

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Populus*, popularmente chamado de Álamo ou Choupo pertence a Família Salicaceae. É originário de regiões de clima temperado e frio do Hemisfério Norte, onde são amplamente cultivados, constituindo-se como uma das principais espécies econômicas.

Segundo previsões da FAO (2004), existem cerca de 70 milhões de hectares de Álamo, os quais crescem em forma de bosques naturais, florestas plantadas, incluindo sistemas agro-florestais e árvores ornamentais. A Federação Russa, Canadá e Ucrânia têm as maiores áreas de Álamo nativos, porém, China, Índia e Paquistão possuem as maiores áreas plantadas.

No Brasil os primeiros plantios comerciais de *Populus* foram implantados na década de 1960, no entanto, somente no início da década de 1990, passaram a ser praticados em áreas mais extensas. Atualmente existem aproximadamente 5.500 ha, entre os estados do Paraná e Santa Catarina, na Bacia do rio Iguaçu.

A madeira destes plantios é destinada ao abastecimento da indústria fosforeira, visto que as características de crescimento rápido, retidão de fuste, composição química (ausência de resinas), coloração esbranquiçada e fibra reta, favorecem a espécie para esse segmento industrial.

Entre os problemas associados ao gênero *Populus* no Brasil, o de maior destaque é o ataque da lagarta *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), conhecida popularmente como “Mariposa-do-Álamo”. Esse inseto provoca desfolha intensa nas plantas, causando danos no período de maior crescimento vegetativo das mesmas, nos meses de dezembro a março.

Para o controle desse inseto são utilizados inseticidas químicos de contato. Como alternativa de substituição desse tipo de inseticida, levantamentos realizados indicam um

vírus entomopatogênico como uma opção viável de controle em um futuro programa de manejo integrado de pragas (MIP).

Para elucidar as possibilidades apresentadas por essa perspectiva, o presente trabalho teve como meta a determinação do potencial de controle de *C. vestigialis* por vírus em condições de laboratório e campo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o controle biológico de *C. vestigialis* visando garantir a produtividade dos plantios de *Populus*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a patogenicidade dos isolados virais de *C. vestigialis* em testes de laboratório e campo;
- Determinar o impacto do vírus de *C. vestigialis* no consumo de folhas de Álamo por lagartas desse inseto em testes de laboratório;
- Determinar a dose viral ideal para o controle de *C. vestigialis* em testes de laboratório e de campo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. GÊNERO *Populus*

##### 3.1.1 Características Gerais

Álamos, também conhecidos como choupos, pertencem ao gênero *Populus*, que é um dos gêneros da Família Salicaceae sendo o Salgueiro, gênero *Salix*, o outro integrante. A família Salicaceae faz parte da ordem Salicales do grupo Amentiflorae, caracterizado por flores unissexuais com o perianto ausente ou insignificante. O grupo Amentiflorae pertence a subclasse Monochlamydae, a classe Dicotyledonae, subdivisão Angiospermae e divisão Phanerogamae (FAO, 1979).

Segundo DICKMANN (2001), Álamos são árvores caducifólias, com uma vasta distribuição geográfica no Hemisfério Norte, desde os trópicos até os limites latitudinais norte para o desenvolvimento de uma árvore. O tronco é caracteristicamente alto e reto, embora possam existir indivíduos com vários galhos ou bifurcados. Trata-se de uma espécie de vida curta, quando comparado ao “White pine”, “Douglas Fir” ou Carvalho (*Quercus robur* L), na maioria das vezes por ser hospedeiro de doenças ou insetos. Todavia, o crescimento rápido frequentemente permite que atinjam grandes dimensões.

Todas as espécies da família Salicaceae são dióicas, isto é, apresentam plantas masculinas e femininas em separado. Suas sementes perdem a capacidade de germinação rapidamente e muitas vezes são estéreis, por não estarem fecundadas, esta dificuldade de fecundação deve-se ao fato das árvores apresentarem sexos distintos. Suas folhas são quase sempre alternas e seus frutos formam uma cápsula que contém grande número de sementes, as quais são envoltas em uma espécie de algodão, o que permite a disseminação em grandes distâncias. A frutificação ocorre ao final da primavera ou início do verão (OLIVER, 1988).

Segundo BRADSHAW (2000), a célula nuclear do Álamo contém dois pares de cromossomos ( $2n=38$ ); raramente, plantas triplóide com três pares de cromossomos ( $3n=57$ ) são encontradas. O tamanho físico do genoma do *Populus* é pequeno - 6 vezes menor que o do milho (*Zea mays*, L) e 40 vezes menor que o do “lobolly pine” (*Pinus taeda*, L).

A madeira recém cortada apresenta uma cor clara, variando de branco, branco amarelado, cinza e rosado, estando esta variação ligada as diferentes espécies de *Populus*. Após secagem, a cor se atenua menos nos híbridos euroamericanos. O odor é indefinido, podendo ser pronunciado em alguns híbridos euroamericanos. Devido ao pequeno tamanho dos vasos, a textura é em geral fina a média, sendo a grã regular. Os anéis de crescimento são bastante visíveis, em cortes transversais, devido a uma fina camada de células de parênquima ao final do ciclo vegetativo (FAO, 1979).

A composição volumétrica da madeira de *Populus* é caracterizada pela alta proporção de fibras (53% a 60%), seguida pelos elementos de vaso (28% a 34%), células de raio (11% a 14%) e pela baixa proporção de parênquima axial (0,1 a 0,3%) (PANSHIN and de ZEEUW<sup>2</sup>, apud BALATINECZ, 2001).

O comprimento das fibras do tecido mecânico pode variar de 800 a 1400 micrometros, e a espessura de 23 a 26 micrometros. A densidade em estado verde varia entre 1,05 a 0,70 e em estado seco ao ar, varia entre 0,30 e 0,55 (FAO, 1979).

Segundo BALATINECZ (2001), o Álamo apresenta uma composição química caracterizada pela alta proporção de polissacarídeos (aproximadamente 80% de holocelulose, sendo 50% de celulose e 30% de hemicelulose) e baixa proporção de lignina (20% ou menos). A taxa de extrativos tóxicos a fungos no Álamo é baixa, o que torna a madeira suscetível a decomposição.

As diferentes utilizações da madeira do Álamo estão condicionadas aos defeitos de forma da árvore e toras, por anomalias anatômicas dos tecidos, por ataques de fungos e

<sup>2</sup>PANSHIN ,A.J. and de ZEEUW,C.1980. Textbook od wood technology.McGraw-Hill, Innc., New York,NY.p.722.

insetos e finalmente por tensões internas devido ao crescimento. Os defeitos de forma que dificultam uma transformação regular para a laminação (contra-chapa e fósforos) são o ovalado do corte transversal e a curvatura das toras (FAO, 1979).

A madeira do Álamo pode ser utilizada para um grande número de produtos florestais primários e secundários. Estes produtos incluem polpa e papel, madeira serrada, compensado, palhetas, móveis, caixas de frutas, recipientes para cargas e “chopsticks” (BALATINECZ, 2001).

Segundo BALATINECZ (2001), além do crescimento rápido e grande porte em curto período de tempo, o Álamo pode ser facilmente clonado. Assim, características hereditárias podem ser melhoradas mais rapidamente que em espécies não passíveis de clonagem. Álamos híbridos são especificamente criados para melhorar a resistência a doenças e insetos, bem como para aumentar volume de produção em condições especiais.

Num resumo estatístico apresentado pela FAO (2004), no que diz respeito a bosques naturais de Álamo, encontram-se os seguintes dados: a superfície total de álamos naturais é aproximadamente 70 milhões de hectares, correspondendo ao Canadá à proporção de 28,3 milhões de ha (ano base 2001), a Federação Russa com 21,9 milhões de ha e os Estados Unidos da América com 17,7 milhões de ha (ano base 2003). Esses três países informam que a principal finalidade desses bosques naturais é a produção de madeira. A China, que tem a quarta maior superfície de Álamos de origem natural, com 2,1 milhões de ha, informa que a principal finalidade da manutenção desses bosques é ambiental, o mesmo que acontece com os cinco próximos países que também possuem bosques de Álamo de origem natural: Alemanha (100.000 ha), Finlândia (67.000 ha), França (39.800 ha), Índia (10.000 ha) e Itália (7.200 ha).

### 3.1.2 Pragas

A família Salicaceae atua como hospedeira de um grande número de insetos. Alguns são especificamente dependentes do Álamo, enquanto outros são polípagos e

atacam diversas espécies florestais. Os insetos que atacam a Família Salicaceae podem ser divididos em quatro grupos: brocas, desfoliadores, sugadores e os formadores de galhas, sendo que existem mais de 200 espécies de lepidópteros que atacam o Álamo (FAO, 1979).

