

Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*

Ricardo A. Polanczyk¹
Sérgio B. Alves²

RESUMO. Avaliou-se em laboratório a interação de isolados de *Bacillus thuringiensis* com *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis* sp., *Nomurea rileyi* e um vírus de poliedrose nuclear (VPN), no controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*. Para a realização do bioensaios utilizou-se a concentração de 3×10^8 esporos/mL para os isolados de *B. thuringiensis* (ESALQ 2.4, 3.7 e 8.7); para o nematóide *Heterorhabditis* sp. foram utilizados cerca de 500, 2500 e 7500 juvenis infectivos (JI)/mL; para os fungos *B. bassiana* (isolados ESALQ 1074, 1115, 1117 e 1284) e *N. rileyi* (isolado ESALQ N1) utilizou-se 1×10^8 conídios/mL; e para o VPN foram testados cerca de 48×10^5 e 24×10^6 corpos de inclusões virais (civ)/mL. Para os bioensaios de interação utilizou-se a aplicação seqüencial dos entomopatógenos, com dois dias de intervalo entre os tratamentos. Observou-se que entre *B. thuringiensis* e *Heterorhabditis* sp. ocorreu interação positiva, variando de efeito aditivo a sinergismo subaditivo, de acordo com a concentração do nematóide. Entre *B. thuringiensis* e os fungos entomopatogênicos foi verificada interação negativa (antagonismo) e entre o VPN e *B. thuringiensis* a interação foi negativa e positiva (efeito aditivo), dependendo da concentração do vírus.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis* sp., *Nomurea rileyi*, vírus de poliedrose nuclear (VPN).

RESUMEN. Interacción de *Bacillus thuringiensis* y otros entomopatógenos en el control de *Spodoptera frugiperda*. Se evaluó en laboratorio la interacción de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* con *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis* sp., *Nomurea rileyi* y un virus de poliedrosis nuclear (VPN), en el control del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. En los bioensayos se utilizó una concentración de 3×10^8 esporas/mL para los aislamientos de *B. thuringiensis* (ESALQ 2.4, 3.7 y 8.7); para el nematodo *Heterorhabditis* sp. se utilizaron cerca de 500, 2500 y 7500 juveniles infectivos (JI)/mL; para los hongos *B. bassiana* (aislamientos ESALQ 1074, 1115, 1117 y 1284) y *N. rileyi* (aislamiento ESALQ N1) se utilizó una suspensión de 1×10^8 conidios/mL; y para el VPN se evaluaron cerca de 48×10^5 y 24×10^6 cuerpos de inclusión virales/mL. En los bioensayos de interacción se realizó la aplicación secuencial de los entomopatógenos, con dos días de intervalo entre los tratamientos. Se observó interacción positiva entre *B. thuringiensis* y *Heterorhabditis* sp., variando de efecto aditivo a sinergismo subaditivo, en función de la concentración del nematodo. Entre *B. thuringiensis* y los hongos entomopatógenos se verificó interacción negativa (antagonismo) y entre el VPN y *B. thuringiensis* la interacción fue negativa o positiva (efecto aditivo), dependiendo de la concentración del virus.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis* sp., *Nomurea rileyi*, virus de poliedrosis nuclear (VPN).

¹ Laboratório de Entomologia, Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário s/n. Centro – Alegre (ES). 29500-000. Brasil. ricardo@cca.ufes.br

² Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos. Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ – USP), Avenia Pádua Dias, 11. Piracicaba, SP. Brasil. 13418-900. sebalves@esalq.usp.br.

ABSTRACT. Interaction between *Bacillus thuringiensis* and other entomopatogens in the control of *Spodoptera frugiperda*. The interaction between isolates of *Bacillus thuringiensis* with *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis* sp., *Nomuraea rileyi* and a nuclear polyhedrosis virus (NVP) to control *Spodoptera frugiperda* was evaluated in the laboratory. The bioassays used a concentration of 3×10^8 spores/mL for *B. thuringiensis* isolates; 500, 2500 and 7500 infective juveniles per mL for the nematode *Heterorhabditis* sp.; for *B. bassiana* and *N. rileyi* a suspension of 1×10^8 conidia/mL, and for the NVP 48×10^5 and 24×10^6 parasporal inclusion bodies per mL. In the interaction bioassays we carried out a sequential application of entomopatogens, with a two-day interval between treatments. There was a positive interaction between *B. thuringiensis* and *Heterorhabditis* sp., varying from additive effect to subadditive synergism, depending on nematode concentration. Between *B. thuringiensis* and the entomopatogenous fungi the interaction was negative (antagonism), and between the NVP and *B. thuringiensis* it was negative or positive (additive effect), depending on virus concentration

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Heterorhabditis* sp., *Nomuraea rileyi*, nuclear polyhedrosis virus (NPV).

Introdução

A eficácia e especificidade das cepas de *Bt* e suas toxinas no controle de insetos praga, favoreceu a formulação de biopesticidas à base deste patógeno e, desde o primeiro produto lançado na França em 1938, mais de 100 formulações foram colocados no mercado mundial, sendo atualmente responsáveis por mais de 90% do faturamento com bioinseticidas. O continente americano é responsável por 50% deste mercado, principalmente os Estados Unidos e Canadá e a América Latina representa apenas 8 a 10% do total (Tamez-Guerra *et al.* 2001).

Na América Latina, Cuba e México lideram a utilização de bioinseticidas à base de *Bt* contra várias pragas na cultura do algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho, pastagens. Estes são os únicos países que tem produção própria destes biopesticidas, tornando-os competitivos em relação aos produtos químicos (Tamez-Guerra *et al.* 2001).

No Brasil utilizam-se produtos à base de *Bt* para o controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que estes produtos são aplicados é apenas a terça parte do México e semelhante à de Cuba, ou seja, cerca de 150.000 hectares (Souza 2001). As principais limitações são o elevado custo, a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores público e privado, no desenvolvimento e formulação destes produtos (Alves 1998a).

