



Bragantia

ISSN: 0006-8705

editor@iac.sp.gov.br

Instituto Agronômico de Campinas

Brasil

Leite Torres, Adalci; Leal Boiça, Arlindo; Manfrè Medeiros, Cesar Augusto; Barros, Reginaldo
Efeito de extractos aquosos de Azadirachta indica, Melia azedarach e Aspidosperma pyrifolium no
desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*

Bragantia, vol. 65, núm. 3, 2006, pp. 447-457

Instituto Agronômico de Campinas
Campinas, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90865311>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

FITOSSANIDADE

FEITO DE EXTRATOS AQUOSOS DE AZADIRACHTA INDICA, MELIA AZEDARACH E ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM NO DESENVOLVIMENTO E OVIPOSIÇÃO DE PLUTELLA XYLOSTELLA ⁽¹⁾

ADALCI LEITE TORRES ⁽²⁾; ARLINDO LEAL BOIÇA JÚNIOR ^(2*);
CESAR AUGUSTO MANFRÉ MEDEIROS ⁽²⁾; REGINALDO BARROS ⁽³⁾

RESUMO

Foram avaliados a CL₅₀ e o efeito de extratos aquosos de plantas na biologia, oviposição e período embrionário de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). Para determinação da CL₅₀ foram utilizadas concentrações entre 0,03 e 0,8 % para amêndoas de *Azadirachta indica* (A. Juss.) 0,5 e 7,0 % para casca de *Aspidosperma pyrifolium* (Mart.) e 0,5 e 12,5 % para frutos de *Melia azedarach* (L.), obtendo-se as CL₅₀ de 0,06; 2,17 e 2,90%, respectivamente. Verificou-se que os extratos aquosos de todas as espécies vegetais afetaram o desenvolvimento do inseto, principalmente na fase larval. Na fase de pupa, os extratos reduziram a massa e a viabilidade. Houve deformação de adultos para os extratos de *A. pyrifolium* e *M. azedarach* e o de *A. indica* causou maior porcentagem. Todos os extratos possuem efeito tóxico para ovos de *P. xylostella*, sendo dependente do aumento da concentração. Nos extratos da casca de *A. pyrifolium*, do fruto de *M. azedarach* e da amêndoa de *A. indica* observa-se ação ovicida quando usados na concentração letal de lagartas de primeiro instar da praga. Em observações do ovo de *P. xylostella* com auxílio de um microscópio eletrônico de varredura, verificou-se a existência de microporos onde pode ocorrer a penetração do produto ovicida, além da constatação da textura rugosa da casca do ovo que pode reter ou fixar os extratos.

Palavras-chave: plantas inseticidas, traça-das-crucíferas, brássicas.

ABSTRACT

EFFECT OF AQUEOUS EXTRACTS OF AZADIRACHTA INDICA (A. JUSS), MELIA AZEDARACH (L.) AND ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM (MART.) ON THE DEVELOPMENT AND OVIPOSITION OF PLUTELLA XYLOSTELLA (L.) (LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE)

The effects of aqueous extracts of plants on the biology, preference for oviposition and embryonic period of *Plutella xylostella* were evaluated. Concentrations between 0.03 and 0.8 % for kernel of *Azadirachta indica*, 0.5 and 7.0% for peel of *Aspidosperma pyrifolium* and 0.5 and 12.5% for fruits of *Melia azedarach* were used, with LC₅₀ values of 0.06; 2.17 and 2.90%, respectively, being obtained. It was verified that the aqueous extracts of all of the appraised vegetable species affected the development of the insect, mainly in the larval phase. In the pupae phase, the extracts reduced the weight and the viability. There was adults' deformation for the extracts of *A. pyrifolium* and *M. azedarach*, being it of *A. indica* what caused larger percentage. Toxics effects on the eggs of *P. xylostella* were observed for all extracts. The extracts from *A. pyrifolium* (peel); *M. azedarach* (fruit) and *A. indica* (kernel) presented ovicide action in the lethal concentration of caterpillars at first instar of the pest. Observations of *P. xylostella* eggs with the aid of an electronic microscope showed presence of microspore, revealing ovicide action, besides wrinkled texture of the eggs peel retaining the extracts.

Key words: Insecticide plants, diamondback moth, cruciferae.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 9 de novembro de 2005 e aceito em 16 de maio de 2006.

⁽²⁾ Departamento de Fitossanidade, FCAV/UNESP. Via de Acesso Prof. Paulo D. Castellane, km 5, 14884-900 Jaboticabal (SP). E-mail: aboicajr@fcav.unesp.br. *Autor correspondente.

⁽³⁾ Departamento de Agronomia/Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife (PE). E-mail: rbarros@ufrpe.br

1. INTRODUÇÃO

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), uma das principais pragas do repolho e da couve no Brasil e no Mundo (CHEN et al., 1996; CASTELO BRANCO e GUIMARÃES, 1990), pode causar grandes prejuízos a cultura. Em alguns casos, quando não é adotada medidas de controle, podem ocorrer perdas de até 100% na produção (BARROS et al., 1993).

Devido ao curto período de desenvolvimento, à alta fecundidade e ao crescimento rápido da população em condições de ausência de precipitação pluvial e temperaturas ao redor de 25 a 28 °C, a principal forma de controle da traça-das-crucíferas tem sido uso de inseticidas. Muitas vezes, são realizadas aplicações sucessivas de produto, o que pode proporcionar a seleção de populações resistentes. Além do mais, são aplicadas misturas de inseticidas, indesejável por motivos econômicos, agressão ao ambiente, impacto aos inimigos naturais e ameaça à saúde do homem e animais (LIU et al., 1981; CHEN et al., 1996). Portanto, devem ser observadas táticas seguras para o ambiente, que mantenham o controle de *P. xylostella* e possam reduzir o uso de inseticidas convencionais.

As plantas inseticidas, a exemplo do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), têm sido muito estudadas em todo o mundo. De acordo com SHIN-FOON e YU-TONG (1993), as plantas inseticidas são fontes de substâncias bioativas, compatíveis com programas de manejo integrado de pragas (MIP) para controle de insetos. Pode ser um forte aliado a outros métodos de controle dos insetos, mantendo o equilíbrio ambiental, nem deixar resíduos químicos, sem ação tóxica aos animais e ao homem.

