USO DE RADIOTRAÇADOR E SEROLOGIA NO ESTUDO DAS RELAÇÕES ALIMENTARES ENTRE A BROCA DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* (FABR. 1794) E ARTRÓPODES PREDADORES

CARLOS ROBERTO SOUSA E SILVA

Orientador: RICARDO B. SGRILLO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em: Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
AGOSTO, 1980

Aos meus pais Carloman e Andrelina

À minha esposa Cristina

Ao meu filho Filipe

AGRADECIMENTOS

- À *CRISTINA*, minha esposa, pela datilografia do original.
- Ao amigo Dr. *RICARDO BOHRER SGRILLO*, pela orientação.
- Ao Dr. *AVELINO RODRIGUES DE OLIVEIRA*, pelo apoio, críticas e revisão do original e demais amigos do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo auxílio e sugestões nos trabalhos de serologia ali desenvolvidos.
- À Dra. *SIU MUI TSAI SAITO* e demais funcionários da seção de Microbiologia do CENA pelo apoio, auxílio e sugestões nos trabalhos de serologia ali desenvolvidos.
- Aos amigos e funcionários do CENA e, em particular, aos do Setor de Entomologia, na pessoa do seu chefe Dr. *FREDERICO MAXIMILIANO WIENDL*, pelo auxílio e sugestões.
- À Dra. *MARIA JOSÉ BAUAB VIANNA*, do Departamento de Zoologia, IBBMA, UNESP, Campus de Botucatu, pela confirmação de identidade da espécie *Psecas zonatus*.
- Ao Dr. *HERMAN LENT* da Academia Brasileira de Ciências, RJ, pela confirmação da identidade da espécie *Phorastes femoratus*.
- Ao Dr. *VARDECI GAMA*, vice-chefe do Departamento de Ciências Biológicas da UFSCar, pela confirmação da identidade da espécie *Ectatoma quadridens*.
- Ao Prof. *FLÁVIO HENRIQUE CAETANO* do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências, Campus de Rio Claro, UNESP, pela confirmação da identidade dos gêneros *Gnaptogenis* sp e

Solenopsis sp.

ii.

- À Profa. GÉRIA MARIA MONTANARI FRANCO do Departamento de Ciências Biológicas da UFSCar, pela versão do Resumo para o Inglês.
- Aos Engenheiros Agrônomos JOSÉ CIONE e ANTONIO P. DE CAMARGO, pelo apoio durante a realização dos trabalhos desenvolvidos na Estação Experimental do IAC (Piracicaba).
- Aos amigos Engº Agrº ANTONIO OSVALDO ROCCIA e ARMANDO GONZAGA SANCHES da Divisão Agronômica da Estação Experimental de Cana, Copersucar, em Piracicaba, pelo apoio durante a realização dos trabalhos ali desenvolvidos.
- Ao Sr. ALÓIS COPRIVA, pelo excelente trabalho de fotografia.
- À Srta. MARIA ELIZABETH GUIMARÃES, pelo cuidadoso trabalho de datilografia.
- À COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR, ao CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA, ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO e a UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, pelas facilidades concedidas.
- E a todos que direta ou indiretamente, embora não citados, colaboraram no desenvolvimento dessa Dissertação.

ÍNDICE

1 - RESUMO	1
2 - INTRODUÇÃO	3
3 - REVISÃO DA LITERATURA	6
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. Radiotraçador	15
4.2. Serologia	17
4.3. Testes serológicos	22
4.4. Amostragem	22
5 - RESULTADOS	24
5.1. Radiotraçador	24
5.2. Serologia	31
6 - DISCUSSÃO	42
6.1. Radiotraçador	42
6.2. Serologia	46
6.3. Amostragem	51
7 - CONCLUSÕES	53
8 - SUMMARY	55
9 - LITERATURA CITADA	57

1 - RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e testar o uso de radiotraçador e técnicas serológicas no estudo das relações alimentares entre a *Diatraea saccharalis* Fabr. 1794 (Lepidoptera: Crambidae) e artrópodes predadores em canaviais da região do Estado de São Paulo.

O estudo com radiotraçador teve como base a marcação de ovos e lagartas da *D. saccharalis* com ^{32}P que após liberados nos canaviais serviram como presas para os predadores ali existentes. Posteriormente, foram identificados pela presença de radioatividade. Os resultados indicaram um número variado de espécies envolvidas no controle da população de *D. saccharalis*. Determinou-se que os principais predadores de lagartas foram formigas e, de ovos, dermapteros.

O estudo serológico teve como base a obtenção de antissoro específico para *D. saccharalis* e testes, utilizando-se a técnica de dupla difusão em gel de agar (OUCHTERLONY, 1958) com antígenos homólogos e heterólogos. Os resultados dos testes homólogos mostraram um máximo de três linhas de precipitação. Os resultados dos testes heterólogos, realizados a partir do antígeno obtido pela maceração do predador *Phorastes femoratus* De Geer, 1773 (Hemiptera: Reduviidae), coletado no canavial e alimentado com uma única lagarta do 5º instar de *D. saccharalis*, mostraram reações altamente positivas e específicas, até 96 h após a alimentação.

2 - INTRODUÇÃO

Face a crise energética que hoje se faz sentir, a cana-de-açúcar, *Saccharum spp*, ganha mais importância fornecendo matéria prima às várias indústrias, principalmente às produtoras de álcool com finalidades combustíveis.

Para a safra de 79/80, iniciada em 1º de junho de 1979 o IAA estima a produção brasileira de 110 milhões de sacos de açúcar e aproximadamente 4 bilhões de litros de álcool. Segundo a mesma fonte, São Paulo deverá contribuir com 47 milhões de sacos de açúcar e aproximadamente 2 bilhões de litros de álcool (SILVA, 1979).

Como toda cultura, a da cana-de-açúcar, também é um empreendimento cujo sucesso acha-se intimamente dependente de diversos aspectos químicos, físicos e biológicos, desta

cando-se, entre eles, os problemas com as pragas.

Das pragas da cultura canavieira destaca-se, no Estado de São Paulo, a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* Fabr. 1794 (Lepidoptera: Crambidae). Este inseto é responsável tanto por danos diretos, quando abrem galerias no colmo das canas, quanto por danos indiretos, quando essas galerias são posteriormente invadidas por fungos (*Glomerella* spp e *Fusarium* spp) que ocasionam a podridão vermelha prejudicando o rendimento industrial dessa matéria prima, pela inversão da sacarose.

A ocorrência de pragas na cultura é uma consequência da própria existência natural das cadeias alimentares. No entanto, quando o homem interfere nestas cadeias usando meios drásticos, como agrotóxicos ou fogo, pode favorecer o aumento ou o aparecimento de novas pragas. Dessa maneira, a aplicação segura e eficiente de qualquer medida de controle deve ser baseada no conhecimento profundo da dinâmica da população da praga, especificamente, dos fatores que regulam a sua densidade populacional. Dentre esses fatores destaca-se a ação dos inimigos naturais, predadores e parasitos, que contribuem significativamente para manter as populações da praga em um baixo nível. É portanto, justificável o desenvolvimento de métodos que permitam a identificação segura desses animais.

De uma maneira geral, as determinações de relações alimentares são realizadas por observações diretas ou pela análise do conteúdo estomacal do predador. O primeiro método

do é muito limitado pela capacidade de observação do pesquisador. O segundo, principalmente, pelo hábito alimentar do predador, pois se este for sugador, como por exemplo hemípteros e aranhas, torna-se impossível especificar a presa consumida.

Atualmente, radiotraçadores e técnicas serológicas, têm sido usados com sucesso em tais determinações.

O uso de radiotraçadores se baseia na marcação de uma determinada fonte alimentar com um radioisótopo e posterior determinação desse radioisótopo nos diversos consumidores existentes no meio estudado.

O uso de técnicas serológicas, se baseia na possibilidade de reações específicas entre um antissoro obtido para uma determinada fonte alimentar e os vários consumidores dessa fonte, como antígenos.

Neste trabalho, procurou-se desenvolver e testar estes dois métodos visando contribuir com os meios tradicionais para identificação dos predadores da *D. saccharalis*.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

Segundo PRUNA (1969), a *D. saccharalis* foi descrita pela primeira vez pelo naturalista Johan Christian Fabricius com o nome de *Phalaena saccharalis*, em 1794.

Nos Estados Unidos NEGM e HENSLEY(1969 e 1972), tem ressaltado a importância dos grupos Formicidae, Carabidae, Forficulidae, Elateridae, Chrisopidae e Araneida no controle dos diferentes estágios da *D. saccharalis*.