Dentre as pragas de grande importância agrícola no Brasil, a lagarta-do-cartucho ocupa lugar de destaque, pois ataca algodão, alfafa, amendoim, arroz, aveia, batata, batata doce, cana-de-açúcar, hortaliças, milho, soja e trigo, sendo mais comum em gramíneas. Já na década de 20 foi relatada a presença desta praga em vários Estados brasileiros, causando severos danos

em algumas culturas (Leiderman & Sauer 1953). Segundo Cruz *et al.* (1999), as perdas causadas pela lagarta-do-cartucho no Brasil atingem cerca de US\$ 40 milhões por ano.

Em estudos iniciais, o *Bt* foi considerado pouco eficiente no controle de *S. frugiperda*. Porém, mais recentemente, com os avanços proporcionados por novas técnicas laboratoriais e maior interesse dos pesquisadores, resultados positivos foram obtidos (Hernandez 1988, Bohorova *et al.* 1996, Dias *et al.* 1999, Silva-Werneck *et al.* 2000, Arango *et al.* 2002, Uribe *et al.* 2003).

Uma forma de incrementar a eficácia de entomopatógenos é utilizá-los em conjunto com inseticidas ou outros agentes de controle biológico. A interação entre inseticidas convencionais e produtos formulados com *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) foi amplamente estudada e, em alguns casos, foram obtidos resultados satisfatórios (Benz 1971). Esta interação baseia-se no princípio de que o inseticida convencional atua como agente estressante do inseto, levando-o a adquirir ou ativar doenças infecciosas, tornando-o mais suscetível às toxinas do *Bt*.

Mais recentemente, o estudo da interação de bioinseticidas à base *Bt* e outros entomopatógenos ganhou mais ênfase (Glare & O'Callaghan 2000). A compatibilidade com outros bioinseticidas ou com agentes naturais de controle é importante no desenvolvimento de estratégias que utilizam entomopatógenos em programas de Manejo Integrado de Pragas (Gardner *et al.* 1984). É essencial, nestes casos estudar as interações potenciais, principalmente para viabilizá-las economicamente e também para avaliar seu impacto sobre o ambiente. Porém, o estudo destas interações tem um elevado grau de complexidade e as respostas sinérgi-

cas são raras, mesmo em laboratório (Koppenhöfer & Kaya 1997). As mesmas dificuldades, até em maior grau, são observadas em campo.

Apesar destas dificuldades, alguns estudos de laboratório avaliaram o sinergismo de *Bt* com outros entomopatógenos. Koppenhöfen *et al.* (1999), Koppernhofer & Kaia (1997) e Shamseldean & Ismail (1997) estudam o efeito da interação do nematóide entomopatogênico *H. bacteriophora* e *Steinernema glaseri* com *Bt*, e observaram efeito sinérgico para *Cyclocephala hirta*, *C. pasadenae* e *Agrotis ipsilon*, respectivamente. A interação de vírus entomopatogênicos com *Bt* para o controle de espécies-praga é o caso mais estudado de interação entre entomopatógenos, envolvendo principalmente o controle de *Heliothis virescens*, *Spodoptera* spp. e *Trichoplusia ni* (Glare & O'Callaghan 2000), porém os exemplos de interação envolvendo *S. frugiperda* são raros (López-Lastra *et al.* 1995). Estudos que avaliam as interações de *Bt* com fungos entomopatogênicos são escassos (Ignoffo *et al.* 1980, El-Maghraby *et al.* 1988, Lewis & Bing 1991) e apresentam resultados variáveis.

Com a finalidade de gerar mais informações sobre a interação de *Bt* com outros entomopatógenos, este trabalho incluiu dois fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* e *Nomureae rileyi*), um vírus de poliedrose nuclear (VPN) e um nematóide entomopatogênico (*Heterorhabditis* sp.), principalmente, pela sua reconhecida eficiência no controle da lagarta-do-cartucho, como será visto a seguir.

B. bassiana tem ampla distribuição geográfica, é mais freqüente em insetos e em amostras de solo, sendo encontrado no campo em coleópteros, lepidópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros e ortópteros. A infecção pode ocorrer por via oral, pelo tegumento ou pelo espiráculo, sendo que 12 horas após o contato com o inseto, ocorre a germinação dos conídios. Decorridas 72 horas, o inseto pode ser totalmente colonizado, advindo à morte em função da falta de nutrientes e do acúmulo de substâncias tóxicas. As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença são umidade relativa em torno de 90% e temperatura entre 23 e 28 °C. O outro fungo, *Nomureae rileyi*, ocorre naturalmente sobre coleópteros, ortópteros e, principalmente lepidópteros. Este patógeno penetra no inseto via oral ou pelo tegumento, sendo que a germinação pode ocorrer em 12 horas e a invasão da hemocele em 24 horas. A colonização e morte do hospedeiro ocorrem entre 3 a 5 dias e 6 a 7 dias, respectivamente (Alves 1998b).

Em relação à *B. bassiana*, embora no Brasil os

relatos não sejam muitos (Castanheira *et al.* 1993), trabalho desenvolvido França *et al.* (1989) mostra o potencial deste patógeno para controlar a lagarta-do-cartucho. Além desses trabalhos, Chonay (1988), Lecuona (1999) e Lezama *et al.* (1996) relataram a alta virulência deste fungo para a lagarta-do-cartucho na Guatemala, México e Argentina, respectivamente. A eficiência de *N. rileyi* no controle de *S. frugiperda* foi relatada no exterior por Gladstone (1989), Lezama *et al.* (1996), Lecuona (1999), sendo que no Brasil também existem vários relatos (Habib & Patel 1990; Moscardi *et al.* 1992).

No Brasil, a ocorrência de um vírus de poliedrose nuclear (VPNSf) em *S. frugiperda* foi constatada em 1978 (Gerk *et al.* 1997), sendo que Moscardi (1998) ressalta o potencial deste VPN para o manejo dessa praga. Além disso, esse patógeno é inócuo ao meio e favorece o desenvolvimento de populações de inimigos naturais. Por esses motivos foi o terceiro entomopatógeno a ser incluído neste trabalho.

Os baculovírus englobam o grupo de vírus mais estudados e utilizados como bioinseticida. Esse entomopatógeno têm como principal rota de infecção a ingestão de alimento contaminado, com a subsequente liberação das partículas virais nas células epiteliais do intestino médio, causando a morte do inseto em poucos dias (Ribeiro *et al.* 1999). A fase larval é a mais suscetível à infecção, e o inseto pode ser contaminado por meio dos ovos, espiráculos, inimigos naturais, ou mais comumente pela via oral. O aparecimento dos sintomas e a morte do inseto dependem de diversos fatores, como: idade do inseto, virulência do isolado e das condições climáticas (Valicente & Cruz 1991).