Com base nos resultados oriundos de pesquisas com *A. Indica*, constatou-se que as plantas inseticidas são capazes de provocar inibição alimentar nos insetos, redução da motilidade intestinal, interferência na síntese do ecdisônio, inibição da biossíntese da quitina, deformações em pupas e adultos, redução na fecundidade, longevidade, esterilização, inibição na oviposição e mortalidade de formas imaturas e adultos (MORDUE e BACKWELL, 1993; SCHMUTTERER, 1988).

BOIÇA JUNIOR et al. (2005), avaliando o efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *P. xylostella*, com aplicação dos extratos na concentração de 10% sobre discos de folha de couve, concluíram que os extratos de *Sapindus saponaria* L. (frutos), *Trichilia pallida* SW (ramos), *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong (frutos) e *Nicotiana tabacum* L. (folhas), proporcionaram 100% de mortalidade das larvas dessa praga e a causada pelo

extrato dos frutos de *S. saponaria* foi superior ao das folhas, com valores de 100,0% e 62,5% respectivamente.

Estudando o efeito de diversos extratos aquosos em relação à preferência para oviposição de *P. xylostella* em discos de folhas de couve, MEDEIROS et al. (2005) constataram que os extratos proporcionaram efeito deterrente na oviposição da praga, com destaque para os extratos de frutos de *S. saponaria*, de frutos de *E. contortisiliquum* e folhas de *T. pallida*, com índice de 100% de deterrência.

De acordo com CHEN et al. (1996), a oviposição de *P. xylostella* foi reduzida pelo extrato aquoso de frutos de *Melia azedarach* (L.) em 49,6; 86,6 e 93,5% em testes com chance de escolha e, em 46,2; 72,1 e 80,2% em teste sem chance de escolha, respectivamente nas, concentrações 0,5; 2 e 4%, tornando evidente que essa redução é proporcional à concentração das substâncias bioativas utilizadas.

Efeitos de extratos de plantas na sobrevivência da fase embrionária de lepidópteros pragas são poucos conhecidos e pode ser devido, segundo SCHMUTTERER (1987), ao baixo ou a nenhum efeito sobre ovos de insetos, mesmo em altas concentrações. Essa pequena eficiência pode decorrente da existência de uma camada lipídica ou cerosa na parte interna do córion, envolvendo a membrana vitelina a qual teria a capacidade de reter as substâncias tóxicas dos extratos impedindo-as de alcançar o embrião (SMITH e SALKELD, 1966; BEAMENT e LAL, 1957). Esses autores mencionaram que esse efeito ovicida pode variar de acordo com a espécie de inseto e com as características das substâncias utilizadas, podendo-se admitir, inclusive, que essa ação ovicida tem certa especificidade para determinadas ordens de insetos.

THOMAZINI (1999) constatou que o efeito de extratos de folha e ramo de *T. pallida* 5% em ovos de *Tuta absoluta* (Meyrick) não resultou efeito ovicida. Por outro lado, COUDRIET et al. (1985) verificaram que ovos de *Bemisia tabaci* (Gennadius), pulverizados com extrato aquoso de semente de *A. indica* na concentração 2%, tiveram a sua viabilidade reduzida em 29%. SOUZA e VENDRAMIM (2000) também constataram efeito ovicida de extratos aquosos de *T. pallida* (ramos) 2% e de *M. azedarach* (folhas) 2% sobre *Bemisia argentifolii* Bellows e Perring, em tomateiro.

Em relação a *P. xylostella*, VERKERK e WRIGHT (1993) mencionam que o AZT (produto formulado extraído de sementes de nim com uma mistura azeotrópica de éter metil tert-butil e metanol, contendo 30 mg azadirachtina . mL⁻¹) a 10, 100 e 1000 mg de azadirachtina . mL⁻¹ ocasionou 11%, 21% e 48% de inviabilidade de ovos da praga respectivamente.

Portanto, tendo em vista a importância que representa o cultivo de brássicas para as regiões produtoras e a escassez de informações sobre métodos alternativos de controle da traça-das-crucíferas, esta pesquisa teve como objetivo determinar os valores de CL₅₀ de extratos aquosos de algumas espécies vegetais em lagartas de *P. xylostella*, bem como avaliar os efeitos desses extratos sobre aspectos biológicos desse inseto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos em condições de laboratório, à temperatura de 25 ± 1 °C, UR de 70 ± 10% e fotofase de 14 horas.

Visando obter material para criar e desenvolver os experimentos, foram semeadas sementes de couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, 'Portuguesa', em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax®, em casa de vegetação, e após 35 dias, transplantadas para canteiro definitivo na área experimental. As irrigações por aspersão foram realizadas sempre que necessárias. Foram adotados os tratos culturais para a cultura recomendados por CAMARGO (1992).

Criação-estoque. Para criação de *P. xylostella*, os insetos foram mantidos e multiplicados em laboratório. Lagartas recém-eclodidas foram confinadas em recipientes plásticos com dimensões 15 x 10 x 5 cm, alimentadas com folhas de plantas de couve portuguesa, previamente lavadas em água corrente, visando obter número suficiente de insetos para os experimentos.

As folhas foram trocadas diariamente até que todos os insetos atingissem a fase de pupa. Essas foram coletadas diariamente e colocadas em tubos de vidro de fundo chato, medindo 1 cm de diâmetro, fechados com filme plástico transparente PVC com pequenos orifícios para circulação do ar. Após a emergência, os adultos foram coletados diariamente com auxílio de um sugador. Foi feita a sexagem e formados casais, que foram confinados em gaiolas plásticas transparentes circulares com uma abertura retangular vedada lateralmente com malha fina de "nylon" para possibilitar a circulação do ar. A parte superior da gaiola continha um orifício circular onde foi colocada uma esponja embebida com uma solução de mel a 10%, presa com uma rolha de pano tamponando o orifício. Dentro dessas gaiolas, foram colocados discos de folha de couve medindo 8 cm de diâmetro sobre papel-filtro em um copo plástico contendo uma esponja umedecida com água destilada

em sua abertura, para permitir a oviposição. Os discos foram substituídos diariamente e aqueles com as posturas, acondicionados em placa de Petri até a eclosão das larvas, mantendo-se então, os procedimentos já descritos.

Obtenção do material vegetal. Amêndoas de 'nim' (*A. indica*) e frutos de 'cinamomo' (*M. azedarach*) foram obtidas no Campus da UNESP Jaboticabal-SP, enquanto a casca de 'pereiro', *Aspidosperma pyrifolium* (Mart.) foi obtida na Fazenda Riacho da Porta, em Belém de São Francisco (PE). O material foi mantido em estufa à temperatura de 40 °C por 48 horas para secagem e posteriormente, moído em moinho de faca com peneira de 0,8 mm, obtendo-se pó, com granulação uniforme, e acondicionado em recipientes plásticos para posterior preparação dos extratos.

