremidade

posterior. A presença de ovos em diferentes posições dentro da lagarta indica que *C. flavicincta* não escolhe um local específico do hospedeiro para depositar seus ovos. Certamente as fêmeas encontraram maior facilidade de ovipositar na parte posterior das lagartas, que ficam impossibilitadas de defender-se por não detectarem a aproximação do parasitóide. Na parte posterior das lagartas foi encontrada a grande maioria das larvas do parasitóide, próximas das inserção dos túbulos de Malpighi.

Período de incubação dos ovos e competição entre larvas do parasitóide - As primeiras larvas eclodidas do parasitóide foram

encontradas na dissecação feita 48 h após o parasitismo. Um dia após à eclosão, já foi possível observar que apenas uma das larvas (exceto em uma das observações) crescera, enquanto o restante manteve o tamanho de larvas recém-eclodidas. Essa larva maior certamente resultaria num adulto do parasitóide, confirmando o que invariavelmente ocorre com a espécie, em que apenas um parasitóide emerge de cada lagarta parasitada. Quando existe um grande número de larvas de endoparasitóides solitários em um hospedeiro, as alternativas para a eliminação das larvas concorrentes, conforme SALT (1961) e VINSON & IWANTSCH (1980) são: eliminação por ataque físico, supressão fisiológica via toxinas, anoxia ou por privação nutricional. O primeiro ínstar das larvas de muitos parasitóides solitários é equipado com uma cápsula cefálica rígida e mandíbulas relativamente grandes, que são usadas para atacar outras larvas da mesma ou de outras espécies e posteriormente são perdidas quando a larva muda para o

segundo ínstar e inicia uma fase de rápido crescimento (GODFRAY, 1994). Para *C. sonorensis*, VINSON (1972) fornece evidências de que há competição e que ocorre ataque físico durante o primeiro ínstar de suas larvas.

Na competição intraespecífica, a eliminação das larvas concorrentes do parasitóide dentro de uma mesma lagarta deve dar-se por ataque físico, dada à morfologia das larvas de primeiro estágio de *C. flavicineta* (presença de cápsula cefálica rígida apenas em larvas de primeiro ínstar - Figura 3, mais nítidas nas larvas 1 e 2, e mandíbulas, que são pouco

desenvolvidas nos instares posteriores), sugerindo que o embate entre as larvas competidoras deve ocorrer no primeiro estágio de desenvolvimento. Larvas com expansões abdominais em formato de cauda são bastante comuns entre Ichneumonidae e Braconidae (RICHARD & DAVIES, 1977). Na Figura 3 é possível observar que apenas uma das larvas do parasitóide desenvolveu-se (nº 1), enquanto as demais tinham as mesmas dimensões de larvas recém-eclodidas.

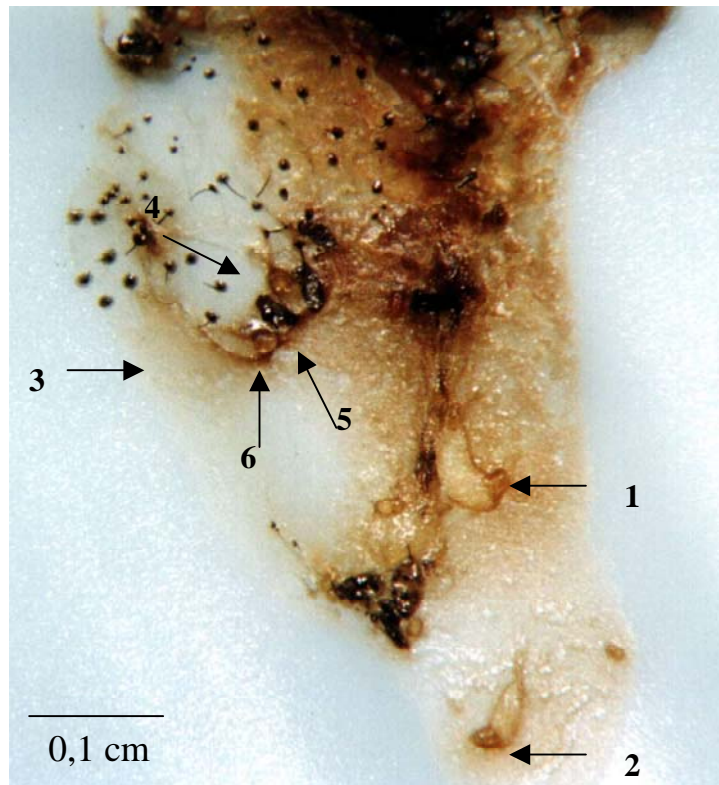


Figura 3. Lagarta do cartucho com 07 dias, morta pelo vírus da poliedrose nuclear (VPN - Sf). As larvas do *Campoletis flavicincta* têm em torno de 24 h de eclosão. A larva maior (nº. 1) tem 0,15 cm, e as menores (nº. 2, 3, e 4)

0,075 cm, medida essa que inclui a expansão em forma de cauda, presente

na porção terminal das larvas recém-eclodidas, que pode ser mais

facilmente observada na larva de nº 2. Pode-se notar ainda, a presença de dois ovos (nº 5 e 6).

Em apenas uma das 460 lagartas dissecadas foram encontradas duas lagartas maiores que as demais (ao todo, cinco larvas do parasitóide na mesma lagarta), no 3º dia após o parasitismo. As três larvas menores não cresceram além do tamanho que tinham ao eclodirem. Nessa lagarta não deve ter havido o enfrentamento das duas larvas competidoras maiores até o momento da morte do hospedeiro no álcool 70%. A

observação de duas larvas grandes em uma mesma lagarta pode ser um indício que reduz a possibilidade da existência de supressão química na competição entre as larvas de *C. flavicincta*, já que um composto inibidor de crescimento deve agir igualmente sobre todas as larvas competidoras, exceto, sobre a larva que primeiro eclodiu e liberou o composto, como ocorre com braconídeos da subfamília Aphidiinae, citado por GODFRAY (1994).

2.4.2 Teste de livre escolha com fêmeas de *C. flavicincta* em lagartas infectadas pelo VPN - *Sf* ou sadias

Parte da mortalidade das 100 lagartas inicialmente utilizadas deveu-se ao canibalismo natural existente entre as lagartas de *S. frugiperda*. Foram contados 101 ovos nas 94 lagartas infectadas e 89 ovos nas 98 lagartas sadias. Independente do tratamento, em 85% das lagartas foram encontrados mais de um ovo (Tabela 2), confirmando o resultado obtido no primeiro ensaio, onde também ocorreu superparasitismo na maioria das lagartas. Há algumas circunstâncias em que um parasitóide solitário pode ser beneficiado pela colocação de mais ovos em um hospedeiro - pode saturar o sistema de defesa do hospedeiro, ou aumentar a probabilidade de que um dos indivíduos da sua prole derrote uma possível larva de um parasitóide concorrente (GODFRAY, 1994). O número médio de ovos depositados por fêmea não foi significativamente diferente nos dois tratamentos. A saturação do ambiente da gaiola com os voláteis provenientes das lagartas pode ter

impedido a discriminação por parte das fêmeas do parasitóide entre lagartas sadias e infectadas.

Tabela 2. Frequência de ovos de *Campoletis flavicincta* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* sadias e infectadas pelo VPN - Sf em teste de livre escolha.

Classe de frequência (n.º ovos / lagarta)	% Lagartas sadias (n=98)	% Lagartas infectadas (n=94)
0	4,08	2,13
1	5,10	9,57
2	8,16	17,02
3	42,86	36,17
4	39,80	35,11
Total	100	100

Os valores médios foram de 10,1 ovos / fêmea no tratamento com lagartas sadias e 8,9 ovos / fêmea nos tratamentos em lagartas

infectadas. Esses valores foram inferiores aos obtidos no primeiro experimento: 25,1 ovos/fêmea em lagartas sadias e 17,4 em lagartas infectadas.

No primeiro experimento, foram encontradas lagartas com até 12 ovos, enquanto que o número máximo no segundo experimento foi de quatro ovos. A maior competição por hospedeiros no primeiro caso (três fêmeas / gaiola) pode ter sido o fator determinante dessa diferença,

aumentando as chances de uma mesma lagarta ser parasitada mais vezes. Fêmeas de parasitóides usam a frequência de contatos com fêmeas da mesma espécie como um indicador de que há potenciais competidoras no ambiente (GODFRAY, 1994). O mesmo autor afirma que, teoricamente, parasitóides solitários nunca deveriam gerar superparasitismo, mas a quantidade de ovos num mesmo hospedeiro aumenta com o aumento do número de fêmeas à procura de hospedeiros.

Outro ponto relevante que deve ser considerado na diferença da amplitude do número de ovos depositados nos dois experimentos é a existência de marcação química que as fêmeas de parasitóides deixam após a oviposição. Uma fêmea só consegue identificar a marcação química feita por ela (GODFRAY, 1994), o que pode ter diminuído a possibilidade de uma mesma lagarta receber número maior de ovos, como observado no experimento 1.

Na teoria, é vantajoso que a fêmea reconheça um hospedeiro já parasitado, pois uma larva secundária têm maiores chances de ser eliminada. Isso evita gasto de ovos e tempo em um local onde sua progênie terá poucas chances de sobreviver, reduzindo o risco de danificar o hospedeiro e colocar em risco sua própria progênie (VAN LENTEREN, 1981). Uma fêmea pode evitar o superparasitismo se ela puder reconhecer que o seu hospedeiro já foi previamente parasitado, habilidade chamada de "discriminação de hospedeiro" (GODFRAY, 1994). Muitas espécies de parasitóides usam marcações químicas para distinguir hospedeiros

parasitados de não parasitados e evitar o superparasitismo (LEWIS & MARTIN Jr. 1990).

Houve diferença significativa no tamanho médio das lagartas infectadas ($0,59 \pm 0,02$ cm) quando comparadas com lagartas sadias ($0,68 \pm 0,01$). Pode-se inferir que passados quatro dias da infecção, quando as lagartas foram mortas, já houve efeito do VPN - Sf, que impôs uma redução na taxa de alimentação e conseqüentemente, no tamanho das lagartas infectadas.

2.4.3 Preferência de fêmeas de *C. flavicineta* por diferentes fontes de odores

O trabalho com o olfatômetro mostrou que o tratamento com lagartas livres do VPN-Sf (i), atraiu 50% das fêmeas do parasitóide. Esse valor foi de 32,1%, 14,3% e 3,5 %, nos tratamentos com VPN - Sf (ii), com folhas (iii) e na testemunha (iv), respectivamente. Pelo teste de χ^2 , apenas não foi possível comprovar diferença ao nível de 10% de probabilidade entre os tratamentos i e ii. O valor do χ^2 foi 14, com 1% de significância e de 5,54 para os tratamentos com folhas, com 10% de significância. Portanto, não foi possível, através do experimento desenvolvido, detectar a capacidade de fêmeas de *C. flavicineta* identificarem lagartas sadias de infectadas pelo VPN - Sf .

A presença de um menor número de ovos de *C. flavicincta* em lagartas infectadas pelo VPN - Sf (primeiro experimento) demonstrou que as fêmeas do parasitóide foram menos estimuladas a depositar ovos em lagartas infectadas do que nas sadias. Entretanto, isso não provou que elas preferiram as lagartas sadias em resposta a um estímulo externo (caïromônio), gerando um menor número de visitas e conseqüentemente, de ovos nas lagartas infectadas. Uma outro modo de explicar o menor número de ovos em lagartas infectadas seria a presença de algum fator interno que determinaria a qualidade do hospedeiro, que não afetaria o número de visitas. Somente após inserir o ovipositor no hospedeiro é que a fêmea seria capaz de perceber a condição da lagarta (se saudável ou infectada). STRAND (1985) afirmou que muitos parasitóides utilizam-se de marcação externa ou de alguma forma de marcação interna para discriminar hospedeiros parasitados de hospedeiros não parasitados.

A eficiência do olfatômetro foi comprovada quando se observou apenas uma fêmea dentro do copo testemunha (iv) (Tabela 3) enquanto que no tratamento com lagartas e folhas sem vírus (i) foram observadas 14 fêmeas. Desse modo, podemos concluir que são realmente os sinais químicos são indispensáveis na localização do hospedeiro. Pode-se afirmar também que o conjunto de substâncias exaladas pelas folhas, lagartas e fezes foram mais atraentes para as fêmeas do que apenas os odores provenientes das folhas. Muitos dos fatores que levam o parasitóide até o hospedeiro são compostos químicos originados do hospedeiro (caïromônios) ou da planta que alimenta o

hospedeiro (sinomônios) (POWELL, 1985). Não é incomum parasitóides serem atraídos pelas fezes das presas (WEAVER, 1978). Lagartas contaminadas comem menos, defecam menos e portanto, têm menor atratividade para os parasitóides, quando comparada com lagartas sadias. Esse seria um fator a mais a favorecer o uso conjunto dos dois agentes controladores,

Tabela 3. Número de fêmeas de *Campoletis flavicineta* atraídas por diferentes tratamentos num olfatômetro de múltipla escolha, em dois dias de observação.

Gaiolas	Tratamentos			
	Lagartas Sem Vírus	Lagartas Com Vírus	Só Folha	Testemunha
1	2	4	0	1
2	3	1	2	0
3	3	1	1	0
4	2	2	1	0
5	4	1	0	0
Total	14	9	4	1

GODFRAY (1994) afirmou que parasitóides localizam seus hospedeiros usando uma variedade de fatores químicos, táteis e visuais. A seleção natural atuou no hospedeiro minimizando, o quanto possível, os estímulos que pudessem ser usados pelo parasitóide na localização do hospedeiro. Por isso não é surpreendente que a maioria dos atraentes e arrestantes químicos usados pelos parasitóides sejam produzidos quando o hospedeiro alimenta-se ou quando defeca, duas atividades que não podem ser evitadas.

O que mais atraiu fêmeas de *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae) foi primeiramente as lagartas de *Spodoptera exigua*, seguida das fezes da lagarta e por fim por folhas danificadas pelas lagartas. Folhas danificadas artificialmente atraem com menor intensidade.

Se a saliva foi colocada em folhas danificadas artificialmente, as fêmeas do parasitóide responderam como se estivessem na presença de lagarta alimentando-se. Aparentemente, os compostos químicos da saliva das lagartas estimulam a planta a liberar terpenóides e indóis, que são atrativos para o parasitóide (GODFRAY, 1994). Fêmeas de *C. sonorensis* respondem ao odor de plantas de algodão, movimentando as antenas sobre a planta e tocando repetidamente com seu ovipositor a superfície da mesma (WILLIAMS *et al.* 1988). A mesma espécie é atraída por alguns componentes voláteis presentes em flores e outras partes das plantas

(ELZEN *et al.*, 1983), que também atestaram que o dano provocado pelo ataque de herbívoros pode liberar grande quantidade de compostos envolvidos na atração dos parasitóides.

Os sintomas correspondentes à infecção do VPN - *Sf* (redução no tamanho e na agilidade das lagartas), quando presentes em indivíduos de uma mesma geração de lagartas, pode tornar justamente as lagartas infectadas mais susceptíveis ao parasitismo. Entretanto, o parasitismo em lagartas sadias seria favorecido pela redução na taxa de

alimentação e conseqüentemente, na quantidade de fezes nas lagartas infectadas, já que antes da oviposição é necessária a aproximação do parasitóide junto ao hospedeiro, que é estimulada pelos odores emanados do processo de mastigação e defecação.

A aplicação precoce e contínua de VPN em uma lavoura pode reduzir as fontes de odores oriundas da saliva e das fezes das lagartas, reduzindo a população daqueles parasitóides responsáveis pelas futuras gerações de inimigos naturais da área em questão.

A preferência por hospedeiros sadios é um elemento que pode minimizar o impacto negativo do vírus sobre a população do parasitóide. Em suma, a utilização dos dois agentes controladores numa mesma área deve respeitar critérios predeterminados, baseados em conhecimentos mais aprofundados da ecologia dos organismos envolvidos.

3 Capítulo II

Interações entre o parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead)
(Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Baculovirus Spodoptera frugiperda*
(Baculoviridae) no controle biológico da lagarta-do-cartucho
Spodoptera frugiperda J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)

3.1 ABSTRACT

The parasitoid *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae) and the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Spodoptera frugiperda* (NPV-Sf) use *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae as a host. When used alone, the efficiency of the virus decreases with the increase of larvae age. Parasitism rate of 3-day old *S. frugiperda* larvae by *C. flavicincta* was of $97,5\% \pm 2,14$. The integrated use of NPV - Sf (6×10^6 polyhedrons / ml) and *C. flavicincta* increased the rate of mortality of *S. frugiperda* in laboratory, compared to the virus treatment. Infected NPV - Sf larvae when offered to parasitoid females presented an adverse effect on the development of parasitoid larva, especially when the infection occurred in two and three days old host larvae. The parasitoid survival increased with the increase of the time interval between parasitism and the NPV infection. Adult parasitoid females originated from virus infected host or healthy females paired with males originating from infected host were capable to transmit the pathogen. To reduce the impact of the pathogen on the parasitoid in the maize agroecosystem, a program of integrated pest management should consider that delaying the spraying of NPV - Sf will allow the larva of *C. flavicincta* reach a development stage not affected by the virus.