NEWSOM (1974), estudou as diferentes respostas de predadores e pragas à inseticidas. Não existe indicação de diferença em suas reações fisiológicas a exposições letais ou não, provenientes de elementos químicos. Indiretamente, as populações dos predadores podem ser mais afetadas do que as das pragas pela introdução de um inseticida no ecossistema, isto,

porque os predadores ficam expostos a mesma toxidez ambiental, além da falta de alimento.

WALDER *et alii* (1977), determinaram a flutuação populacional da broca da cana-de-açúcar, assim como os fatores climáticos que interferem nesta flutuação. Os principais resultados obtidos foram: 1) Uma intensidade de infestação média de 11,7%, no período de safra, (1975); 2) Maior porcentagem de formas imaturas da *D. saccharalis* durante o período de janeiro a maio; 3) A temperatura e a umidade do ar foram os fatores climáticos que mais influenciaram na flutuação populacional das pragas; 4) A *D. saccharalis* realizou quatro gerações anuais, ocorrendo a primeira em outubro-novembro, a segunda em dezembro-janeiro.

No Brasil o sincronismo da população de alguns predadores existentes nos canaviais com a população de lagartas pequenas (CARLUCCI *et alii*, 1977) e a sua importância no controle à *D. saccharalis* (TEERAN, 1978; GUAGLIUME, 1973) já foi relatado.

YATES *et alii* (1951), usaram três métodos para obtenção de mosquitos radioativos. Um método era permitir aos adultos sugarem ratos aos quais tinha-se injetado, intraperitonealmente, uma solução de sacarose a 10%, contendo ^{32}P . Também obtiveram insetos marcados pela alimentação dos adultos com uma solução de sacarose a 10%, contendo ^{32}P . A criação das larvas em água radioativa também foi um método funcional.

LINQUIST *et alii* (1951), obtiveram moscas radioativas alimentando-as com uma solução açucarada, contendo ^{32}P .

HOFFMAN *et alii* (1951), também alimentaram moscas domésticas com uma solução de sacarose contendo ^{32}P , juntamente, com criação de larvas em meio radioativo, contendo ^{32}P , resultando insetos adultos marcados.

RADELEF *et alii* (1952), adicionaram ^{32}P à dieta de larvas da mosca *Cochliomya sp* obtendo moscas radioativas.

FOOTT (1954), desenvolveu dois métodos para obtenção de moscas (*Hylemya brassicae* Bouche) radioativas. No primeiro método 0,25 mCi a 0,5 mCi de ^{32}P , foi diluído em aproximadamente 5cc de água destilada e pulverizado sobre os insetos. No segundo método, obteve moscas radioativas após alimentá-las com uma solução de sacarose contendo ^{32}P . Esse método resultou mais eficiente, não interferindo na mortalidade das moscas.

BALDWIN *et alii* (1955), investigaram a relação presa/predador entre duas espécies de mosquito, em Chatterton, Ontario. Marcaram larvas e pupas de mosquitos, com ^{32}P e soltaram em locais e datas determinados. Os animais, após coletados, foram testados quanto à radioatividade. Os resultados mostraram que várias espécies de animais eram predadoras dessas larvas e pupas. A importância dos predadores no controle biológico desses mosquitos foi evidenciada pelo número de exemplares radioativos coletados e também, pela alta radioatividade

de certas espécies.

KNAPP *et alii* (1956), marcaram aproximadamente 1300 exemplares do inseto *Amblioma americanum* L., com ^{32}P , tratando-os com tergitol nº 7 e Triton x-100 adicionados ao radioisótopo. A adição de um agente umectante não influenciou na transferência ou retenção do ^{32}P mas, reduziu substancialmente a sobrevivência das fêmeas quando as concentrações usadas eram iguais a 1%.

JENKINS (1960), atenta para a seleção do radioisótopo a ser empregado na marcação de insetos. Segundo esse autor os seguintes aspectos devem ser considerados: 1) tipo de radiação; 2) energia da radiação; 3) meia vida física; 4) acumulação, extensão biológica e meia vida efetiva; 5) toxicidade.

JENKINS *et alii* (1963), ressaltaram a importância dos radionuclídeos nos estudos de dispersão, movimento, migração, comportamento e hábitos alimentares de insetos.

ODUM e KUENZLER (1963), marcando com ^{32}P três espécies dominantes de plantas de um velho ecossistema da U.S. Atomic Energy Commission's Savannah River Plant, puderam determinar a sequência de transferência do radiotraçador na população animal da área. O experimento veio demonstrar que o uso de traçadores radioativos pode ajudar, não só no conhecimento das cadeias alimentares, como também na determinação da principal fonte energética de que se utilizam certas populações heterotróficas na natureza.

PELEG e GOTHILF (1964), marcaram ovos de um lepidoptero (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller), com ^{32}P adicionado a dieta das larvas. Fêmeas que no estágio de larvas alimentaram-se de $10\mu\text{Ci}$ de ^{32}P por grama de matéria ingerida puseram ovos que em média apresentavam uma atividade de 56 cpm.

MARCHART (1967), descreve um método para marcação de uma praga de cacau, *Distantiella theobroma* Distant através de uma solução de sacarose contendo ^{32}P . As larvas radioativas levadas ao campo eram expostas a população natural de predadores. Após 48 h, a área era mostrada coletando-se os predadores por saturação do meio com piretrina. Não foram encontrados predadores especializados em *D. theobroma*, porém, alguns apresentavam-se bastante radioativos, como espécies das famílias Formicidae; Reduvidae; Mantidae e Arachinidae.

SHURE (1970), utilizando o ^{32}P , estudou as transferências tróficas de vegetais para espécies herbívoras, que variaram como resultado da diferença na velocidade de transferência do radioisótopo, específica de cada órgão da planta. Concluiu que as curvas de transferência do ^{32}P não podem ser usadas sozinhas na determinação das posições tróficas, a menos que seja demonstrado, de antemão, a estabilidade entre produtores e consumidores.

SHURE (1973), marcou duas espécies dominantes de plantas, com ^{32}P , para determinar os componentes da cadeia alimentar. Obteve também algumas medidas das suas transferên

cias tróficas. Os gafanhotos foram os maiores consumidores de folhas. A seiva era muito sugada por afídeos enquanto os besouros alimentavam-se da semente.

WALDER *et alii* (1975), desenvolveram um método para marcação de adultos da broca da cana-de-açúcar através da alimentação de lagartas com dieta radioativa. Esse método é de grande interesse para estudos ecológicos em que existe a necessidade de marcação de adultos sem manuseio.

SGRILLO *et alii* (1975), marcaram insetos adultos da *D. saccharalis* alimentando-os por doze horas com uma solução de sacarose a 10% (100 ml) contendo 5 mCi de ^{32}P , livre de carregador, na forma de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$. Por meio do detector G-M, verificavam a atividade das posturas feitas e dos insetos, após a morte natural destes.

SGRILLO *et alii* (1977), marcaram lagartas do 3º instar de *D. saccharalis*, alimentando-as em colmos de cana-de-açúcar, marcados com ^{32}P . Calcularam que uma atividade específica de 0,3 mCi de ^{32}P /g do colmo da cana é suficiente para obtenção de adultos marcados.

LEONE (1947), usando macerado de insetos inteiros, conduz testes de precipitina, através de dois métodos diferentes: 1) titulação, usando a técnica do teste do anel (BOYDEN, 1926). 2) medições fotoelétricas da turbidez das reações usando o photronreflectometer (Libby, 1938). Relaciona ainda a intensidade das reações de precipitina com a posição sistemática

ca das espécies comparadas. Os resultados não mostram nenhuma diferença na resposta do teste. Finalizando, o autor, discute brevemente a validade do uso de macerados de organismos inteiros, como base para classificação sistemática.

WEST (1950), ressalta a importância do teste de precipitina em estudos entomológicos, principalmente na determinação da relação presa/predador, sistemática e fontes sanguíneas para insetos hematófagos.

FOX *et alii* (1956), usando teste de precipitina, determinaram a predação de elaterídeos, em campo, por certas espécies de Carabídeos do gênero *Agonum*, *Amara*, *Clivana*, *Harpalie* e *Pterostichus* e de staphylinídeos do gênero *Philonthus*, *Staphylinus* e *Tachyporus*. Todos os predadores foram coletados em todos os meses, com exceção de janeiro, março e novembro. Foram macerados, filtrados em papel e testados contra antissoro de *Agriotes sputator* L.

DEMPSTER (1960), desde 1956 vem estudando os predadores do besouro *Phytodecta olivacea* Forster por meio do teste de precipitina. Dentre 11286 predadores testados, cinco espécies de Miridae duas de Anthocoridae, mostraram alimentarem-se regularmente do besouro. O antígeno permaneceu detectável por 24h, após ter sido, respectivamente, comido por um mirídeo e um anthocorídeo. Concluiu ainda que o número de besouros comidos por cada predador depende do sincronismo das populações da presa e do predador.