Embora o Álamo cresça independentemente em “stands” naturais ou plantios comerciais, as pragas, incluindo doenças e insetos, estarão presentes, algumas causando grandes perdas econômicas, outras despercebidas. Insetos e doenças constituem um desafio constante para a cultura do *Populus*, especialmente durante os cinco primeiros anos de plantio. O perigo é intensificado em grandes plantações com uma única espécie ou idade, pois aumenta rapidamente o potencial de ataque de pragas (MORRIS, 1975; MATTSON, 2001).

O número de insetos que tem o Álamo como hábito alimentar é bem considerável. O grau do dano causado pode variar amplamente, dependendo da extensão da desfolha; período em que ocorre e o estado fitossanitário da planta. Em reflorestamentos, pode-se dizer que plantas saudáveis sofrem pouco menos com uma desfolha moderada; o incremento da madeira não é reduzido apreciavelmente até que mais da metade das folhas sejam perdidas (FAO, 1979).

Embora o número de pragas do Álamo seja elevado, apenas algumas são potencialmente prejudiciais. Os patógenos podem ser classificados quanto a parte que atacam na árvore; sendo : foliares (*Septoria* spp., *Melampsora* spp., *Marssonina* spp., *Venturia* spp.); tronco ou galhos, causando cancrios (*Septoria* spp., *Hypoxylon* spp., *Dothichiza* spp, *Xanthomonas* spp.) e os de raiz, causando podridões (*Armaillaria* spp. e a *Rosellinea* spp.) (NEWCOMBE, 2001; OSTRY 1988).

Segundo TILLESSE (2002) e FAO (2004), no que diz respeito a insetos de Álamo cultivado na Argentina, *Platypus mutatus* (Chapuis, 1865) (Coleoptera: Platypodidae) é o principal causador de danos e trabalhos para seu controle estão em andamento; na Itália uma ameaça potencial ao cultivo do Álamo é também o *P.mutatus*, e ainda *Cryptorhynchus lapathi* L. (Coleoptera: Curculionidae); no Chile, o principal dano

dos Álamos é ocasionado por *Tremex fusicornis* F. (Hymenoptera:Siricidae), que afeta as árvores debilitadas; na França há evidências da continuidade e aumento dos ataques massivos de *Phloeomyzus passerini* Sign. (Homoptera:Aphididae), mas com o desafio de que existem distintos cultivares que têm mostrado diferentes níveis de ataque; por sua vez, na Índia ocorre um desfoliador, *Clostera cupreata* Butler (Lepidoptera:Notodontidae), que é a principal e mais prejudicial praga, ocasionando desfolha em grande escala, especialmente em *Populus deltoides* Bartr.ex Marsh (Salicales:Salicaceae), que é plantado em três das principais províncias de cultivo da espécie; na Sérvia e Montenegro, no período de 2001 a 2004, tem ocorrido ataque em grande escala de uma lagarta desfoliadora, *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae). E na Espanha e Itália, embora controlados, continuam os ataques de *Paranthrene tabaniformis* (Rottemburg, 1775) (Lepidoptera:Sesiidae).

Em grande parte dos Estados Unidos e Canadá, com exceção da costa noroeste do Pacífico, desfoliadores do gênero *Populus* são os insetos mais agressivos, entre eles, destaca-se como o mais danoso o besouro da folha do Álamo (cottonwood leaf beetle – CLB) *Chrysomela scripta* F. (Coleoptera: Chrysomelidae) (MATTSON, 2001).

COYLE (2000), evidenciando os Estados Unidos, ressaltou o impacto da desfolha causada por *C. scripta* sobre o crescimento do *Populus* spp em condições de campo. Verificou variações em perda de volume de 42% a 58% após 2 ciclos vegetativos da espécie florestal.

No Brasil, segundo DIODATO (1999), a principal praga de *Populus* spp. é uma lagarta desfoliadora, denominada *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera:Crambidae).

### 3.2 OCORRÊNCIA DE *Condylorrhiza vestigialis* EM POVOAMENTOS DE *Populus* NO BRASIL.

Segundo DIODATO (1996), *C. vestigialis* conhecida como Mariposa-do-Álamo, surgiu como praga nos plantios de Álamo em 1992, após dois anos do início da cultura na região de São Mateus do Sul-PR e Porto União-SC. De acordo com esse autor, as lagartas de *C. vestigialis* passam o período de outono e inverno em áreas de floresta nativa próximas aos plantios de Álamo, pois esse é o período de dormência dessa planta. O inseto inicia seu desenvolvimento no mês de dezembro, apesar do *Populus* entrar em atividade no final do mês de setembro, registrando-se em janeiro a fase de pupa do inseto. Todas as fases do ciclo da Mariposa-do-Álamo ocorrem de janeiro a maio, pois a partir de maio inicia-se o processo de dormência das árvores com conseqüente queda das folhas. Sem o alimento proveniente das folhas de álamo, o inseto migra para hospedeiros nativos, como *Erythrina crista-gali* (Leguminosae), *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), *Sebastiania commersoniana* (Verbenaceae), *Matayba griyanesnsi* (Sapindaceae), *Salix babylonica* e *Salix humboldtiana* (Salicaceae),

Segundo MARQUES et al. (1995), *C. vestigialis* tem provocado vários danos aos povoamentos de *Populus* da região de São Mateus do Sul - PR. Sua distribuição nos talhões ocorre em focos que se iniciam nos viveiros de segundo ano e distribuem-se pelas áreas vizinhas. Em árvores adultas, as lagartas consomem todo o limbo da folha, permanecendo apenas as nervuras. O nível de desfolha pode chegar a mais de 50%. No viveiro de segundo ano, as folhas são inteiramente consumidas e a desfolha pode chegar a 100%.

Os danos que as lagartas de *C. vestigialis* produzem nas folhas de *Populus*, podem ser divididos em dois tipos: retirada da epiderme das folhas em pequenas áreas (tipo I) e consumo da folha (tipo II). O tipo I é provocado por lagartas do primeiro ínstar, às vezes do segundo. No dano do tipo II, causado por lagartas a partir do terceiro ínstar (algumas vezes do segundo), a larva consome a folha respeitando as nervuras. Nessas duas situações ocorre necrose dos tecidos na área afetada (DIODATO, 1999).

### 3.3 CONTROLE DE *C. vestigialis*

O controle de *C. vestigialis* é problemático, pois o seu cultivo é realizado em áreas de várzea, onde o emprego de produtos químicos pode causar impactos negativos, sendo necessária a utilização de agentes biológicos para este fim e o desenvolvimento de técnicas que levem ao manejo integrado dessa praga (TREFFLICH e PORTELA ,1997 e TREFFLICH ,1998).

DIODATO (1999), testou o acelerador de ecdise tebufenozide para o controle de *C. vestigialis*, que apresentou 80% de eficiência. Porém, como o número de lagartas testado foi pequeno, existe a necessidade de testes mais amplos para comprovar a eficiência do produto. Para este autor, vários fatores justificam a aplicação de um programa de controle biológico para *C. vestigialis*, através da utilização de inimigos naturais.

TREFFLICH e SOUSA (2000/a), relataram o desenvolvimento das seguintes pesquisas envolvendo o controle de *C. vestigialis*: a) técnicas para a criação do inseto em laboratório; b) identificação de inimigos naturais; c) dieta artificial para a criação de parasitóides; d) determinação de hospedeiros alternativos da praga; e) estudos biológicos à base de fungos. Como etapas a serem desenvolvidas, os autores citam testes de eficiência e viabilidade com inseticidas fisiológicos e químicos, e testes com predadores e vírus entomopatogênicos. Os autores ressaltam que todas estas informações no futuro serão utilizadas para a implantação de um programa de manejo integrado (MIP) da Mariposa-do-Álamo.

TREFFLICH e SOUSA (2000/b), testaram a eficiência em laboratório, de três produtos para o controle da Mariposa-do-Álamo. Um produto biológico (*Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*), um fisiológico (derivado de úreia) e um piretróide (deltametrina). As lagartas tratadas com *Bacillus* e com deltametrina apresentaram 100% de mortalidade três dias após a aplicação. Quanto ao inseticida fisiológico, a mortalidade

foi de 91,6%, seis dias após a aplicação. A conclusão dos autores é que esses produtos poderão ser utilizados em um MIP desta praga, desde que sejam realizados testes de campo para verificar a especificidade dos mesmos.

SOUSA (2002) desenvolveu uma classificação específica para algumas moléculas de inseticidas, agrupando informações disponíveis para cada substância em um sistema de notas, que associadas a testes de eficiência de vários ingredientes ativos em laboratório, levam a um agrupamento dos mesmos, os quais foram testados sobre a “Mariposa-do-Álamo”. Com os resultados foi simulado um programa de “Manejo de Resistência para *C. vestigialis*”, indicando como princípios ativos mais viáveis o *Bacillus thuringiensis* (produto biológico) e methoxefenozide (produto fisiológico).

Segundo SOUSA (2005), atualmente o controle de *C. vestigialis* em viveiro e em plantios comerciais vem sendo feito com *B. thuringiensis*.