RESUMO

O parasitóide *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae) e o Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (VPN-Sf) utilizam lagartas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) como recurso para sua sobrevivência. A eficiência do vírus, quando testada isoladamente, apresentou tendência de redução associada ao aumento da idade da lagarta. Ao parasitar lagartas de *S. frugiperda* com três dias de idade, a eficiência média foi de $97,5\% \pm 2,14$. A utilização conjunta de VPN - Sf [6×10^6 poliedros / mL) e *C. flavicincta* aumentou a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* em laboratório, quando comparada com a do tratamento onde foi utilizado apenas o vírus. Quando houve a infecção prévia com o VPN - Sf, a capacidade de larvas de *C. flavicincta* completarem seu desenvolvimento foi bastante afetada, principalmente nos tratamentos com lagartas infectadas no segundo e terceiro dias de vida. A reduzida taxa de alimentação das lagartas com idade de um dia e quatro dias diminuiu a ingestão de poliedros e aumentou a emergência de adultos de *C. flavicincta* em lagartas infectadas. Quanto maior o intervalo de tempo entre o parasitismo e a infecção das lagartas, maior a sobrevivência de *C. flavicincta*. Fêmeas do parasitóide originadas de lagartas infectadas pelo vírus ou fêmeas inicialmente isentas de VPN - Sf que se acasalaram com machos oriundos de lagartas infectadas

foram capazes de transmitir o patógeno. Para reduzir o impacto do patógeno no agroecossistema do milho, um programa de controle de pragas deverá considerar que se o VPN - *Sf* for aplicado mais tardiamente, permitirá que larvas de *C. flavicincta* atinjam um estágio de desenvolvimento em que sejam capazes de sobreviver à infecção virótica do hospedeiro.

3.2 INTRODUÇÃO

No Brasil, *Spodoptera frugiperda* (Smith), conhecida popularmente como lagarta-do-cartucho, é uma praga-chave da cultura do milho (*Zea mays* L.) e de outras culturas anuais (CRUZ, 1995a). Estima-se que os danos provocados por essa praga ocasionem à produção brasileira de milho, prejuízos acima de 400 milhões de dólares anuais (CRUZ, 1999). O controle de *S. frugiperda* na cultura do milho é baseado em produtos químicos, empregados quando aparecem os primeiros sintomas de danos na cultura. Cruz (1997) assim descreva o controle convencional do fitófago: quando a planta de milho está com 40 e 45 dias, geralmente deve ser feito o controle curativo, sendo que para o teto de produtividade de 3.000 Kg/ha, a praga deve ser controlada quando aproximadamente 20% das plantas apresentarem os sintomas de "folhas raspadas". Em áreas onde é comum a ocorrência de inimigos naturais, aconselha a utilização de produtos químicos somente quando a larva estiver com cerca de 10 a 12 mm. Quanto maior for a produtividade esperada, considerando que o custo do tratamento não irá variar muito com o nível de tecnologia usado, mais rapidamente devem ser iniciadas as medidas de controle.

O uso de agrotóxicos trouxe impacto negativo na agricultura em geral pelo (a) o desenvolvimento de pragas resistentes, (b) surgimento de outras tantas até então inexistentes, (c) criação de barreiras alfandegárias impostas por alguns países aos alimentos com resíduos de agrotóxico acima de níveis pré-estabelecidos e (d) redução da ocorrência de inimigos naturais. O grande índice de intoxicação de agricultores (e), a contaminação do próprio alimento (f) do solo (g) e dos recursos hídricos (h) são outros impactos que ainda não foram totalmente dimensionados. A infiltração de pesticidas agrícolas nas águas subterrâneas tornou-se, aliás, no limiar dos anos 90, uma grande preocupação para os produtores de água potável (VERNIER, 1994). No Brasil, somente no ano de 1998, 40,22 % das 450 mortes no campo foram ocasionadas por intoxicação de agrotóxicos (MS / FIOCRUZ / SINITOX, <http://www.fioCRUZ.br/cict/english/sinitox/tabingles01.htm>, 2002). Esses valores passaram para 37,4% no ano de 2000 (de 181 para 141, em números absolutos) segundo o próprio SINITOX.

O controle biológico apresenta-se como alternativa viável a esse quadro por diminuir o risco de contaminação dos processos associados ao agroecossistema. *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae) tem se mostrado promissor como agente de controle biológico da lagarta-do-cartucho na cultura do milho no Brasil (CRUZ *et al.*, 1997b), correspondeu a 53% dos parasitóides de lagartas que atacam o milho na região de Sete Lagoas, MG (CRUZ *et al.* 1997a). É o parasitóide mais freqüente em milho

no estado do Paraná, onde atingiu 47% de parasitismo em lagartas de *S. frugiperda* (VALICENTE & BARRETO, 1999).

Entre os agentes de controle biológico, os produtos a base de vírus, que são, na maioria, do grupo *Baculovirus*, têm sido apontados como os de maior potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas, devido à especificidade, à alta virulência ao hospedeiro e à maior segurança proporcionada aos vertebrados (KLEIN & PODOLER 1978, BURGHEES *et al.* 1980, MOSCARDI 1986). Para MOSCARDI (1999), os Baculovirus têm apresentado grande potencial como inseticida biológico para o controle de lepidópteros desfolhadores. Devido à crescente importância dos entomopatógenos no manejo integrado de pragas, torna-se indispensável a avaliação dos prováveis efeitos desses agentes sobre os inimigos naturais das pragas, representados por parasitóides, predadores e também sobre outros insetos, como abelhas (MAGALHÃES *et al.*, 1998). Embora geralmente seja assumido que muitos inseticidas naturais sejam compatíveis com agentes de controle biológico, seu efeito na eficiência de inimigos naturais não são bem documentadas (BENTZ & NEAL 1995). Numa análise aprofundada, DANFA (1998) argumentou que não é suficiente que um organismo seja específico para que seja ecologicamente aceito, sendo antes, necessário que seus efeitos colaterais sejam cuidadosamente avaliados. Para se estimar o risco da liberação de qualquer agente microbiano de controle no ambiente, é importante conhecer a forma como

ele interage com o ambiente, incluindo outros organismos presentes (MEADOWS, 1993).

Embora aparentemente não possa multiplicar-se no tecido de parasitóides, o vírus pode afetá-los, indiretamente, (a) pela produção de substâncias que são tóxicas para a larva do parasitóide dentro do hospedeiro, (b) pela redução no número de hospedeiros disponíveis para a oviposição, ou (c) pela morte do hospedeiro antes do parasitóide ter completado o seu desenvolvimento (LEVIN *et al.*, 1981). A mortalidade de parasitóides em desenvolvimento em hospedeiros infectados pelo vírus certamente é menor que quando do uso de inseticidas convencionais (CROFT & BROWN 1975).

Por estarem associados ao mesmo nicho e por serem parte do estoque de ferramentas essenciais de um programa de controle de fitófagos com abordagem ecológica, é indispensável avaliar a compatibilidade do Vírus da Poliedrose Nuclear de *S. frugiperda* (VPN - Sf) e o parasitóide *C. flavicincta*, para que sejam utilizados em toda sua potencialidade como peças complementares.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos no laboratório de criação de insetos (LACRI) na Embrapa/Milho e Sorgo, na cidade de Sete Lagoas, MG.

As condições ambientais do laboratório foram: temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12h. Os experimentos foram conduzidos em duas etapas:

3.3.1 Efeito do parasitismo imposto por *C. flavicincta* em lagartas de *S. frugiperda*, que posteriormente foram infectadas ou não, pelo VPN

–

Sf em diferentes intervalos de tempo

Os procedimentos desse experimento foram repetidos em duas oportunidades. Em frasco de vidro de 2 litros, 50 lagartas de três dias de idade foram expostas por um período de duas horas, a três fêmeas fecundadas de *Campoletis flavicincta* que ainda não haviam ovipositado. A idade das fêmeas variou entre cinco e dez dias, alimentadas com solução de mel a 10% em algodão. Em cada um dos nove dias que se seguiram ao parasitismo, uma parcela do total de lagartas parasitadas foi infectada ao alimentar-se com folhas de milho por 24 h, embebidas em suspensão viral na concentração de 3×10^6 CIP (Corpos de Inclusão Poliédricas) / ml (Tabela 1). Ao final desses procedimentos, as lagartas foram individualizadas em copo plástico de 50 ml, contendo 5 g de dieta artificial

a

base de feijão e germe de trigo. O grupo controle foi composto por três tipos distintos de tratamentos:

1° - Lagartas sadias: 1ª repetição - 184 lagartas, 2ª repetição - 93;

2° - Lagartas com idade mínima de três e máxima de 11 dias, na presença apenas de vírus por 24 h. Quando com três dias, essas lagartas também permaneceram por duas horas em um frasco de vidro (50 lagartas/frasco) (Tabela 1);

3° - Lagartas com idade de três dias, apenas parasitadas: 1ª repetição - 195 lagartas, 2ª repetição - 78 lagartas.

Tabela 1. Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas pelo VPN - Sf em diferentes idades. Quando ocorreu, o parasitismo deu-se no terceiro dia de vida das lagartas.

	Idade da infecção das lagartas (dias)								
Repetição	3	4	5	6	7	8	9	10	11
nº 1									
Parasitadas	335	192	210	195	169	175	172	167	126
não parasitadas	200	197	175	198	173	183	187	185	186
nº 2									
Parasitadas	89	92	92	93	92	93	92	91	93
não parasitadas	89	89	91	91	89	91	90	90	87

Os resultados foram apresentados pela média dos dois experimentos. Buscou-se ainda, detectar a capacidade que adultos do parasitóide originados de lagartas infectadas têm de transmitir o VPN - *Sf* para lagartas sadias. Esse procedimento ocorreu apenas com os adultos gerados na primeira repetição do experimento anterior. Com esses adultos, foram formados casais com insetos provenientes de laboratório, ou seja: machos originados da criação foram cruzados com fêmeas que originaram-se de lagartas infectadas e fêmeas isentas de qualquer contato com o vírus foram acasaladas com machos originados de lagartas infectadas. Foram expostas ao parasitismo 48 lagartas com três dias de idade durante três horas, o que ocorreu assim que os adultos acasalados atingiram a idade mínima de cinco ou máxima de dez dias. A presença do vírus nessas lagartas foi detectada em microscópio óptico quando foi impreciso o diagnóstico visual (sem equipamento) da doença (aparência rósea no início e mais escurecida com o passar do tempo, imobilidade e tegumento frágil, rompendo-se facilmente). A detecção de uma única lagarta morta pelo VPN - *Sf*, por tratamento, foi o bastante para que fosse considerada como positiva a transmissão do vírus, não tendo ocorrido, portanto, a dissecação de cada uma das lagartas dos diferentes tratamentos para a detecção dos poliedros.

3.3.2 Efeito da infecção de VPN - *Sf* em lagartas de *S. frugiperda*, que posteriormente foram parasitadas ou não, por *C. flavicincta* em diferentes intervalos de tempo.

Lagartas de *S. frugiperda* em idades distintas (de um a cinco dias) foram infectadas ao permanecerem por 24 h alimentando-se de folhas de milho embebidas em suspensão com o VPN - *Sf* (3×10^6 poliedros / ml). Para cada uma das diferentes idades de lagartas infectadas, uma parcela foi exposta diariamente ao parasitismo (três fêmeas/gaiola, 2 horas de exposição) nos quatro dias subseqüentes (Tabela 2).

Tabela 2. Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* utilizadas em cada tratamento, infectadas pelo VPN - *Sf* e posteriormente parasitadas por *Campoletis flavicincta*

Idade das lagartas infectadas pelo VPN - <i>Sf</i> (dias)	idade das lagartas ao serem parasitadas (dias)							
	2	3	4	5	6	7	8	9
1	96	50	52	52	-	-	-	-
2	-	53	49	48	50	-	-	-
3	-	-	46	53	52	55	-	-
4	-	-	-	58	60	59	58	-
5	-	-	-	-	69	50	48	50

No controle (Tabela 3), três tipos de procedimentos distintos ocorreram: (a) parte das lagartas infectadas não foi exposta ao parasitismo,

(b) enquanto que uma outra parcela, sem entrar em contato com o vírus, foi apenas parasitada e (c) um terceiro lote de lagartas foi transferido diretamente para a dieta, sem qualquer contato com o vírus ou com os parasitóides. Findo o procedimento específico de cada tratamento, as lagartas foram acondicionadas em copos plásticos de 50 ml, com 5 g da dieta artificial. Foram avaliadas a sobrevivência das lagartas e as causas da mortalidade.

Tabela 3. Número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* utilizadas nos controles

Idade (dias) das lagartas	Controle		
	Apenas VPN - <i>Sf</i>	Apenas parasitadas	Sadias
1	55	73	79
2	69	56	144
3	86	88	88
4	310	98	106
5	68	68	68

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Efeito do parasitismo imposto por *C. flavicincta* em lagartas de *S. frugiperda*, que posteriormente foram infectadas ou não pelo VPN - *Sf* em diferentes intervalos de tempo

a - A eficiência do parasitismo de *C. flavicincta* em lagartas de três dias de idade, isentas de VPN - *Sf*

Quando o parasitismo deu-se em lagartas com três dias de idade, a eficiência do processo foi elevada, com a mortalidade média de $97,5\% \pm 2,14$. Na testemunha, na qual não atuaram nenhum dos agentes de controle, a mortalidade foi de $24,6 \pm 7,12$. A Tabela 4 mostra que um reduzido nº de adultos de *S. frugiperda* foi gerado após o parasitismo, o que denota a eficiência do controle populacional do fotófago imposto pelo hymenóptero em laboratório. As duas repetições que geraram esse valor médio apresentaram dados aproximados (Tabela 4), exceto pelo elevado número de lagartas mortas por causa não identificada, que pode estar associado a características intrínsecas dos lotes de lagartas utilizados.

Tabela 4. Efeito do parasitismo de *Campoletis flavicincta* sobre o total de lagartas de *Spodoptera frugiperda* isentas de vírus, com três dias de idade. Repetição 1: n = 195, repetição 2: n = 78.

Variáveis	%	
	repetição nº 1	repetição nº 2
Adultos de <i>S. frugiperda</i>	3,59	1,41
Adultos de <i>C. flavicincta</i>	86,67	73,24
Pupas de <i>S. frugiperda</i> inviáveis	1,54	1,41
Pupas de <i>C. flavicincta</i> inviáveis	1,02	1,41
lagartas mortas por causa desconhecida	7,18	22,53

Para NOBLE & GRAHAM (1966), lagartas com idade de três a cinco dias são mais adequadas para a produção de *Campoletis predistinctus* (Viereck) em laboratório. CRUZ *et al.* (1997b) consideraram que a maior taxa

de parasitismo promovida por *C. flavicineta*, em laboratório, ocorreu em lagartas de *S. frugiperda* com idade de três dias.

b - A ação do VPN - Sf em lagartas de diferentes idades

Quanto maior o tamanho das lagartas, menor foi a capacidade do vírus levar o hospedeiro à morte, considerando que apenas uma dosagem do microrganismo foi utilizada (Tabela 5). ESCRIBANO *et al.* (1999) observaram que a susceptibilidade de *S. frugiperda* ao VPN - Sf depende do desenvolvimento larval, sendo os estádios iniciais bem mais susceptíveis ao vírus que os estádios finais. Lagartas infectadas tardiamente ou que ingeriram um número de poliedros insuficientes podem, ainda assim, chegar à fase adulta. Recomenda-se que nos ínstaes iniciais seja feito o controle populacional das lagartas, pela intervenção com o VPN - Sf, já que para controlar uma população de lagartas maiores, é exigida maior concentração e/ou frequência na aplicação do vírus (CRUZ, 2000).

A utilização de lotes diferentes de lagartas nas repetições pode ser o motivo para a ocorrência dos diferentes graus de susceptibilidade ao patógeno, expressos pelos elevados valores de intervalo de confiança para lagartas que foram apenas infectadas (Tabela 5).

Tabela 5. Mortalidade média (%) de lagartas de *S. frugiperda*. Quando ocorreu o parasitismo, as lagartas tinham a idade de três dias.