ROTHSCHILD (1966), fez uma tentativa para relacionar a mortalidade de ninfas e adultos de *Conomelus anceps* Germar com o parasitismo e a predação. O teste de precipitina foi usado para avaliar a predação, mas, as tentativas feitas para avaliações quantitativas foram dificultadas por causa do pouco conhecimento a respeito do número de presas comidas por cada predador. A porcentagem de predadores, contendo tecido de *Conomelus* era frequentemente alta (acima de 50% para aranhas licosidae e 40% para as phalangidae).

TITOVA (1970), obteve um antissoro contra *Eurigaster integriceps* Put com um alto título, através de repetidas injeções do antígeno homólogo em coelho. O antissoro assim preparado reagiu fortemente com antígenos de espécies do mesmo gênero e mais fracamente com alguns antígenos obtidos de espécies com gêneros diferentes. As reações com essas últimas foram completamente eliminadas pela técnica de exaustão do soro com seus antígenos, mantendo porém, a mesma sensibilidade.

FIGUEREDO *et alii* (1975), apresentaram um histórico da serologia aplicada a fungos em geral, citando todos os trabalhos desenvolvidos no Brasil sobre o assunto. Ao mesmo tempo, descreveram alguns conceitos básicos como os de antígenos, antígeno imunizante, antígeno reagente e método de preparo, ao lado de uma vastíssima revisão bibliográfica.

OLIVEIRA (1975), utilizando antígenos purificados de agentes fitopatogênicos, enzimas e proteínas vegetais

no preparo de antíseros específicos, observou que a resposta imunológica foi mais rápida quando os antígenos foram injetados nos linfonódulos.

BOREHAM *et alii* (1978), utilizando as reações de precipitação e aglutinação na determinação das relações presa/predador fazem referência ao método utilizado na produção do antísero específico com alto título. Ressaltam as limitações do método serológico, incluindo a especificidade do antísero e as dificuldades de interpretação dos resultados quantitativos quando o número de presas ingeridas por cada predador é desconhecida. Mencionam os erros de quantificação de predação que ocorrem por resultados positivos de reações devido a ingestão de carniças ou material vegetal, acidentalmente, por artropodes fitófagos.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. RADIOTRAÇADOR

Foi utilizado o radioisótopo ^{32}P na forma de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$, livre de carregador, proveniente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo, para a marcação de ovos e lagartas do 3º ao 5º instar de *D. saccharalis*, obtidos da criação do setor de entomologia do CENA e da Copersucar. Em média, 25 ovos aderidos a pedaços triangulares do substrato de papel sulfite eram imersos por 5 a 8 min. em uma solução aquosa radioativa, contendo 100 μCi de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ por ml de água destilada.

As lagartas (em média 120 lagartas entre o 3º, 4º e 5º instar) foram alimentadas durante 7 a 8 dias em dieta

artificial marcada com uma solução aquosa radioativa contendo 500-600 μCi de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ por 0,5 ml de água destilada, para cada 100g de dieta (SGRILLO *et alii*, 1978).

Ovos e lagartas após terem sido marcados foram distribuídos pelos canaviais das regiões determinadas. Os substratos de papel sulfite contendo ovos foram grampeados nas folhas das plantas (em média 25 ovos/folha).

Os ovos, antes de serem liberados foram irradiados com uma dose de 10 Krd de radiação gama, com uma taxa de dose de 600 Krd/h, através do irradiador de ^{60}Co "Gammabeam 650" fabricado pela Atomic Energy of Canada, com uma atividade de 18000 Ci na época do experimento, com a finalidade de impedir que se desenvolvessem.

Foram realizados testes para a obtenção de predadores radioativos pela alimentação com presas radioativas. Para tanto, predadores da espécie *Psecas zonatus* Simon, 1901 (Araneida: Salticidae), *Doru lineari* Eschs, 1822 (Dermaptera: Labiidae) e *Phorastes femoratus* De Geer, 1773 (Hemiptera: Reduviidae) coletados em canaviais, foram alimentados com ovos ou lagartas radioativas de *D. saccharalis*.

A radioatividade das amostras, de laboratório e de campo, foi determinada através de um sistema de cintilação líquida LS-230 Beckman, operando com alta tensão de 1200 volts, equipado com um circuito de coincidência, três canais de contagens simultâneos (A, B e C) e uma fonte radioativa de 40 μCi de

^{137}Cs para padronização externa automática. As amostras ou foram contadas em 10 ml de água destilada (efeito Cerenkov), ou, em 10 ml de solução cintiladora (5g de PPO(2,5 diphenyloxazole) por litro de tolueno, em frascos de vidro para cintilador líquido, no tempo máximo de 1 min. Nas contagens por efeito Cerenkov foi usado o canal monitor, B, com discriminador de pulso de 0 a 500 e ganho do amplificador 500. Nas contagens por cintilação líquida foi usado o canal integral, A, com discriminador de pulsos de 0 a 1000 e ganho do amplificador 300.

Para se minimizar erros acidentais cuja natureza é aleatória, foi estabelecido como limite mínimo para uma amostra ser considerada radioativa, a média do Back-Ground adicionada de três vezes o seu desvio padrão ($\bar{BG}+3s$).

4.2. SEROLOGIA

Lagartas do 5º instar da *D. saccharalis*, deixadas em jejum por 48h foram utilizadas como antígeno no preparo de antissoros específicos.

Dois diferentes métodos foram utilizados na obtenção de antissoros e sangrias.

Método 1:

Lagartas de *D. saccharalis* do 5º instar foram deixadas em jejum por 48h. A seguir, foram maceradas em pilão de porcelana, em presença de solução salina 0,85% (3 ml da solu

ção por g de lagarta). O macerado foi filtrado através de algodão, deixado por 24h a uma temperatura de 4⁰C e centrifugado por 30 min a 5910g. O precipitado(p) foi descartado; parte do líquido sobrenadante (ls), puro e parte emulsionado com Adjuvante Freund completo em partes iguais (v/v), foi utilizado como antígeno (1) para obtenção do antissoro específico. Para tanto, imunizou-se um coelho (A), pesando 3 kg, com o antígeno 1, através de injeções semanais, via subcutânea e/ou intravenosa, durante sete semanas. Na primeira semana foi injetado, via subcutânea, 1,0 ml do antígeno emulsionado em partes iguais (v/v) com Adjuvante Freund completo. Na segunda semana foi injetado, via intravenosa, 0,5 ml do antígeno. Na terceira e quarta semana o antígeno foi injetado via subcutânea (0,5 ml) e intravenosa (0,5 ml), observando-se um intervalo de 2h entre uma aplicação e outra. Na quinta semana foi injetado 0,5 ml do antígeno, via subcutânea e 2h após, via intravenosa, mais 2 ml. Na sexta semana foi injetado, via subcutânea, 1,0 ml e 2h após, mais 2,25 ml via intravenosa. Na sétima semana foi injetado, via intravenosa, 2,0 ml do antígeno.

No intervalo entre a quarta e a quinta e na sétima semana foram feitas sangrias. Onze dias após a última injeção do antígeno foi feita punção cardíaca no coelho retirando-se todo o sangue (figura 1). O sangue recolhido permaneceu por 2 a 3h a temperatura ambiente. Após coagular foi mantido a 4⁰C por 24h. O coágulo foi descartado e o antissoro (P) obtido, adicionado de mertiolato para uma concentração final de 1:10.000,

FIGURA 1 - Esquema de preparo do antígeno 1 (líquido sobrenadante obtido com a centrifugação de lagartas do 5º instar de *D. saccharalis*), imunização e sangrias no coelho A.

foi armazenado a -20°C para testes serológicos posteriores (TITOVA, 1970).

Método 2:

Lagartas do 5^o instar de *D. saccharalis* foram deixadas em jejum por 48h. A seguir, foram maceradas no tubo da centrífuga (Ependorff-3200) em presença de solução salina 0,85% (0,5 ml da solução/lagarta). O macerado foi centrifugado por 3 min a 15.000 g. O precipitado (p-1) foi descartado. O líquido sobrenadante (ls-1) obtido foi novamente centrifugado pelo mesmo ciclo. O precipitado (p-2) foi descartado. O líquido sobrenadante (ls-2), parte foi emulsionado com adjuvante Freund completo, (v/v) e utilizado como antígeno (2) para obtenção do antissoro específico e parte, armazenado durante sessenta dias sob três condições diferentes de temperatura: temperatura ambiente (ta) câmara fria, 4°C (cf) e freezer, -20°C (fr), para serem posteriormente utilizados nos testes serológicos de dupla difusão.