Segundo SOUSA (2005), em 1999, durante a realização de experimentos com *C. vestigialis* no Laboratório de Proteção Florestal da UFPR, foi detectada uma grande mortalidade de lagartas em uma população coletada em plantios de *Populus* no município de São Mateus do Sul – PR. Em fevereiro de 2002, foram realizadas coletas de lagartas de *C. vestigialis* em campo específicas para a detecção de microorganismos. Em maio de 2002, lagartas que tinham sintomatologia características de vírus, foram observadas em microscópio ótico, onde se constatou que os corpos poliédricos observados eram típicos de vírus entomopatogênico. Parte das lagartas que apresentavam essa característica foram enviadas para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, visando a análise da morfologia do vírus em microscópio eletrônico de transmissão e a sua caracterização molecular.

### 3.4 VÍRUS ENTOMPATOGÊNICO

Os vírus foram discutidos na literatura científica em fins do século passado, pelos trabalhos de Meyer, Beijerinck e Ivanov, com o vírus do mosaico do fumo. Em tese, todos

os seres vivos devem ser suscetíveis aos vírus, e esse parasitismo por vírus, em geral, resulta em prejuízo para a célula/organismo, redundando em doenças ou morte precoce e deve constituir-se em mais um fator na evolução das espécies (RIBEIRO, 1998).

Os insetos e outros invertebrados não fogem a essa regra, pois diversos vírus têm sido encontrados causando patologias nos mesmos, tanto em insetos úteis à humanidade como em pragas e vetores de doenças. Isso justifica o desenvolvimento de várias linhas de pesquisa procurando identificar e caracterizar tais vírus, a fim de controlá-los no caso de insetos de interesse industrial (bicho-da-seda e abelhas) ou para utilizá-los como meio de controle biológico, na forma de bioinseticidas virais. (RIBEIRO, 1998; MOSCARDI, 1998 e 1999).

Segundo RIBEIRO (1998), os vírus são macromoléculas, usualmente nucleoproteínas, dotadas ou não de membrana envoltório, capazes de se replicar quando introduzidas em células permissíveis, isto é, nas quais os vírus têm condições de se multiplicar. Apresentam algumas características marcantes, como: a) apenas um tipo de ácido nucléico (DNA ou RNA); b) composição química simples (ácido nucléico e proteína e no caso dos vírus providos de membrana acrescentam-se carboidratos e lipídeos); c) não contém informações que geram energia; d) têm dimensões sub-microscópicas; e) replicam-se por um processo de montagem, e não de crescimento/divisão; f) são parasitas celulares obrigatórios.

Segundo ALVES (1990) do ponto de vista de identificação prática, os vírus que atacam insetos podem ser colocados em dois grandes grupos: a) Vírus que possuem corpos de inclusão visíveis ao microscópio óptico. b) Vírus que não possuem corpos de inclusão e, portanto, só podem ser vistos ao microscópio eletrônico.

Os vírus contaminam os insetos, normalmente, por via oral, sendo ingeridos por alimentos representados por folhas e caules das plantas. A contaminação pelos ovos dos insetos tanto interna quanto externamente pode ocorrer (ALVES, 1990).

A contaminação interna dos ovos (transovariana), não é comum, porém, pode acontecer a transmissão através de partículas virais aderidas ao córion dos ovos

(transovum), facilitando a contaminação devido ao hábito de lagartas de primeiro ínstar ingerirem o córion dos ovos após a eclosão (ALVES, 1986).

As partículas virais existentes no solo podem ser levadas para as folhas das plantas através de respingos de chuva, pássaros e outros animais, Outra possibilidade é a transmissão de certos vírus pela picada do ovipositor de parasitóides (ALVES, 1986).

Segundo ALVES (1990) e CORY et al (2003), durante o processo doença podem ocorrer as seguintes fases: a) Liberação de vírions: os poliedros que contém as partículas de vírus (vírions) são dissolvidos em meio alcalino do intestino ( $\text{pH} > 7,5$ ) liberando, dessa maneira, os vírions. b) Penetração: os vírions em contato com as micro-vilosidade intestinais liberam os capsídeos nas células epiteliais do intestino. c) Infecção primária: caracteriza-se pela produção de nucleocapsídeos em células do intestino. d) Infecção secundária: após a produção e migração de grandes quantidades de nucleocapsídeos formam-se os “cristais” dentro das células de diversos tecidos dos insetos. e) Liberação do patógeno: nessa fase os insetos contaminados liberam o vírus através do vômito e das fezes: após a morte o inseto podre representa importante fonte de inoculo.

#### 3.4.1 Família Baculoviridae.

Os baculovírus constituem uma família de vírus isolados do filo Arthropoda, com maior ocorrência na classe Insecta, principalmente na ordem Lepidoptera (VALADARES-INGLIS et al, 1998).

Devido a sua alta especificidade e ocorrência natural, os baculovírus são ótimos agentes de controle de insetos para serem usados em programas de manejo integrado de pragas (MOSCARDI, 1983; CORY et al, 2003).

A família Baculoviridae está taxonomicamente dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus*, que diferem pela morfologia do corpo de oclusão (cristais). Os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) possuem corpos de inclusão poliédrica (PIB), formados por uma proteína chamada poliedrina. Esses corpos, por sua vez, contém

múltiplas partículas virais, enquanto os granulovirus (GV) são formados pela granulina e contém, em geral, partículas únicas, ocluídas em corpos protéicos de forma ovóide. (FEDERICI, 1986 e CASTRO et al, 1999).

Os vírus da família Baculoviridae, com poucas exceções, têm como característica o fato das partículas virais estarem associadas a corpos de inclusão de natureza protéica, que conferem, de modo geral, uma proteção contra a desativação no meio ambiente, principalmente pela ação de raios solares, além disso, protegem as partículas virais da degradação por ação de microrganismos do solo. (JAQUES<sup>3</sup> apud SANTOS, 2003).

Durante o ciclo de vida dos baculovirus, os vírions podem assumir duas formas fenotipicamente distintas: uma que brota da membrana citoplasmática da célula hospedeira para o meio extracelular de forma polarizada, com a presença de estruturas denominadas peplômeros, sendo envelopadas individualmente (“budded vírus” – BV ou “extracellular vírus” – ECV); e outra, que adquire a membrana sintetizada de novo no núcleo da célula infectada, podendo ser encontrado mais de um núcleo-capsídeo por vírion e são oclusos em cristais protéicos denominados corpos de oclusão (“polyhedra-derived virus” - PDV). (GRANADOS, 1986; CORY et al, 2003; ANDRADE et al, 2004).

A forma ocluída do vírus (PDV) é responsável pela transmissão de inseto para inseto, enquanto a forma não ocluída (BV) é responsável pela transmissão de célula para célula, em um mesmo indivíduo (infecção sistêmica) (CASTRO et al, 1999).

Uma das principais características dos baculovírus é o seu grande tamanho, quando comparado a outros, devido ao cristal protéico que os envolve. Este é constituído principalmente da proteína poliedrina que confere a forma de poliedro ao vírus. Essa estrutura é responsável pela proteção das unidades virais (nucleocapsídeos) nele ocluídos. O nucleocapsídeo é helicoidal, em forma de bastonete de 30 a 35 nm de diâmetro e 250 a 300 nm de comprimento e acha-se envolto por uma membrana.

<sup>3</sup> JAQUES, R.P. 1972. The inactivation of foliar deposits of viruses of *Trichoplusia ni* and *Pieris rapae* and tests on protectant activities. *The Canadian Entomologist*, 4: 1985-94.

O acúmulo de poliedros no núcleo é responsável pela lise celular. Assim, a morte do inseto ocorre por uma ação mecânica e não química (por ação tóxica por parte do cristal da poliedrina) (VALADARES-INGLIS et al, 1998 ; RIBEIRO et al, 1998, CORY et al, 2003).

Segundo MARACAJÁ et al (1999), o modo mais comum de entrada dos baculovírus nos insetos é via aparelho bucal durante a alimentação da larva. Outras vias, como transovo, transovariana (intra-ovo), através dos espiráculos ou pelo ovipositor das fêmeas de endoparasitos durante a oviposição, são consideradas de menor importância devido a sua baixa frequência relativa a ocorrência.

De acordo com GRANADOS (1986), em estudos com larvas de lepidópteros infectadas com NPV, observou-se que, em geral, a infecção se inicia logo após a ingestão de poliedros pela larva, levando a uma série de mudanças comportamentais e morfológicas. Estas alterações começam entre 48 e 78 h após a infecção, quando se inicia uma redução na alimentação e retardamento do crescimento do inseto, muitas vezes não havendo mudança de instar. No final do ciclo de infecção, o tecido do corpo da larva é convertido em milhões de corpos de inclusão, que são liberados no ambiente com a morte do inseto, servindo de inóculo para infectar populações subseqüentes de larvas do inseto hospedeiro.

Segundo SANTIAGO-ALVAREZ et al (1986), na maioria dos estudos realizados, a exposição de insetos a inóculos de baculovírus causa não somente a morte de alguns indivíduos, mas a debilidade dos sobreviventes que pode influenciar na capacidade reprodutiva, reduzindo a fecundidade dos adultos ou a viabilidade dos ovos.