Idade das lagartas	Mortalidade Média (%) \pm IC
--------------------	--------------------------------

quando da infecção		
	apenas VPN -Sf	VPN - Sf e parasitismo
3	93,8 ± 9,38	100
4	85,1 ± 10,38	98,7 ± 0,42
5	85,0 ± 13,70	98,7 ± 0,27
6	80,3 ± 16,79	98,9 ± 2,17
7	86,8 ± 14,61	97,4 ± 0,77
8	72,3 ± 17,43	98,9 ± 2,24
9	79,0 ± 14,40	98,3 ± 1,19
10	64,9 ± 8,71	98,0 ± 0,40
11	62,2 ± 23,69	97,6 ± 1,61

3.4.1.3 – Lagartas parasitadas por *C. flavicincta* e posteriormente infectadas com o VPN - Sf

Quando na presença dos dois agentes de controle (Tabela 5), a mortalidade total foi maior do que em lagartas expostas apenas ao vírus. Isso indica que o entomopatógeno e o parasitóide têm ações complementares com relação ao controle do hospedeiro, sem, no entanto, revelar o efeito de um inimigo natural sobre o outro. BALASUBRAMANIAN *et al.* (1989) observaram que a liberação de *Trichogramma pretiosum* seguida da aplicação do VPN produziu uma redução (76,4%) na população de *Heliothis armigera* (Hubn.), superior à obtida apenas com o VPN (51,3%). Nesse caso, o vírus e o parasitóide não chegaram a dividir ao mesmo tempo

um só hospedeiro, tendo ações complementares, com o parasitóide controlando a população de ovos e o vírus a de lagartas.

Com o aumento do intervalo de tempo entre o parasitismo e a posterior infecção, aumentou o número de larvas do himenóptero que conseguiu chegar até o estágio de pupa e de adultos (Tabela 6). Quando a infecção ocorreu nos cinco primeiros dias após o parasitismo, apenas 8,48 % das lagartas parasitadas gerou pupas inviáveis de parasitóide, enquanto que nos quatro dias subseqüentes, esse valor foi de 28,9 % (valores médios). Quanto maior a idade da lagarta no dia da infecção com o VPN-Sf, maior o tamanho da larva do parasitóide nela hospedada, já que para todas as lagartas, o parasitismo ocorreu no terceiro dia de idade. Larvas de *C. sonorensis* não sobreviveram em hospedeiros que ingeriram uma dose letal do vírus imediatamente após o parasitismo, mas houve sobrevivência de parasitóides com um intervalo de dois dias entre o parasitismo e a infecção viral (ESCRIBANO *et al.*, 2000).

Tabela 6. Valores médios da proporção de pupas e de adultos de *C. flavicincta* em relação ao total de lagartas parasitadas, em duas repetições.

Idade das lagartas infectadas (dias)	Proporção de pupas de <i>C. flavicincta</i> (%) \pm IC	Proporção de adultos de <i>C. flavicincta</i> (%) \pm IC
3	0	7,98 \pm 12,72
4	1,57 \pm 3,09	23,35 \pm 1,20
5	1,62 \pm 1,32	15,08 \pm 0,28

6	$0,55 \pm 1,09$	$30,73 \pm 29,07$
7	$4,74 \pm 3,49$	$51,14 \pm 19,06$
8	$10,09 \pm 0,38$	$63,91 \pm 23,34$
9	$4,86 \pm 3,00$	$68,59 \pm 13,65$
10	$8,51 \pm 7,96$	$72,51 \pm 5,98$
11	$5,46 \pm 0,17$	$76,77 \pm 5,07$

Esse fato pode ser detalhado conforme fizeram CHITITIHUNSA & SIKOROWSKI em 1996, a respeito de *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae): os primeiros ínstares larvais do parasitóide requerem relativamente mais nutrientes essenciais e energia para o seu metabolismo; assim, o uso de energia e nutrientes para as atividades virais pode ter um grande efeito na mortalidade de ínstares iniciais dos parasitóides. A Figura 1 atesta um momento dessa relação entre ambos.



Figura 1. O VPN - *Sf* causou a morte de larva *Campoletis flavicineta* antes desta completar seu desenvolvimento. 1 - ovo do parasitóide. 2 - larva de parasitóide.

LA SALLE & GAULD (1991) atestam que a sensibilidade de Hymenoptera parasítica foi demonstrada em várias ocasiões, geralmente em infestações de pragas causadas por distúrbios provocados pelo homem, que eliminam os parasitóides mais sensíveis mas não eliminam a praga.

Larvas de *Campoletis sonorensis* em *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas pelo VPN (Irabagon & Brooks 1974) e de *Hyposoter exigua* (Hymenoptera: Ichneumonidae) em lagartas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) também contaminadas pelo VPN (BEEGLE & OATMAN 1975) interromperam seu desenvolvimento e morreram assim que o hospedeiro morreu.

Inoculação de vírus em hospedeiros próximos do momento de parasitismo promovido por *C. sonorensis* leva os hospedeiros (*Spodoptera exigua* e *Pseudaletia unipuncta*) à morte antes da emergência do parasitóide; mas quando o vírus foi administrado no hospedeiro após o parasitismo, estes desenvolveram-se até a fase de pupa (HOTCHKIN & KAYA, 1983). Os parasitóides *Microplitis demolitor*, *Cotesia kazak* (ambos Hymenoptera Braconidae Microgastrinae) e *Hyposoter dydimator* (Hymenoptera: Ichneumonidae: Campopleginae) necessitaram de um tempo prévio de pelo menos três dias a 25 °C antes do hospedeiro ser exposto ao VPN para

completar com sucesso seu desenvolvimento (MURRAY *et al.* 1995). *Apanteles glomeratus* (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae) deve ovipositar na lagarta hospedeira *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) pelo menos cinco dias antes do hospedeiro ingerir o Vírus da Granulose (VG) para completar seu desenvolvimento e emergir do hospedeiro infectado (KAYA & TANADA, 1973).

Afetadas pelo parasitismo de *C. flavicineta*, lagartas de *S. frugiperda* chegaram a ingerir apenas 6,9% de seu consumo normal (CRUZ *et al.* 1997). A redução do volume de folhas ingerido e conseqüentemente, do número de poliedros ingeridos pelas lagartas previamente parasitadas favoreceu a sobrevivência do parasitóide. A porcentagem de emergência de adultos de *C. sonorensis* aumentou significativamente com o aumento do intervalo entre parasitismo e infecção viral (ESCRIBANO *et al.*, 2000).

Pode-se assumir que o estresse causado pela ação de parasitóides resulta em maior susceptibilidade do hospedeiro, mas em algumas situações, o hospedeiro pode ser menos infectado por viroses (SANTIAGO-ALVAREZ & Caballero, 1990). A produção de vírus no hospedeiro parasitado pode ser afetada pelo decréscimo da susceptibilidade deste à infecção ou pela competição direta pelos recursos do hospedeiro por parte do parasitóide em desenvolvimento (SANTIAGO-ALVAREZ & CABALLERO, 1990). Lagartas de *S. frugiperda* não parasitadas produziram duas vezes mais poliedros por lagarta, quando comparadas com as lagartas parasitadas por *C. sonorensis* (ESCRIBANO *et al.* 2000). Esses mesmos autores ressaltaram a existência de um potencial para a competição

interespecífica entre parasitóides e vírus, quando estes se encontram na mesma lagarta hospedeira, visto que há uma grande sobreposição no requerimento de recursos tanto para o desenvolvimento do estágio larval do parasitóide como para a replicação do vírus.

O VPN - *Sf* imporá um impacto menor à população de parasitóides imaturos presentes nas lagartas de *S. frugiperda* se a infecção ocorrer mais tardiamente, de tal modo que uma parcela das larvas dos himenópteros seja capaz de sobreviver à escassez de recursos imposta pela concorrência com o vírus. Uma mortalidade elevada, causada por excesso de fontes de inóculo, pode interferir na população de parasitóides no campo, pois lagartas infectadas alimentam-se menos e conseqüentemente defecam menos, produzindo menores quantidades de compostos secundários atrativos aos inimigos naturais. GODFRAY (1994) afirmou que parasitóides localizam seus hospedeiros usando uma variedade de fatores químicos, táteis e visuais. A seleção natural atuou no hospedeiro minimizando, o quanto possível, os estímulos que pudessem ser usados pelo parasitóide na localização do hospedeiro. Por isso não é surpreendente que a maioria dos atraentes e arrestantes químicos usados pelos parasitóides sejam produzidos quando o hospedeiro alimenta-se ou quando defeca, duas atividades que não podem ser evitadas.

Por outro lado, a presença de *C. flavicincta* no campo, concorrendo com o patógeno pelo mesmo recurso, reduziria o número de inóculos em ambiente aberto, diminuindo a possibilidade de ocorrer uma epizootia, que por sua vez estimularia o surgimento de lagartas resistentes a

patógenos, aumentando o poder destrutivo do fitófago num momento seguinte, fato comum quando do uso dos agrotóxicos. Quando a população da praga é drasticamente diminuída, seus inimigos naturais também o são e uma resurgência na população da praga pode ocorrer, resultando no aumento de dano na lavoura (WARE, 1980).

A utilização de cepas distintas é uma forma eficiente de reduzir a chance de criação de insetos resistentes. O aumento da eficiência do controle natural da população de fitófagos está diretamente associado à biodiversidade dos agroecossistemas, onde muitos serão os inimigos naturais que atuarão nas diferentes fases de desenvolvimento do fitófago.

Embora *C. flavicincta* sobreviva à infecção do VPN - *Sf* mesmo em intervalos reduzidos entre o parasitismo e a infecção, outras espécies de himenóptera, quando comparadas com *C. flavicincta*, podem não ter a mesma capacidade adaptativa e perecer em situações menos estressantes. Essa vantagem sobre as demais espécies pode ser um dos trunfos adaptativos de *C. flavicincta*, o que explicaria o seu predomínio sobre as demais espécies de parasitóides.

***Campoletis flavicincta* como bioindicador**

C. flavicincta pode ser considerada uma espécie indicadora do impacto do Vírus da Poliedrose Nuclear de *S. frugiperda* no agroecossistema do milho, preenchendo requisitos apresentados por NARDO & CAPALBO (1997) para que uma espécie seja escolhida como tal: (i) ser representativa

da região ou ecossistema em que o agente microbiano de controle será aplicado e (ii) alimentar-se do organismo-alvo quando este está infectado. Além disso, para fins práticos, é indispensável que o organismo indicador seja de fácil criação, reprodução artificial, manutenção e manipulação (Nardo & CAPALBO, 2000), que também são características intrínsecas a *C. flavicincta*.

3.4.1.4 - Transmissão do VPN - *Sf* por adultos do *C. flavicincta*

A capacidade de parasitóides originados de lagartas infectadas pelo VPN - *Sf* transmitirem o vírus para lagartas sadias foi confirmada (Tabela 7). Fêmeas do parasitóide, originadas de lagartas infectadas, foram capazes de transmitirem o patógeno para lagartas sadias e machos que se originaram de lagartas infectadas transmitiram o VPN - *Sf* para fêmeas sadias, que por sua vez parasitaram e transmitiram o vírus, que levou à morte, por infecção, lagartas originalmente sadias. Em himenópteros parasitóides, é comum a transmissão de baculovírus da poliedrose e granulose durante a oviposição em hospedeiros sadios (THOMPSON & STEINHAUS, 1950; LEVIN *et al.*, 1981). Tem sido demonstrado que mesmo parasitóides machos emergidos de hospedeiros contaminados podem transmitir viroses (CABALLERO *et al.*, 1991).

IRABAGON & BROOKS (1974) demonstraram que fêmeas de *C. sonorensis* (Cameron) podem transmitir VPN para *Heliiothis virescens* por meio da oviposição. Os ovos de *C. sonorensis* são injetados na lagarta, facilitando a entrada do vírus dentro da hemocela do hospedeiro (VAIL, 1981). O mais provável mecanismo de transmissão de vírus por parasitóides deve ser através da contaminação do ovipositor ou da superfície do corpo e das fezes (OLOFSSON, 1989). A presença de vírus no sistema reprodutivo de machos de *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae: Microgastrinae) indica que não somente a transmissão vertical (de pais para filhos) é possível, mas também a horizontal (de machos para fêmeas) (CHITITIHUNSA, & SIKOROWSKI 1996).

Tabela 7. Detecção de VPN - Sf em lagartas mortas e % de mortalidade de lagartas *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicincta* originados de lagartas infectadas

Idade da infecção das lagartas (dias) que geraram adultos do parasitóide	machos gerados à partir de lagartas infectadas		fêmeas geradas à partir de lagartas infectadas	
	presença do VPN	% morte	presença do VPN	% morte
3	sim	(25,00%)	sim	(10,42%)
4	sim	(97,92%)	sim	(31,25%)
5	sim	(73,91%)	sim	(47,92%)
6	sim	(89,36%)	*	*
7	sim	(54,17%)	sim	(47,92%)
8	não	(27,08%)	sim	(78,72%)

9	sim	(95,83%)	sim	(78,57%)
10	sim	(06,25%)	sim	(57,45%)
11	sim	(66,67%)	sim	(77,77%)

* Não emergiram fêmeas do lote parasitado, o que impediu proceder os trabalhos nesse tratamento

A elevada mortalidade das lagartas em alguns tratamentos desse experimento (Tabela 5) não seria suficiente para confirmar a eficiência desse processo de infecção no campo. No laboratório, estando

confinadas em uma área restrita, as lagartas foram visitadas mais de uma vez pelas fêmeas contaminadas, aumentando as chances de inoculação do VPN - *Sf* em quantidade suficiente para desencadear uma infecção mortal. Experimentos em laboratório com arenas, que são geralmente pequenas e completamente fechadas, impedem a fuga do parasitóide, forçando-o a parasitar no local (van LENTEREN & BAKER, 1978). Se um parasitóide estiver procurando sozinho por hospedeiros, as chances de superparasitismo são mínimas, mas na presença de competidores, o superparasitismo pode ser favorecido (GODFRAY 1993), o que também deve favorecer a inoculação do patógeno.

A capacidade que *C. flavicincta* tem de sobreviver à infecção sofrida por seu hospedeiro demonstra que, apesar de competirem por um mesmo nicho, não há exclusão do competidor. Mesmo quando o parasitóide

sobrevive à infecção do hospedeiro, impedindo que o vírus multiplique-se normalmente, ainda assim, tanto macho como fêmea gerados são potenciais transmissores do VPN - *Sf*. Parasitóides e predadores não só favorecem a transmissão viral mas também mantêm a persistência do vírus no campo (CHITITHUNSA & SIKOROWSKI. 1996).

3.4.2- Efeito da infecção prévia de lagartas de *Spodoptera frugiperda* pelo Vírus da Poliedrose Nuclear na taxa de parasitismo promovida por *Campoletis flavivincta*

3.4.2.1 – Lagartas de *Spodoptera frugiperda* em diferentes idades: efeito na taxa de parasitismo promovida por *Campoletis flavicincta* e na infecção causada por VPN - *Sf*

Quando desenvolvida sem o contato com esses agentes bióticos, a sobrevivência das lagartas de *S. frugiperda* (lagartas que completaram seu desenvolvimento até mariposas) em laboratório foi elevada, apresentando sempre, índices superiores a 92%. O parasitismo de *S. frugiperda* por *C. flavicincta* ou sua infecção pelo VPN causou grande redução à sobrevivência do hospedeiro (Figuras 2 e 3). Lagartas de um dia de idade restringiram a atuação desses inimigos naturais por motivos diferentes. A efetividade do parasitóide em lagartas neonatas foi limitada pela fragilidade do hospedeiro: 28,77% não suportou o estresse, perecendo antes

de completar a incubação do ovo do parasitóide (Figura 2), enquanto que a mortalidade de lagartas sadias nessa fase foi de apenas 6,33% (testemunha).

A pequena capacidade de ingestão de folha e por conseguinte, de poliedros, faz de lagartas de um dia, hospedeiros pouco favoráveis à multiplicação do VPN (Figura 3). A mortalidade de lagartas infectadas nessa fase foi de apenas 43,64%, inferior à mortalidade de 97,1% e 100%, ocorrida em lagartas infectadas no 2º e 3º dias de vida, respectivamente.