Imunizou-se um coelho (B), pesando 2,5 kg, com duas injeções do antígeno 2, na região do linfonódulo (OLIVEIRA, 1975), observando-se um intervalo de quinze dias entre a primeira e a segunda injeção (0,5 ml do antígeno/injeção). Durante o período de imunização fez-se sangrias diárias durante trinta dias. Antes da primeira injeção do antígeno fez-se uma sangria para obtenção do soro normal (SN), utilizado como controle nas reações serológicas (figura 2).

Nas sangrias, fez-se um pequeno corte longituu

FIGURA 2 - Esquema de preparo do antígeno 2 (líquido sobrenadante obtido com a segunda centrifugação de lagartas do 5ª instar de *D. saccharalis*), imunização e sangrias no coelho B.

dinal na veia marginal da orelha do coelho e recolheu-se entre 9 a 11 ml de sangue. O sangue permaneceu por 2 a 3h a temperatura ambiente e o coágulo formado foi descolado das paredes do frasco que o continha e mantido em refrigerador (4°C) durante 24h. O coágulo (c-1) foi descartado e o soro (s-1) obtido foi centrifugado por 3 min a 15.000g. O precipitado foi descartado e o soro (s-2), adicionado de mertiolato (1:10000) foi armazenado a -20°C para ser, posteriormente, utilizado como antissoro (C).

4.3. TESTES SEROLÓGICOS

Os testes serológicos foram realizados, utilizando-se a técnica de dupla difusão em gel de agar a 1% (OUCHTERLONY, 1958), em tampão PBS, pH 7,0, em lâminas de microscópio (3,0 ml da solução a 1% de agar por lâmina de 75x25 mm).

4.4. AMOSTRAGEM

Os locais utilizados para liberação de insetos radiomarcados e coletas de predadores, posteriormente, através da presença de radioatividade e testes serológicos de dupla difusão, foram os seguintes:

1. Estação Experimental do IAC (Piracicaba)

Período: 23/07/78 - 22/11/78

Infestação: lagartas do 3º, 4º e 5º instar

Altura média das canas: 210 cm

2. Estação Experimental do IAC (Piracicaba)

Período: 15/05/79 - 21/05/79

Infestação: ovos

Altura média das canas: 210 cm

3. Fazenda Iracema, Usina Palmeiras (Piracicaba)

Período: 15/05/79 - 19/06/79

Infestação: ovos

Altura média das canas: 100 cm

4. Estação Experimental da Copersucar (Piracicaba)

Período: 25/06/79 - 2/07/79

Infestação: ovos

Altura média das canas: 60 cm

Todas as coletas foram diurnas, utilizando-se como armadilha de solo latas de 10 cm de diâmetro e 1000 ml de capacidade, contendo pequeno volume de formol a 10%.

As armadilhas foram distribuídas uniformemente pelos centros das ruas dos canaviais, nivelando-se a extremida de aberta com o solo.

5 - RESULTADOS

5.1. RADIOTRAÇADOR

A imersão dos ovos de *D. saccharalis* na solução radioativa, por 5 a 8 min e a alimentação das lagartas com dieta radiotiva, por 7 a 8 dias, permitiu obter-se ovos e lagartas radioativos. A radioatividade, determinada por efeito Cerenkov, foi em média de 375047,7 cpm para os ovos e 19598cpm para as lagartas, conforme ilustram as tabelas 1a e 1b.

Os predadores (*P. zonatus*, *P. femoratus* e *D. lineare*) coletados no canavial e alimentados com ovos ou lagartas radioativas de *D. saccharalis* tornaram-se radioativos. Ovos com radioatividade média de 743,5 cpm permitiram obter predadores com média de 203,7 cpm. Lagartas com radioatividade média

TABELA 1a - Contagens, em água destilada, da radioatividade de ovos de *D. saccharalis* após imersão por 5 a 8 min, em uma solução aquosa radioativa, contendo 100 μCi de $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4/\text{ml}$ de água destilada.

Repetições	Atividade em cpm de ovos de <i>D. saccharalis</i>
1	257614
2	352472
3	366864
4	478265
5	311517
6	385855
7	393627
8	454168

TABELA 1b - Contagens, em água destilada, da radioatividade das lagartas de *D. saccharalis*, após alimentarem-se durante 7 a 8 dias com dieta artificial, contaminada com uma solução aquosa radioativa, contendo 500-600 $\mu\text{Ci Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ /0,5 ml de água destilada/100g de dieta.

Repetições	Atividade em cpm das lagartas de <i>D. saccharalis</i>
1	8310
2	18867
3	30616
4	37796
5	45754
6	179753
7	209522
8	361120
9	386975
10	409684
11	436670

de 29026 cpm permitiram obter predadores com média de 1964,5 cpm, conforme ilustram as tabelas 2a e 2b.

Após as infestações dos canaviais com lagartas radioativas foram realizadas 94 amostragens e após as infestações com ovos radioativos foram realizadas 13 amostragens. No total de amostragens após as infestações com lagartas radioativas, o grupo das formigas (Hymenoptera: Formicidae), representado pela espécie *Ectatoma quadridens* Fabr., 1793, uma espécie do gênero *Gnaptogenis* sp e duas espécies do gênero *Solenopsis* sp, foi o mais significativo em número de indivíduos capturados e presença de radioatividade. Em números reduzidos foram capturados, radioativos, exemplares de baratas (Blattariae:Blattidae), exemplares da espécie *Cycloneda sanguinea* L., 1763 (Coleoptera: Coccinelidae) e exemplares da espécie *P. zonatus* conforme ilustra a tabela 3a. No total de amostragens realizadas após as infestações com ovos radioativos, a única espécie radioativa foi *D. lineare*, conforme ilustra a tabela 3b.

A espécie *E. quadridens* apareceu com 80% de frequência, sendo capturados 364 exemplares, dos quais, 44 estavam radioativos somando 22365 cpm.

A espécie do gênero *Gnaptogenis* sp apareceu com 21% de frequência, sendo capturados 111 exemplares, dos quais, 40 estavam marcados, somando 8444 cpm.

As duas espécies do gênero *Solenopsis* sp, somadas, apareceram com 40% de frequência, sendo capturados 370

TABELA 2a - cpm, em água destilada, dos ovos radioativos de *D. saccharalis* e dos predadores (*P. zonatus* e *D. lineare*) coletados no canavial, após terem sido alimentados com esses ovos

Predador	Atividade em cpm dos ovos	Atividade em cpm dos predadores
* <i>P. zonatus</i> (1)	622	11
<i>P. zonatus</i> (2)	211	94
<i>D. lineare</i> (1)	786	148
<i>D. lineare</i> (2)	1355	562
$\overline{\text{BG}} + 3s$		38

*Pela observação visual da postura, notou-se que *P. zonatus*(1) não se alimentou dos ovos.

TABELA 2b - cpm, em água destilada, das lagartas, do 5º instar de *D. saccharalis*, radioativas e dos predadores (*P. zonatus* e *P. femoratus*) coletados no canavial e alimentados com essas lagartas radioativas.

Predador	Atividade em cpm das lagartas do 5º instar de <i>D. saccharalis</i>	Atividade em cpm dos predadores
<i>P. femoratus</i>	35552	664
<i>P. zonatus</i>	22500	3265
$\overline{\text{BG}} + 3s$		36

TABELA 3a - Espécies coletadas radioativas, frequência, número de exemplares capturados, número de exemplares capturados radioativos e cpm no total das amostragens realizadas após as infestações dos canaviais com lagartas radioativas de *D. saccharalis*.

Total de amostragens	Espécies coletadas radioativas	Frequência de coleta	Total de exemplares coletados	Total de exemplares radioativos	cpm total dos radioativos
94	<i>E. quadridens</i>	80%	364	44	22365
	<i>Gnaptogenis</i> sp	21%	111	40	8443
	<i>Solenopsis</i> sp	40%	370	30	810
	Blattidae	14%	14	3	4270
	<i>C. sanguinea</i>	2%	2	1	38
	<i>P. zonatus</i>	30%	46	1	30

TABELA 3b - Espécie coletada radioativa, frequência, número de exemplares capturados, número de exemplares capturados radioativos e cpm no total das amostragens realizadas após as infestações dos canaviais com ovos radioativos de *D. saccharalis*.

Total de amostragens	Espécies coletadas radioativas	Frequência de coleta	Total de exemplares coletados	Total de exemplares radioativos	cpm total dos radioativos
13	<i>D. lineare</i>	85%	38	14	24329

exemplares, dos quais 30 estavam radioativos, somando 810 cpm.

As baratas apareceram com 14% de frequência, sendo capturados 14 exemplares, dos quais, 3 estavam radioativos, somando 4270 cpm.

A espécie *C. sanguinea* apareceu com 2% de frequência, sendo capturados 2 exemplares, dos quais, 1 estava radioativo apresentando 38 cpm.