Apesar da existência de um grande número de vírus entomopatogênicos, a família Baculoviridae é a que apresenta maior interesse em entomologia aplicada, pois engloba vários vírus já em uso e outros com grande potencial como inseticidas biológicos (RIBEIRO et al, 1998; MOSCARDI, 1999; CASTRO et al, 1999; CORY et al, 2003).

### 3.5 UTILIZAÇÃO DE VÍRUS ENTOMOPATOGÊNICO NO CONTROLE DE PRAGAS NO BRASIL.

A utilização de vírus em campo pode ser feita de diferentes maneiras, dependendo dos objetivos do programa, do inseto-alvo e da espécie de planta que este ataca. O sucesso da utilização de qualquer estratégia de controle depende de fatores bióticos e abióticos que influenciam o sistema vírus-hospedeiro-planta, cujo conhecimento torna-se fundamental antes da implementação de programas de uso desses entomopatógenos em campo (MOSCARDI, 1998).

Um exemplo bem sucedido de controle biológico, com a utilização de um vírus entomopatogênico, como parte de um programa de MIP, é o da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera:Noctuidae). Pesquisas pioneiras desenvolvidas a partir de 1977 no Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), sediado em Londrina, PR, viabilizaram o uso em larga escala em plantios comerciais de soja, de um nucleopoliedrovirus da lagarta-da-soja, denominado AgMNPV. Após a constatação da viabilidade técnico-econômica em testes-piloto, realizados em diferentes regiões produtoras de soja no Paraná por duas safras consecutivas (1980/81 e 1981/82), foi iniciada a difusão da técnica de aplicação do AgMNPV na safra 1982/83, primeiramente no Paraná e Rio Grande do Sul (MOSCARDI, 1998, 1999).

Segundo MOSCARDI (2004), a área de soja tratada com esse vírus no Brasil cresceu rapidamente, de 2 mil hectares em 1982/83 para mais de 2 milhões de hectares na safra 2002/2003, o que atesta o sucesso desse método de controle biológico (cerca de 12% da área de soja cultivada no Brasil). Ressalta-se que, em termos de área atingida, este é o maior programa de uso de vírus de insetos, em nível mundial.

De acordo com MONTOR (2003), o programa que vem sendo desenvolvido no Brasil para o controle da lagarta-da-soja, proporciona ao país uma economia estimada em cem milhões de dólares em agrotóxicos, sem considerar os benefícios ambientais resultantes da não-aplicação de mais de onze milhões de litros desses produtos.

Um outro programa resulta no combate à lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* J.E.Smith (Lepidoptera:Noctuidae). Essa lagarta é a principal praga da cultura do milho, podendo reduzir a produção em até 34%. Aproximadamente 5000 ha de milho já foram tratados com o vírus da poliedrose nuclear de *S. frugiperda*. No entanto, existe um potencial para a aplicação em área muito maior (RIBEIRO et al,1998).

Segundo RIBEIRO et al (1998), o vírus da granulose do mandarová-da-mandioca, *Erinnyis ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera:Sphingidae) revelou ser um importante agente biológico. O mandarová é a principal praga na cultura da mandioca. O bioinseticida, um produto na forma de macerado da lagarta infectada, é aplicado em santa Catarina e Paraná e em alguns locais do Nordeste.

ORLATO (2002), em estudos realizados com uma das principais pragas do eucalipto, a lagarta *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), aponta um vírus da granulose como potencial agente biológico no controle da praga.

### 3.6 VIRUS ENTOMOPATOGÊNICO ASSOCIADO A *C.vestigialis*.

Segundo CASTRO et al. (2003), a análise por microscopia ótica e eletrônica do material purificado obtido de lagartas de *C.vestigialis* com sintomatologia característica de infecção por vírus, confirmou a presença de estruturas bi-refringentes típicas de poliedros.

Nas micrografias, do material obtido de lagartas de *C. vestigialis* foram constatadas partículas virais (poliedros), com cortes transversais e longitudinais de virions contendo um a vários nucleocapsídeos envoltos por uma membrana, caracterizando esse vírus como um baculovírus múltiplo (M), inclusos numa matriz protéica de forma poliédrica, sendo dessa forma, similar à morfologia descrita no Sétimo Relatório de Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus (BLISSARD<sup>4</sup> apud CASTRO et al, 2003).

<sup>4</sup>BLISSARD, G.W. et al. In: VAN REGENMORTEL, M.H.V. et al. Vírus taxonomy seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego:Academic Press, 2000. p.195-202

CASTRO et al. (2003), concluíram que as partículas virais obtidas de material purificado de *C. vestigialis* se tratava de um vírus do gênero Nucleopolyhedrovirus (NPV), que foi denominado como *Condylorrhiza vestigialis multiplenucleopolyhedrovirus* (CvMNPV).

A detecção desta virose em *C.vestigialis*, confirma as colocações de FEDERICI (1997), que afirma que os baculovírus constituem o maior grupo de vírus que atacam insetos, principalmente os da ordem Lepidoptera.

CASTRO et al. (2004), em estudos realizados através da purificação de poliedros (PIBs) e virions extraídos de lagartas contaminadas de *C.vestigialis*, e analisados por eletroforese, obtiveram uma fração de poliedros que mostrou uma banda intensa de aproximadamente 33kDa, indicando a presença da principal proteína dos corpos de oclusão dos NPVs, a poliedrina, que segundo RHORMANN (1986), permite a preservação do vírus no meio ambiente por longos períodos de tempo.

Os vírus poliédricos ou inclusos são mais resistentes às condições de tempo e, portanto mais promissores para serem utilizados no controle microbiano de insetos. As formações protéicas que envolvem esses vírus também protege-os da ação indesejável de RNA-ases, DNA-ases, proteases e de outras enzimas, durante o processo de infecção no ciclo das relações patógeno-hospedeiro (ALVES, 1986).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS EXPERIMENTAIS

Os experimentos deste trabalho foram conduzidos em laboratório, casa de vegetação e campo. Os bioensaios em laboratório e em casa-de-vegetação (70m<sup>2</sup>, automatizada, com controle de fotoperíodo, temperatura e umidade), foram realizados no setor de Populicultura da Empresa Swedish Match do Brasil S.A, no município de Curitiba-Pr.

As avaliações de campo foram realizadas em duas fazendas: a) São Joaquim, de propriedade da Companhia Florestal Guapiara, São Mateus do Sul-PR, altitude 750 metros, latitude sul de 26° e temperatura média anual de 18,5°C; b) Pintado, de propriedade da empresa Swedish Match do Brasil S.A., Porto União-SC, altitude de 740 metros, latitude sul de 26° 14' e temperatura média anual de 18°C.

### 4.2 OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.2.1 Folhas de Álamo

Nos bioensaios de laboratório, as folhas de Álamo utilizadas eram provenientes de plantas cultivadas em vasos, em casa de vegetação, sendo irrigadas manualmente, três vezes por semana, com solução nutritiva completa (macro e micro elementos).

A coleta das folhas era realizada diariamente, sendo encaminhadas ao laboratório, para desinfecção com água destilada esterilizada (autoclave) e hipoclorito de sódio a 5%, por um minuto, passando, em seguida, por nova lavagem somente em água destilada esterilizada. Concluída a desinfecção as folhas foram recortadas manualmente com auxílio de bisturi, gerando uma área de forma quadrada de 36 cm<sup>2</sup> por amostra.

#### 4.2.2 *Condylorrhiza vestigialis*

A criação estoque de *C. vestigialis*, foi iniciada a partir de lagartas coletadas em folhas no viveiro de Álamo na Fazenda Pintado, Porto União-SC. Essas folhas com as lagartas foram acondicionadas em caixas plásticas, com tampa telada (filó). No interior das mesmas foi colocado um pedaço de algodão molhado com água na base dos pecíolos, a fim de manter o turgor das folhas, para posterior transporte ao laboratório do Setor de Populicultura da Swedish Match em Curitiba, visando a obtenção de pupas do inseto. As pupas obtidas, foram mantidas em câmara B.O.D, a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10\%$ , fotofase de 12h, até a emergência dos adultos.

Após o nascimento dos adultos (Figura 1), vinte casais foram levados à casa de vegetação com temperatura de  $25\pm 4^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $70\% \pm 10\%$  e colocados em gaiolas acondicionadas sobre vasos plantados com mudas de Álamo (Figuras 2A, 2B e 2C), que tinham altura variando entre 80 cm e 100 cm.