Os nematóides entomopatogênicos são organismos com grande potencial e ainda pouco explorados, destacando-se os gêneros *Steinernema*, *Heterorhabditis* e *Neosteinernema*. Espécies de *Heterorhabditis* têm como características favoráveis: capacidade de locomoção no solo à procura de hospedeiros, ampla gama de hospedeiros, o que auxilia na sua sobrevivência em campo, não são patogênicos a inimigos naturais e podem ser multiplicados tanto *in vivo* como *in vitro*. Na fase de juvenis infectivos os nematóides encapsulam células da bactéria simbiótica e têm o trato digestivo desativado. Nesta fase estão aptos a suportar condições ambientais adversas, enquanto localizam um novo hospedeiro. Quando isso ocorre, invadem o corpo do inseto através de aberturas naturais, ou até mesmo através da

cutícula intacta. Ao alcançarem a cavidade do corpo, liberam na hemolinfa células da bactéria simbiótica, as quais multiplicam-se rapidamente e matam o inseto por septicemia em aproximadamente 24 a 48 horas. Então os nematóides se desenvolvem, alimentando-se da bactéria e alcançam o estágio adulto (Ferraz 1998).

Molina-Ochoa *et al.* (1996) estudaram a eficiência de diferentes espécies de nematóides entomopatogênicos para *S. frugiperda*, e constataram que *H. bacteriophora* foi mais eficaz para a fase larval, causando 65% de mortalidade em lagartas de segundo ínstar.

Koppenhöfer *et al.* (1999) e Koppenhöfer & Kaya (1970) ressaltam que o efeito sinérgico entre os nematóides entomopatogênicos e *Bt japonensis*, para o controle de *C. hirta* e *C. pasadenae*, tanto em casa de vegetação como em campo, foi maior quando os entomopatogênicos foram aplicados em sequência, com intervalo de sete dias entre a aplicação dos tratamentos, e que os estágios mais suscetíveis dos insetos são os primeiros ínstars larvais. Os autores afirmam que as larvas inoculadas com *Bt japonensis* estressam devido à presença do patógeno, ficando mais suscetíveis à ação do nematóide, posteriormente aplicado.

Na América Latina, a empresa Probioma (Bolívia) comercializa *Heterorhabditis* spp. com o nome comercial Probione para o controle de *Spodoptera* sp., *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Pseudoplusia includens*, *Diaphania hyalinata*, *Leptophobia* sp., *Phyllophaga* sp., *Diabrotica* sp., *Agrotis* sp., *Cylas formicarius*, *Eusepeus* sp., *Cosmopolites sordidus*, *Pachnaeus litus*, *Hypothenemus hampei* e Pseudococcidae em cerca de 20 culturas. Além da alta eficiência este nematóide não apresenta efeito sobre insetos polinizadores; tem capacidade de reproduzir-se em campo nos insetos que parasita, portanto apresenta um controle duradouro; pode ser utilizado em conjunto com outras medidas de controle biológico; é capaz de se movimentar no solo para encontrar o hospedeiro; pode ser aplicado por meios convencionais e pode ser utilizado na agricultura orgânica. A aplicação deste nematóide é feita com esponjas (40/ha), sendo que cada esponja contém cerca de 3 milhões de nematóides. Poinar (1971), resalta que fatores físicos do solo podem influenciar a eficiência dos nematóides entomopatogênicos. Entre estes fatores, o autor afirma que a alta umidade do solo é essencial para a longevidade satisfatória destes nematóides.

Neste trabalho, avaliou-se em laboratório o efeito da interação dos fungos entomopatogênicos *B.*

bassiana e *N. rileyi*, de um vírus de poliedrose nuclear de *S. frugiperda* (VPNSf) e do nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. com isolados de *Bt* no controle de *S. frugiperda*.

Material e métodos

Testes de patogenicidade de *Bt* para *Spodoptera frugiperda*

Para os testes de interação com outros entomopatogênicos foram utilizados 3 isolados (ESALQ 2.4, 3.7 e 8.7) de *Bt* previamente selecionados para *S. frugiperda*, pertencentes ao Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, ESALQ (USP), Piracicaba-SP (Brasil). Estes isolados foram selecionados pois causaram mortalidade acima de 50% para a lagarta-do-cartucho em trabalhos anteriores.

Para os testes de interação estes isolados foram multiplicados em meio de cultura BHI (Infusão de Cérebro e Coração – Caldo BHI da AZ Labor) a 28 °C, e 180 rpm por 76 horas para um crescimento padrão dos mesmos. Após a lise bacteriana, a mistura contendo esporos, cristais e células vegetativas foi submetida a três centrifugações consecutivas (5.000 rpm por 20 minutos), a fim de eliminar o meio de cultura e lavar o concentrado obtido, eliminando toxinas extra-celulares como as β -exotoxinas.

Após a multiplicação do isolado, uma alíquota de 1 mL foi diluída 1000 vezes em água destilada esterilizada, e a concentração de esporos foi determinada conforme método descrito por Alves & Moraes (1998). Para os bioensaios, uma alíquota de 100 μ L de suspensão de *Bt* na concentração de 3×10^8 esporos/mL, foi aplicada na superfície do disco de dieta artificial (Burton & Perkins 1972), previamente distribuída em placas de acrílico. Após a evaporação do excesso de água, 1 lagarta de segundo ínstar foi colocada na superfície de cada recipiente contendo a dieta com *Bt*. Os insetos foram individualizados (1 por recipiente) devido ao hábito canibal do inseto. Foram utilizadas 45 lagartas, distribuídas em 3 repetições em cada tratamento. No lote correspondente à testemunha foi aplicada água destilada e esterilizada, em volume equivalente aos lotes tratados. A criação dos insetos para realização dos bioensaios foi feita no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, onde as lagartas foram alimentadas em dieta artificial de Burton & Perkins (1972) e os adultos com solução de açúcar 10%.