Preparação e aplicação dos extratos aquosos. As concentrações dos extratos aquosos foram determinadas pela razão massa/volume (m/v), misturando o pó do material vegetal em gramas em 100 mL de água destilada cada um, ficando em repouso por 24 horas. Findo esse período, foram feitas filtragens com pano de malha fina para obtenção dos extratos. Após sua preparação, discos com aproximadamente 8 cm de diâmetro de folhas de plantas de couve foram imersos em cada extrato por 30 segundos e postos para secagem sobre papel-toalha ao ar livre. O mesmo foi feito em água destilada para o tratamento testemunha. Após a secagem, os discos tratados foram transferidos para placa de Petri contendo papel-filtro levemente umedecido com água destilada.

Determinação e efeito da CL₅₀ de extratos vegetais aquosos na biologia de *P. xylostella*. Para determinar a CL₅₀, inicialmente foram realizados testes preliminares para definir as concentrações limites superior e inferior, ou seja, uma concentração que causasse mortalidade de 95% a 100% das larvas e uma segunda que causasse mortalidade próxima à verificada na testemunha (BLISS, 1934). Após a determinação dos limites, foram misturados 7; 5; 4; 3; 2; 1 e 0,5 g de pó de casca de *A. pyrifolium*, 12,5; 10; 7,5; 5; 2,5; 1 e 0,5 de pó de *M. azedarach* e 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,03 g de pó de amêndoa de *A. indica* em 100 mL de água destilada cada, ficando em repouso por 24 horas, obtendo-se as concentrações (peso/volume). Após a preparação e aplicação dos extratos aquosos, foram confinadas doze lagartas recém-eclodidas em cada tratamento, em cada repetição, sendo os discos de folha trocados diariamente a partir do quarto dia de confinamento. As placas de Petri foram vedadas com filme PVC para evitar fuga das lagartas.

Determinada a CL₅₀ dos extratos, foram feitas aplicações das respectivas doses de cada espécie vegetal seguindo procedimento semelhante. Quando as larvas se transformavam em pupas, eram coletadas diariamente e individualizadas em ‘células’ de placa de teste ELISA, observando-se diariamente a emergência dos adultos. Em seguida, foi confinado um casal por gaiola em um total de cinco repetições por tratamento, contendo em seu interior discos de folhas de couve para a obtenção dos ovos. Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: duração da fase larval, massa de pupa com 24 horas, duração e viabilidade pupal, razão sexual, longevidade de adultos, número de ovos por fêmea, período de incubação e viabilidade de ovos.

Efeito dos extratos na fase embrionária de *P. xylostella*. Quatro casais da traça-das-crucíferas com até 12 h de idade foram selecionados para a oviposição e colocados em gaiolas plásticas idênticas àquelas da criação. Após 12 horas de exposição, os discos foram retirados das gaiolas e cuidadosamente recortados, de modo que cada parte da folha de couve contivesse 20 ovos da praga. Em seguida, os ovos foram imersos nos extratos nas concentrações letal e subletal (CL₅₀) de cada espécie vegetal, e na testemunha em água destilada. Cada tratamento, portanto, era composto por cinco repetições, tendo cada uma 20 ovos da praga.

A duração e a viabilidade da fase embrionária foram os parâmetros biológicos usados na avaliação do efeito ovicida dos extratos. Diariamente contou-se o número de lagartas eclodidas, sendo confrontado com o número de ovos em que se observaram o córion transparente, indicativo de ter ocorrido a eclosão. Avaliou-se também o número de ovos inviáveis, correspondente aqueles com embriões formados, mas sem eclosão das lagartas. Essas avaliações ocorreram durante oito dias e eram realizadas com o auxílio de um estereoscópico.

Para análises microscópicas do ovo foram feitos herbários de discos de folhas de couve, com 8 cm de diâmetro, secos em estufa a 48 °C por um período de 48 horas. Em seguida os discos foram colocados em gaiolas plásticas com procedimento semelhante ao da criação, exceto ao umedecimento do disco de papel-filtro que foi colocado seco. Foram adicionados 10 casais de adultos de *P. xylostella* que ficaram expostos para oviposição nos discos por um período de 24 horas.

Para a observação dos ovos de *P. xylostella*, os discos contendo-os foram processados segundo SANTOS (1996), sendo colocados em frascos de vidro contendo algodão umedecido com formaldeído a 10% por 24 horas. Após esta etapa, os espécimes foram montados em cilindros de alumínio, metalizados com

uma camada de ouro-paládio (JEOL JFC1100) e observados no microscópio eletrônico de varredura (MEV), marca JEOL, modelo JSM5410, utilizando-se para a elétron-micrografia o filme ILFORD FP4 (ISSO 125/22°).

Efeito dos extratos na oviposição de *P. xylostella*. Discos de folhas de couve ‘Portuguesa’ com 8 cm de diâmetro foram imersos nos extratos nas concentrações letal e subletal (CL₅₀) por 30 segundos e postos sobre papel-toalha para secagem ao ar livre; em seguida, divididos em partes, obtendo-se quatro triângulos com dimensões semelhantes. Discos retirados das mesmas folhas de couve foram imersos em água destilada e usados como padrão nos testes de repelência. Assim, formou-se um conjunto, constituído por quatro triângulos dispostos alternadamente sobre papel-filtro levemente umedecido com água destilada, sendo dois tratados com os extratos e outros dois tratados com água destilada. Esse conjunto foi colocado em gaiolas idênticas às utilizadas na criação de *P. xylostella*.

Quatro casais de *P. xylostella* com até 12 horas de idade, provenientes da criação, foram introduzidos nas gaiolas e mantidos por 24 horas para oviposição sendo alimentados com solução de mel a 10%, embebida em esponja presa na parte superior da gaiola.

Paralelamente, para cada extrato, usaram-se cinco gaiolas, similares às descritas anteriormente, as quais diferiram apenas por conterem discos imersos em água destilada. Esse procedimento foi adotado como forma de observar a uniformidade de postura de *P. xylostella*.