A espécie *P. zonatus* apareceu com 30% de frequência, sendo capturados 46 exemplares, dos quais, 1 estava radioativo apresentando 30 cpm.

A espécie *D. lineare* apareceu com 85% de frequência, sendo capturados 38 exemplares, dos quais, 14 estavam radioativos somando 24329 cpm.

5.2. SEROLOGIA

Os resultados dos testes serológicos, entre o antissoro P, obtido de cada uma das 3 sangrias no coelho A e o antígeno homólogo, foram positivos. Na reação do antissoro obtido com a primeira sangria (P-1^a) foram observadas duas linhas de precipitação. Na reação do antissoro obtido com a segunda sangria (P-2^a) foram também observadas duas linhas de precipitação e na reação do antissoro obtido com a terceira sangria (P-3^a) foram observadas três linhas de precipitação, conforme ilustra a tabela 4.

A reação do antissoro P com o soro normal(SN) foi negativa.

Os testes serológicos realizados com o antissoro C, obtido de cada uma das vinte e oito sangrias no coelho B permitiram verificar que: utilizando-se o antígeno homólogo (h), preparado pouco antes dos testes, os resultados foram positivos à partir das reações feitas com o antissoro obtido da sétima sangria (C-7^a). Nas reações efetuadas sessenta dias após o armazenamento do antígeno homólogo em temperatura ambiente (ta), a 4⁰C (cf) e a -20⁰C (fr), os resultados também foram positivos à partir dos testes feitos com o antissoro obtido da sétima sangria (C-7^a). Permitiram também observar diferenças quanto ao número de linhas de precipitação obtidas nas respectivas reações e a defasagem no aparecimento dessas linhas conforme ilustra a tabela 5.

TABELA 4 - Reações serológicas, de dupla difusão, realizadas entre o antissoro P, obtido com cada uma das três sangrias e o antígeno homólogo.

<i>Ordem da sangria</i>	<i>Código do antissoro</i>	<i>Reação do antissoro com o antígeno homólogo</i>
1/6 ⁽¹⁾	P-1 ^a	++
2/6; 1/10	P-2 ^a	++
3/6; 2/10; 1/11	P-3 ^a	+++

++ = duas linhas de precipitação

+++ = três linhas de precipitação

(1) = *Numerador*: ordem de sangria após a última injeção do an
tígeno

Denominador: número de injeções

TABELA 5 - Reações serológicas, de dupla difusão, entre o antissoro C, obtido com cada uma das 28 sangrias realizadas e os antígenos h, ta, cf e fr.

Ordem da sangria	Código do antissoro	Reação do antissoro com os diversos antígenos			
		h	ta	cf	fr
(1)					
1/1	C-1 ^a	-	-	-	-
2/1	C-2 ^a	-	-	-	-
3/1	C-3 ^a	-	-	-	-
4/1	C-4 ^a	-	-	-	-
5/1	C-5 ^a	-	-	-	-
6/1	C-6 ^a	-	-	-	-
7/1	C-7 ^a	+	+	+	+
8/1	C-8 ^a	+	+	+	+
9/1	C-9 ^a	+	+	+	+
10/1	C-10 ^a	++	+	+	+
11/1	C-11 ^a	++	+	+	+
12/1	C-12 ^a	++	+	+	+
13/1	C-13 ^a	+++	+	+	+
14/1	C-14 ^a	+++	+	+	+
15/1;1/2	C-15 ^a	++	+	+	+
16/1;2/2	C-16 ^a	++	+	+	+
17/1;3/2	C-17 ^a	++	+	+	+
18/1;4/2	C-18 ^a	+++	++	++	+
19/1;5/2	C-19 ^a	+++	++	++	++
20/1;6/2	C-20 ^a	+++	++	++	++
21/1;7/2	C-21 ^a	+++	++	++	+
22/1;8/2	C-22 ^a	+++	++	++	+
23/1;9/2	C-23 ^a	+++	++	++	+
24/1;10/2	C-24 ^a	++	+	++	+
25/1;11/2	C-25 ^a	++	+	++	+
26/1;12/2	C-26 ^a	+++	++	+++	+
27/1;13/2	C-27 ^a	++	+	++	+
28/1;14/2	C-28 ^a	++	+	++	+

- Ausência de linha de precipitação

+

++ Presença de duas linhas de precipitação

+++ Presença de três linhas de precipitação

(1) Numerador: ordem de sangria após a última injeção
Denominador: número de injeções

Uma linha de precipitação foi observada à partir das reações efetuadas entre o antissoro obtido da sétima sangria (C-7^a) e os antígenos: h, ta, cf e fr.

Duas linhas de precipitação foram inicialmente observadas à partir das reações efetuadas entre o antissoro obtido com a décima sangria (C-10^a) e o antígeno h. Após, foram também observadas à partir das reações entre o antissoro obtido com a décima-oitava sangria (C-18^a) e os antígenos ta e cf e entre o antissoro obtido com a décima-nona sangria (C-19^a) e o antígeno fr.

Três linhas de precipitação foram inicialmente observadas à partir das reações entre o antissoro obtido com a décima terceira sangria (C-13^a) e o antígeno h. Após, foram também observadas entre o antissoro obtido com a vigésima sexta sangria (C-26^a) e o antígeno cf.

A partir desses resultados fez-se a titulação dos antissoros P-3^a, C-7^a e C-26^a. Para tanto, cada antissoro foi diluído em presença de uma solução salina 0,85% seguindo uma progressão geométrica de razão 2 e testados, por dupla difusão, contra o antígeno homólogo. Os resultados obtidos revelaram valores máximos de 32 para o antissoro P-3^a; 4 para o antissoro C-7^a e 32 para o antissoro C-26^a. Após, os antissoros P-3^a e C-26^a foram utilizados nas reações com antígenos obtidos à partir da maceração, em presença de solução salina 0,85%, de exemplares de *D. saccharalis* nos diversos estágios de desen

volvimento e de predadores coletados no canavial e respectivamente alimentados com uma única lagarta do 5º instar de *D. saccharalis*. Os estágios de desenvolvimento da *D. saccharalis* foram: ovo (AG-DS₀) lagartas do 1º ao 5º instar (AG-DS₁ a AG-DS₅) pupa (AG-DS_p) adulto macho (AG-DS_{ao}[♂]) e fêmea (AG-DS_{a♀}). Os predadores foram: *P. femoratus* (AG-Pf) e *P. zonatus* (AG-Pz). As reações com o antígeno Pf foram realizadas até 96 h após a alimentação e com o antígeno Pz até 24 h após.

Os resultados não mostraram diferenças, em relação ao número máximo de linhas de precipitação obtidas, nas reações análogas entre os antissoros P-3^a, C-26^a e os antígenos obtidos a partir de cada estágio de desenvolvimento da *D. saccharalis*, conforme ilustra a tabela 6. Uma linha de precipitação foi observada nas reações com o antígeno DS₀. Duas linhas de precipitação foram observadas nas reações com os antígenos DS₁, DS₂, DS₃, DS_p, DS_{ao}[♂] e DS_{a♀}. Três linhas de precipitação foram observadas com os antígenos DS₄ e DS₅ (Figs. 3a e 3b).

Os testes análogos realizados com os antissoros P-3^a e C-26^a em reação com cada um dos antígenos Pf e Pz foram específicos e não mostraram diferenças quanto ao número máximo de linhas de precipitação obtidas, conforme ilustram as tabelas 7 e 8. Com o antígeno Pf, duas linhas de precipitação foram observadas nas reações efetuadas até 72h após. Uma linha de precipitação foi observada até 96h após. Com o antígeno Pz foram observadas duas linhas de precipitação nas reações efetuadas até 24h após. (Figura 4).

TABELA 6 - Reações serológicas de dupla difusão, entre os antissoros P-3^a e C-26^a e os antígenos DS₀, DS₁, DS₂, DS₃, DS₄, DS₅, DS_p, DS_{a♂} e DS_{a♀}

Código do antissoro	Reação dos antissoros com os diversos antígenos								
	DS ₀	DS ₁	DS ₂	DS ₃	DS ₄	DS ₅	DS _p	DS _{a♂}	DS _{a♀}
P-3 ^a	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++
C-26 ^a	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++

+ uma linha de precipitação

++ duas linhas de precipitação

+++ três linhas de precipitação

TABELA 7 - Teste serológico de dupla difusão, entre o antissoro P-3^a, C-26^a e o antígeno Pf, até 96 h após sua alimentação com uma lagarta do 5º instar da *D. saccharalis*.