Avaliação da interação de *Bt* com outros entomopatogênicos para o controle de *Spodoptera frugiperda*

Avaliação da interação do nematóide entomopatogênico (*Heterorhabditis sp.*) e *Bt*

O nematóide foi isolado de amostra de solo procedente de campo de citros na região de Itapetininga-SP. Para manutenção e utilização nos bioensaios o mesmo foi produzido *in vitro* pelo método da esponja (Bedding 1981) no Instituto Biológico em Campinas - SP.

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (ESALQ-USP). A câmara de Peters foi utilizada para a determinação das concentrações de cerca de 500, 2500 e 7500 juvenis infectivos (JI)/mL, o que corresponde à aproximadamente 10^8 , 5×10^8 e $1,6 \times 10^9$ JI /ha. Para obter estes valores, utilizou-se uma suspensão preparada a partir da esponjas utilizadas na criação do nematóide. Estes valores são utilizados para estudos laboratoriais visando ao controle de larvas do besouro da raiz dos citros (*Naupactus sp.*) (Leite *et al.* 2003) e serviram de referência na condução destes bioensaios. Cada concentração foi aplicada sobre papel filtro colocado no interior de placa de Petri plástica (5,0 x 1,5 cm), utilizando-se 45 placas por tratamento, divididas em 3 repetições. Na testemunha foi utilizada água destilada esterilizada, adaptado de Molina-Ochoa *et al.* (1996). Após a aplicação dos tratamentos as lagartas de segundo instar foram individualizadas no interior das placas.

Nos bioensaios de interação, as lagartas foram inicialmente submetidas à inoculação com *Bt*, e dois dias após foram transferidas para placas contendo os nematóides. Conforme Gardner *et al.* (1984) e Jaques & Morris (1981), a aplicação seqüencial dos tratamentos em estudos de interação de entomopatogênicos tem maior probabilidade de êxito. Além disso, esta transferência foi necessária devido aos diferentes substratos utilizados nos experimentos.

Avaliação da interação entre fungos entomopatogênicos (*B. bassiana* e *N. rileyi*) x *Bt*

Para *B. bassiana* foram testados os isolados 1074, 1115, 1117 e 1284, pertencentes ao Banco de Entomopatogênicos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (ESALQ-USP). O isolado de *N. rileyi* (ESALQ N1), utilizado nos experimentos foi obtido durante coleta de lagartas na área experimental do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ-USP).

Para os fungos entomopatogênicos, foram testadas 45 lagartas de segundo instar da população de São Paulo,

distribuídas em 3 repetições e uma testemunha. Para a realização dos bioensaios o isolado foi repicado e multiplicado em meio de cultura M.C. (0,18 g KH_2PO_4 , 0,525 g Na_2HPO_4 , 0,30 g MgSO_4 , 0,50 g KCl, 5,0 g Glicose, 0,79 g NaNO_3 , 2,5 g extrato de levedura, 10 g g ágar, 1 L água destilada). Uma suspensão de 100 μL do patógeno, na concentração de 1×10^8 conídios/mL (utilizada para discriminar isolados patogênicos), foi aplicada na superfície do disco de dieta artificial (Burton & Perkins 1972), previamente distribuída em placas de acrílico (35 mm de diâmetro). Após a evaporação do excesso de umidade, as lagartas foram acondicionadas individualmente. No lote correspondente a testemunha foi aplicada água destilada e esterilizada, em volume equivalente aos lotes tratados.

Assim como nos bioensaios envolvendo *Bt* e *Heterorhabditis sp.*, neste caso a aplicação dos tratamentos foi realizada com dois dias de intervalo, sendo inicialmente aplicado o *Bt* e, posteriormente os fungos entomopatogênicos.

Avaliação da interação entre *Virus de Poliedrose Nuclear de S. frugiperda* (VPNSf) x *Bt*

O vírus de Poliedrose Nuclear (VPNSf) foi obtido junto a Embrapa de Milho e Sorgo (Sete Lagoas - MG). Para a realização dos testes foram utilizadas 45 lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*. Foram utilizadas as concentrações de 48×10^5 e 24×10^6 corpos de inclusões virais (civ)/mL, correspondentes à $2,5 \times 10^{11}$ e $1,25 \times 10^{12}$ cip/ha (Cruz *et al.* 1996), na formulação de pó molhável. Um alíquota de 0,1 mL destas concentrações foi aplicada sobre a superfície da dieta artificial (Burton & Perkins 1972).

Assim como no bioensaio de interação anterior, neste caso a aplicação dos tratamentos foi realizada com dois dias de intervalo, sendo inicialmente aplicado o *Bt* e, posteriormente o vírus.

Em todos os bioensaios, o acondicionamento do material foi feito em câmara incubadora tipo B.O.D., regulada para $25 \pm 0,5$ °C, 65 $\pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase. Os tratamentos foram avaliados diariamente até o 8º dia (*Bt* e nematóide e sua interação) e 12º dia (fungos, vírus e sua interação com *Bt*) após a aplicação.

Análise e interpretação dos dados

A mortalidade foi corrigida conforme Abbott (1925) e para avaliação do grau de interação entre os entomopatogênicos foi adaptada terminologia utilizada por Benz (1971):

1 - Sinergismo independente: é um sistema onde os dois componentes atuam de maneira indepen-

dente, sem interferência entre eles. A mortalidade (%) resultante deste sinergismo pode ser expressa por: $A_{1+2} = A_1 + A_2(1 - A_1/100)$, onde: A_1 e A_2 correspondem a mortalidade causada pelos agentes 1 e 2, respectivamente.

- 2 - Sinergismo suplementar: é um sistema com dois componentes efetivos que em conjunto produzem um efeito maior que a soma algébrica dos efeitos independentes ($A_{1+2} > A_2 + A_1$).
- 3 - Sinergismo subaditivo: é um sistema onde os dois componentes atuando em conjunto produzem um efeito maior que o sinergismo independente, porém menor que a soma algébrica dos dois efeitos individuais.
- 4 - Efeito aditivo: é um sistema onde os dois componentes atuando em conjunto produzem um leve incremento no seu efeito, em relação a atuação dos componentes individuais, porém insuficiente para ser considerado sinergismo.
- 5 - Antagonismo: é um sistema onde a interação dos elementos produz um efeito menor do que suas atuações individuais. Neste caso a interação é considerada negativa, enquanto que nos outros quatro exemplos, acima citados, é considerada positiva.