O efeito repelente dos extratos foi avaliado através da fórmula: PR = (NC - NT)/(NC + NT) x 100, adaptada de OBENG-OFORI (1995), sendo PR, a porcentagem média de repelência; NC, o número de ovos no tratamento com água destilada e NT, o número de ovos em cada tratamento com extrato, e foi atribuída a seguinte classificação: Repelente: PR > 0; Não-repelente: PR < 0.

Análise estatística. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado com oito tratamentos e cinco repetições para determinação da CL₅₀ de cada espécie vegetal. Para o efeito da CL₅₀ na biologia de *P. xylostella* foram utilizados cinco tratamentos e cinco repetições.

Para estimar o efeito da concentração letal e da subletal (CL₅₀) no período embrionário e na oviposição de *P. xylostella*, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3 (três espécies vegetais, três concentrações: letal, CL₅₀ e testemunha) e cinco repetições.

A comparação entre as médias dos tratamentos foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o pacote computacional SANEST (Versão 3.0). A estimativa da CL₅₀ foi feita através do método Probit para cada extrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da CL₅₀ para primeiro ínstare de *P. xylostella*. As concentrações letais dos extratos aquosos de plantas foram diferentes entre as três plantas estudadas (Figuras 1, 2 e 3). A concentração letal do extrato aquoso de *A. indica* para lagartas de primeiro ínstare de *P. xylostella* foi de 0,6% (m/v)

(Figura 1), cujas lagartas atingiram 100% de mortalidade após dez dias do confinamento; na concentração letal de 0,8%, observou-se a mortalidade total de lagartas no sexto dia após confinamento, tendo 90% das lagartas morto nos quatro primeiros dias. A CL₅₀ estimada para lagartas de primeiro ínstare foi de 0,06% ($y = 9,91 + 3,97 \log x$). Estudos da CL₅₀ de extratos aquosos de *A. indica* para *P. xylostella* foram também realizados por SOMBATSIRI et al. (1986), que obtiveram concentrações letais de 0,84% e 8,6%, para o segundo e quarto ínstares larvais respectivamente. Esses valores foram maiores que os obtidos na presente pesquisa possivelmente devido a esses autores usarem lagartas maiores, necessitando, consequentemente de mais produtos para atingir a CL₅₀.

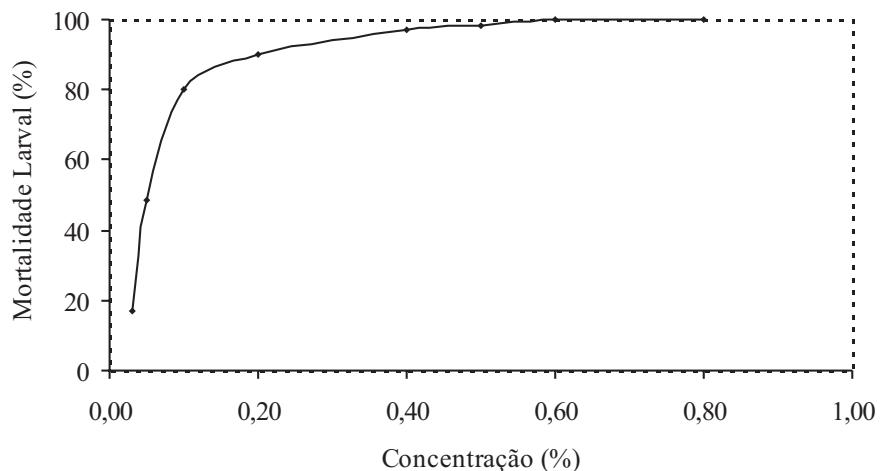


Figura 1. Mortalidade de lagartas de *Plutella xylostella* submetidas a diferentes concentrações de extratos aquosos de amêndoas de *Azadirachta indica*.

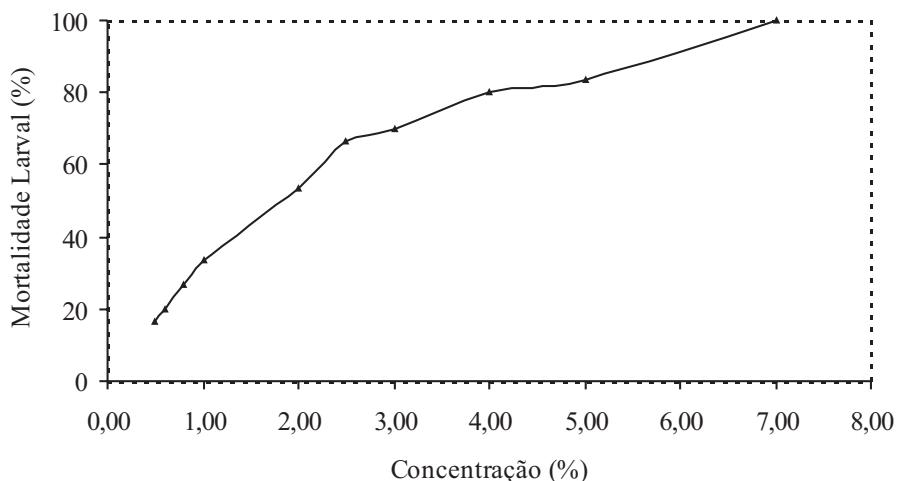


Figura 2. Mortalidade de lagartas de *Plutella xylostella* submetidas a diferentes concentrações de extratos aquosos de casca de *Aspidosperma pyrifolium*.

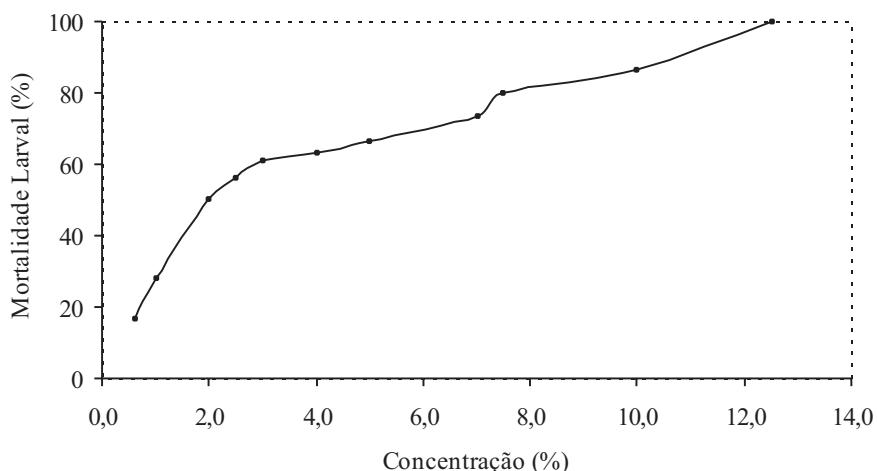


Figura 3. Mortalidade de lagartas de *Plutella xylostella* submetidas a diferentes concentrações de extratos aquosos de frutos de *Melia azedarach*.