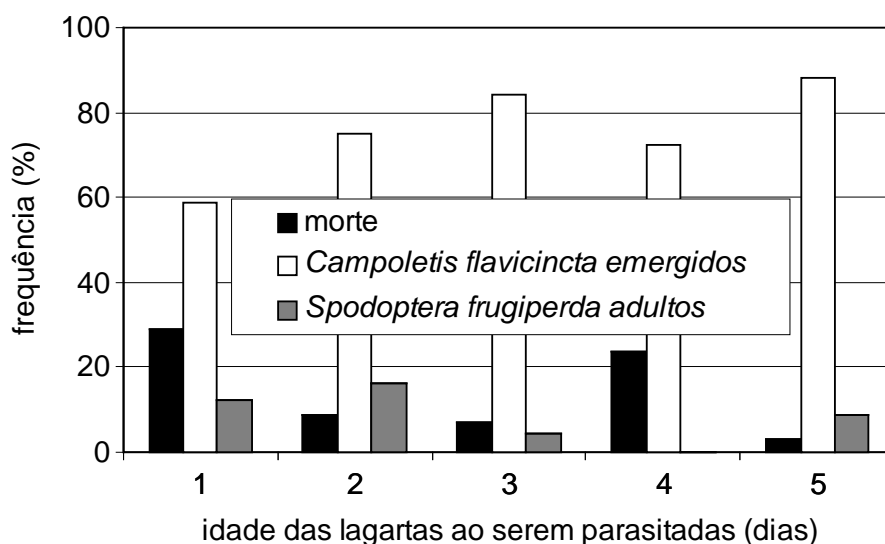


Figura 2. Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda* parasitadas em diferentes idades por *Campoletis flavicincta*.

Na Figura 2, nota-se que até o terceiro dia de idade, há uma tendência de crescimento no número de parasitóides emergidos e redução

no número de lagartas mortas. No quarto dia ocorre uma redução no número de parasitóides emergidos e um aumento no número de lagartas mortas. A hipótese que explica esses valores também está associada à fase de desenvolvimento das lagartas. No quarto dia de vida, sob as condições vigentes no laboratório de criação, as lagartas estão em processo de ecdise. Enquanto têm três e quatro dias de idade, as lagartas encontram-se no segundo ínstar, passando para o terceiro ínstar em torno do 5º dia de vida, a 25 °C, conforme CRUZ *et al.* (1997b). Durante a fase de muda, as lagartas apresentam-se com sua atividade motora reduzida, como consequência do processo de troca do exoesqueleto e crescimento, o que teria facilitado o acesso dos parasitóides às lagartas. A maior fragilidade e disponibilidade para a oviposição podem ser as causas do aumento da mortalidade das lagartas parasitadas e da diminuição do número de parasitóides eclodidos. Na etapa de troca de exoesqueleto, a redução na taxa de alimentação é regra geral entre os insetos, o que explicaria uma menor ingestão de poliedros, com consequente redução na mortalidade causada pelo VPN e uma maior emergência de adultos do hospedeiro (Figura 3).

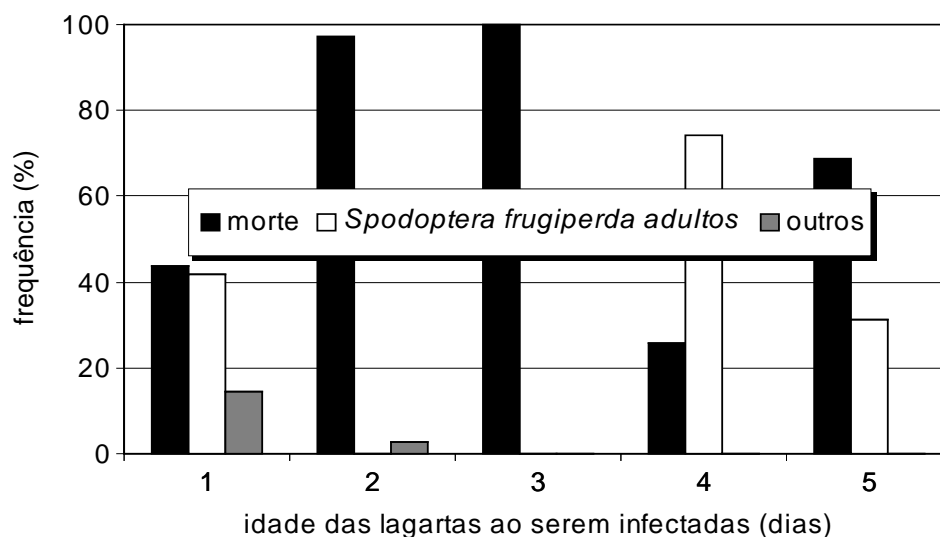


Figura 3. Sobrevivência de *Spodoptera frugiperda* de diferentes idades infectadas pelo VPN-Sf.

3.4.2.2 - Lagartas infectadas pelo VPN - Sf e posteriormente expostas ao parasitismo por *C. flavicincta*

Quando o VPN - Sf foi ministrado às lagartas de *S. frugiperda* antes da exposição ao parasitóide, a maior taxa de mortalidade foi atribuída à ação do VPN - Sf, que por sua vez também afetou a capacidade de larvas de *C. flavicincta* que completaram o seu desenvolvimento, exceto para lagartas infectadas no quarto dia de idade (Figura 4).

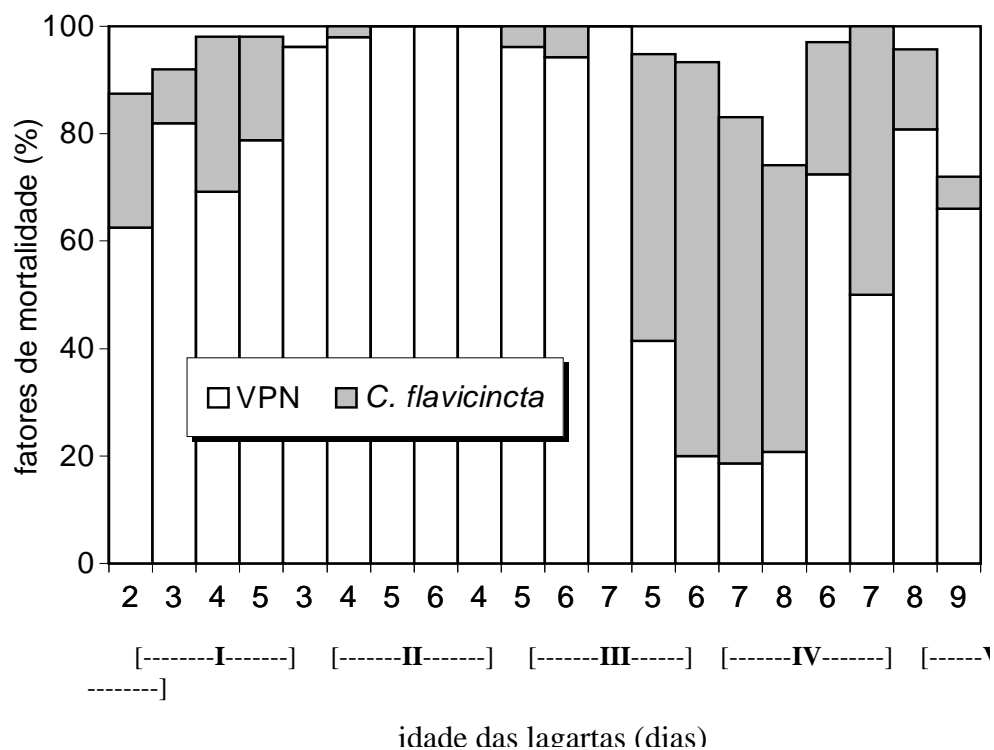


Figura 4. Fatores de mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas e posteriormente parasitadas. Nas abscissas, os algarismos Romanos indicam a idade (dias) em que as lagartas iniciaram a alimentação com o VPN -*Sf* e os algarismos Árabicos indicam a idade das lagartas ao serem expostas posteriormente ao parasitismo por *Campoletis flavicineta*.

A aplicação precoce de VPN - *Sf* no campo pode gerar uma redução brusca da população F1 de *C. flavicineta* e de outros parasitóides. Os resultados de ESCRIBANO *et al.* (2000) também sugerem que a aplicação de vírus para o controle biológico de *S. frugiperda* provavelmente levará a uma substancial mortalidade de parasitóides imaturos. Acontecendo antes do parasitismo, haverá tempo suficiente para que a infecção se instale num nível tal que retardará ou reduzirá a taxa de desenvolvimento

parasitóides. A menor ingestão de alimento de lagartas com um e com quatro dias de idade diminuiu sua ingestão de poliedros, o que aumentou a chance das larvas do parasitóides gerarem adultos (Figura 4). Uma parcela das lagartas infectadas no quinto dia de vida provavelmente ainda estavam em processo de ecdise, permitindo também que uma parte significativa das larvas do parasitóide se desenvolvesse com sucesso. *C. flavicineta* tem papel importante no controle populacional de *S. frugiperda* durante a mudança de ínstar das lagartas, justamente por que nessa fase o patógeno é menos eficiente.

Se o VPN - *Sf* for aplicado quando a população da lagarta-do-cartucho atingir o nível de controle, na fase inicial da cultura, corre-se o risco de afetar densidade de *C. flavicineta* e de outros parasitóides. O estabelecimento da primeira população de inimigos naturais certamente interfere quantitativamente na população da praga no agroecossistema. Em Cruz Alta e Santa Rosa (RS), MORAES *et al.* (1991) detectaram que os parasitóides (entre eles *C. sonorensis*) foram os primeiros agentes de controle natural de *Rachiplusia nu* (GUENÉE, 1852) e *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em campos de soja.

IRABAGON & BROOKS (1974) concluíram que a possibilidade prática de coordenar uma liberação inundativa de parasitóides com o uso do

VPN parece ser negada pelo fato da interação hospedeiro-parasitóide-patógeno ser altamente detrimental para o parasitóide. Entretanto, o efeito do impacto do VPN - *Sf* pode ser minimizado caso a aplicação do vírus ocorra num momento em que as larvas do parasitóide já tenham atingido um tamanho que não sejam afetados pelo VPN - *Sf*. Quanto mais tarde ocorrer a infecção, mais adultos do parasitóide sobreviverão a ela, aumentando também a probabilidade dos próprios parasitóides disseminarem o VPN - *Sf*. Embora uma infecção viral possa resultar na morte prematura de hospedeiros parasitados, parasitóides que foram manejados para completar seu desenvolvimento e emergir de insetos infectados podem atuar como eficientes vetores para a dispersão do vírus (CABALLERO *et al.*, 1991).

Fêmeas e machos dos parasitóides, vindos de outros locais e que se originaram de lagartas infectadas pelo VPN - *Sf*, podem fazer parte da população colonizadora do parasitóide. Sua presença na lavoura é fator relevante para o controle populacional da praga, por trazerem cepas diversas de VPN - *Sf*, aumentando a biodiversidade do ambiente, diminuindo a chance de criação de raças da praga resistentes a uma dada cepa predominante (conforme o processo de seleção de raças de pragas resistentes no sistema agro-industrial convencional). A disseminação de baculovírus na população de hospedeiro pode ser realizada pelos

parasitóides que sobrevivem em hospedeiros infectados (SANTIAGO-ALVAREZ & CABALLERO 1989). A taxa de parasitismo e a diversidade de parasitóides foram maiores em ambientes mais complexos (MENALLED *et al.* 1999).

A aplicação precoce do vírus gera ainda outros inconvenientes. Um deles seria o aumento da mortalidade de lagartas pequenas, o que diminui o potencial de inóculo do vírus naquela área, devido ao reduzido volume corporal dos hospedeiros, o que geraria pequeno volume de propágulos virais. Além disso, com a mortalidade precoce, a densidade do hospedeiro pode ficar muito baixa, favorecendo a dispersão dos parasitóides devido à falta de hospedeiros suficientes para manter o comportamento de procura (POWELL 1985). O baixo parasitismo em plantas de tomate [*Lycopersicon lycopersicon* (L.)] tratadas com extratos de *Nicotiana glauca*, comparado com tratamento onde aplicou-se apenas água, pode ter sido causado em parte pela inabilidade de *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) de encontrar baixas densidades da praga (BENTS & NEAL 1995).

Para VAIL (1981), a dissecação (embora consuma muito tempo e seja tediosa) ou um outro método para estimar o parasitismo em hospedeiros infectados ou mortos, é um pré-requisito para que a taxa real de

parasitismo seja acurada. Onde ocorre infecção pelo VPN (ou outro patógeno), o poder dos parasitóides pode ser subestimado.

É previsível uma antecipação da morte da lagarta que estiver com os dois inimigos naturais, pois o recurso (corpo da lagarta), limitado que é, esgota-se mais rapidamente e restringe o crescimento dos dois invasores. Isso pode gerar parasitóides menores e menor quantidade de esporos do vírus.

Intervenções antrópicas bruscas (como a aplicação maciça do vírus no início do desenvolvimento da cultura) podem desarmonizar as relações entre os diversos organismos controladores de fitófagos e o seu ambiente, causando prejuízos para o equilíbrio dinâmico dos agroecossistemas.

4 Capítulo III

Interações entre agentes de controle biológico e o material resistente
Zapalote Chico sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith
(Lepidoptera: Noctuidae) em milho (*Zea mays*)

4.1 ABSTRACT

The integrated pest management concept uses different strategies to minimize the impact of organisms on the vegetable production. The first objective of this research was to evaluate the interactions of resistant plants ("Zapalote Chico - ZC"), the parasitoid (*Campoletis flavicincta*) and the entomopathogen (Nuclear Polyhedrosis Virus) to control the *Spodoptera frugiperda* host. In laboratory, host larvae were fed with corn leaves representing the different levels of corn introgression between resistant ZC and susceptible BR 105. Evaluations were based on the larva and pupa weight, parasitism efficiency, viability, and duration of the pupal phase and sexual ratio. In the field, releases of parasitoid female and application of the virus were realized over the same corn genotypes evaluated in the laboratory. In laboratory, it was not observed any significant differences among treatments. In the field, the effect of resistant ZC genotype could be observed. In the ZC treatment, it was verified lower number of larvae, larval development and damage of the leaves, compare to the others genotypes. For this reason, the number of the *C. flavicincta* pupae and to the predator *Doru luteipes* Scudder (Dermaptera: Forficulidae) was the lower.

RESUMO

O manejo integrado de pragas utiliza-se de inúmeras ferramentas disponíveis para minimizar o impacto desses organismos sobre a produção vegetal. O objetivo primeiro desse trabalho foi avaliar interações entre plantas resistentes (Zapalote Chico = ZC), o parasitóide (*Campoletis flavicincta*) e um entomopatógeno (Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda*). Em laboratório, as lagartas foram alimentadas com folhas de milho representando os diferentes níveis de introgressão de milho, tendo como base o resistente Zapalote Chico e o BR 105. Foram avaliados o peso médio de lagartas (parasitadas ou não) e das pupas (do fitófago e do hospedeiro), a eficiência do parasitismo, viabilidade, duração da fase pupal e razão sexual (n.º de machos/n.º machos + n.º de fêmeas). No campo, foi avaliado o efeito da aplicação do Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda* nos mesmos materiais de milho testados em laboratório, em área onde foi feita a liberação do parasitóide. Em laboratório, não observou-se diferença estatística para nenhum dos parâmetros avaliados. No experimento de campo, detectou-se uma menor presença de lagartas mais desenvolvidas em ZC que nos outros materiais. No campo, em ZC foram encontrados menor n.º de lagartas de *S. frugiperda*, de pupas de *C. flavicincta*, de tesourinhas, e onde o nível de dano foi menor. Por essa

razão, o número de pupas de *C. flavicincta* e do predador *Doru luteipes* Scudder (Dermaptera: Forficulidae) foram menores.

4.2 INTRODUÇÃO

A cultura do milho tem relevante impacto sobre a produção agrícola brasileira, sendo uma das principais culturas de subsistência de grande parte dos pequenos agricultores, de norte a sul do país. A reduzida rentabilidade econômica da cultura praticamente inviabiliza investimentos direcionados ao controle populacional de fitófagos por parte desses pequenos proprietários, que convencionalmente é feito com o emprego de inseticidas químicos. Além do elevado preço, outra desvantagem do uso desses produtos está na toxidez dos agrotóxicos ao ambiente. Esse quadro confere grande importância à algumas técnicas naturais de controle populacional de pragas do milho: insetos parasitóides e predadores, microorganismos entomopatogênicos e plantas resistentes. A utilização conjunta de técnicas que causem menor impacto ao ambiente depende de um conhecimento mais aprofundado de suas interações ecológicas dentro dos agroecossistemas.

A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada praga-chave para o milho em grande parte do mundo, sendo responsável, no Brasil, por prejuízos acima de 400 milhões de dólares anuais (CRUZ 1999). *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae) é o parasitóide de *S. frugiperda* que mais adaptou-se ao

agroecossistema do milho no Brasil, sendo abundante em vários locais. Para PATEL & HABIB (1986), houve amostragens em que essa espécie representou 83,33% dos parasitóides em milho. CRUZ *et al.* (1997b), VALICENTE & BARRETO (1999) e DEQUECH *et al.* (2001) detectaram índices de parasitismo impostos à população da lagarta-do-cartucho por essa vespa da ordem de 43%, 57% e 69,95%, respectivamente. Já os bioinseticidas à base de vírus, que são, na maioria, do grupo Baculoviridae, têm sido apontados como os de maior potencial para o controle desse inseto devido à sua especificidade, à alta virulência ao hospedeiro e à maior segurança proporcionada aos vertebrados (KLEIN & PODOLER 1978, BURGHEES *et al.* 1980, MOSCARDI 1986). O Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (VPN-Sf), desenvolvido na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, (VALICENTE *et al.* 1989) é considerado como tendo grande potencial para controlar esse inseto fitófago, pois além de possuir elevada virulência, é específico para a lagarta-do-cartucho (VALICENTE & CRUZ 1991).