Resultados e discussão

Interação do nematóide entomopatogênico (*Heterorhabditis* sp.) e *Bt*

No estudo da interação entre os isolados de *Bt* e o nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp., verificou-se interação positiva entre os isolados de *Bt* testados e as concentrações do nematóide (Tabela 1). Para os isolados ESALQ 2.4 e 8.7 o aumento da concentração do nema-

tóide determinou a efeito sinérgico entre os entomopatogênicos, uma vez que o sinergismo subaditivo somente foi obtido na maior concentração deste, enquanto que nas demais foi observado efeito aditivo. Para o isolado ESALQ 3.7 foi possível apenas determinar que houve interação positiva entre este isolado e o nematóide, em todas as concentrações. Este fato se deve a alta mortalidade individual causada pelos agentes envolvidos. Em geral, este elevado grau de interação positiva pode ser explicado, em parte, pela rápida ação destes dois patógenos (Baur *et al.* 1998, Knowles 1994).

Em relação à alta atividade do nematóide para a lagarta-do-cartucho (60-80% de mortalidade), estes dados corroboram com os obtidos por Molina-Ochoa *et al.* (1996), que estudando a eficiência de diferentes espécies de nematóides para *S. frugiperda*, verificou que *H. bacteriophora* na concentração de 100 nematóides/mL, causou mortalidade de 64,7% em lagartas desta espécie.

Heterorhabditis spp. associam-se à bactérias, com as quais estabelecem relação mutualística, oferecendo proteção à bactéria fora do corpo do hospedeiro e transportando seus vetores, do cadáver de um inseto, ao hemoceloma de outro. Já as bactérias servem de alimento aos nematóides, provendo-lhes meio nutritivo adequado ao desenvolvimento e à reprodução (Ferraz 1998).

O processo infectivo destes entomopatogênicos ainda não foi totalmente elucidado (Ribeiro *et al.* 1999), porém o cadáver fica então tomado por verdadeira “sopa bacteriana”, ou seja, um meio rico em nutrientes constituído pelas bactérias e por tecidos já desorganizados do inseto, a partir do qual os nematóides alimentam-se e desenvolvem-se.

Tabela 1. Interação entre *Bacillus thuringiensis* (ESALQ 2.4, 3.7 e 8.7) e o nematóide *Heterorhabditis* sp. (10^8 , 5×10^8 e $1,6 \times 10^9$ juvenis infectivos/ha) no controle de lagartas de segundo ínstar de *Spodoptera frugiperda*

Entomopatogênicos	Mortalidade corrigida (%)	Tipo de interação
ESALQ 2.4	55,00 ± 4,0	-
ESALQ 3.7	82,00 ± 3,0	-
ESALQ 8.7	62,00 ± 4,5	-
Nematóide 1 (10^8 JI/ha)	66,66 ± 3,0	-
Nematóide 2 (5×10^8 JI/ha)	80,00 ± 2,5	-
Nematóide 3 ($1,6 \times 10^9$ JI/ha)	80,00 ± 7,0	-
ESALQ 2.4 x nematóide 1	77,00 ± 9,5	efeito aditivo
ESALQ 2.4 x nematóide 2	100	sinergismo subaditivo
ESALQ 2.4 x nematóide 3	100	sinergismo subaditivo
ESALQ 3.7 x nematóide 1	97,50 ± 4,0	interação positiva
ESALQ 3.7 x nematóide 2	91,00 ± 2,0	interação positiva
ESALQ 3.7 x nematóide 3	100,00	interação positiva
ESALQ 8.7 x nematóide 1	79,00 ± 1,5	efeito aditivo
ESALQ 8.7 x nematóide 2	97,00 ± 3,0	efeito aditivo
ESALQ 8.7 x nematóide 3	100,00	sinergismo subaditivo

Quando os dois microrganismos são aplicados ao mesmo tempo, o nematóide afeta menos as larvas, pois uma proporção destas conseguem resistir ao seu ataque utilizando mecanismos fisiológicos e estruturais defensivos. Além do mais, durante esta defesa a larva cessa sua alimentação, ingerindo menos *Bt*, reduzindo significativamente o efeito deste patógeno (Benz 1971; Ribeiro *et al.* 1999). Portanto, nesta interação, o estresse inicial causado pelo *Bt* é essencial para que ocorra interação positiva (efeito aditivo ou sinergismo) entre os agentes de controle, assim como foi observado por (Koppenhöfer *et al.* 1999 e Koppenhöfer & Kaya 1970). O intervalo de dois dias entre a aplicação dos tratamentos nos bioensaios realizados no presente estudo, foi suficiente para favorecer o efeito sinérgico entre os tratamentos.

A defesa dos insetos aos nematóides inclui: supressão pelas células responsáveis pela primeira linha de defesa (hemócitos), inibição causada pelos peptídeos antibacterianos produzidos pelo inseto e supressão pela atividade da feniloxidasas (substâncias antimicrobianas). O modo como estes mecanismos de defesa atuam ainda não foi totalmente esclarecido, mas estes compõem uma série de respostas fisiológicas complexas, cuja intensidade varia de acordo com o hospedeiro e o patógeno envolvidos (Ribeiro *et al.* 1999).

Embora neste trabalho tenha sido observado sinergismo entre os isolados de *Bt* e *Heterorhabditis* sp., o mesmo não foi verificado com o nematóide entomopatogênico *Steinernema carpocapse* e *Bt kurstaki* no controle da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*). Ao contrário, Baur *et al.* (1999) verificaram efeito antagônico entre estes dois patógenos para uma linhagem de *P. xylostella* resistente a *Bt*.

Isto mostra que existe uma série de fatores que influenciam o sucesso de da interação entre *Bt* e nematóides entomopatogênicos. Talvez a mais importante delas seja a agressividade do nematóide, pois este desencadeia uma série de eventos comportamentais no inseto que determinam sua suscetibilidade ao outro patógeno envolvido na interação.

Fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi*) x *Bt*

A interação entre os isolados e os fungos entomopatogênicos resultou em antagonismo entre os agentes de controle. Este efeito antagônico foi mais severo entre os isolados ESALQ 2.4 e ESALQ 3.7, pois o efeito da interação foi menor do que a atividade individual destes isolados, indicando que, neste caso, os fungos inibiram a ação do *Bt*. O mesmo efeito foi observado para o isolado ESALQ 8.7, porém em menor intensidade (Tabela 2).