FIGURA 1 - ADULTOS DE *C.vestigialis*

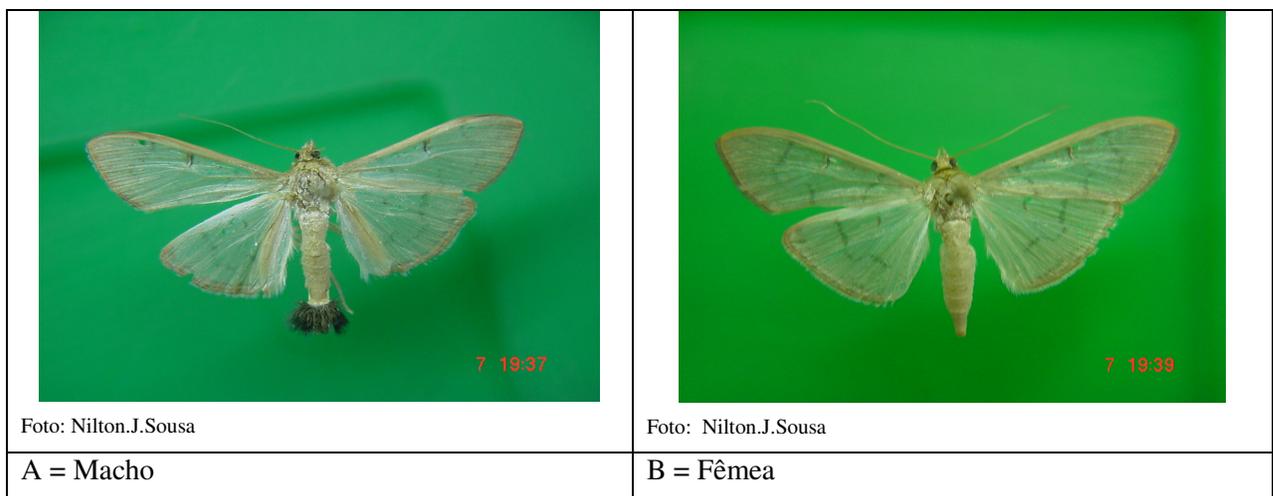
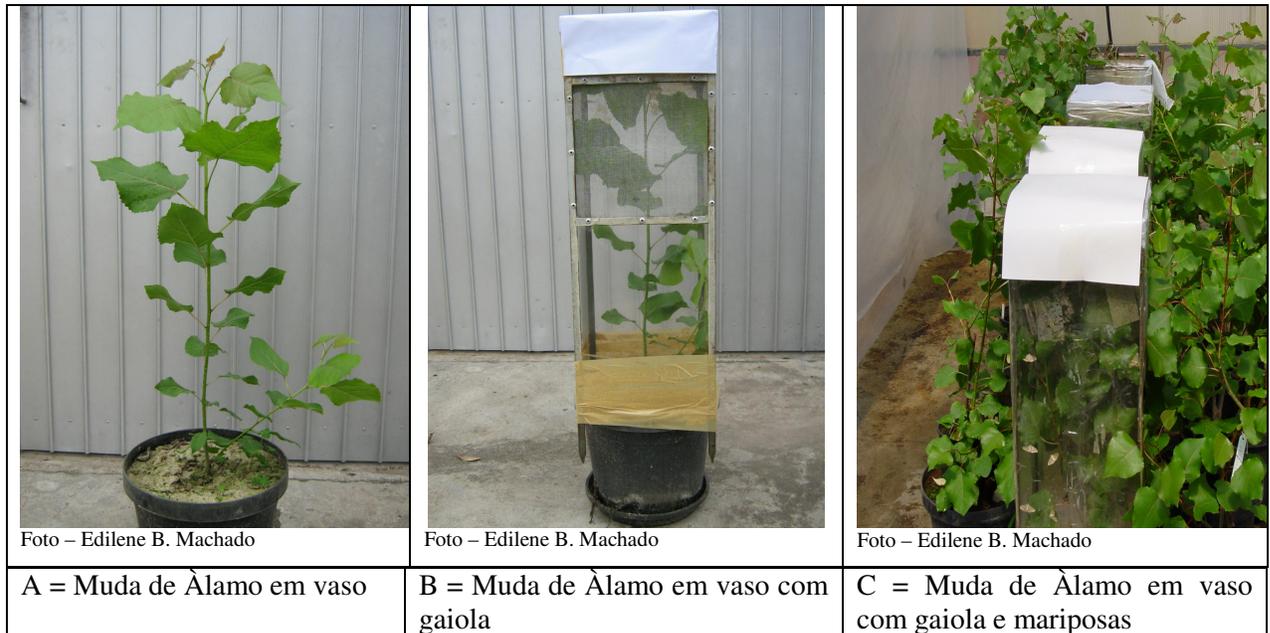


FIGURA 2 – MUDAS DE ÁLAMO PLANTADAS EM VASO E GAIOLAS UTILIZADAS PARA A OBTENÇÃO DE OVOS DE *C.vestigialis* EM CASA DE VEGETAÇÃO

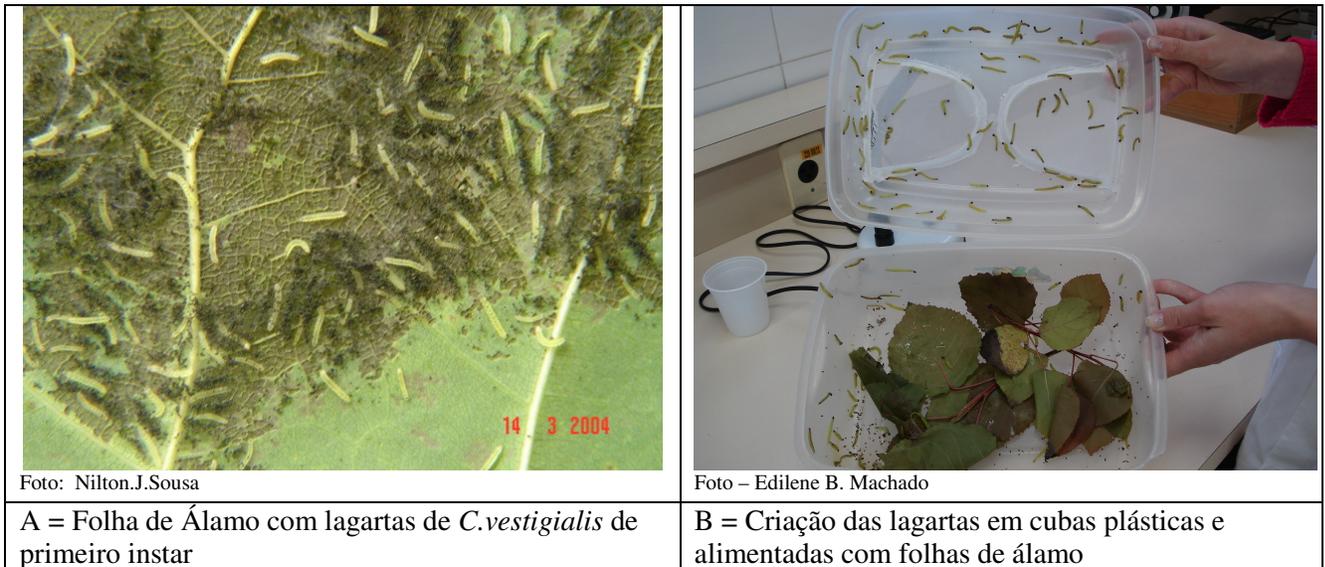


Diariamente, as mariposas foram alimentadas com solução de água e mel, na proporção de 50%. Durante a troca de alimento, folhas de Álamo com ovos de *C. vestigialis* (Figura 3) foram retiradas e levadas para o laboratório. As lagartas provenientes destes ovos foram criadas em caixas plásticas (26x16x9,5cm) com folhas de *Populus* (Figuras 4A e 4B).

FIGURA3 – OVOS DE *C. vestigialis*.



FIGURA 4 – ASPECTOS DA CRIAÇÃO DE *C.vestigialis* EM LABORATÓRIO COM FOLHAS DE ÁLAMO.



#### 4.2.3 Dieta Artificial.

Um dos bioensaios realizados em laboratório exigiu que fosse utilizada dieta artificial para as lagartas, em substituição às folhas de Álamo, pois o uso da dieta artificial facilita os procedimentos laboratoriais, viabilizando o desenvolvimento dos experimentos quando faz-se necessário a utilização de um grande número de insetos. Assim, fez-se uso de uma dieta artificial desenvolvida por CORRÊA (2006), para *C. vestigialis* e amplamente testada. Sua composição encontra-se na Tabela 1.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DA DIETA ARTIFICIAL UTILIZADA NA ALIMENTAÇÃO DE LAGARTAS DE *C.vestigialis*

Ingrediente	<b>Quantidade</b>
Água destilada	300ml
Agar	7g
Óleo de soja	10g
Germe de trigo	12,5g
Suco de vegetais “V8”	80ml
Feijão branco cozido moído	15,6g
Folhas de álamo desidratadas	10g
Caseína	7g
Complexo vitamínico	20g
Sais de Wesson	1g
Cloranfenicol	0,0034g
Nipagim	1g
Açúcar	3,5g
Levedura	8g

Fonte: Corrêa (2006).