Para *A. pyrifolium*, a concentração letal foi de 7% (m/v), havendo mortalidade de 100% das lagartas nos três primeiros dias após confinamento (Figura 2). A CL₅₀ estimada foi de 2,17% ($y = 4,10 + 2,65 \log x$) com mortalidade de 40% das lagartas nos três primeiros dias após o confinamento, o que permite afirmar que o efeito de *A. pyrifolium* é mais inseticida do que insetistático, efeito observado em *A. indica*. O efeito insetistático com o uso de *A. indica* foi sugerido pelo fato de ter ocorrido prolongamento da duração larval, quando comparado ao uso do extrato de *A. pyrifolium* e pelo fato de muitas lagartas terem morrido durante a ecdise, não conseguindo liberar totalmente a exúvia, enquanto outros insetos morreram na fase de pré-pupa e pupa. Não foram observadas lagartas mortas com dificuldade de liberação das exúvias para *A. pyrifolium* que, no entanto, morriam escurecidas.

A concentração dos extratos de *M. azedarach* que causou mortalidade de 100% das lagartas de primeiro ínstar de *P. xylostella* foi de 12,5% (m/v). A CL₅₀ foi de 2,90% ($y = 4,01 + 2,13 \log x$) (Figura 3).

Efeito da CL₅₀ de extratos vegetais aquosos na biologia de *P. xylostella*. Os extratos aquosos prolongaram a duração da fase larval de *P. xylostella*. No entanto, diferença significativa foi observada apenas no tratamento com o extrato aquoso de *A. indica* (Figura 4). TORRES et al. (2001), selecionando plantas com propriedades inseticidas e insetistáticas a *P. xylostella* por extratos aquosos a 10%, relataram que, nessa concentração, houve alongamento da fase larval em 3,5 dias para o extrato de *M. azedarach*, enquanto os extratos de *A. indica* e *A. pyrifolium*, nessa mesma concentração, não permitiram que as lagartas atingissem a fase de pupa. Ressalta-se que esse alongamento pode ser atribuído a um crescimento mais lento das lagartas, devido à presença de

inibidores de crescimento, deterrentes de alimentação ou substâncias tóxicas existentes nesses extratos. Este efeito de alongamento da fase larval, resultante da ingestão de *M. azedarach*, também foi observado em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (RODRIGUEZ e VENDRAMIM, 1997).

Em relação à fase pupal, os extratos aquosos influenciaram na massa de pupas havendo diferença dos tratamentos *A. indica* e *A. pyrifolium*, quando comparados ao tratamento testemunha, ficando *M. azedarach* como intermediário. A ação dos extratos não interferiu na duração dessa fase, bem como não houve efeito na viabilidade pupal (Tabela 1).

Embora não tenha havido influência dos extratos na duração da fase de pupa de *P. xylostella*, é importante salientar que o atraso ou a completa inibição dessa fase têm sido observados em outras espécies de insetos tratadas com extratos de *A. indica* ou seus derivados e metabólitos, bem como de outras melíaceas, a exemplo do ocorrido em *S. frugiperda* (RODRIGUEZ e VENDRAMIM, 1997) e *S. exempta* (TANZUBIL e MCCAFFERRY, 1990). Essa discrepância pode ser decorrente da aplicação dos extratos ter sido feita apenas no primeiro ínstar larval (CL₅₀ para primeiro ínstar) e, consequentemente ter havido tempo suficiente para a degradação das substâncias tóxicas dos extratos até a pupação.

De acordo com os dados, houve correlação negativa entre os parâmetros duração larval versus massa de pupa ($r = -0,73^*$, $P \leq 0,05$), duração larval versus viabilidade pupal ($r = -0,62^*$, $P \leq 0,05$) e correlação positiva entre a massa de pupa e viabilidade pupal ($r = 0,68^*$, $P \leq 0,05$), ou seja, a viabilidade aumentou quando a massa de pupa foi maior, explicando biologicamente a ação insetística dessas espécies vegetais.

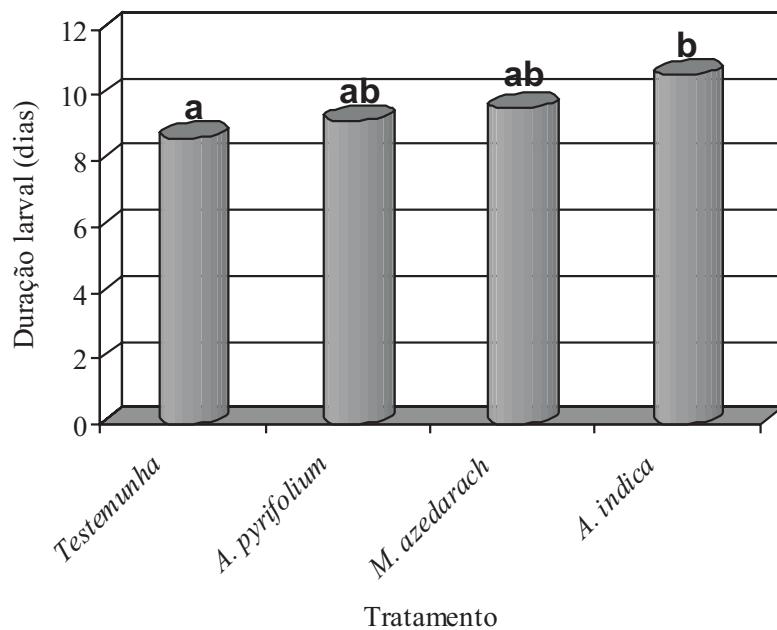


Figura 4. Duração da fase larval de *Plutella xylostella* alimentadas com folha de couve tratadas com extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium*, *Melia azedarach* e *Azadirachta indica*.