Tabela 2. Interação entre *Bacillus thuringiensis* (ESALQ 2.4, 3.7 e 8.7) e fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana* 1074, 1115, 1117 e 1284; *Nomuraea rileyi* ESALQ N1) para o controle de lagartas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda*

Entomopatógenos	Mortalidade corrigida (%)	Tipo de interação
ESALQ 2.4	53,00 ± 5,0	-
ESALQ 3.7	80,00 ± 6,4	-
ESALQ 8.7	61,00 ± 7,1	-
<i>Beauveria bassiana</i> 1 (1074)	30,00 ± 5,2	-
<i>Beauveria bassiana</i> 2 (1115)	33,00 ± 3,7	-
<i>Beauveria bassiana</i> 3 (1117)	45,00 ± 2,5	-
<i>Beauveria bassiana</i> 4 (1284)	40,00 ± 4,5	-
<i>Nomuraea rileyi</i> (ESALQ N1)	33,00 ± 4,5	-
ESALQ 2.4 x <i>Beauveria bassiana</i> 1	43,00 ± 3,2	antagonismo
ESALQ 2.4 x <i>Beauveria bassiana</i> 2	33,00 ± 2,0	antagonismo
ESALQ 2.4 x <i>Beauveria bassiana</i> 3	38,00 ± 3,0	antagonismo
ESALQ 2.4 x <i>Beauveria bassiana</i> 4	41,00 ± 3,0	antagonismo
ESALQ 3.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 1	43,50 ± 4,5	antagonismo
ESALQ 3.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 2	29,00 ± 3,0	antagonismo
ESALQ 3.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 3	53,00 ± 4,0	antagonismo
ESALQ 3.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 4	47,00 ± 5,0	antagonismo
ESALQ 8.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 1	49,00 ± 7,0	antagonismo
ESALQ 8.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 2	57,00 ± 2,0	antagonismo
ESALQ 8.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 3	54,00 ± 3,0	antagonismo
ESALQ 8.7 x <i>Beauveria bassiana</i> 4	58,00 ± 3,0	antagonismo
ESALQ 2.4 x ESALQ N1	40,00 ± 3,5	antagonismo
ESALQ 3.7 x ESALQ N1	42,00 ± 4,0	antagonismo
ESALQ 8.7 x ESALQ N1	45,00 ± 5,0	antagonismo

A inibição da ação do *Bt*, pode ser devida à diminuição da ingestão do alimento com *Bt* quando o fungo é inoculado no inseto, devido ao início de uma série de reações fisiológicas envolvidas no mecanismo de defesa do inseto, assim como foi verificado para a interação *Heterorhabditis* sp. e *Bt*. Outra explicação pode ser a competição entre os entomopatógenos pelo hospedeiro (Glare & O'Callaghan 2000).

O *Bt* que atua por ingestão têm sua ação inicialmente limitada ao aparelho digestivo do inseto, porém com a redução do pH intestinal, causada pela ação das toxinas Cry, os esporos disseminam-se pelo corpo do inseto, causando contaminação generalizada (Glare & O'Callaghan 2000). É neste momento que pode ocorrer a competição com os fungos entomopatogênicos, durante a colonização do hospedeiro pelos fungos, quando suas estruturas envolvidas neste processo encontram os esporos do *Bt*. A colonização do fungo ocorre após a penetração do tegumento do inseto e caracteriza-se pelo engrossamento da hifa que penetra no hospedeiro e sua ramificação, inicialmente no tegumento e posteriormente na hemocele do hospedeiro (Alves 1998).

Com relação a ação destes fungos sobre a lagarta-do-cartucho, Gardner & Fuxa (1980) e Gardner *et al.* (1984) observaram mortalidade semelhante (30 a 45%) em estudos de laboratório. Os autores ressaltam que embora estes microrganismos sejam frequentemente encontrados infectando lagartas no campo, sua virulência é reduzida, sendo necessária a realização de bioensaios de seleção para a obtenção de um isolado mais eficaz.

Resultados semelhantes na interação entre *B. bassiana* e *Bt* foram verificados por El-Magharaby *et al.* (1988). Os autores observaram o antagonismo entre os patógenos no sistema parasitóide x hospedeiro, *Microplitis/Spodoptera*. Segundo os autores, esta interação negativa, é resultante da incompatibilidade entre os microrganismos.

De acordo com Krieg (1971), estudos realizados com o objetivo de utilizar *B. bassiana* e *Bt* no controle de ortópteros e coleópteros, obtiveram resultados pouco satisfatórios. Do mesmo modo, Lewis & Bing (1991), realizaram um programa em campo para o controle de *Ostrinia nubilalis* utilizando-se *Bt kurstaki* e *B. bassiana*. Os autores não observaram efeito positivo ou negativo quando aplicaram os dois tratamentos ao mesmo tempo, sendo que os resultados foram altamente satisfatórios nas combinações testadas. Os resultados da literatura aqui citados e os obtidos neste trabalho indicam que a interação entre fungos e *Bt* pode resultar em efeitos variáveis. Provavelmente, esta variação está ligada à variação entre as subespécies e/ou toxinas e também à espécie de inseto com a qual foram realizados os testes.

Interação de um Virus de Poliedrose Nuclear de *S. frugiperda* (VPNSf) x *Bt*

Neste estudo a interação entre os agentes de controle variou de positiva (efeito aditivo) a antagonista (negativa) (Tabela 3). Entre os isolados ESALQ 2.4 e ESALQ 8.7 e a maior concentração do vírus foi observado um leve efeito aditivo, enquanto que nos demais casos foram verificados efeitos antagonistas. Neste caso fica claro que o sucesso da interação depende da concentração do vírus, sendo que, aparentemente, quanto maior a concentração maior a possibilidade de interação positiva.