A Raça de milho resistente à lagarta-do-cartucho Zapalote Chico (ZC), que serviu de base para os estudos neste trabalho, causa diminuição do peso e o aumento da duração da fase larval de *S. frugiperda* em condições de laboratório (VENDRAMIM & FANCELLI, 1988). WILSON *et al.* (1991) concluíram que ZC sofre menor dano foliar e causa uma redução no peso das lagartas-do-cartucho que dele se alimentam. Cultivares resistentes podem contribuir para o controle natural de insetos que se

alimentam deles, requerendo mais tempo para se desenvolver, permanecendo por mais tempo susceptíveis aos inimigos naturais (McCUTCHEON & TURNIPSEED, 1981). A proposta desse trabalho foi avaliar as potencialidades do uso conjunto de três métodos de controle natural de *S. frugiperda* : o parasitóide de lagartas *C. flavicincta*, o VPN - *Sf* e resistência genética de milho.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos na Embrapa/Milho e Sorgo, localizada na cidade de Sete Lagoas - MG, onde foram conduzidos dois experimentos: um em laboratório e outro em campo. No laboratório, sob condições controladas de temperatura (25 + ou - 2 °C), umidade relativa (70 + ou - 10%) e fotoperíodo (fotofase de 12h), foram estudados aspectos biológicos do parasitóide e da lagarta-do-cartucho.

No campo, lagartas de *S. frugiperda*, hospedeiras de *C. flavicincta* foram coletadas em diferentes materiais de milho: parental exótico Zapalote Chico (ZC), parental adaptado BR 105, e em F1 e três gerações de retrocruzamento (RC1, RC2 e RC3) populações semi-exóticas, com diferentes porcentagens de introgressão gênica: F1 - 50 % de ZC + 50% BR 105, 25% de ZC + 75 % BR 105 (RC1), 12,5% de ZC + 87,5 BR 105 (RC2) e

6,25 % de ZC + 93,75% BR 105 (RC3), para posterior avaliação em laboratório e avaliação de dano no campo.

4.3.1 EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DA LAGARTA-DO-CARTUCHO *S. frugiperda* COM MILHO RESISTENTE SOBRE O PARASITÓIDE *C. flavicincta*

Lagartas de *S. frugiperda*, de mesma idade e recém-eclodidas, provenientes de criação da Embrapa Milho e Sorgo, foram alimentadas com pedaços de folhas dos diferentes materiais de milho, na fase de 8 a 10 folhas. Os pedaços de folhas foram substituídos a cada dois ou três dias, até completar o ciclo da larva ou morte dos insetos. Ao completarem três dias de idade, 10 lagartas de cada tratamento foram pesadas em balança de precisão. No dia seguinte, as lagartas foram parasitadas por *C. flavicincta*. Em frasco de vidro de dois litros, quatro fêmeas do parasitóide (com cinco e dez dias de idade, acasaladas, que não tiveram contato prévio com lagartas) permaneceram por três horas com 60 lagartas alimentadas com os diferentes materiais genéticos. Para avaliar o efeito dos materiais em lagartas não parasitadas, procedeu-se do mesmo modo que no caso das lagartas parasitadas, exceto pela ausência das fêmeas do parasitóide nas gaiolas.

A partir do quarto dia após o parasitismo, 10 lagartas/tratamento foram pesadas nos quatro dias seguintes. Nenhuma

lagarta parasitada foi pesada mais de uma vez, o que diminuiu o efeito do estresse pelo manuseio excessivo. Apenas no caso das lagartas não parasitadas, somente após cinco dias é que uma mesma lagarta foi novamente pesada. Passados 14 dias do parasitismo, procedeu-se a pesagem das pupas do parasitóide. As pupas de *S. frugiperda* foram pesadas 21 dias após a emergência das lagartas hospedeiras.

Além do peso médio de lagartas (parasitadas ou não) e das pupas (do fitófago e do hospedeiro) alimentadas com os diferentes materiais genéticos de milho, foram comparados do valores médios da eficiência do parasitismo, viabilidade e duração da fase pupal e razão sexual (n.º machos / n.º de machos+ n.º de fêmeas).

4.3.2 IMPACTO DO PARASITISMO E DA APLICAÇÃO DO VPN - *Sf* SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO E SOBRE SEUS DANOS EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE MILHO

Foi utilizada uma área total de 2.040 m², e cada um dos seis genótipos foi repetido por cinco vezes. Cada parcela foi constituída de por 10 linhas de seis metros, subdividida em duas subparcelas com quatro linhas cada. Nas duas fileiras centrais de cada subparcela foi feita apenas avaliação de dano. Uma das subparcelas de cada material genético recebeu a

aplicação do VPN - *Sf* (2×10^{10} Corpos de Inclusão Poliédrica/ml - dose recomendada para uma área de 0,1 ha) e outra não.

Nove dias após a emergência, cada planta foi infestada com quatro lagartas de *S. frugiperda* com três dias de idade. Dois dias após a infestação, foram liberadas no centro da área experimental, 60 fêmeas do parasitóide, provenientes de criação de laboratório da Embrapa Milho e Sorgo, com idade variando entre cinco e dez dias. Dois dias após a liberação dos parasitóides, foi feita a aplicação, por meio de pulverizador costal do VPN - *Sf* na dose recomendada.

Para avaliar o impacto dos tratamentos no campo, foram coletadas 20 plantas / subparcela (cartuchos-do-milho), em duas datas distintas: sete e dezesseis dias após a infestação artificial, totalizando 100 plantas por tratamento/coleta. Esse estágio inicial de desenvolvimento das plantas de milho é considerado como o preferido para a deposição de ovos por fêmeas de *S. frugiperda* (HARRISON, 1984).

Em laboratório, o tamanho das lagartas foi estimado, atribuindo-se valores de 1 a 4 (1 - lagartas menores que 1 cm; 2 - maiores que 1 cm e menores que 2 cm; 3 - maiores que 2 e menores que 3 cm e 4 - maiores que 3 cm). Para avaliar o desenvolvimento e a *causa-mortis*, as lagartas foram individualizadas em copos plásticos de 50 ml e alimentadas com dieta artificial a base de feijão e gérmen de trigo. As pupas de parasitóides presentes nas plantas amostradas foram contadas e individualizadas. Anotou-se também o número dos predadores *Doru luteipes* (Dermaptera:

Forficulidae) encontrados. A avaliação de dano foi realizada 22 dias após a infestação. Utilizou-se seguinte escala de valores: 1 (nenhum dano), 2 (folhas raspadas), 3 (folhas furadas), 4 (folhas rasgadas e dano no cartucho) e por fim 5 (cartucho destruído). O cronograma das operações realizadas está resumido no quadro 1.

QUADRO 1. Cronograma das operações realizadas em cultura de milho representado por diferentes materiais genéticos

Idade das plantas (dias)	Operação realizada
09	Infestação das plantas com lagartas
11	Liberação dos parasitóides
13	Aplicação do vírus
16	1ª coleta de plantas
25	2ª coleta de plantas
31	Avaliação de dano

A comparação nos diferentes materiais genéticos utilizados e nas diferentes épocas de coleta foi feita por meio de teste de médias, para os seguintes parâmetros: dimensões e n.º de lagartas coletadas, densidade populacional das pupas do parasitóide, densidade de tesourinhas e nível de dano.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 EFEITO DA ALIMENTAÇÃO DA LAGARTA-DO-CARTUCHO *S. frugiperda* COM MILHO RESISTENTE SOBRE O PARASITÓIDE *C. flavicincta*

O peso das lagartas com três dias (antes do parasitismo), alimentadas com os materiais ZC, BR 105 e F1 foi semelhante, enquanto que os outros três materiais, com médias de peso mais elevadas que o grupo anterior, também não diferiram significativamente entre si ($P = 10\%$). A planta exótica ZC provocou diminuição do peso e o aumento da fase larval de *S. frugiperda* em estudos de VENDRAMIM & FANCELLI (1988). SILVEIRA *et al.* (1998) consideraram que o mecanismo de não-preferência de Zapalote Chico ficou evidente em lagartas de primeiro ínstar *S. frugiperda*, enquanto que em teste com lagartas de 5º ínstar, ZC foi o material que menos estimulou o consumo foliar, sendo que o mecanismo de resistência foi menos evidente em lagartas maiores que em recém-eclodidas. Nas pesagens posteriores, praticamente não foi observada diferença significativa no peso das lagartas, a exceção da pesagem ocorrida em lagartas com nove dias, quando F1 e RC2 apresentaram pesos inferiores aos demais tratamentos (Tabela 1). Não foi observada, portanto qualquer tendência de influência do material genético de milho sobre o peso de lagartas parasitadas.

Não foi detectada diferença significativa ($P = 10\%$) na taxa de parasitismo de *S. frugiperda* pelo *C. flavicincta* que pudesse ser atribuída à alimentação dada às lagartas hospedeiras (Tabela 2). Na mesma tabela está apresentada a razão sexual tanto de hospedeiro como do parasitóide, que também não diferiram entre si.

Em cinco das seis observações feitas, o material RC1 esteve entre os dois que resultaram em maior peso médio de lagartas não parasitadas (Tabela 3). Justamente nesse material não foi possível proceder à última pesagem, pois parte das lagartas estavam em fase de pré-pupa já no 15o. dia, indicando que o referido material promoveu aceleração no desenvolvimento das lagartas. Na pesagem das pupas de parasitóide e hospedeiro, não foi detectada diferença significativa (Tabela 4). Já com relação à duração da fase pupal, foi detectada diferença significativa ($P = 10\%$), sendo que o material BR 105 proporcionou maior longevidade à fase pupal do parasitóide (Tabela 5). CRUZ *et al.* (1997a) encontraram o valor de 7,3 dias para a duração da fase pupal do himenóptero, semelhante ao encontrado em BR 105. Para o hospedeiro, não houve qualquer diferença relativa ao peso pupal.

As variáveis avaliadas foram incapazes de demonstrar qualquer efeito relevante dos materiais genéticos avaliados, seja com relação a *S. frugiperda* ou a *C. flavicincta*. Com base nesses dados, é possível concluir que, em ambiente de laboratório, as propriedades advindas do diferentes

materiais genéticos não foram suficientes para interferir significativamente nos parâmetros avaliados tanto para o parasitóide *C. flavicincta* como para seu hospedeiro.

Tabela 1. Médias do peso (mg) de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, parasitadas por *Campoletis flavicincta* em diferentes intervalos de tempo (dez lagartas/material de milho), em câmara climatizada, a 25 ± 2 °C, UR $75 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h.

Idade das lagartas (dias)	3*	8	9	10	11
ZC	1,73 ± 0,11 a	14,8 ± 1,27 a	17,7 ± 1,70 a	23,0 ± 2,01 a	20,5 ± 1,72 a
F1	1,99 ± 0,18 ab	13,15 ± 1,39 a	13,51 ± 0,96 b	19,89 ± 1,89 a	20,23 ± 2,48 a
RC1	2,05 ± 0,10 b	16,7 ± 3,29 a	17,4 ± 1,76 a	24,8 ± 2,47 a	24,9 ± 3,29 a
RC2	2,01 ± 0,05 b	14,7 ± 1,13 a	15,1 ± 1,43 ab	24,2 ± 2,07 a	20,8 ± 1,47 a
RC3	1,94 ± 0,09 b	15,0 ± 1,00 a	16,9 ± 1,50 a	21,8 ± 2,00 a	23,6 ± 1,99 a
BR 105	1,86 ± 0,11 ab	13,3 ± 1,60 a	18,4 ± 1,65 a	25,0 ± 2,28 a	22,7 ± 2,16 a

* O parasitismo ocorreu no quarto dia de vida das lagartas, portanto, as lagartas de três dias ainda não haviam sido parasitadas.

As médias, dentro das colunas, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 10% de probabilidade.

Tabela 2. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* e *Campoletis flavicincta* nos diferentes materiais genéticos de milho testados. Razão sexual = $n.^{\circ} m / (n.^{\circ} m + n.^{\circ} f)$.

Material genético	Parasitismo (%)	Viabilidade pupal (%)		Razão sexual (m/m+f)	
		<i>C. flavicincta</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>C. flavicincta</i>	<i>S. frugiperda</i>
ZC	95,4	90,9 (n=44)	98 (n=50)	0,80	0,49
F1	98,0	89,8 (n=49)	90,4 (n=52)	0,95	0,57
RC1	93,6	89,4 (n=47)	98,1 (n=53)	0,98	0,47
RC2	97,6	90,5 (n=42)	98 (n=49)	0,82	0,66
RC3	93,5	86,9 (n=46)	95,8 (n=48)	0,95	0,46
BR 105	94,1	90,2 (n=51)	97,9 (n=48)	0,87	0,40

Tabela 3. Médias do peso (mg) de lagartas da *Spodoptera frugiperda* não parasitadas, em diferentes intervalos de tempo após a emergência, alimentadas com os diferentes materiais genéticos de milho testados (dez lagartas/material de milho).

Material genético	Idade das lagartas (dias)					
	8	9	10	11	14	15
ZC	54,76 ± 8,0ab	127,53 ± 26,27bc	146,9 ± 9,90a	203,9 ± 24,09a	451,9 ± 29,16b	458,1 ± 26,93a
F1	47,52 ± 8,53ab	139,9 ± 16,76c	176,1 ± 40,44ab	219,1 ± 11,48a	352,7 ± 29,91a	469,1 ± 31,03a
RC1	74,5 ± 21,16b	117,8 ± 25,90abc	178 ± 14,70b	272,2 ± 33,60b	468,4 ± 26,38b	-
RC2	58,4 ± 8,98ab	88,7 ± 9,97a	158,3 ± 19,47ab	276,9 ± 27,30b	422,6 ± 19,51b	451,1 ± 27,64a
RC3	52,1 ± 5,42ab	107,1 ± 12,80ab	142,1 ± 21,83ab	198,7 ± 29,16a	465,5 ± 27,55b	463 ± 21,50a
BR 105	46,8 ± 4,77a	98,5 ± 12,53ab	143,3 ± 10,66a	238,2 ± 23,63ab	424,8 ± 17,13b	471,1 ± 22,56a

As médias, dentro das colunas, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 10% de probabilidade.

Tabela 4. Peso médio (mg) de pupas de *Campoletis flavicincta* e *Spodoptera frugiperda*, nos diferentes materiais genéticos de milho testados

Material genético	<i>Campoletis flavicincta</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
ZC	7,11 ± 0,51 (n=29)	182,0 ± 8,39 (n=49)
F1	7,02 ± 0,39 (n=40)	173,58 ± 9,63 (n=46)
RC1	6,96 ± 0,33 (n = 42)	174,5 ± 7,50 (n=52)
RC2	7,40 ± 0,36 (n=33)	177 ± 7,54 (n=48)
RC3	7,80 ± 0,65 (n=34)	175,1 ± 10,29 (n=46)
BR 105	7,55 ± 0,34 (n=43)	172,56 ± 9,38 (n=47)

Tabela 5. Duração média da fase pupal (dias) de *Campoletis flavicincta* e *Spodoptera frugiperda*, nos diferentes materiais genéticos de milho testados.

Material genético	<i>Campoletis flavicincta</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
ZC	6,67 ± 0,20 (n=49)a	11,47 ± 0,29 (n=49)a
F1	6,54 ± 0,33 (n=49)a	11,83 ± 0,19 (n=46)a
RC1	6,81 ± 0,2 (n = 49)a	11,65 ± 0,26 (n=52)a
RC2	6,74 ± 0,31 (n=31)a	11,68 ± 0,22 (n=48)a
RC3	6,38 ± 0,22 (n=49)a	11,85 ± 0,24 (n=46)a
BR 105	7,35 ± 0,24 (n=49)b	11,98 ± 0,23 (n=47)a

As médias, dentro das colunas, seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, ao nível de 10% de probabilidade.

4.4.2 Densidade populacional da lagarta-do-cartucho e de seus inimigos naturais em diferentes gerações de retrocruzamento de milho resistente e susceptível

O dado que denotou com maior ênfase o mecanismo de não-preferência em Zapalote Chico para *S. frugiperda* talvez tenha sido a ausência de lagartas de tamanho 4 nesse material, como pode ser observado na Figura 1, onde também foi observado o menor número de lagartas do tamanho 3, o que demonstra que as lagartas levaram mais tempo para crescer. Foi constatada não-preferência alimentar das lagartas para 'Zapalote Chico' por VIANA & POTENZA (2000) enquanto SILVEIRA *et al.* (1997) o consideraram como um dos materiais menos adequados ao desenvolvimento de *S. frugiperda*.