#### 4.2.4 Vírus

O vírus da poliedrose nuclear utilizado nos bioensaios, foi obtido da coleção estoque de lagartas mortas por agentes entomopatogênicos provenientes de populações naturais de *C. vestigialis* coletadas de forma sistemática em locais isentos de pulverizações de inseticidas nas Fazendas São Joaquim (São Mateus do Sul-PR) e Pintado (Porto União-SC). Essas coletas foram realizadas pela equipe do Laboratório de Proteção Florestal da UFPR em conjunto com as empresas Swedish Match do Brasil e Guapiara em 2002. Tal procedimento consistiu na coleta de cem lagartas por semana, as quais foram acondicionadas em cubas plásticas e alimentadas a cada 24 horas com folhas de Álamo.

As lagartas que morreram com sintomatologia típica de microorganismos entomopatogênicos foram armazenadas em freezer (-17°C). Parte desse material que possuía sintomatologia típica de morte por vírus foi macerado em gral de porcelana com auxílio de um pistilo, originando as alíquotas virais que foram inicialmente utilizadas nesse trabalho. De posse desse material, este foi pincelado sobre folhas de Álamo previamente desinfetadas, as quais foram oferecidas às lagartas de *C.vestigialis* da colônia obtida em laboratório, visando obtenção de soluções virais suficientes para a realização dos bioensaios.

Assim, diariamente o desenvolvimento das lagartas foi acompanhado, com anotação de parâmetros como coloração, comportamento e voracidade, entre outros. As lagartas que morreram foram armazenadas em frascos esterilizados, etiquetados e colocadas em freezer (-17°C). As lagartas que chegaram ao estágio de pupa foram descartadas.

Desse material foi realizada análise microscópica qualitativa. Para essa análise, o corpo de cada lagarta foi perfurado com o auxílio de uma agulha e parte da hemolinfa foi então colocada em lâmina coberta com lamínula, para observação a fresco em microscópio óptico comum, em aumento de 400x, que permite a visualização de corpos poliédricos de inclusão (CPI) do vírus, bem como a visualização de células cujos núcleos apresentam os CPIs (Figura 5).

Uma vez detectada a presença de poliedros, as lagartas com essa condição foram agrupadas e submetidas ao processo de maceramento em gral de porcelana com auxílio de um pistilo, também de porcelana, sendo a suspensão filtrada em tecido de malha fina (filó). O filtrado foi então centrifugado por 1 minuto a 1200 rpm, sendo o sobrenadante novamente centrifugado por vinte minutos a 6000 rpm. O menisco (“pellet”) obtido foi dissolvido com água destilada esterilizada e a concentração do vírus foi determinada (CPI/ml) em câmara de Neubauer (hemacitômetro - 0,1mm de profundidade), com auxílio de microscópio óptico (aumento de 400x). A suspensão obtida foi armazenada em freezer (-17°C) e nomeada como suspensão-estoque.

FIGURA 5 – ESTRUTURAS VIRAIS (POLIEDROS) OBSERVADAS NA HEMOLINFA DE *C. vestigialis* EM MICROSCÓPIO OTICO

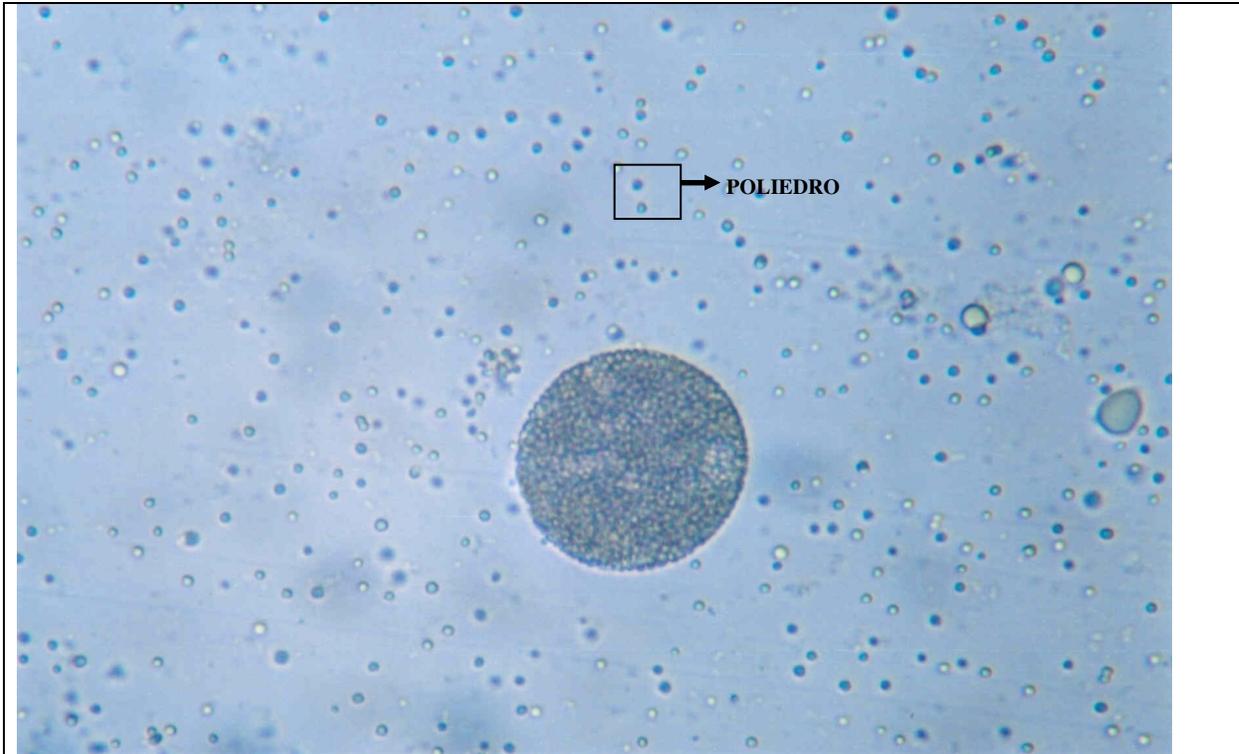


Foto : Edilene B. Machado

Poliedros dispersos e aspectos de um núcleo celular repleto de poliedros. Aumento de 400x.

### 4.3 BIOENSAIOS

#### 4.3.1 Determinação da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) das Suspensões Virais e do Tempo Letal Médio de Ação (TL<sub>50</sub>) do Vírus para Lagartas de *C. vestigialis*.

Com a finalidade de determinar a CL<sub>50</sub> e o TL<sub>50</sub> das soluções virais testadas em *C. vestigialis*, um bioensaio foi conduzido em laboratório utilizando lagartas de 3º ínstar, que foram alimentadas com folhas de Álamo tratadas com diluições da suspensão viral estoque obtida conforme metodologia descrita no item 4.2.4.

Para a montagem dos experimentos foram definidos 5 tratamentos, sendo para cada um utilizadas 30 lagartas, totalizando 150 lagartas em todo o experimento. Os tratamentos utilizados foram diluições obtidas através da retirada de alíquotas da solução viral estoque, misturadas com água destilada esterilizada, obtendo-se um volume final de 100 mL para cada suspensão. As diluições utilizadas foram 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> CPI\*/mL. Para as lagartas-testemunha, quinto tratamento, foram fornecidas folhas de Álamo não contaminadas.

Em cada tratamento as 30 lagartas foram separadas em grupos de três lagartas cada, totalizando 10 grupos por tratamento, que foram colocadas em contato com folhas contaminadas com as respectivas concentrações de vírus para cada tratamento. Essas folhas foram acondicionadas sobre papel filtro umedecido com água destilada esterilizada em placas de Petri plásticas com 12,0 cm de diâmetro, por 24 horas, em câmara B.O.D a 24 °C±2 °C, 70 %±10 e fotofase de 12 h.

Após esse período, as lagartas foram individualizadas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo folhas de Álamo não contaminadas por suspensões virais, sobre papel filtro umedecido com água destilada esterilizada.

Diariamente, as folhas dessas placas foram substituídas por folhas não contaminadas. Esse procedimento foi realizado até a morte ou pupação da última lagarta do experimento.

\* CPI= corpos poliédricos de inclusão

O primeiro registro das observações quanto ao comportamento das lagartas foi realizado 24 h após a aplicação dos tratamentos, no momento da individualização das mesmas.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise estatística, para estimativa da  $CL_{50}$ , utilizando-se análise de regressão logística, baseada no log. da dose (Modelo:  $P[y=1] = p = \exp\{\alpha + \beta \cdot \log(\text{dose})\} / (1 + \exp\{\alpha + \beta \cdot \log(\text{dose})\})$ ) através do programa estatístico “R” (Modelo de regressão S-Plus Gratuito).

Para determinação do tempo letal médio ( $TL_{50}$ ), os dados foram analisados com o auxílio do programa Microprobit 3.0 (T.C. Sparks e A. Sparks, Lily Research Labs., Greenfield, IN).