Tabela 1. Médias (\pm EP) da massa, duração e viabilidade de pupa de *P. xylostella* alimentadas com folha de couve tratadas com extratos aquosos de *A. pyrifolium*, *M. azedarach* e *A. indica*. T: 25 ± 1 °C, UR: $70 \pm 10\%$, fotofase: 14 horas

Tratamento*	Massa de pupa mg	Duração pupal dias	Viabilidade pupal %
Testemunha	$5,0 \pm 0,46$ a	$4,3 \pm 0,12$ a	$88,7 \pm 5,59$ a
<i>M. azedarach</i>	$4,9 \pm 0,27$ ab	$4,3 \pm 0,07$ a	$82,0 \pm 16,21$ a
<i>A. pyrifolium</i>	$4,3 \pm 0,24$ b	$4,4 \pm 0,07$ a	$88,6 \pm 14,97$ a
<i>A. indica</i>	$4,2 \pm 0,24$ b	$4,4 \pm 0,07$ a	$69,3 \pm 19,64$ a
C.V. (%)	7,86	2,24	21,64

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Médias (\pm EP) do número de ovos por fêmea, viabilidade e período de incubação de ovos de *P. xylostella* alimentadas com folhas de couve tratadas com extratos aquosos de *A. pyrifolium*, *M. azedarach* e *A. indica*. T: 25 ± 1 °C, UR: $70 \pm 10\%$, fotofase: 14 horas

Tratamento*	Ovos/Fêmea nº	Viabilidade de Ovos %	Período de Incubação dias
Testemunha	$125,7 \pm 20,38$ a	$90,4 \pm 8,11$ a	$3,3 \pm 0,44$ a
<i>M. azedarach</i>	$125,0 \pm 18,70$ a	$86,8 \pm 22,75$ a	$3,3 \pm 0,04$ a
<i>A. pyrifolium</i>	$118,3 \pm 9,49$ a	$85,8 \pm 16,33$ a	$3,2 \pm 0,23$ a
<i>A. indica</i>	$122,0 \pm 6,82$ a	$74,8 \pm 22,75$ a	$3,3 \pm 0,38$ a
C.V. (%)	26,71	15,78	8,45

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Os extratos aquosos não influenciaram a fertilidade, a viabilidade e o período de incubação de ovos de *P. xylostella* (Tabela 2). Segundo SCHMUTTERER (1990), vários produtos de *A. indica* exercem, dependendo da dose, influência na fecundidade das fêmeas, a qual é reduzida pela absorção do princípio ativo pelas lagartas, o que não ocorreu na presente pesquisa.

Os extratos não afetaram a razão sexual e a longevidade de adultos de *P. xylostella*, tanto para fêmeas quanto para machos (Tabela 3). De acordo com SCHMUTTERER (1990), de modo geral, os adultos não morrem pela ação dos derivados de *A. indica*; entretanto, essas substâncias podem acarretar redução significativa da fecundidade ou total esterilização depois de aplicações de altas doses, principalmente nas gerações seguintes. A porcentagem de adultos deformados foi maior para o extrato de *A. indica* com percentual de 30,5%,

diferindo da constatada na testemunha, ficando o extrato de *A. pyrifolium* e *M. azedarach* como intermediários, com 20,8% e 18,3% de adultos deformados, respectivamente. Efeito semelhante foi registrado por TRINDADE (2000) ao estudar extratos metanólicos de amêndoas de *A. indica* sobre *T. absoluta*. VERKERK e WRIGHT (1993) afirmaram que doses baixas de derivados de *A. indica* ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de azadirachtina) causam deformações morfogenéticas em *P. xylostella*.

Ocorreu redução da massa de pupa com o uso dos extratos de *A. indica* e *A. pyrifolium*; o primeiro reduziu a viabilidade dessa fase em aproximadamente 20% em relação à testemunha. Essa alteração do ciclo biológico é de grande importância, pois os extratos afetam a fase de maior importância dessa praga, a fase larval, podendo reduzir os danos na cultura, diminuir o número de gerações e expor por mais tempo à ação dos inimigos naturais.

Tabela 3. Médias (\pm EP) da razão sexual, longevidade e deformação de adultos de *P. xylostella* oriundos de lagartas alimentadas com folhas de couve tratadas com extratos aquosos de *A. pyrifolium*, *M. azedarach* e *A. indica*. T: $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR: $70 \pm 10\%$, fotofase: 14 horas

Tratamento	Razão Sexual	Longevidade		Adultos Deformados
		Fêmeas	Machos	
		dias		%
Testemunha	$0,5 \pm 0,08$ a	$11,0 \pm 3,31$ a	$10,4 \pm 2,02$ a	$12,7 \pm 3,11$ a
<i>M. azedarach</i>	$0,5 \pm 0,05$ a	$12,0 \pm 2,81$ a	$12,0 \pm 2,77$ a	$18,3 \pm 3,27$ ab
<i>A. pyrifolium</i>	$0,4 \pm 0,11$ a	$12,0 \pm 2,60$ a	$9,2 \pm 2,09$ a	$20,8 \pm 8,17$ ab
<i>A. indica</i>	$0,5 \pm 0,11$ a	$10,6 \pm 2,60$ a	$7,8 \pm 2,09$ a	$30,5 \pm 5,44$ b
C.V. (%)	35,20	23,15	24,45	19,71

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Dessa forma, pela eficiência demonstrada, o uso desses extratos pode ser interessante, principalmente quando associado a outros métodos em programas de manejo integrado da traça-das-crucíferas.

Efeito dos extratos na fase embrionária. Na média de mortalidade da fase embrionária de *P. xylostella*, para cada extrato na concentração letal de larvas de primeiro instar, constata-se que o extrato aquoso da casca de amêndoas de *A. pyrifolium* proporcionou mortalidade superior ao extrato de frutos de *M. azedarach*, o qual por sua vez foi maior que o extrato da amêndoas de *A. indica* (Tabela 4). Para as concentrações subletais (CL_{50}), *A. pyrifolium* proporcionou mortalidade dos ovos superior aos dos extratos de *M. azedarach* e de *A. indica*, que não diferiram entre si.

A mortalidade da fase embrionária pelos extratos foi diretamente correlacionada ($r = 0,88^*$; $P < 0,05$) com as concentrações dos extratos, independentemente da espécie vegetal utilizada, demonstrando que a ação ovicida se acentua com a quantidade de substâncias bioativas extraídas. BOFF e ALMEIDA (1996) também verificaram que o efeito tóxico de extrato metanólico e acetônico de *Piper nigrum* L. (pimenta-do-reino) em ovos de *Sitotroga cerealella* (Oliver) cresceu em decorrência da concentração.