O número menor de lagartas de *S. frugiperda* presentes em ZC (Figura 1) sugere uma possível associação com uma menor deposição de ovos que, por sua vez, é uma resposta aos aleloquímicos gerados pela planta. A seleção do local de oviposição adequado por um fitófago é crítica para o sucesso do desenvolvimento de sua prole, e é mediada primeiramente por voláteis da planta (RENWICK, 1989). A planta exótica ZC provocou diminuição do peso e o prolongamento da fase larval de *S. frugiperda* (VENDRAMIM & FANCELLI 1988) demonstrando ser menos favorável ao desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*. A confirmação desse dado

exige a contagem do número de ovos nas plantas, o que não foi realizado no presente trabalho.

Muitos dos fatores que levam o parasitóide até o hospedeiro são compostos químicos originados do hospedeiro (caimônios) ou da planta que alimenta o hospedeiro (sinomônios) (POWELL, 1985). A ausência de alguns desses fatores atrativos ou a presença de algum que provoque efeito inverso (repelente) podem ter sido os responsáveis pela reduzida presença de *C. flavicincta* em ZC, que pôde ser demonstrada pela menor quantidade de pupas do parasitóide amostradas (Figura 2) nesse material. Genótipos de soja (*Glycine max*) (L.) não tiveram efeito na incidência de parasitismo de nenhuma espécie de lepidóptero estudada sobre ela, embora a população do parasitóide *Plathypena scabra* (Fabricius, 1798) tenha sido menor em material resistente do que em material susceptível (McCUTCHEON & TURNIPSEED 1981). FOX *et al.* (1990) afirmaram que a variação nutricional ou nos aleloquímicos do hospedeiro ou da planta que lhe serve de alimento podem modificar a dinâmica das interações parasitóide-hospedeiro.

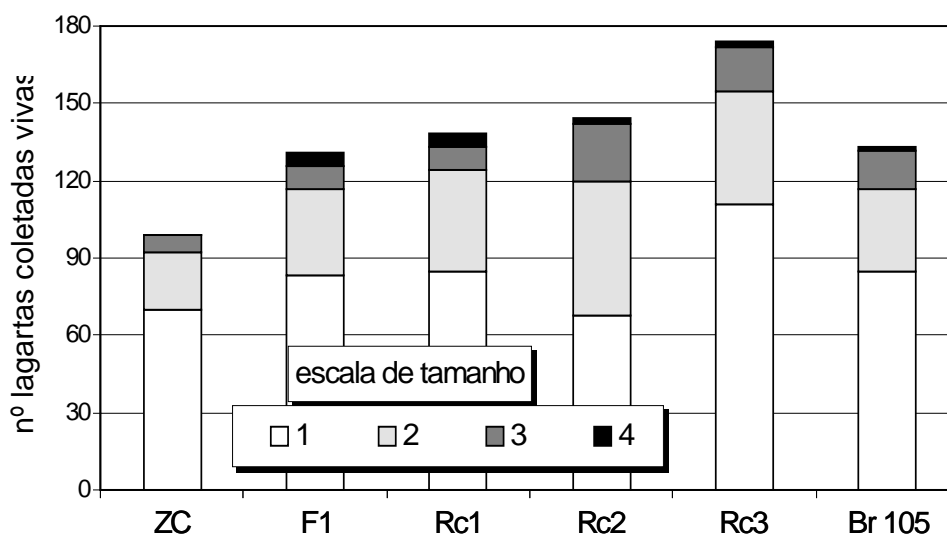


Figura 1. Número de lagartas *Spodoptera frugiperda* coletadas vivas em diferentes materiais genéticos de milho.

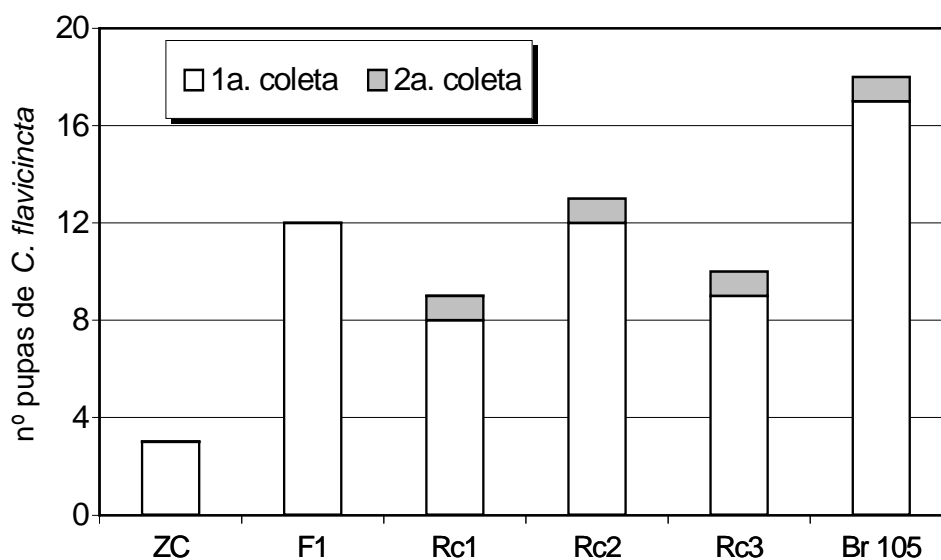


Figura 2. Número de pupas de *Campoletis flavicineta* coletadas nos diferentes materiais genéticos de milho, em duas datas, realizadas com nove dias de intervalo.

BERGMAN & TINGEY (1979) expressaram preocupação de que o uso de materiais resistentes pode não somente reduzir a abundância ou vigor do fitófago, mas também resultar em um decréscimo na população dos inimigos naturais. Isso pode não ser um problema para uma cultura específica, mas pode causar problemas em uma que é dependente dos inimigos naturais. A integração de linhagens resistentes, liberação suplementar de parasitóides e o efeito do controle natural promovido por entomopatógenos podem resultar num efetivo controle de fitófagos se as características de resistência afetarem menos as espécies entomófagas do que a espécie fitófaga (LINGREN *et al.*, 1978). FARID *et al.* (1998) consideram que plantas resistentes, ao afetarem adversamente os agentes de controle biológico, podem reduzir em excesso a efetividade de um programa de manejo integrado de pragas. A redução geral dos fatores de atração do hospedeiro em todo um ambiente homogêneo pode causar uma redução na atividade dos parasitóides ou mesmo o êxodo em busca de um habitat mais favorável (JOHNSON 1997). Essa incompatibilidade pode ser exacerbada se a praga desenvolver resistência ao mecanismo de resistência da planta e o parasitóide permanecer sensível, do mesmo modo que acontece comumente com os inseticidas químicos (CAMPBELL & DUFFEY 1979).

Na Figura 2 estão apresentados dados que mostraram a importância de *C. flavicincta* no controle populacional da praga em sua fase inicial de desenvolvimento, quando 93,85% do total das pupas foi amostrado na 1ª coleta de plantas (16 dias após a emergência das plantas no campo).

De acordo com CRUZ & TURPIN (1982), seria no estágio de crescimento com 8-10 folhas (plantas com aproximadamente 40 dias após o plantio) o mais susceptível do milho à lagarta-do-cartucho. O número de lagartas de *S. frugiperda* amostradas na primeira coleta (437) não foi tão superior ao da segunda coleta (382 ou 12,6 % a menos) a ponto de justificar a diferença no número de pupas do parasitóide encontradas nas plantas amostradas, sugerindo que outro fator, provavelmente relacionado ao estágio de desenvolvimento fenológico da planta, seja o principal fator determinante na atratividade de plantas mais novas para *C. flavicincta*.

Ao contrário de *C. flavicincta*, o predador *D. luteipes* foi encontrado em números reduzidos na 1ª coleta (29 exemplares adultos) e em grande quantidade na segunda (1.415 exemplares adultos) com um aumento populacional superior em 48 vezes (Figura 3). A densidade populacional do predador *Doru* sp. aumentou de acordo com a idade das plantas, e deveu-se não somente à reprodução dentro de cada parcela, mas também à imigração de áreas próximas (MARENCO & SAUNDERS 1993). Essa espécie chega a se alimentar de 39 ovos de *Helicoverpa zea* em um dia, em ambiente de laboratório, estando entre os principais inimigos naturais de *S. frugiperda* no Brasil, juntamente com *C. flavicincta*, *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae), *Trichogramma* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Telenomus* sp. (Hymenoptera: Scelionidae) e o entomopatógeno Baculovirus (CRUZ *et al.* 1995).

Doru sp. foi predador de várias espécies de insetos, incluindo *S. frugiperda*, sendo capaz de alimentar-se de 30 lagartas de 1º ínstar ou 13 de 2º ínstar (MARENCO & SAUNDERS 1993). Um estudo mais aprofundado deve ser feito para avaliar se lagartas de *S. frugiperda* parasitadas por *C. flavicineta*, que têm sua atividade motora reduzida pelo processo parasitário, seriam presas mais vulneráveis ao ataque de *D. luteipes*. Se realmente houver maior facilidade em predação de lagartas parasitadas, a tesourinha pode ser a responsável pela redução do número de pupas de *C. flavicineta* observado na segunda coleta.

Por ser justamente nos primeiros dias de desenvolvimento das plantas de milho quando se observa maior índice de parasitismo por *C. insularis* e quando também se nota a imigração de *D. luteipes*, é recomendável que no início do desenvolvimento da cultura cuidados especiais devam ser tomados para reduzir o impacto de medidas de controle (principalmente agrotóxicos) sobre a população desses inimigos naturais, os quais certamente têm papel importante no equilíbrio populacional de lagartas no milho. A Figura 3 apresenta também os dados que associam material genético de milho e a população de tesourinhas amostradas no campo. Em ZC foram coletadas 34,6% menos tesourinhas (187) que em Rc3 (286).

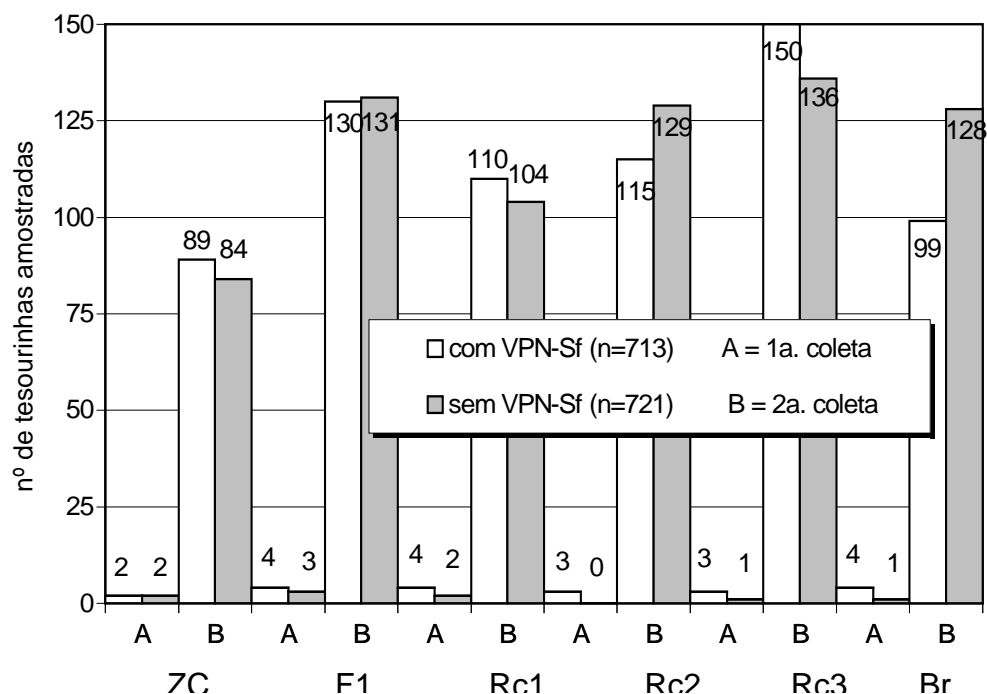


Figura 3. Número de *Doru luteipes* (tesourinhas) coletadas em diferentes materiais genéticos, em duas épocas distintas, com um intervalo de 09 dias.

A diferença no número de lagartas coletadas no tratamento onde não foi feita aplicação do VPN-Sf (437) não foi significativa, quando comparada com o número de lagartas encontradas no tratamento onde o vírus foi aplicado (382). Pode-se considerar que até a data da primeira coleta de plantas após a aplicação do VPN - Sf não havia transcorrido tempo hábil para que a infecção se desenvolvesse e a mortalidade de lagartas ocorresse de forma significativa na população de *S. frugiperda*. Consequentemente, no momento da triagem, o número de lagartas que já estavam mortas nos dois tratamentos não diferiu (39 lagartas mortas na coleta em área onde foi feita a aplicação e 40 onde não foi empregado o VPN - Sf). Essa mortalidade deve-

se provavelmente ao manuseio e transporte das plantas de milho do campo para o laboratório, acondicionadas em sacos plásticos.

Na primeira coleta, tendo transcorrido o tempo necessário para que o patógeno pudesse matar o hospedeiro, foi grande a diferença no número de lagartas mortas em laboratório que provieram de área tratada com o VPN - *Sf*, quando comparada com aquelas de área isenta desse tratamento (Figura 4). A primeira coleta de plantas foi feita três dias após a aplicação do VPN - *Sf* e a segunda 12 dias após a aplicação. A menor mortalidade de lagartas na segunda coleta deve-se provavelmente à redução da virulência, naturalmente provocada pela incidência de radiação ultravioleta sobre os poliedros virais. De acordo com Moscardi (1986), os entomopatógenos em geral são sensíveis à radiação ultravioleta e podem ser eliminados nas primeiras 48 h após a exposição. A baixa eficiência do patógeno pode ser devido às chuvas (40,6 mm) ocorridas entre o período de aplicação e a primeira coleta das lagartas. Utilizando VPN - *Sf* na concentração de $2,5 \times 10^{11}$ /ha, por meio de pulverizador costal, CRUZ *et al.* (1997b), encontraram uma mortalidade de 74% em lagartas coletadas três dias após a aplicação do vírus no campo.

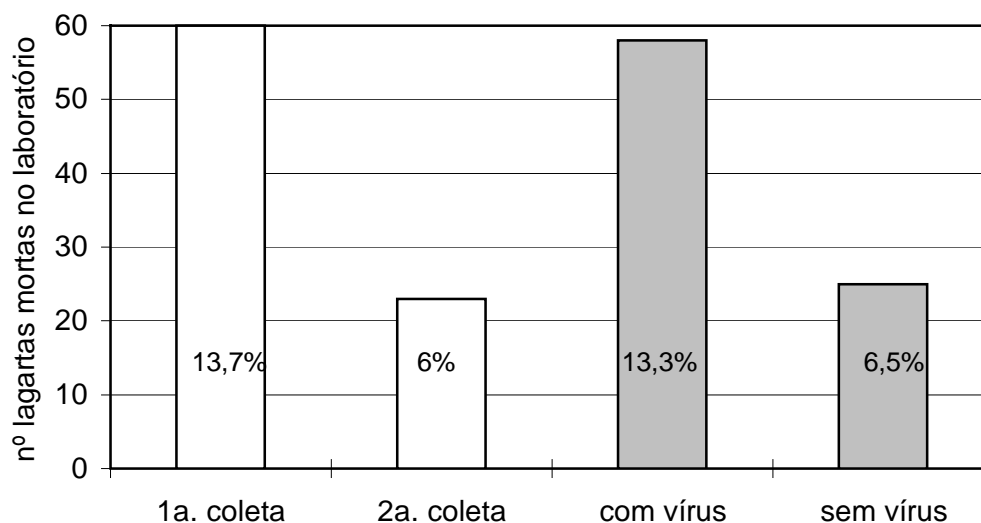


Figura 4. Número de lagartas mortas nos tratamentos com ou sem a aplicação de VPN - *Sf* por época de coleta das plantas.

A única aplicação do VPN - *Sf* na área onde foram realizadas as amostragens de plantas não chegou a interferir no balanço populacional dos parasitóides. Foram amostradas 33 pupas de *C. flavicincta* nas plantas onde ocorreu aplicação do patógeno e 32 onde não foi feita aplicação.