Código do antissoro	Reação do antissoro com o antígeno Pf nos diversos intervalos de tempo					
	na	0	24	48	72	96
P-3 ^a	-	++	++	++	++	+
C-26 ^a	-	++	++	++	++	+

na = não alimentado

- = ausência de linha de precipitação

+ = uma linha de precipitação

++ = duas linhas de precipitação

TABELA 8 - Teste serológico de dupla difusão, entre o antissoro P-3^a, C-26^a e o antígeno Pz, até 24 h após sua alimentação com uma lagarta do 5º instar da *D. saccharalis*.

Código do antissoro	Reação do antissoro com o antígeno Pz, nos diversos intervalos de tempo		
	na	0	24
P-3 ^a	-	++	++
C-26 ^a	-	++	++

na = não alimentado

- = ausência de linha de precipitação

++ = duas linhas de precipitação

FIGURA 3a - Testes serológicos de dupla difusão em agar. Anti-genos de lagartas do 5^o instar de *D. saccharalis* nas seguintes diluições: 1= não diluído; 2=1:2; 3=1:4; 4= 1:8; 5= 1:16; 6= 1:32; 7= 1:64; 8= 1:128; 9= 1:256; 10= 1:512; 11= 1:1024. A e B apresentam as reações com o anti-soro C; C e D apresentam as reações com o anti-soro P.

FIGURA 3b - Testes serológicos de dupla difusão em agar feitos com antígenos de *D. saccharalis* A= ovo; B= instar; C= 3º instar; D= 4º instar; E= 5º instar e F= pupa. Os anti-soros C e P foram colocados nos orifícios centrais. Os antígenos foram diluídos em solução salina 1= não diluído; 2= 1:2; 3= 1:4; 4= 1:8; 5= 1:16; 6= 1:32.

FIGURA 4 - Testes serológicos de dupla difusão em agar deitos com antígeno obtido do macerato de um hemíptero (*Phorastes femoratus*) alimentado com lagartas de 59 instar de *D. saccharalis*. A= logo após a alimentação; B= 24 horas após a alimentação; C= 96 horas após a alimentação. C= Anti-soro; 1= antígeno não diluído; 2= 1:2; 3= 1:4; 4= 1:8; 5= 1:16; 6= 1:32.

Nos testes serológicos de dupla difusão, realizados com os predadores coletados nos canaviais a partir das infestações com ovos radioativos de *D. saccharalis*, não foram observadas reações positivas.

6 - DISCUSSÃO

6.1. RADIOTRAÇADOR

O uso do ^{32}P mostrou-se bastante adequado aos objetivos do trabalho, sugerindo a existência de um número diversificado de espécies envolvidas no controle das populações de *D. saccharalis*. É importante notar que a rapidez desse controle foi evidenciada pela captura de predadores radioativos logo no primeiro dia de coleta após a liberação das presas radioativas nos canaviais.

As coletas realizadas em canaviais com plantas novas, Iracemápolis e Copersucar, já mostravam, pelos predadores ali coletados, a existência de um complexo alimentar. É interessante notar que a essas plantas novas, antecederam plantas

mais velhas que antes de serem colhidas foram queimadas, prejudicando as populações de predadores ali existentes. Tal fato evidencia a rapidez com que esse complexo é novamente formado. Talvez, por estarem os seus integrantes adaptados a habitats com curta duração de estabilidade.

Após as infestações dos canaviais com lagartas radioativas, os predadores coletados com maior porcentagem de radioatividade total foram as formigas. Os exemplares da espécie *E. quadridens* foram observados atuando com ampla distribuição pelos canaviais, com operárias bastante ativas, em constante procura tanto no solo quanto nas plantas. Foram também observadas transportando lagartas radioativas vivas. Os exemplares de *Gnaptogenis* sp e de *Solenopsis* sp foram igualmente observadas com ampla distribuição pelos canaviais, tanto no solo quanto nas plantas. NEGM e HENSLEY (1969) em Louisiana, U.S.A., observaram formigas (*Solenopsis saevissima richteri* Forel) atacando lagartas grandes e pupas de *D. saccharalis* dentro das galerias. SGRILLO (1979) cita que um dos principais fatores de mortalidade de lagartas grandes em São Paulo é o parasitismo por Taquinídeos. ROCCIA e SANCHES (1976) e TERAN e NOVARETTI (1976) em SGRILLO (1979) citam até cerca de 80% de lagartas parasitadas em várias regiões do Estado.

Aranhas das famílias Salticidae e Clubionidae foram frequentemente observadas nas folhas das plantas e coletadas. Do total coletado, apenas um exemplar da espécie *P. zonatus* estava radioativo, apresentando porém baixa contagem. O úni

co exemplar radioativo de *C. sanguinea* coletado, também, apresentava baixa contagem.

Visto que no campo são liberadas lagartas com grande amplitude de radioatividade, pode ser que as baixas contagens dos exemplares *P. zonatus* e *C. sanguinea* se deva a esse fato. Devemos considerar, também, a possibilidade desses exemplares como consumidores secundários ou mesmo terciários de uma lagarta radioativa.

Após as infestações dos canaviais com ovos radioativos, os únicos predadores coletados radioativos foram os dermápteros, (*D. lineare*). Frequentemente esses insetos foram vistos alimentando-se das massas de ovos que foram fixadas nas folhas das plantas e cujas bainhas lhes fornecem abrigo, não raro, encontrando-se ali suas posturas. TERAN (1978) cita uma média geral de 76% de controle natural de ovos de *D. saccharalis*. Desse total, 63,64% foi através de predadores, 3,90% através de parasitos e os 8,6% restantes, possivelmente por fatores climáticos ou talvez doenças. Ressalta porém que estes dados podem estar encobertos pela ação de predadores mastigadores que não fazem distinção entre ovos sadios e aqueles parasitados ou sugados. NEGM e HENSLEY (1969) em Louisiana (U.S.A.), citam que predadores sugadores, em particular as aranhas, são mais importantes que os mastigadores como agentes de controle biológico para ovos de *D. saccharalis*.

Visto que a liberação das presas radioativas re

presenta uma situação artificial, estabelecendo um local de alta densidade populacional e como a intensidade de predação é frequentemente função dessa densidade, os dados coletados durante o experimento poderiam sugerir uma estimativa irreal da atividade do predador. Dessa maneira uma correlação entre a radioatividade dos indivíduos capturados e preferência alimentar pela *D. saccharalis*, não foi aqui considerada.

A partir da realização dos testes serológicos em paralelo com as determinações da radioatividade dos predadores, passou-se a utilizar o efeito Cerenkov no lugar do líquido cintilador. Essa mudança foi baseada na necessidade do reaproveitamento da amostra para os testes serológicos e, o líquido cintilador, devido às suas propriedades solventes, não poderia satisfazer a esta condição. Contudo, essa mudança tornou-se, em parte, compensadora, porque minimizou o custo das análises e evitou os problemas de quenching químico comuns ao uso de líquidos cintiladores, devido as transferências de energia entre as amostras e os componentes químicos do meio. Por outro lado, os resultados das contagens podem ter sido um pouco prejudicados, pois o líquido cintilador é mais eficiente do que o efeito Cerenkov para essas determinações.

Ao final do trabalho achou-se conveniente padronizar os métodos de detecção utilizados. Para tanto, as análises que tinham sido feitas através do líquido cintilador foram corrigidas para efeito Cerenkov empregando-se um fator de

correção igual a 2,8 (SGRILLO, 1980). Esse fator foi determinado pelos resultados de contagens, respectivamente, por efeito Cerenkov e líquido cintilador para um trabalho específico com a mosca de frutas *Ceratitis capitata* Wied.

6.2. SEROLOGIA

Os resultados obtidos nas reações serológicas com os antissoros P e C, mostraram que o uso de técnicas serológicas é bastante adequado para o estudo das relações alimentares entre a *D. saccharalis* e artropodes predadores. FOX *et alii* (1956) usando teste de precipitina, determinaram a predação de elaterídeos por certas espécies de carabídeos dos gêneros *Agonum*, *Clivana*, *Harpalie* e *Pterostichus* e de Staphylinídeos do gênero *Phylonthus*, *Staphylinus* e *Tachyporus*. DEMPSTER (1960) determinou por meio do teste de precipitina, cinco espécies de Miridae e duas de Anthocoridae que se alimentavam regularmente do besouro *Phytodecta olivacea* Forster.

Não foram notadas diferenças entre os títulos máximos dos antissoros obtidos pelos dois métodos de imunização. Um título maior para o antissoro P poderia ser esperado devido ao maior número de injeções do antígeno. Contudo, antissoros com alto título, são menos específicos em suas reações, possibilitando o aparecimento de reações cruzadas, o que é indesejável em estudos de relações alimentares. TITOVA (1970) obteve um antissoro contra *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelari

dae) com um alto título, 1:1000, através de repetidas injeções do antígeno no coelho. Porém, com o aparecimento de reações cruzadas para insetos do mesmo gênero.