Verificou-se que a inviabilidade de ovos de *P. xylostella* foi ocasionada após o início da formação do embrião, visto que para todos os extratos em todas as concentrações houve correlação positiva ($r = 0,82^*$; $P < 0,05$) entre a porcentagem de ovos inviáveis e a percentagem de

ovos que tiveram os embriões formados, porém inviáveis. Outros fatores contribuíram para a inviabilidade dos ovos da praga, pois um pequeno porcentual de ovos foi inviável sem ter o embrião formado, significando que a mortalidade ocorreu antes do início da embriogênese, como observado principalmente para o extrato de *A. indica* na concentração letal (26,5%) (Tabela 4).

Através de observações microscópicas, verificaram-se microporos com 0,8 µm, responsáveis pelas trocas gasosas do embrião, o que pode explicar a ação ovicida dos extratos e da morte dos embriões impedindo sua eclosão. Os orifícios foram encontrados em número de três, localizados em uma das extremidades do ovo de *P. xylostella*. Pode-se observar ainda que o córion possui uma textura rugosa, podendo ser favorável à fixação ou retenção dos

extratos vegetais, o que mantém os extratos mais aderidos à superfície do ovo.

Segundo BEAMENT e LAL (1957) e SMITH e SALKELD (1966), o baixo efeito ovicida de determinados extratos de plantas pode ser devido à existência de uma camada lipídica ou cerosa na parte interna do córion, envolvendo a membrana vitelina de lepidópteros. Essa camada teria a capacidade de reter as substâncias tóxicas e desse modo impedi-las de alcançar o embrião. Portanto, como a maioria dos ovos inviáveis já estava com embrião parcial ou completamente formado, é possível atribuir esse fato a essa camada. A ação dos compostos, com ação ovicida, existentes nos extratos das plantas devem ter agido com mais intensidade próximo à eclosão da lagarta, quando essa camada é dissolvida (BEAMENT e LAL, 1957).

Tabela 4. Médias (\pm EP) da porcentagem de ovos com embriões mortos de *P. xylostella* quando submetidos às concentrações letal e subletal (CL_{50}) para lagartas de primeiro instar dos extratos aquosos de *M. azedarach*, *A. pyrifolium* e *A. indica*. T: 25 ± 1 °C, UR: 70 ± 10%, fotofase: 14 horas

Tratamento	Concentrações			Média
	Letal	CL_{50}	Testemunha	
	%			
<i>A. pyrifolium</i>	46,7 ± 3,73 aA	31,2 ± 1,72 aB	3,2 ± 1,10 aC	27,0 a
<i>M. azedarach</i>	37,9 ± 0,86 bA	15,9 ± 2,07 bB	3,0 ± 1,01 aC	18,7 b
<i>A. indica</i>	26,5 ± 1,70 cA	12,4 ± 0,67 bB	2,2 ± 1,31 aC	13,9 c
Média	37,04 A	19,84 B	2,82 C	-
C.V. (%)	-	18,08	-	-

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Efeito de Extratos Aquosos de Plantas na Oviposição de *Plutella xylostella*. Pela média de porcentagem de repelência para oviposição da concentração letal determinada para larvas de primeiro instar, verifica-se que o extrato aquoso da casca de *A. pyrifolium* apresentou repelência superior aos extratos de frutos de *M. azedarach*, que por sua vez foi mais repelente que o de amêndoas de *A. indica*. Para as concentrações subletais (CL_{50}), *A. pyrifolium* proporcionou repelência superior à constatada com os extratos de *M. azedarach* e de *A. indica*, que não diferiram entre si (Tabela 5).

A oviposição de *P. xylostella* nos discos de folhas de couve ‘Portuguesa’ imersos em água destilada foi uniforme uma vez que a porcentagem de repelência (PR) foi inferior a 1,8, significando que a quantidade de ovos colocados pelas fêmeas da traças-das-crucíferas foi similar nos triângulos de folhas de couve expostos a oviposição da praga. Desse modo,

os resultados provenientes dos testes realizados nessa pesquisa refletem com precisão o efeito repelente dos extratos na oviposição de *P. xylostella* (Tabela 5).

Apesar da oviposição de diversos lepidópteros ser, segundo GUPTA e THORSTEINSON (1960), geralmente mediada por mecanismos sensoriais, mecano e quimio-receptores, a ação deterrent de extratos vegetais na oviposição de insetos ainda é pouco conhecida, e, os poucos trabalhos mencionando esse fato o fazem superficialmente, a exemplo de COUDRIET et al. (1985), ao relatarem que adultos de *B. tabaci* são mais atraídos para folhas de algodão não tratadas do que para aquelas tratadas com extrato de sementes de *A. indica*. CHEN et al. (1996) reportaram que, em testes com chance de escolha, o número de fêmeas de *P. xylostella* pousadas foi menor em plântulas de brássicas tratadas com os extratos *M. azedarach* em comparação à testemunha, o que pode ter sido responsável pelo menor número de ovos.

Desses resultados, pode-se deduzir que o menor número de ovos colocados por *P. xylostella* nas superfícies tratadas com os extratos avaliados nessa pesquisa (Tabela 5) tenha sido decorrente da ação repelente dos compostos voláteis ou ocasionado pela irritabilidade das fêmeas em contato com as superfícies tratadas por ocasião da oviposição. Nessa última hipótese, reforçada por relato de MORDUE e BLACKWELL (1993), menciona-se que a seleção do substrato para oviposição de lepidópteros é feita através de estímulos sensitivos, sendo os tarsos e a probóscis os principais locais quimiorreceptores.

A oviposição de *P. xylostella* foi negativamente correlacionada ($r = -0,82^*$; $P < 0,05$) com o aumento das concentrações dos extratos aquosos, independentemente da espécie vegetal utilizada, demonstrando que o efeito repelente se acentua com a quantidade de substâncias bioativas extraídas e existentes em cada extrato. Esse processo, no entanto, pode variar de acordo com as espécies de insetos e de plantas envolvidas. COUDRIET et al. (1985)

verificaram que folhas de algodão tratadas com extratos de semente de *A. indica* a 0,2 e 2%, repeliram de modo semelhante a postura de *B. tabaci*. Já CHEN et al. (1996) constataram haver relação direta entre o aumento nas concentrações e a porcentagem de repelência para a oviposição de *P. xylostella* em plântulas de brássicas tratadas com extratos orgânicos de *M. azedarach*

Em resumo, pelos resultados verifica-se que as CL₅₀ para primeiro ínstar de *P. xylostella* foram de 0,06%, 2,17% e 2,90% para *A. indica*, *A. pyrifolium* e *M. azedarach* respectivamente. A duração da fase larval, o número de adultos deformados e a massa de pupas foram afetados pela aplicação de sub-dose de *A. indica*, caracterizando seu efeito inseticida. As concentrações subletais de *A. pyrifolium* proporcionaram mortalidade dos embriões dos ovos e repelência de larvas de primeiro ínstar superior aos extratos de *M. azedarach* e de *A. indica*. Assim, o uso desses três extratos aquosos vegetais pode vir a ser de interesse em programas de manejo integrado de pragas em brássicas.