Através da amostragem de lagartas em campo, nota-se a relevância de *C. flavicincta* no complexo de parasitóides de *S. frugiperda* em milho, sendo que apenas em uma oportunidade (material Rc1) o número de *C. flavicincta* foi inferior à soma dos outros parasitóides (Figura 5). Os outros parasitóides de *S. frugiperda* foram *Cotesia* sp. (Hymenoptera: Braconidae) (28 exemplares ou 34,1%), dípteros taquinídeos (20 exemplares ou 24,4%), *Eiphosoma* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae) (15 exemplares ou 8,3%), *Chelonus insularis* (10 exemplares ou 12,2%), além de 9 exemplares de um

braconídeo não identificado (11%). Para Cruz *et al.* (1995), *C. flavicincta* e *Chelonus insularis* estão entre os mais importantes inimigos naturais de *S. frugiperda* no Brasil. Patel & Habib (1986) encontraram seis espécies de parasitóides em seus levantamentos em milharais no interior de São Paulo [*C. flavicincta*, *Chelonus texanus*], *Ophion flavidus* Brulle (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Eiphosoma vitticolle*, *Apanteles* sp. e *Archytas incertus* (Diptera: Tachinidae).

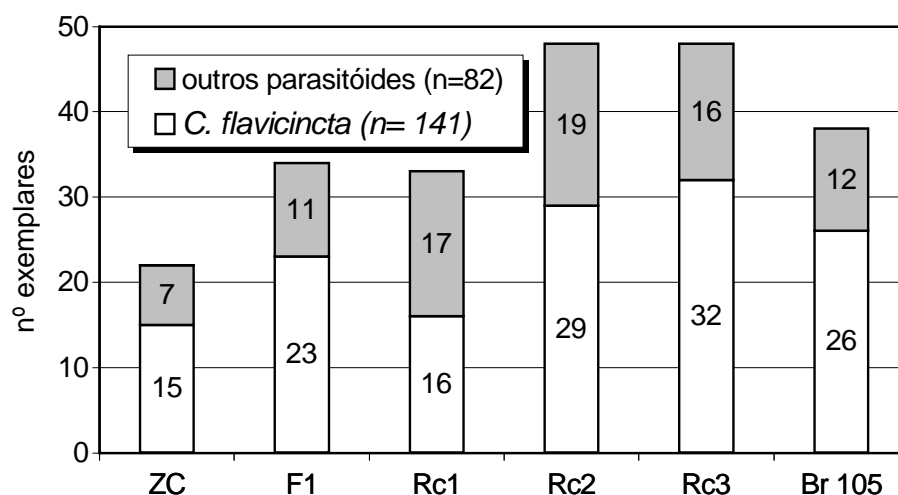


Figura 5. Número de parasitóides de lagartas de *Spodoptera frugiperda* coletadas no campo, em diferentes materiais genéticos de milho.

Na figura 5 estão apresentados os dados provenientes de lagartas de *S. frugiperda* amostradas no campo. Foi possível detectar diferença de freqüência nos diferentes materiais genéticos com relação aos parasitóides. No Zapalote Chico foi a menor freqüência, seguido de Rc1 e F1. Os valores sugerem que a menor taxa de alimentação das lagartas

nesses materiais pode ter reduzido a quantidade de substâncias voláteis atrativas provenientes das fezes e saliva do fitófago. O dano provocado pelo ataque de herbívoros pode liberar grande quantidade de compostos envolvidos na atração de parasitóides (Elzen *et al.* 1983). A planta na qual o hospedeiro está se alimentando, o próprio hospedeiro ou os produtos do hospedeiro liberam substâncias químicas que servem como mediadores na localização do hospedeiro (LEWIS & MARTIN, 1990). *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae, Microgastrinae) usam semioquímicos provenientes do hospedeiro e das suas fezes para localizá-los (JONES *et al.* 1971, HOPPER & KING, 1986). WISEMAN & CARPENTER (1995) afirmaram que significativamente menos fezes foram produzidas por lagartas de *Heliothis zea* que tinham se alimentado por sete dias de dieta a base de estilo-estigma de ZC. Esse efeito não se apresenta muito claro neste experimento, o que implica na necessidade de aprofundamento nos estudos dessa interação.

A figura 6 estão apresentados os dados da intensidade de dano causada por *S. frugiperda* nas plantas de milho. Pela amostragem, não houve efeito do VPN - *Sf* nesse índice. A baixa persistência do entomopatógeno no campo exige que mais de uma aplicação seja feita, devido ao curto efeito residual do vírus. A ausência de qualquer outra intervenção que pudesse controlar o crescimento da população de lagartas na área do experimento, além de uma única aplicação do vírus, provavelmente permitiu que a população do fitófago

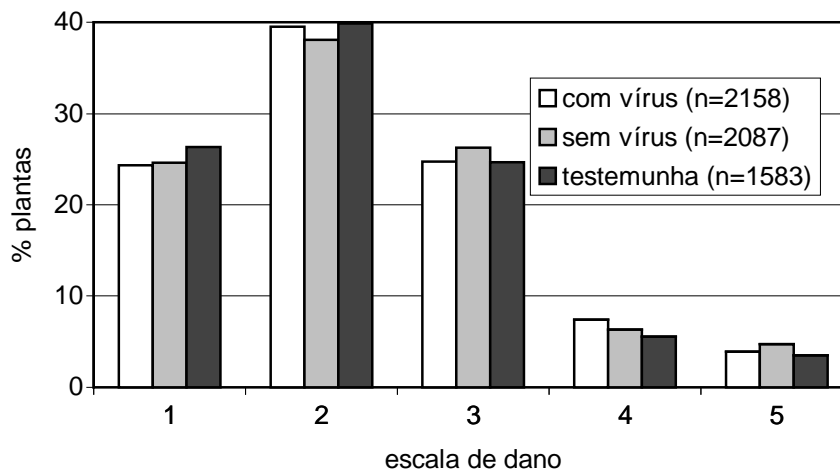


Figura 6. Intensidade de danos em plantas de milho, provocada por *S. frugiperda*. Sete Lagoas, MG.

se distribuísse homoganeamente pela plantação, provocando danos também de forma homogênea. A ausência de plantas isentas de dano (nota zero) em todos os tratamentos (Figura 7) confirma essa hipótese. Nesse caso, outros fatores relevantes devem ser considerados: além das condições climáticas da região (Bioma Cerrado) serem bastante favoráveis à lagarta-do-cartucho, as imediações da área do experimento (Área rural, onde localiza-se a Unidade de Pesquisa da Embrapa Milho e Sorgo) servem de local de plantio de milho durante o ano inteiro.

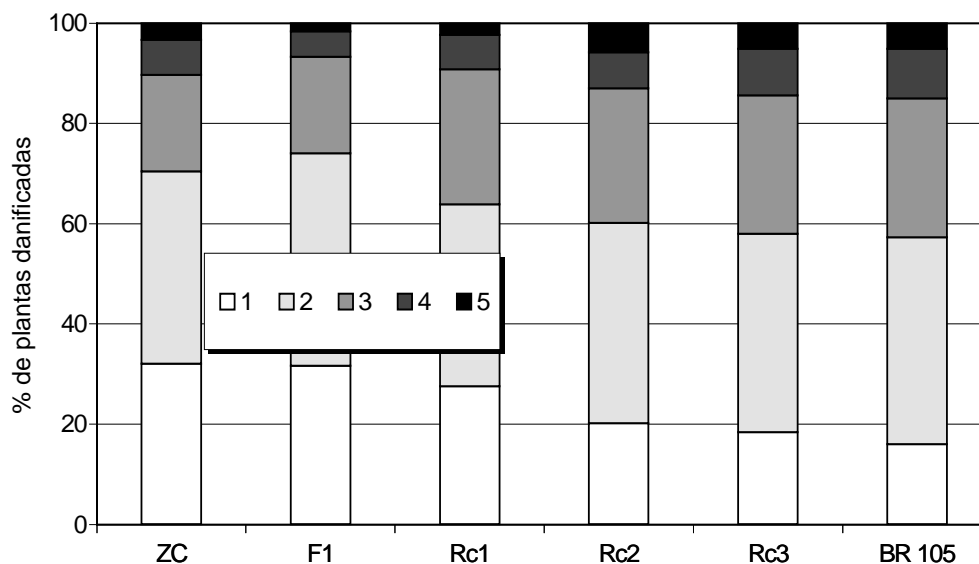


Figura 7. Frequência de plantas por classe de dano (1 a 5) provocado por *Spodoptera frugiperda* em plantas de milho, de acordo com o material genético. Número de plantas amostradas: ZC - 342, F1 - 361, RC1 - 375, RC2 - 366, RCc3 - 343 e Br 105 - 367.

Com o crescimento das lagartas, é esperado que as folhas que estavam inicialmente raspadas (dano 1) tornem-se danificadas, recebendo um valor posterior maior. Por reduzir a velocidade de desenvolvimento das lagartas, o material Zapalote Chico também prolonga o tempo necessário para que uma planta que tem uma intensidade de dano reduzida evolua para um valor maior. Pode-se notar pela figura 7 que nos tratamentos Zapalote Chico e F1, a proporção de plantas que recebeu os valores 3, 4 e 5 foi respectivamente de 29,57 e 25,98%, enquanto que em RC3 esse valor foi de 42,06 e de 42,74% em Br 105. Nem a maior ou menor presença de parasitóides no campo nem a aplicação do VPN - *Sf* são

capazes de justificar essa tendência, o que leva à conclusão de que a quantidade de introgressão gênica de Zapalote Chico nos materiais é que interferiu na intensidade de dano.

Algum efeito dos materiais genéticos foi notado no experimento de campo, enquanto que o mesmo não pode ser dito para os trabalhos desenvolvidos em laboratório. O confinamento dos parasitóides nas gaiolas pode ser o fator principal que limitou a capacidade de escolha das fêmeas, sugerindo que dados provenientes do campo seriam mais próximos do real que aqueles provenientes de laboratório.

5 CONCLUSÕES

Dentro do conjunto de agentes de controle natural de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) estudados, *Campoletis flavicincta* (Hymenoptera: Ichneumonidae), apresentou-se sensível tanto à presença do Vírus da Poliedrose Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (VPN - Sf), como aos diferentes materiais de milho (nesse caso, particularmente em experimentos realizados em campo). O parasitóide apresentou-se como um eficiente bioindicador, demonstrando sensibilidade às alterações impostas pelos outros agentes de controle populacional da fitófago. A grande maioria dos hospedeiros apresentou mais de um ovo do parasitóide em seu interior. Invariavelmente, apenas um adulto do parasitóide origina-se de cada hospedeiro. O período de incubação dos ovos de *C. flavicincta* é de 48h. A presença de cápsula cefálica e mandíbulas rígidas em larvas de primeiro ínstar do parasitóide sugerem um processo de competição intraespecífica pelos recursos do hospedeiro. Fêmeas do parasitóide depositaram mais ovos em lagartas sadias do que em infectadas, quando não tiveram opção de escolha. Estando em contato com lagartas sadias e infectadas pelo VPN - Sf ao mesmo tempo, não houve diferença no número de ovos depositados. Nesse caso, as fêmeas não teriam sido capazes de discriminar os odores de lagartas sadias e infectadas. A mistura dos odores provenientes de lagartas sadias e infectadas, confinadas que estavam numa mesma gaiola, teria causado o confundimento. Em teste de olfatômetro, lagartas sadias atraíram

50% das fêmeas, enquanto que em lagartas infectadas, esse valor foi de 32,1%. Discriminar hospedeiros sadios de infectados pode minimizar o impacto negativo do VPN - *Sf* sobre os parasitóides. Quanto maior o intervalo de tempo entre o parasitismo e a infecção das lagartas, maior a sobrevivência de *C. flavicincta*. Foram capazes de transmitir o patógeno para lagartas sadias as fêmeas do parasitóide originadas de lagartas infectadas pelo vírus e aquelas fêmeas inicialmente isentas do vírus, mas que acasalaram-se com machos oriundos de lagartas infectadas. Os materiais genéticos utilizados não indicaram diferenças significativas nos parâmetros biológicos avaliados em laboratório. Em campo, Zapalotre Chico apresentou-se como menos favorável ao desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*, onde foi coletado o menor número de pupas do parasitóide e que apresentou o menor nível de dano imposto pelo fitófago. *Doru luteips* (tesourinha) apresentou crescimento rápido de sua população no início da fase de desenvolvimento do milho, justamente quando é maior a presença de lagartas parasitadas, o que sugere um possível efeito negativo desse predador sobre a população de lagartas parasitadas, que por apresentarem menor atividade motora devido ao processo parasitário, ficariam mais propensas a tornarem-se presas. As reações de *C. flavicincta* à presença de outros agentes de controle confirmam a interdependência entre os diversos seres de um agroecossistema, servindo de argumento para estudos mais aprofundados dessas inúmeras interações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALASUBRAMANIAN, S.; R. S. ARORA & A. D. PAWAR. Biological control of *Heliothis armigea* (Hubn.) using *Trichogramma pretiosum* Riley and nuclear polyedrosis virus in Sriganganagar district of Rajasthan. **Plant-Protection-Bulletin-Faridabad**. v. 41, p. 3-4, 1989.

BEEGLE, C.C. & E.R. OATMAN. Effect os a polyhedrosis virus on the relationship between *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasite *Hyposoter exigua* (Hymenoptera: Ichneumonidae). **J. Invert. Path.** v. 25, p. 59-71, 1975.

BENTZ, J & J. W. NEAL JR. Effect of a natural insecticide from *Nicotiana glauca* on the whitefly parasitoid *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). **J. Econ. Entomol.** v. 88, p. 611-615, 1995.

BERGMAN, J. M. & W. M. TINGEY. Aspects of interaction between plant genotype and biological control. **Bull. Entomol. Soc. Am.** 25: 275-278. 1979.

BURGHES, H. D.; G. CROZIER & J. HEBER. A review of safety tests on Baculoviruses. **Entomophaga**. v. 25, p. 329-340, 1980.

CABALLERO, P.; E. VARGAS-OSUNA & SANTIAGO-ALVAREZ. Parasitization of granulosis-virus infected and noninfected *Agrotis segetum* larvae and the virus transmission by three hymenopteran parasitoids. **Entomol. Experim. Applic.** v. 58, p. 55-60, 1991.

CAMPBELL, B. C. & S. S. DUFFEY. Tomatine and parasitic wasps: potential incompatibility of plant antibiosis with biological control. *Science*. v. 205, p. 700-702, 1979.

CAPALBO, D.M.F & DE NARDO, E. A. B. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. p. 351-387. In Melo I.S. de & J. L. de Azevedo (eds.) **Controle biológico**, 2. Jaguariúna, Embrapa, 2000. 387p.

CHITITHUNSA, T. & P.P SIKOROWSKI. Transmission of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) of Monoccluded Baculovirus (baculovirus: Subgroup C). **Environ. Entomol.** v. 25, p.192-197, 1996.

CROFT, B. A. & A.W. A. BROWN. Response of natural enemies to insecticides. **Ann. Rev. Entomol.** v. 20, p. 285-335, 1975.

CRUZ, I, M. L. C. FIGUEIREDO, F. H. VALICENTE, & A. C. OLIVEIRA. Application rate trials with a Nuclear Polyhedrosis Virus to control *Spodoptera frugiperda* on maize. *An. Soc. Entomol. Brasil.* v. 6, p. 145-152, 1997b.

CRUZ, I. & M. TURPIN. Efeito de *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura do milho. **Pesq. Agrop. Brasil.** v. 17, p. 355-359. 1982.

CRUZ, I. & M. TURPIN. Yield impact of larval infestation of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) to mid-whorl growth stage of corn. **J. Econ. Entomol.** v. 76, p. 1052-1054. 1983.

CRUZ, I. 1995b. Manejo integrado de pragas de milho com ênfase para o controle biológico. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 4, 1995, Campinas. **Anais...** Campinas: Instituto Biológico, 1995. p.48-92.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa. CNPMS. 45p. (EMBRAPA - CNPMS). **Circular Técnica**, 21. 1995 a.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: **SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO SAFRINHA**, 5, Barretos, SP. Cursos para agricultores. Campinas: IAC. 1999. p. 27-56.

CRUZ, I. Utilização do baculovírus no controle de da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. In Melo, I.S. de & J. L. de Azevedo (eds.), **Controle biológico**, 3. Jaguariúna, Embrapa, 2000. 308p.

CRUZ, I., C. D. ALVARENGA & P. E. F. FIGUEIREDO. Biologia de *Doru luteipes* Scudder e sua capacidade predatória de ovos de *Helicoverpa zea* (Boddie). *An. Soc. Entomol. Brasil.* v. 24, p. 273-278, 1995.

CRUZ, I., M.L. C. FIGUEIREDO, E. P. GONÇALVES, D.A.N. LIMA & E. E. DINIZ. Efeito da idade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no desempenho do parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Hymenoptera: Ichneumonidae) e consumo foliar por lagartas parasitadas e não-parasitadas. **An. Soc. Entomol. Brasil.** v. 26, p. 229-234. 1997.b.

DANFA, A. Effects of entomopathogen, *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana*, on *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) and *Epidinocarsis lopezi* De Santis (Hymenoptera: Encyrtidae). Cap.5. 103-116. In: **Environmental side-effects of locust and grasshopper control.** v.3. Ed. Everts, J. W. , D. Mbaye, O. Barry & W. Mullié. 1998. 207p.