As reações serológicas com o antissoro C mostraram que após uma única injeção do antígeno no linfonóculo do coelho é possível detectar reações específicas. OLIVEIRA (1975) utilizando antígenos purificados de agentes fitopatogênicos, enzimas e proteínas vegetais no preparo de antissoros específicos, observou que a resposta imunológica foi mais rápida quando os antígenos foram injetados nos linfonóculos.

Os resultados dos testes serológicos com os antígenos ta, cf e fr, mostraram um declínio na atividade do antígeno, traduzido em um menor número de linhas de precipitação e defasagem no aparecimento dessas linhas em relação às aquelas obtidas nas reações com o antígeno homólogo (h). Esses resultados, podem ser atribuídos ao tempo de estocagem e às condições de temperatura a que foram submetidos os antígenos. Contudo, mostram, também, que é possível detectar-se reações específicas, mesmo após longos períodos, sem a necessidade de se dispensar maiores cuidados com a armazenagem do antígeno.

Comparando-se os resultados dos testes serológicos realizados com os antígenos ta, cf e fr, a temperatura parece ter sido o principal fator responsável pelas diferenças no número de linhas de precipitação observadas e defasagem no aparecimento dessas linhas, já que o tempo de estocagem foi o

mesmo.

Não foram notadas diferenças quanto ao número máximo de linhas de precipitação obtidas nos testes serológicos análogos realizados, respectivamente, com cada um dos antissoros P-3^a e C-26^a. Nos estudos serológicos efetuados com esses antissoros, os antígenos DS_0 , DS_1 , DS_2 , DS_3 , DS_4 , DS_5 , DS_6 , $DS_{a\sigma}$ e DS_{af} mostraram diferenças qualitativas nas reações em relação ao número de linhas de precipitação obtidas, porém, todas as reações foram positivas. Essas diferenças, podem ter sido ocasionadas por quantidades diferentes do mesmo determinante antigênico, nas diversas fases do inseto.

Os resultados dos testes serológicos realizados com os antígenos Pf, até 72h após e Pz até 24h após, quando comparados com o resultado das reações homólogas, mostraram uma linha de precipitação a menos. Nos testes realizados até 96h após com o antígeno Pf, notou-se duas linhas a menos. Tais resultados, evidenciam a existência de um limite de tempo no qual o determinante antigênico, permanece serologicamente detectável após ter sido consumido pelo predador. TITOVA (1970) obteve reações específicas, pelo método de dupla difusão em agar, até três dias após, a partir de predadores (aranhas) alimentados com uma única ninfa do 5º instar de *E. integriceps*. DEMPSTER (1960) obteve reações específicas, em testes de precipitina, até 24h após, a partir de predadores, (Miridae e Anthocoridae) alimentados com um adulto de *Phytodecta olivacea* Forster, enquanto que *Forficula*, ainda reagiu até 30h após ter comido um ovo de *Phytodecta* e

até 5 dias após ter comido uma larva do último instar.

Os testes serológicos realizados a partir de material de campo, foram limitados aos predadores coletados nos canaviais após as infestações com ovos radioativos de *D. saccharalis*. A ausência de resultados positivos pode ter sido devido a: 1) pequeno número de artrópodes testados. DEMPSTER (1960) em aproximadamente 11.000 predadores testados, encontrou 14,8% de Miridae e 9,5% de Anthocoridae alimentando-se regularmente do besouro *P. olivacea*. 2) o Título máximo do antissoro, 1:32, pode ter sido um fator limitante nos resultados, visto que, mesmo nos testes serológicos realizados com predadores (Dermapter^{os}) coletados radioativos, após as infestações com ovos radioativos, isto é, predadores que com certeza se alimentaram de ovos radioativos de *D. saccharalis*, nenhuma linha de precipitação foi observada. Por esse motivo foi feita uma comparação entre a sensibilidade dos métodos radiotraçador e serológico. Para tanto, duas lagartas do 5º instar de *D. saccharalis*, uma com 35552 cpm e a outra com 22500 cpm foram, respectivamente, oferecidos aos predadores *P. femoratus* e *P. zonatus* que após alimentarem-se das presas apresentaram, respectivamente, uma radioatividade de 664 cpm e 3265 cpm. Cada predador foi, a seguir, macerado em presença de solução salina 0,85% e diluído até 1:1024 segundo uma progressão geométrica de razão 2. Após, para as respectivas diluições de cada predador, tomou-se uma alíquota para testes serológicos de dupla difusão e a porção restante foi contada por efeito Cerenkov (Tabela 9).

TABELA 9 - Comparação entre a sensibilidade do método do radiotraçador e do método serológico, respectivamente, pela determinação da radioatividade, por efeito Ce renkov e reação de dupla difusão, para cada diluição do macerado dos predadores *P. femoratus* e *P. zo natus*, respectivamente alimentados com uma lagarta do 5º instar de *D. saccharalis* radioativa.

Diluição	Resultado dos testes realizados com os predadores			
	<i>P. femoratus</i>		<i>P. zonatus</i>	
	Serologia	Atividade em cpm	Serologia	Atividade em cpm
1	+	105	+	1835
2	+	304	+	721
4	+	121	+	330
8	-	84	-	197
16	-	79	-	123
32	-	48	-	50
64	-	27	-	42
128	-	40	-	44
256	-	35	-	52
812	-	17	-	33
1024	-	28	-	37
$\bar{B}\bar{G}+3s$		36 cpm		43 cpm

+ testes serológicos positivos

- testes serológicos negativos

Os resultados obtidos permitiram observar uma sensibilidade oito vezes maior para o método do radiotraçador, sem levar em conta que as contagens realizadas foram prejudicadas pelo "quenching de cor", ocasionado pela maceração dos predadores. Torna-se claro que qualquer correlação entre os dois métodos, só pode ser feita em dependência do conhecimento da quantidade e da radioatividade da presa consumida pelo predador. Nos testes realizados a partir de material de campo ficamos sem saber se a alta radioatividade do predador era devida ao consumo de um grande número de ovos radioativos ou, de um pequeno número consumido, porém, muito radiotativo porque não se dispõe de dados quantitativos de predação e nem de uma metodologia simples e eficiente para padronizar a radioatividade das presas que são liberadas no campo. Dessa maneira, se faz necessário a continuidade dos testes serológicos, com maior quantidade de exemplares, visto que os resultados obtidos a nível de laboratório, indicam que o emprego de técnicas serológicas, pode contribuir bastante, para o conhecimento das relações alimentares entre a *D. saccharalis* e artrópodes predadores.

6.3. AMOSTRAGEM

Devem ser aqui considerados com restrições os métodos de coleta, visto que interferem nos resultados obtidos selecionando os artrópodes capturados e dessa maneira, não estimar com fidelidade o verdadeiro potencial de uma determinada es

pêcie. Como exemplo podemos citar que em nenhuma das coletas realizadas com armadilha de solo capturou-se dermapteros e que durante as coletas manuais, a captura de formigas e aranhas era bastante trabalhosa. Outro aspecto negativo a considerar deve-se a coletas unicamente diurnas. NEGM e HENSLEY (1969) em Louisiana (U.S.A.), citam que as mais altas porcentagens de predação de larvas e ovos de *D. saccharalis* foram durante à noite. SGRILLO (1979) cita que uma maneira de se minimizar os erros de levantamento populacional seriam coletas diuturnas.

De uma maneira geral, as amostragens foram consideradas válidas para obtenção de informações que forneçam subsídios para uma melhor compreensão da dinâmica populacional da *D. saccharalis*.

7 - CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos no presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. O ^{32}P pode ser usado com sucesso na obtenção de ovos e lagartas radioativas de *D. saccharalis*, respectivamente, pela imersão dos primeiros em solução aquosa e pela alimentação dos segundos com dieta contendo o radioisótopo.
2. Mesmo com menor eficiência o efeito Cerenkov pode ser utilizado para as determinações de radioatividade no estudo das relações alimentares entre a *D. saccharalis* e artropodes predadores.
3. Os testes serológicos realizados com os antissoros obtidos pela técnica do linfonódulo e por injeções intravenosas e in

traperitoniais alternadas foram específicos.

4. Testes serológicos efetuados com antíseros obtido pela técnica do linfonôdulo indicaram que é possível detectar-se reações específicas sete dias após uma única injeção do antígeno no coelho.
5. Testes homólogos realizados até 60 dias após o armazenamento do antígeno sob diferentes condições de temperatura e heterólogos até 96h após a alimentação de predadores com uma única lagarta do 5º instar de *D. saccharalis* foram positivos e específicos.

8 - SUMMARY

The purpose of this work has been the development and testing of radiotracers use and serological techniques on the studies of the feeding relationships between *Diatraea saccharalis* Fabr. 1794 (Lepidoptera: Crambidae) and predator arthropods in sugarcane fields, of São Paulo State region.