A infecção das lagartas pelo baculovirus ocorre pela ingestão de alimento contaminado com corpos de inclusão virais, que são solubilizados no intestino médio do inseto, liberando os vírions. Estes infectam as células epiteliais em cujos núcleos, os vírus se replicam, resultando num segundo tipo viral com a capacidade de infectar outros tecidos, como a hemolinfa e através

Tabela 3. Interação entre *Bacillus thuringiensis* (ESALQ 2.4, 3.7 e 8.7) e um vírus de poliedrose nuclear ($2,5 \times 10^{11}$ e $1,25 \times 10^{12}$ poliedros/ha) para o controle de lagartas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda*

Entomopatógenos	Mortalidade corrigida (%)	Tipo de interação
ESALQ 2.4	59,00 ± 4,0	-
ESALQ 3.7	87,00 ± 3,5	-
ESALQ 8.7	64,00 ± 2,0	-
VPNSf 1 ($2,5 \times 10^{11}$ poliedros/ha)	75,00 ± 3,0	-
VPNSf 2 ($1,25 \times 10^{12}$ poliedros/ha)	66,00 ± 3,5	-
ESALQ 2.4 x VPNSf 1	60,00 ± 4,0	antagonismo
ESALQ 2.4 x VPNSf 2	68,00 ± 2,5	efeito aditivo
ESALQ 3.7 x VPNSf 1	66,50 ± 3,0	antagonismo
ESALQ 3.7 x VPNSf 2	79,00 ± 5,0	antagonismo
ESALQ 8.7 x VPNSf 1	58,00 ± 6,0	antagonismo
ESALQ 8.7 x VPNSf 2	77,00 ± 4,0	efeito aditivo

desta acarretar a infecção sistêmica (Andrade *et al.* 2003). O intestino médio também é o local de ação das toxinas do *Bt* (Knowles 1994). Este fato pode explicar o antagonismo na interação entre o vírus e o *Bt*.

Resultados diferentes aos obtidos neste trabalho foram verificados por López-Lastra *et al.* (1995). Em condições de campo, os autores observaram que na interação entre a toxina Cry1Ac e um vírus de poliedrose nuclear no controle de *S. frugiperda* não resultou em efeito sinérgico nem antagônico.

Devido à alta eficiência deste patógeno no controle de *S. frugiperda* (Valicente & Cruz 1991, Cruz *et al.* 2000), um programa nacional de utilização de VPNSf foi implementado pela Embrapa Milho e Sorgo, utilizando-se um isolado tão eficiente quanto os inseticidas convencionais. Neste programa a multiplicação do VPN foi feita em lagartas de *S. frugiperda* criadas individualmente, em dieta artificial, e posterior formulação do patógeno como pó-molhável, para distribuição aos produtores de milho. O produto biológico é atualmente utilizado em pequena escala no Brasil, mas os aperfeiçoamentos realizados, principalmente quanto à produção e utilização, indicam possibilidade de aumento gradativo da sua utilização (Moscardi 1998).

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com as observações feitas por Benz (1971). Este autor afirma que não é apropriado fazer generalizações sobre a interação entre entomopatógenos, pois muitas vezes o resultado da interação depende mais das concentrações utilizadas do que do patógeno utilizado. Além disso, a falta de padronização dos termos utilizados nestes estudos dificulta a interpretação e comparação dos resultados.

A variação nos resultados obtidos nestes experimentos mostra que a interação entre entomopatógenos e outros agentes de controle pode ser um instrumento importante no controle de pragas importantes, como é o caso de *S. frugiperda*. No entanto, deve-se verificar se esta interação ocorre em condições de campo, onde fatores bióticos e abióticos podem afetar significativamente a ação dos agentes de controle. Devido a complexidade de fatores no ambiente natural, a definição dos parâmetros a serem avaliados a campo é importante para evitar desperdício de material, tempo e trabalho. Em sistemas agrícolas com uso constante de bioinseticidas e cujas pragas são reguladas por outros patógenos, que atuam como agentes do controle biológico natural, os estudos de suas interações devem ser considerados com maior ênfase.

Literatura citada

- Abbott, WS. 1925. A method of computing the effectiveness insecticide. *Journal of Economic Entomology*, v.18, p.265-267.
- Alves, SB. 1998. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In Alves, SB. (Ed.). *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba, FEALQ, cap. 1, p.21-38.
- _____. 1998 Fungos entomopatogênicos. In Alves, SB. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, FEALQ. cap. 11, p. 289-382.
- _____; Moraes, SB. 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos In Alves, SB. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. cap. 23, p.765-778.
- Arango, JA; Romero, M; Orduz, S. 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Applied Microbiology*, v.92, p. 466-474.
- Baur, ME; Kaya, HK; Tabashnik BE; Chilcutt, CF. Suppression of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) with an entomopathogenic nematode (Rhabditida: Steinernematidae) and *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Journal of Economic Entomology*, v.91, p.1089-1095.
- Bedding, RA. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoapectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica*, v. 27, p. 109-114.
- Benz, G. 1971. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In Burges, HD; HUSSEY, NW. (Ed.) *Microbial control of insects and mites*. Londres: Academic Press, cap. 14, p.327-356.
- Bohorova, N; Maciel, AM; Brito, RM; Aguillart, L; Ibarra, JE; Hoisington, D. 1996. Selection and characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. *Entomophaga*, v.41, p.153-165.
- Burton, RL; Perkins, WD. 1972. WSB, a new laboratory diet for the corn earworm and the fall armyworm. *Journal of Economic Entomology*, v.65, p.385-386.
- Castanheira, RS; Munhoz, ERB; Couto, GP. 1993. Influencia da adubacao do milho (*Zea mays* L.) sobre a eficiencia da *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., no controle da *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). *Ecosistema*, v.18, n.2, p.119-129.
- Chonay, MFC. 1988. Determinación de la patogenidad del entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill en 20 especies de insectos plaga en condiciones de laboratorio y su efecto a nivel de campo en *Pieris* sp. Guatemala, 23 p. Tese (Mestrado) - Universidade de São Carlos.
- Cruz, I; Figueiredo, MLC; Valicente, FH; Oliveira, AC. 1996. Application rate trials with a nuclear polyhedrosis virus to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) on maize in Brazil. In *Simpósio de Controle Biológico*, 5., Foz do Iguaçu. Anais: Sessão de Pôsteres. Londrina: Embrapa Soja. p.169.
- _____; Figueiredo, MLC; Oliveira, AC; Vasconcelos, CA. 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *International Journal of Pest Management*, v.45, p.293-296.
- _____; Figueiredo, MLC; Oliveira, VC. 2000. Effect of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* larvae, its damage and yield of maize crop at different egg mass infestation levels. In *International Congress of Entomology*, 21., Foz do Iguaçu, 2000. Abstrats. Londrina: Embrapa Soja. v.1, p.382.
- Dias, SC; Sagardoy, MA; Silva, SF; Dias, JMCS. 1999. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from argentinean soils. *BioControl*, v.44, p.59-71.