DE PAULA, Z C. O campo da vida o campo da morte: uma leitura da agricultura no município de Maringá na década de 80. *Revista de História Regional*. v. 3. p. 1-15. 1998. Vol. 3. - nº 2 - Inverno 1998

DEQUECH, S.T., A . R. LUCHO, S.L. SIEBEN, R.F.P. SILVA E L.M. FIUZA. Levantamento de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) na região de Cachoeirinha, RS. Anais VII Simpósio de Controle Biológico, Poços de Caldas, MG. P. 294. 03 a 07 junho de 2001. 2001.

ELSEY, K. D. & R.L.RABB. Biology of *Voria ruralis* (Diptera: Tachinidae) **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 63, p. 216-222. 1970.

ELZEN, G.W., H.J. WILLIAMS & S.B. VINSON. Response by the parasitoid *Campoletis sonorensis* (Hymenoptera: Ichneumonidae) to chemicals (Synomones) in plants: implications for host location. **Environ. Entomol.** v. 12, p. 1873-1877. 1983.

ESCRIBANO, A., T. WILLIAMS, D. GOULSON, R. D. CAVE, J. W. CHAPMAN & P. CABALLERO. Effect of parasitism on a nucleopolyhedrovirus amplified in *Spodoptera frugiperda* larvae by *Campoletis sonorensis*. **Ent. Exp. Appl.** v.97, p. 257-264. 2000a.

ESCRIBANO, A., T. WILLIAMS, D. GOULSON, R. D. CAVE & P. CABALLERO. Parasitoid-pathogen-pest interactions of *Chelonus insularis*, *Campoletis sonorensis*, and a nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera frugiperda* larvae. **Biol. Control** v. 19, p. 256-273. 2000b.

ESCRIBANO, A.; T. WILLIAMS; D. GOULSON; R.D. CAVE & P. CABALLERO. Parasitoid-pathogen-pest interactions of *Chelonus insularis*, *Campoletis sonorensis*, and a Nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera frugiperda* larvae. **Biological Control**. v. 19, p. 265-273, 2000.

ESCRIBANO, A.; T. WILLIAMS; D. GOULSON; R.D. CAVE; CHAPMAN, J.W. & P. CABALLERO. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. **J. Econ. Entomol.** v. 92, p. 1079-1085, 1999.

FARID, A., S. S. QUINSENBERRY, J. B. JOHNSON & B. SHAFH. Impact of wheat resistance on russian wheat aphid and a parasitoid. *J. Econ. Entomol.* v. 91, p. 334-339, 1998.

FLETCHER, J.P., J. P. HUGHES E I. F. HARVEY. Life expectancy and egg load affect oviposition decision of a solitary parasitoid. **Proc. R. Soc. Lond.** v. 258, p.163-167. 1994.

FOX, L. R.; D. K. LETOURNEAU; J. EISENBACH & S. van NOUHUYS. Parasitism rates and sex ratios of a parasitoid wasp: effect of herbivor and plant quality. *Oecologia*. v. 83, p. 414-419, 1990.

FUXA, J.R. Fate of released entomopathogens with reference to risk assssment of genetically engineered microorganisms. **Bull. Entomol. Soc. Am.** v. 5, p. 12-24, 1989.

GODFRAY, H.C.J. **Parasitoids**: behavioral and evolutionary ecology. 1st. ed., New Jersey, Princeton University Press, 1994. 437p.

HARRISON, F.P. Observation on the infestation of the corn by fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) with reference to plant maturity. *Florida Ent.* v. 63, p. 333-335, 1984.

HOCHBERG, M.E. Intra-host interactions between a braconid endoparasitoid, *Apanteles glomeratus*, and a baculovirus for larvae of *Pieris brassicae*. **J. Animal Ecol.** v. 60, p. 51-63. 1991.

HOPPER, K. R. & G. KING. Linear functional response of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) to variation in *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) density in the field. *Environ. Entomol.* v. 15. P. 476-480, 1986.

HOTCHKIN, P.G. & H.K. Kaya. Interactions between two baculoviruses and several insect parasites. **Can. Ent.** v. 115, p. 841-846, 1983.

IRABAGON, T. A. & W.M. BROOKS. Interaction of *Campoletis sonorensis* and Nuclear polyhedrosis virus in larvae of *Heliothis virescens*. **J. Econ. Entomol.** v. 67, p. 229-231, 1974.

JEPSON, P.C., B.A. CROFT & G.E. PRATT. Test systems to determine the ecological risks posed by toxin release from *Bacillus thuringiensis* genes in crop plants. **Molecular Ecology**. v.3, p. 81-89. 1994.

JOHNSON, M. T. Interaction of resistant plants and wasp parasitoids of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* v. 26, p. 76-80, 1997.

JONES, R.L., W.J. LEWIS, M.C. BOWMAN, M. BEROZA & B.B. BIERL. Host seeking stimulant for parasite of corn earworm: isolation, identification, and synthesis. *Science* v. 173, p. 842-843, 1971.

KAYA, H.K. & Y. TANADA.. Hemolymph factor in armyworm larvae infected with a nuclear polyhedrosis virus toxic to *Apanteles militaris*. **J. Invertebr. Pathol.** v. 15, p. 328-340, 1973

KLEIN, M. & H. PODOLER. Studies on the application of a nuclear polyhedrosis virus to control, populations of the egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis*. **J. Invert. Path.** V. 32, p. 244-248, 1978.

LA SALLE, J. & GAULD, I.D. Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. **REDIA.** v 54, p. 315-334. 1991.

LANDIS, W. G., G. B. MATTHEWS, R. A. MATTHEWS & A. SERGEANT. 1994. Application of multivariate techniques to endpoint determination, selection and evaluation in ecological risk assessment. **Environ. Tox. and Chem.** v. 13, p. 1917-1927.

LASALLE, J. & I. D. GAULD. Parasitic hymenoptera and the biodiversity crisis. **Redia.** v. 74. p. 315 - 334. 1991.

LEVIN, D. B., J. E. LAING & R. P. JACQUES. Interactions between *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae) and granulosis virus in *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). **Environ. Entomol.** v. 10. p. 656-68. 1981.

LEVIN, D. B., J. E. LAING & R. P. JACQUES. Interactions between *Apanteles glomeratus* (L.) (Hymenoptera: Braconidae) and granulosis virus in *Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae). **Environ. Entomol.** v.10, p. 656-68. 1981.

LEWIS, W.J. & W.R. MARTIN JR. Semiochemicals for use with parasitoids: status and future. **J. Chem. Ecol.** v. 16, p. 3067-3089. 1990.

LINGREN, P. D., M. J. LUKEFAHR, M. DIAZ JR & A. HARTSTACK JR. Tobacco budworm control in caged cotton with a resistant variety, augmentative releases of *Campoletis sonorensis*, and natural control by other beneficial species. *J. Econ. Entomol.* v. 71, p. 739-745, 1978.

MAGALHÃES, B. P., R. MONNERAT & S. B. ALVES. Interações entre entomopatógenos, parasitóides e predadores. p. 195-216. In: **Controle Microbiano de Insetos.** 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

MARENCO, R. A. & J. L. SAUNDERS. Depredacion de *Spodoptera frugiperda* por *Doru* sp. en maiz, en Turrialba, Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas. v.27, p. 24-26, 1993.

McCUTCHEON, G. S. & S.G. TURNIPSEED. Parasites of larvae in insect resistant and susceptible soybean in South Carolina. Environ. Entomol. v. 10, p. 69-74, 1981.

MEADOWS, M.P. *Bacillus thuringiensis* in the environment - ecology and risk assesment, In: Entwistle, P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey & S. Higgs (eds.), ***Bacillus thuringiensis*: an environmental biopesticide - theory and practice**. Chichester: John Wiley. p.1. 93-200. 1993.

MENALLED, F. D., P.C. MARINO, .S. H. GAGE & D.A. LANDIS. Does agricultural landscape structure affect parasitism and parasitoid diversity? **Ecological Applications**. v.9, p. 634-641. 1999.

MILTENBURGER, H. G. & A. KRIEG. Bioinseticides: II. Baculoviridae. In Alan Liss (ed.), **Advances in Biotechnological Process 3**. New York. p. 291-31. 1984.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX. Disponível na internet. <http://www.fioCRUZ.br/cict/english/sinitox/tabingles01.htm>. 31 jul. 2002.

MORAES, R. R. de, LOECK, A. E. & L. C. BELARMINO. Inimigos naturais de *Rachiplusia nu* (GUENÉE, 1852) e *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em campos de soja no Rio Grande do Sul. **Pesq. agropec. bras.** v. 26, p. 57-64. 2002.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **An. Rev. Entomol.**v. 44, p. 257-289. 1999.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para controle de lagarta-da-soja. In: Alves, S.B. Coord. **Controle microbiano de insetos**. SP, Ed. Manole. 1986. p. 278-288.

MOSCARDI, F. **Utilização de vírus para controle de lagarta-da-soja**. In Alves, S.B. Coord. Controle microbiano de insetos. SP, Ed. Manole. 1986. p. 278-288.

MURRAY, D.A.H.; C.J. MONSOUR; R.F.TEAKLE; K.P. RYNNE & J.A. Bean. Interactions between nuclear polyhedrosis virus and three larval parasitoids of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera;Noctuidae). **J. Australian Entomological Society**. v. 34, p. 319-322. 1995.

NARDO, E. A. B. & D. M. F. CAPALBO. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. p. 351-387. In: **Controle biológico**. Eds. Melo, I. S de. & Azevedo, J. L. de. Jaguariúna, SP. EMBRAPA Meio Ambiente. 2000, 388 p.

NARDO, E. A. B. & D. M. F. Capalbo. Avaliação ecotoxicológica de agentes microbianos de controle de pragas. **Biológico**. v. 59, p. 63-68. 1997.

NOBLE, L. W. & H. .M. GRAHAM. Behavior of *Campoletis perdinctus* (Viereck) as a parasite of tobacco budworm. **J. Econ. Entomol.** v. 59, p. 1118-1120, 1966.

OATMAN, E.R. & G.R. PLATNER. An ecological study of insect populations on cabbage in southern California. **Hilgardia**. V. 40, p. 1-40.1969.

OLOFSSON, E. Transmission agents of the nuclear polyhedrosis virus of *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae). **Entomophaga**. v. 34, p. 373-380, 1989.

PATEL, P.N. & M.E.M. HABIB. Levantamento e eficiência de insetos parasitos de *Spodoptera frugiperda*. **Rev. Agricult.** v. 6, p. 93-100. 1986.

PICKETT, S.T.A., J.KOLASA, J.J. ARNESTO & S.L.COLLINS. The ecological concept of disturbance and its expression at various hierarchial levels. **Oikos**. v.54, p.129-136. 1989.

POWELL, W. Enhancing parasitopids activity in crops. In **Insect Parasitoid**, Eds. Waage, J. e D. Greathead. Academis Press, London. 1985. 389 p.

PRICE, P.W. Strategies for egg production. **Evolution**. v. 28, p. 76-84. 1974.

RENWICK, J. A . A . Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia*. v. 45, p. 223-228, 1989.

ROSENBERG, D. M. , H. V. DANKS & D. M. LEHMKUHL. Importance of insects in environmental impact assessment. **Environmental Management**. v. 10, p. 773-783. 1986.

ROYAL SOCIETY. **Risk: Analysis, perception and management**. The Royal Society, London. 1992.

SALT, G. Competition among insect parasitoids. Symposium of the Society of **Experimental Biology**. V. 5, p. 81-95. 1961.

SANDLAN, K. Sex ratio regulation in *Coccygomimus turonella* Lennæus (Hymenoptera: Ichneumonidae) and its ecological implications. **Ecol. Entomol.** v. 4, p. 365-378. 1979.

SANTIAGO-ALVAREZ, C. & P. CABALLERO. Susceptibility of parasitized *Agrotis segetum* larvae to a granulosis virus. **J. Invert. Pathol.** v. 56, p. 128-131, 1989.

SILVEIRA, L. C. P., J. D. VENDRAMIM & C. J. ROSSETTO. Não preferência para alimentação da lagarta-do-cartucho em milho. *Bragantia*. v. 57, p. 35-40. 1998.

SILVEIRA, L.C. P.; J.D. VENDRAMIM E C.J. ROSSETTO. Efeito de genômaterais de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *An. Soc. Entomol. Brasil.* v. 26, p.291-298, 1997.

STILING, P.D. The frequency of density dependence in insect host-parasitoid systems. **Ecol.** v. 8, p. 844-856. 1987.

STRAND, M. R. The physiological interactins of parasitoids with their hosts and their influence on reproductive strategies. In Waage, J. & D. Greathead (eds.), **Insect Parasitoid**. London, Academic Press, 1985. 389 p.

THOMPSON, C. G. & E. A. STEINHAUS. Further tests using a polyhedrosis virus to control the alfafa caterpillar. **Hilgardia**. v. 19, p. 411-445, 1950.

VAIL, P.V. Cabbage looper nuclear polyhedrosis virus-parasitoid interactions. **Environ. Entomol.** v. 10, p. 517-520. 1981.

VALICENTE, F. H. & I. CRUZ. 1991. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas, EMBRAPA,CNPMS. Circ. Téc. 15, 23p.

VALICENTE, F. H. & I. CRUZ. **Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus.** Sete Lagoas, EMBRAPA,CNPMS. Circ. Téc. 15, 23p. 1991.

VALICENTE, F. H. & M.R. BARRETO. Survey of natural enemies of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in the Cascavel region, PR, Brazil. **An. Soc. Entomol. Brasil.** v. 28, p. 333-337, 1999.

VALICENTE, F. H., M.J.V.V.D. PEIXOTO, E. PAIVA & E. KITAJIMA. Identificação e purificação de um vírus de poliedrose nuclear da lagarta do

cartucho, *Spodoptera frugiperda*. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 18, p. :71-82. 1989.

VAN ALPHEN, J. J. M. & I. E. M. VET. An evolutionary approach to host finding and selection, p. 23-61. In J. WAAGE & D. GREATHEAD (eds.), **Insect parasitoids**. London, Academic Press, 1985. 389 p.

VAN LENTEREN & K. BAKER. Behavioral aspects of the functional responses of a parasite (*Pseudeucoila bochei* Weld) to its host (*Drosophila melanogaster*). **Netherlands J. Zoology**. v. 28, p. 3213-233, 1978.

VAN LENTEREN, J.C. Host discrimination by parasitoids, p.153-180. In D. A. Nordlund, R.L. Jones & W.J. Lewis (eds.), **Semiochemicals**. New York, Wiley, 1981. 396p.

VENDRAMIM, J. .D & M. FANCELLI. Efeito de genómatérias de milho na biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) **An. Soc. Entomol. Brasil**. v. 17, p. 141-150, 1988.

VERNIER, Jacques. **O Meio Ambiente**. Campinas: Papirus, 1994. p. 20.

VERSOL, P.L. E W. G. YENDOL. Discrimination by the parasite, *Apanteles melanoscelus*, between healthy and virus-infected moth larvae. **Environm. Entomol.** v. 11, p. 42-45. 1982.

VIANA, P. A. & POTENZA, M. R. Avaliação de antibiose e não-preferência em cultivares de milho selecionados com resistência à lagarta-do-cartucho. *Bragantia*. v. 59, p. 27-33, 2000.

VINSON, S.B. & G.F. IWANTSCH. Host regulation by insect parasitoids. **Quarterly Review of biology**. v. 55, p. 143-165. 1980.

VINSON, S.B. Competition and host discrimination between two species of tobacco budworm parasitoids. **Ann. Entomol. Soc. Am.** v. 5, p. 229-236. 1972.

VISSER, M.E. Adaptive self- and conspecific parasitism in the solitary parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Behav. Ecol.** v.4, p. 22-28. 1993.

WARE, G.W. Effects of pesticides on nontarget organisms. **Residue Reviews**. v. 76, p.173-201, 1980.

WILLIAMS, H.J., G.W. ELZEN & S.B. VINSON. Parasitoids-host-plant interactions, emphasizing cotton (*Gossypium*), p. 171-191. In P. Barbosa & D.

K. Letourneau (eds.), **Novel aspects of insect-plant interactions**. New York, Wiley, 1988. 362 p.

WILSON, R.L.; B.R. WISEMAN E G. L. REED. Evaluation of J.C. Eldredge popcorn collection for resistance to corn earworm, fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and corn European corn borer. *J. Econ. Entomol.* v. 84, p.693-698, 1991.

WISEMAN, B. R. & J. E. CARPENTER. Growth inhibition of corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae reared on resistant corn silk diets. *J. Econ. Entomol.* v. 88, p. 1037-1043, 1995.