Radiotracer studies have been based on ^{32}P marked eggs of *D. saccharalis*, which after spreading in the sugarcane fields functioned as preys for existing predators. Further, they were identified by its radioactivity. Results has shown a varied number of species associated with *D. saccharalis* population control. It was verified that the main predators of larvae were ants and the eggs were eaten mostly by earwigs.

Serological studies have been based on the obtention of specific antiserum for *D.saccharalis*, and on testing by the use of the agar double diffusion technique (OUCHTERLONY, 1958), employing homologous and heterologous antigens. Results of homologous testing have shown a maximum of three precipitation lines. Heterologous testing was done with antigen obtained from macerated predator *Phorastes femoratus* De Geer, 1773 (Hemiptera: Reduviidae) which had been previously collected in the sugarcane fields and fed on a single fifth instar larva of *D. saccharalis*, results, in this case, have shown highly positive and specific reactions, up to 96 hours after feeding.

9 - LITERATURA CITADA

- BALDWIN, W.F.; JAMES, H.G. e WELCH, H.E. 1955. A study of predators of mosquito larvae and pupae with a radioactiv tracer. *Canadian Ent.*, 87(8): 350-356.
- BOREHAM, P.F.L. e OHIAGU, C.E. 1978. The use of serology in evaluating invertebrate prey-predator relationship: *Buu Entomol. Res.*, 68(2): 171-194.
- CARLUCCI, A.; C. PERUCA; R.B. SGRILLO; F.M. WIENDL e J.M.M. WALDER. 1977. Flutuação populacional de alguns insetos predadores que vivem em canaviais. *Ciência e Cultura*, 29(7).
- DEMPSTER, J.P. 1960. A quantitative study of the predators

on the eggs and larvae of the broom beetle *Phytodecta olivacea* Forster, using the precipitin test. *J. Anim. Ecol.*, 29: 149-167.

FIGUEREDO, M.B.; ALBA, A.P.C. e OLIVEIRA, A.R. 1977. Sorologia aplicada ao estudo dos fungos fitopatológicos. *Summa Phytopathologica*, 3: 233-259.

FOOTT, W.H. 1954. Phosphorus-32 labeling of the adults of the cabbage maggot, *Hylemya brassicae* (Bouche) (Diptera: Anthomyiidae). 85th Ann. Rept. Entomol. Soc. Ontario. p. 56-61.

FOX, C.J.S. e MACLELLAN, C.R. 1956. Some carabidae and staphylinidae shown to feed on a wire worm *Agriotes sputator* (L), by the precipitin test. *Cann. Ent.*, 88: 228-31.

GUAGLIUME, P. 1973. *Pragas da cana-de-açúcar - Nordeste do Brasil*. R.J. IAA. 622 p.

HOFFMAN, R.A.; A.W. LINDQUIST e J.S. BUTTS. 1951. Studies on treatment of flies with radioactiv phosphorus. *J. Econ. Ent.*, 44: 397-400.

JENKINS, D.W. 1960. Radioisotopes in ecological and biological of agricultural insects. *Proc. IAEA Symp. Bombay*. p. 322.

- JENKINS, D.W. 1963. *Use of radionuclides in ecological studies of insects*. In V. Schultz and A.W. Klement, Jr. (eds.) Radioecology, Reinhold, New York. p. 431-440.
- KNAPP, S.E.; FARINACCI, C.J.; HERBERT, C.M. Jr. e SAENGER, E.L. 1956. A method for labeling the lone star tick with a radioactive indicator (P^{32}). *J. Econ. Entomol.*, 49(3): 393-395.
- LEONE, C.A. 1947. A serological study of some Orthoptera. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 40: 417-33.
- LINDQUIST, A.W.; W.W. YATES; R.A. HOFFMAN e J.S. BUTTS. 1951. Studies on the fly habits of three species of flies tagged with radioactive phosphorus. *J. Econ. Ent.*, 44: 397-400.
- MARCHART, H. 1967. Radiotracer study of the predators on *Distantiella theobroma* (Distant) (Hemiptera: Miridae). *Proceedings of a Symposium on the use of isotopes and radiation in Entomology*.
- NEGM, A.A. e D.S. HENSLEY. 1969. Evaluation of certain biological control agents of sugarcane borer in Louisiana. *Journ. Econ. Entomol.*, 62(5): 1008-13.
- NEGM, A.A. e S.D. HENSLEY. 1972. Role of predaceous arthropods of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (F.) in

- Louisiana. In *XIV Congress of the Internacional Society of Sugarcane Technologists*. p. 445-53.
- NEWSOM, L.D. 1974. Predador inseticide relationships. *Entomophaga*. 7: 13-23.
- ODUM, E.P. e KUENZLER, E.J. 1963. *Experimental isolation of food chains in an old field ecosystem with the use of phosphorus-32*. In Schultz, V. & Klement, A.W. (eds.) *Radioecology*. p. 113-120.
- OLIVEIRA, A.R. 1975. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonôdulo. *Summa Phytopathologica*, 1: 61-64.
- OUCHTERLONY, O. 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis, In: *Progress in Allergy*, S. Karger, Basel, New York, 5: 1-78.
- PELEG, B.H. e GOTHILF, S. 1964. Labeling of eggs carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller), with ^{32}P for ecological studies. *The Israel Journ. of Agric. Research*, 14(2): 75-76.
- PRUNA, P.M. 1969. Revision de la literatura acerca del borer de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* (F.). *Acad. Cienc. Cuba Sen. Biol.*, nº 5. 73 p.

- RADELEFF, R.O.; R.C. BUSHLAND e D.E. HOPKINS. 1952. Phosphorus-32 labeling of the screw-worm fly. *J. Econ. Ent.*, 45: 509-514.
- ROTHSCHILD, G.H.L. 1966. A study of a natural population of *Conomelus anceps* (Germar) (Homoptera, Delphacidae) including observations on predation using the precipitin test. *Journ. Anim. Ecol.*, 35(3): 413-434.
- SCHMIDT, C.H. e SMITH, C.N. 1963. *The role of rad-onuclides in insect behavior studies*. In V. Schultz and A.W. Klement, Jr. (eds.). Radioecology. Reinhold. New York. p. 441-443.
- SGRILLO, R.B. 1977. Desenvolvimento de modelo matemático para população da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) e simulação da técnica do indivíduo estéril. Piracicaba, ESALQ/USP. 189 p (Tese de Doutorado).
- SGRILLO, R.B. 1980. Informação pessoal.
- SGRILLO, R.B.; WIENDL, F.M. e ARTHUR, V. 1977. Marcação da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis* F.) através da introdução de fósforo radioativo em colmos de cana-de-açúcar. *Ciência e Cultura*, 29(7).
- SGRILLO, R.B.; WIENDL, F.M.; COLLETTE, G. e ARTHUR, V. 1975. Marcação da broca de cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*

- (Fabr.) por meio de fósforo radioativo. *Revista de Agricultura*. Piracicaba, 50. 8 p.
- SHURE, D.J. 1970. Limitations in radiotracer determination of consumer trophic positions." *Ecology*, 51(5): 899-901.
- SHURE, D.J. 1973. Radionuclide tracer analysis of trophic relationships in an old field ecosystem. *Ecol. Monogr.*, 43: 1-19.
- TEERAN, F.O. 1978. Controle natural de ovos de *Diatraea saccharalis* em canaviais do Estado de São Paulo, Brasil. In: *V Congresso Brasileiro de Entomologia*.
- TITOVA, E.V. 1970. Use of the precipitin test in a study of interrelationship between *Eurygaster integriceps* Put (Hemiptera: Scutelleridae) and predatory arthropods. *Entomological Review*, 49(2): 155-162.
- WALDER, J.M.M.; ARTHUR, V.; WIENDL, F.M. e SGRILLO, R.B. 1975. Marcação de adultos da *Diatraea saccharalis* (F.) pela alimentação das lagartas em dieta marcada com radioisótopo (^{59}Fe). *Ciência e Cultura*, 27(7): 402.
- WALDER, J.M.M.; R.B. SGRILLO; F.M. WIENDL; W.H. LONG; V.L. TORNISTELO; V. ARTHUR e J.C. PERUCA. 1977. Estudo da população da *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) em quatro regiões

canavieiras do Estado de São Paulo, durante o ano de 1975.
Ciência e Cultura, 29(7): 476.

WEST, A.S. 1950. The precipitin test as an entomological
tool *Canadian Ent.*, 82(12): 241-244.

YATES, W.W.; C.M.G. JULLIN; A.W. LINDQUIST e J.S. BUTTS. 1951.
Treatment of mosquito larvae and adults with radioactiv
phosphorus. *J. Econ. Ent.*, 44: 34-37.