- El-Maghraby, MMA; Hegag, A; Yousif Khalil, SI. 1998. Interactions between *Bacillus thuringiensis* Berl., *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and the host/parasitoid system *Spodoptera littoralis* (Boisd.)/*Microplitis rufiventris* Kok. *Journal of Applied Entomology*, v.106, p.417-421.
- Ferraz, LCCB. 1998. Nematóides entomopatogênicos. In Alves, SB. (Ed.) Controle microbiano de insetos. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. p.541-70.
- França, MM; Tigano, MS; Carvalho, RS. 1989. Suscetibilidade de *S. frugiperda* aos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *Nomuraea rileyi*. In Congresso Brasileiro de Entomologia, 12., Belo Horizonte, 1989. Resumos. Belo Horizonte: EMBRAPA. p. 254.
- Gardner, WA; Fuxa, JR. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. *Florida Entomologist*, v.63, p.439-447.
- Gardner, WA; Noblet, R; Schwehr, R. 1984. The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, v.67, p.325-332.
- Gerk, AO; Kitajima, EW; Souza, ML. 1997. Identificação e caracterização do isolado brasileiro do vírus de poliedrose nuclear da lagarta do cartucho do milho. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.26, n.3, p.507-515.
- Gladstone, S. 1989. Prueba del hongo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, para el control de cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en maíz de riego sembrado en época seca. *Revista de la Escuela de Sanidad Vegetal*, v.1, n.2, p.10-13.
- Glare, TR; O'callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley & Sons. 350 p.
- Habib, MEEM; Patel, PN. 1990. Patogenicidade de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), praga de milho. *Revista de Agricultura*, v.65, n.1, p.83-90.
- Hernández, JLL. 1988. Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. *Entomophaga*, v.32, p.163-171.
- Ignoffo, CM; García, C; Kroha, MJ; Hoffman, JD. 1980. Effects of bactería and a fungus fed singly or in combination on mortality larvae of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, v.53, 797-800.
- Jaques, RP; Morris, ON. 1981. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops. In Burges, ED. (Ed.) *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. London: Academic Press. p.695-715.
- Knowles, BH. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, v.24, p. 275-308.
- Koppenhofer, AM; Choo, HY; Kaya, HK; Lee, DW; Gelernter, WD. 1999. Increased field and greenhouse efficacy against scarab groups with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biological Control*, v.14, p.37-44.
- _____; Kaya, HK. 1997. Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab group control. *Biological Control*, v.8, p.131-137.
- Lecuona, R. 1999. Microbial control with entomopathogenic fungi in Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, v.58, n.1/2, p.301-306.
- Leiderman, L; Sauer, HFG. 1953. A lagarta dos milharais *Laphygma frugiperda* (Abbot e Smith, 1797). *O Biológico*, v.19, p.105-113.
- Leite, LG; Machado, LA; Batista Filho, A. 2003. Potencial para produção e uso de nematóides entomopatogênicos para o controle de pragas e necessidade de pesquisas no Brasil. In *SICONBIOL*, 8, São Pedro, 2003. Livro de Resumos. São Pedro. p.51.
- Lezama, GR; Alatorre, RR; Bodajil, JLF. 1996. Virulencia de cinco cepas de los hongos entomopatogênicos contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en huevos y larvas neonatas. *Revista Internacional de Control Biológico*, v.3, n.1, p.35-39.
- Lewis, LC; Bing, LA. 1991. *Bacillus thuringiensis* Berliner and *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillimen for european corn borer control: program for immediate and season-long suppression. *The Canadian Entomologist*, v.123, p.387-393.
- Lopez-Lastra, CC; Boucias, DG; Soares Júnior, GC. 1995. *Bacillus thuringiensis* endotoxin effects on *Spodoptera exigua* and *S. frugiperda* larva infected with baculoviruses. *Environmental Entomology*, v.24, n.2, p.239-242.
- Molina-Ochoa, J; Hamm, JJ; Lezama-Gutiérrez, R; Bojalil-Jaber, LF; Arenas-Vargas, M; Gonzales Ramírez, M. 1996. Virulence of six entomopathogenic nematodes (Steinernatidae and Heterorhabditidae) on immature stages of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Vedalia*, v.3, p.25-29.
- Moscardi, F. 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (Ed.) *Controle Microbiano de Insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. cap. 15, p. 509-540.
- _____; Kastelic, JG; Sosa-Gómez, DR. 1992. Suscetibilidade de três espécies de lepidópteros associados a soja a três isolados do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.21, n.2, p.93-100.
- Poinar, GO. 1971. Use of nematodes for microbial control of insects. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.) *Microbial control of insects and mites*. Londres: Academic Press. cap. 8, p.181-204.
- Ribeiro, C; Duvic, B; Oliveira, P. 1999. Insect immunity – effects of factors produced by a nematobacterial complex In immunocompetent cells. *Journal of Insect Physiology*, v.45, p. 677-685.
- Shamseldeen, MMM; Ismail, AA. 1997. Effect of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and the bacterium *Bacillus thuringiensis* as integrated biocontrol agents og the black cutworm. *Anzeiger fuer Schaedlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, v.70, p.77-99.
- Silva-Werneck, JO; Abreu Neto, JRMV; Tostes, AN; Faria, LO; Dias, JMCS. 2000. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, p.221-227.
- Souza, ML. de. 2001. Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.21, p.28-31.
- Tamez-Guerra, P; Galán-Wong, LJ; Medrano-Roldán, H; García-Gutiérrez, C; Rodríguez-Padilla, C; Gómez-Flores, RA.; Tamez-Guerra, RS. 2001. Bioinseticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, v.4, n.2, p.143-152.
- Uribe, D; Marinez, W; Cerón, J. 2003. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.82, p.119-127.
- Valicente, FH; Cruz, I. 1991. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. *Sete Lagoas: Embrapa*. 23 p. (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 15).