#### 4.3.2 Quantificação da Concentração Viral (número de corpos poliédricos de inclusão) por Grama de Lagarta Infectada

Nesse experimento foi feita a determinação da concentração de poliedros por grama de lagarta e não por lagarta propriamente dita (lagarta equivalente, LE). Esse procedimento foi adotado em função dos resultados obtidos em pré-testes, que indicaram uma variação elevada entre as amostras, quanto ao número de poliedros por lagarta, isto em função do peso de cada lagarta morta diferir muito, mesmo quando as lagartas foram infectadas no mesmo instar, pois segundo observações de MOSCARDI (1998), um dos aspectos que resultam em imprecisão de experimentos em campo se refere à concentração efetivamente aplicada, uma vez que tem sido comum o uso de lagartas equivalentes (LE) como parâmetro para definir a dose de vírus empregada, resultando em quantidades diferentes de corpos poliédricos de inclusão (CPI) aplicadas por área de cultivo.

Assim, nesse bioensaio foram utilizadas lagartas de *C. vestigialis* de 3º instar, alimentadas com dieta artificial especialmente desenvolvida para esse inseto, conforme descrição do item 4.2.3.

A dieta foi fracionada a cada 10 mL em recipientes plásticos, de 50 mL, esterilizada em câmara com luz U.V. por 30 minutos. Para a contaminação dessa dieta

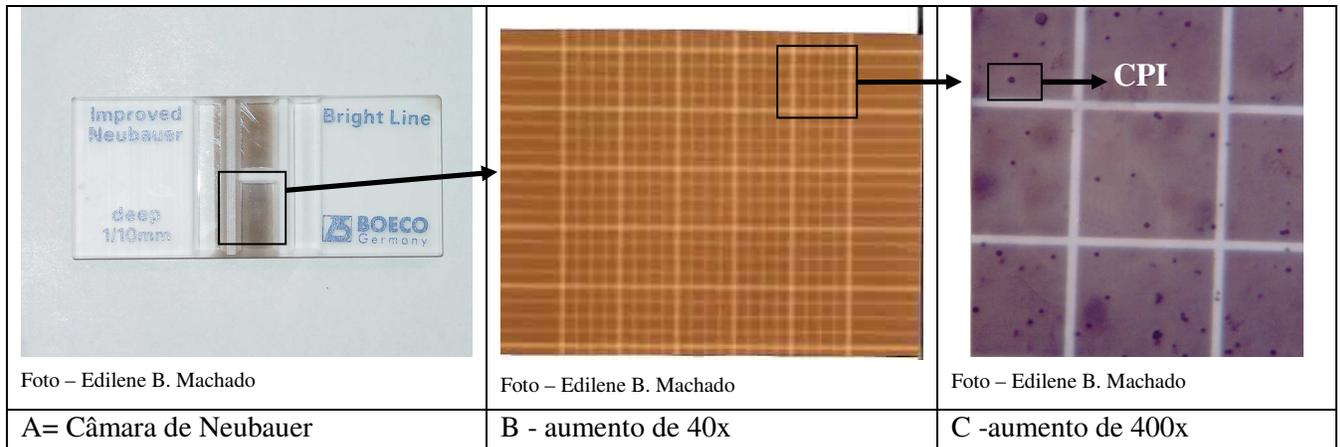
foram utilizados 200  $\mu$ l de uma suspensão viral de  $10^8$  CPI/mL, pincelada superficialmente. Após o período de uma hora, tempo para que a suspensão viral fosse absorvida pela dieta artificial, cada recipiente recebeu três lagartas de terceiro ínstar. Os recipientes foram então fechados com tampas de papel, tipo cartolina e acondicionados em câmara B.O.D, a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $70\text{ }\%\pm 10$  e fotofase de 12 h.

Oito dias após a realização destes procedimentos, os recipientes foram abertos e as lagartas mortas foram armazenadas em tubos plásticos (60 a 70 lagartas por tubo) em freezer ( $-17^{\circ}$ ), para posterior purificação. As lagartas que passaram para a fase de pupa foram descartadas.

Até a fase acima citada, esse bioensaio foi repetido por duas vezes, devido ao alto número de recipientes e lagartas manuseados. Sendo assim, cada fase foi composta pela utilização de 400 recipientes e 1200 lagartas. Estes números foram adotados para que se tivesse uma margem de segurança que possibilitasse a obtenção da quantidade de lagartas mortas necessárias para as avaliações desse teste.

Para a purificação parcial do vírus, foram preparadas 10 amostras, sendo que cada uma continha 10 g de lagartas mortas infectadas pelo vírus, aproximadamente 140 lagartas. Cada amostra foi macerada em gral de porcelana, com água destilada, sendo a suspensão filtrada em tecido fino, resultando no volume final de 200 mL por amostra. Foram feitas contagens de número de CPI/mL, utilizando-se Câmara de Neubauer (Figuras 6A, 6B, 6C), sendo para cada amostra realizadas três contagens em distintas câmaras. A partir do número de CPI/mL da suspensão de 200 mL contendo o equivalente a 10 g de lagartas mortas, procedeu-se a estimativa do número de CPI viral/g de lagarta morta. Com os dados obtidos nesse bioensaio, foram analisados a média e o intervalo de confiança.

FIGURA 6 – DETALHES DA CÂMARA DE NEUBAUER, UTILIZADA PARA CONTAGEM DE CORPOS POLIÉDRICOS DE INCLUSÃO (CPI) EM SOLUÇÃO AQUOSA



#### 4.3.3 Determinação da Susceptibilidade de Ínstares Larvais ao Vírus.

Este experimento foi realizado com a finalidade de determinar o efeito do vírus sobre lagartas de *C. vestigialis* de diferentes ínstares. Para tanto, foram utilizadas lagartas de 2º a 5º instar, alimentadas com dois tratamentos: folhas de Álamo, pinceladas com solução viral de  $10^8$  CPI/mL (conforme resultados obtidos em pré-testes, com mortalidade acima de 90%) e folhas de Álamo pinceladas com água destilada e esterilizada (testemunha). Lagartas de primeiro instar não foram avaliadas devido a dificuldade de manuseio e a fragilidade das lagartas nessa fase, fatores que poderiam levar a falsos resultados de mortalidade, conforme observações realizadas em experimentos preliminares.

Para cada instar foram utilizadas 60 lagartas, sendo 30 lagartas alimentadas com folhas contaminadas com a suspensão viral e 30 lagartas alimentadas com folhas não contaminadas (testemunha), totalizando 240 lagartas em todo o experimento. Sobre cada folha contaminada ou não (acondicionadas sobre papel filtro umedecido com água destilada e esterilizada em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro), foram colocadas 3

lagartas, totalizando 10 placas (repetições) por tratamento para cada ínstar, correspondendo, assim, a 20 placas para cada instar.

Estas placas foram mantidas por 24h, em câmara B.O.D a  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10$  e fotofase de 12 h. Após esse período, as lagartas foram individualizadas em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo folhas de Álamo não contaminadas por suspensões virais, sobre papel filtro umedecido com água destilada esterilizada.

Diariamente as folhas de Álamo foram substituídas por folhas novas, não contaminadas, procedimento que foi realizado até a morte ou pupação da última lagarta do experimento. Os dados relativos às mortalidades em cada tratamento foram acumulados até o décimo dia após a infecção.

O delineamento experimental utilizado para esse bioensaio foi inteiramente ao acaso, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.4.4 Consumo de Alimento (folhas de Álamo) por Lagartas de *C. vestigialis* Infectadas por Diferentes Concentrações de Solução Viral

Este experimento visou a determinação da relação existente entre doses e mortalidade de *C. vestigialis*, bem como o reflexo no consumo de alimento por essa espécie. Para tanto, foram utilizadas cinco diluições (tratamentos) da solução viral estoque, respectivamente  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  CPI/mL, mais a testemunha constituída por água destilada e esterilizada, caracterizando, assim 6 tratamentos (tratamentos definidos em função dos resultados obtidos nos bioensaios 4.3.1 e 4.3.3).

Definidos os tratamentos, estes foram pincelados em folhas de Álamo, que foram cortadas com bisturi em formato quadrado de  $36\text{ cm}^2$  (Figura 7A), na proporção de  $50\mu\text{l}$  da solução viral para cada repetição. Essas superfícies foliares foram acondicionadas sobre papel filtro esterilizado, umedecido com água destilada esterilizada, em placas de Petri de 9 cm de diâmetro e levadas a uma câmara B.O.D a  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70\% \pm 10\%$  e fotofase de 12 h.

Uma hora após a aplicação (tempo necessário para a completa fixação da solução viral nas folhas), foi colocada uma lagarta de 3º instar por placa de Petri (Figura 7B), sendo utilizadas 10 placas (repetições) por tratamento, totalizando 60 placas no bioensaio. As placas foram colocadas em câmara B.O.D a  $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa de  $70\% \pm 10\%$  e fotofase de 12 h, por um período de 24h. Após esse período as lagartas foram transferidas para novas placas com folhas de Álamo de mesma área foliar, porém sem suspensão viral, e levadas novamente para B.O.D nas mesmas condições acima citadas. Esse processo foi repetido até a morte ou pupação das lagartas, a cada 24 h as lagartas eram transferidas de placas.