Tabela 5. Porcentagem de repelência (média ± EP) para oviposição de *P. xylostella* quando submetida às concentrações letal e subletal (CL₅₀) dos extratos aquosos de *M. azedarach*, *A. pyrifolium* e *A. indica*. T: 25 ± 1 °C, UR: 70 ± 10%, fotofase: 14 horas

Tratamento	Concentrações			Média
	Letal	CL ₅₀	Testemunha	
		%		
<i>A. pyrifolium</i>	76,3 ± 4,30 aA	62,7 ± 1,75 aB	1,8 ± 1,14 aC	46,9 a
<i>M. azedarach</i>	45,2 4,95 bA	16,0 ± 1,79 bB	1,6 ± 0,42 aC	20,9 b
<i>A. indica</i>	25,9 ± 2,96 cA	10,4 ± 1,66 bB	1,5 ± 0,15 aC	12,6 c
Média	49,17 A	29,70 B	1,61 C	-
C.V. (%)	-	19,61	-	-

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de doutoramento ao primeiro autor e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de Produtividade em Pesquisa ao segundo autor.

REFERÊNCIAS

BARROS, R.; ALBERTO JÚNIOR, I.B.; OLIVEIRA, A.J.; SOUZA, A.C.F.; LOPES, V. Controle químico da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) em repolho. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v.22, p.463-469, 1993.

BEAMENT, J.W.L.; LAL, R. Penetration through the eggshell of *Pieris brassicae* (L.). *Bulletin Entomology Research*, Oxon, v.48, p.109-125, 1957.

BLISS, C. I. The method of probits. *Science*, Washington, v.79, p.38-39, 1934.

BOFF, M. I. C.; ALMEIDA, A. A. Ação tóxica de pimenta-do-reino, *Piper nigrum*, em ovos de *sitotroga cerealella* (Oliv.) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, Londrina, v.25, p.423-429, 1996.

BOIÇA JUNIOR, A.L.; MEDEIROS, C.A.M.; TORRES, A.L.; CHAGAS FILHO, N.R. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) em couve. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.1, p.45-50, 2005.

CAMARGO, L. S. *As hortaliças e seu cultivo*. São Paulo: Fundação Cargill, 1992. 252p.

- CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A. L. Controle da traça das crucíferas em repolho, 1989. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.10, p.24-25, 1990.
- CHEN, C.; CHANG, S.; CHENG, L.; HOU, R. F. Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep. Yponomeutidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.120, p.165-169, 1996.
- COUDRIET, D. L.; PRABHAKER, N.; MEYERDIRK, D. E. Sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): effects of neem-seed extract on oviposition and immature stages. **Environmental Entomology**, Lanhan, v.14, p.776-779, 1985.
- GUPTA, P. D.; THORSTEINSON, A. F. Food plant relationships of the diamondback moth (*Plutella maculipennis* Curt.). II. Sensory regulation of oviposition of the adult female. **Entomologia Experimentalis Applicata**, Dordrecht, v.3, p.305-314, 1960.
- LIU, M. Y.; TZENG, Y. J.; SUN, C. N. Diamondback moth resistance to several synthetic pyrethroids. **Journal of Economic Entomology**, Lanhan, v.74, p.393-396, 1981.
- MEDEIROS, C.A.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; TORRES, A.L. Efeito de extratos aquosos de plantas na oviposição da traça-das-crucíferas, em couve. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.2, p.227-232, 2005.
- MORDUE, A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal Insect of Physiology**, Exeter, v.39, p.903-924, 1993.
- OBENG-OFORI, D. Plant oils as grain protectants against infestations of *Cryptolestes pusillus* and *Rhyzopertha dominica* in stored grain. **Entomological Experimental Applied**, Dordrecht, v.77, p.133-139, 1995.
- RODRÍGUEZ, H. C.; VENDRAMIM, J. D. Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliáceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.72, p.305-318, 1997.
- SANTOS, J. M. **Microscopia de varredura aplicada às ciências biológicas**. Jaboticabal: Funep, 1996. 56 p.
- SCHMUTTERER, H. Potential of azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. **Journal Insect of Physiology**, Exeter, v.34, p.713-719, 1988.
- SCHMUTTERER, H. Insect growth-disrupting and fecundity-reducing ingredients from the neem and chinaberry trees. In: MORGAN, E.D.; MANDAVA, N.B. **Handbook of Natural Pesticides**: Volume III, Insect Growth Regulators, Part B. Washington: CRC, 1987. p. 119-167.
- SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.35, p.217-297, 1990.
- SHIN-FOON, C; YU-TONG, Q. Experiments on the application of botanical insecticides for the control of diamondback moth in South China. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.116, p.479-486, 1993.
- SMITH, E.H.; SALKELD, E. H. The use and action of ovicides. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.11, p.331-368, 1966.
- SOMBATSIRI, K.; TEMBOONKEAT, K.; SCHMUTTERER, H.; ASCHER, K. R. S. título do trabalho? In: INTERNATIONAL NEEM CONFERENCE, 3., 1986, Nairobi, Kenya. 1986. p.195-203.
- SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J. D. Efeito ovicida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca branca *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, p.403-406, 2000.
- TANZUBIL, P.B.; MCCAFFERY, A. R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*. **Crop Protection**, Guilford, v.9, p.383-386, 1990.
- THOMAZINI, A.P.B.W. **Efeito de genótipos de *Lycopersicon* spp. e de extratos aquosos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lep., Gelechiidae)**. 95p. 1999. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- TORRES, A.L.; BARROS, R.; OLIVEIRA, J. V. Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, p.151-156, 2001.
- TRINDADE, R.C.P.; MARQUES, I. M. R.; XAVIER, H. S.; OLIVEIRA, J. V. Extrato metanólico da amêndoia da semente de nim e a mortalidade de ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, p.407-413, 2000.
- VERKERK, R.H.J.; WRIGHT, D. J. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. **Pesticide Science**, Oxford, v.37, p.83-91, 1993.