O tecido foliar remanescente em cada placa foi devidamente identificado para posterior leitura em medidor digital de área foliar (modelo LI-3100, Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA). Sendo assim, o valor da área foliar consumida diariamente foi obtido pela diferença entre a área foliar fornecida e a remanescente.

O delineamento experimental utilizado para esse bioensaio foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

FIGURA 7 – FOLHA DE ÁLAMO ACONDICIONADA EM PLACA DE PETRI COM LAGARTA DE 3º INSTAR DE *C.vestigialis*



Foto: Edilene B. Machado

A



Foto: Edilene B. Machado

B

#### 4.4.5 Determinação, em Campo, da Eficiência de Diferentes Concentrações Virais sobre Lagartas de *C. vestigialis*

Esse ensaio foi instalado na Fazenda São Joaquim, localizada no município de São Mateus do Sul-PR, em área de *Populus* com dois anos de estabelecimento, plantados em espaçamento 6 X 6 m, altura média de 9 m (Figura 8). Os talhões utilizados para instalação dos experimentos não haviam recebido nenhum tipo de controle durante o ciclo, apesar do ataque do inseto.

FIGURA 8 – PLANTIOS DE ÁLAMO (6 X 6 M, 2 ANOS) PARA CONTROLE DA *C.vestigialis*



Foto : Nilton J.Sousa

Foram utilizados cinco tratamentos, como segue: a) três diferentes concentrações do vírus ( $3 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$  e  $9 \times 10^{11}$  CPI/ha); b) uma dose de inseticida comercial\* (a base de Metoxifenoziide, na formulação de solução concentrada, na concentração de 240 g de i.a/L), na dose de 70mL de p.c./ha (16,8g de ingrediente ativo/ha) c) testemunha (que foi pulverizada com água).

Cada tratamento foi aplicado em 3 linhas com 20 plantas cada uma (60 plantas por tratamento, 300 plantas em todo o experimento). Porém, para a amostragem, foram utilizadas apenas 10 árvores da fila central, representando, efetivamente, 10 plantas (repetições) por tratamento, totalizando 50 plantas avaliadas em todo o experimento.

Entre cada tratamento foi deixada uma bordadura de 5 linhas de árvores, para evitar a deriva e a contaminação entre os tratamentos testados.

Definidos os tratamentos e as repetições, antes da instalação do experimento foi determinado o índice de infestação do inseto em cada tratamento, através de um levantamento preliminar (pré-avaliação), que consistiu na retirada de um galho por árvore, sempre na mesma posição (terço médio da copa). Foram amostradas 10 árvores por tratamento, totalizando 50 árvores (galhos) amostradas em todo o experimento.

Após a coleta, os galhos foram etiquetados e acondicionados em sacos plásticos, sendo posteriormente levados à sede da Fazenda, onde determinou-se os seguintes parâmetros: número total de folhas, número de folhas com lagartas e número total de lagartas por amostra (Figura 9).

As suspensões do vírus para cada tratamento foram preparadas a partir da retirada de alíquotas da solução-estoque, obtida em laboratório, sendo que a determinação da concentração de corpos poliédricos de inclusão (CPI) do vírus/mL foi determinada previamente em laboratório. A partir dessas determinações, foram feitos os devidos cálculos para obtenção das suspensões finais. Sendo assim, as alíquotas das suspensões estoque do vírus, destinadas a cada tratamento, foram preparadas para o transporte, sendo

devidamente etiquetadas e acondicionadas em bolsas térmicas, com gelo, evitando-se qualquer alteração do patógeno.

FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DO MATERIAL (FOLHAS DE ÁLAMO) COLETADO EM CAMPO PARA CONTROLE DA *C.vestigialis*.



Foto: Nilton J.Sousa

Encerrada essa fase inicial de preparação, quando as condições climáticas tornaram-se favoráveis, foi iniciada a aplicação dos tratamentos. Assim, as pulverizações foram realizadas no período das 16:20 h as 18:40 h, com umidade relativa acima de 65%. Optou-se por fazer as pulverizações nesse horário porque, segundo MOSCARDI (1983), a radiação solar é o principal fator de desativação do vírus sobre folhas, e quando aplicado após as 16:00 h, possibilita manter o máximo da atividade original do vírus nas primeiras 24h após a aplicação.

As aplicações foram realizadas com o auxílio de atomizador, do tipo canhão, acoplado a um trator, com vazão de 200 litros de calda por ha (Figura 10)

FIGURA 10 – PULVERIZAÇÃO COM CANHÃO ACOPLADO A TRATOR (VAZÃO 200L/HA) PARA CONTROLE DA *C.vestigialis* EM PLANTIOS DE ÁLAMO



Porém, uma chuva de 12 mm ocorreu a 1:10 h após o termino das pulverizações. Por ser um fator de ocorrência natural, e que pode acontecer em outras situações, foi levado em consideração, mas não impediu a continuidade do experimento. Salienta-se que neste período de sete dias somente ocorreram os 12 mm de chuva inicial.

Sete dias após a aplicação dos tratamentos, foram realizadas novas coletas de amostras, seguindo os mesmos procedimentos realizados no levantamento preliminar. Os parâmetros analisados por amostra foram: número total de folhas; número de folhas com lagartas; número de lagartas sadias; número de lagartas com sintomas do vírus (flacidez e amarelecimento e/ou escurecimento do tegumento) ou sintomas do produto químico (alteração na coloração); e número de lagartas mortas amareladas, marrons ou pretas.

Os dados obtidos na avaliação preliminar foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente as médias da proporção do número total de lagartas sobre

número de folhas com lagarta foram comparadas através do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Como os tratamentos foram feitos em faixas, os dados obtidos na segunda avaliação, ou seja, na avaliação realizada sete dias após a pulverização na área experimental, foram submetidos a uma análise exploratória anterior a análise de variância (ANOVA). Esse processo teve como objetivo avaliar se os pré-requisitos para realizar a análise de variância haviam sido aceitos. Esses pré-requisitos são: os dados devem seguir distribuição normal; o coeficiente de assimetria deve ser o mais próximo possível de zero e o modelo do delineamento deve ser aditivo, isto é, as variâncias dos tratamentos devem ser homogêneas e os resíduos devem ser independentes. Após a análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL<sub>50</sub>) DE SUSPENSÕES VIRAIS E TEMPO LETAL MÉDIO (TL<sub>50</sub>) DE AÇÃO DO VÍRUS PARA LAGARTAS DE TERCEIRO INSTAR DE *C. vestigialis*.

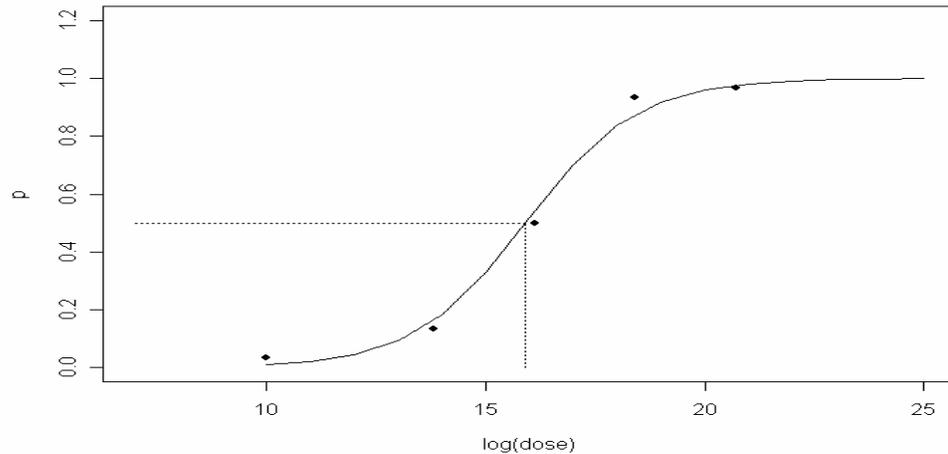
Os dados percentuais de mortalidade (Tabela 2) transformados pela análise estatística através do modelo de regressão logística (Gráfico 1), indicaram que a concentração letal média (CL<sub>50</sub>), ou seja a concentração requerida para provocar 50% de mortalidade dos indivíduos tratados foi de  $0,8 \times 10^7$  poliedros/mL de suspensão aquosa (I.C.<sub>95%</sub>  $0,39 \times 10^7$  poliedros /mL -  $1,6 \times 10^7$  poliedros/mL).

TABELA 2 - MORTALIDADE ACUMULADA (%) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *C. vestigialis* INFECTADAS POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VIRUS.

TRATAMENTO (CPI/mL)	MORTALIDADE ACUMULADA (%)*			
	Dias Após a Infecção			
	5	6	7	8
Testemunha	0	0	3,33	3,33 A
10 <sup>6</sup>	0	0	0	13,33 A
10 <sup>7</sup>	0	0	10,00	50,00 B
10 <sup>8</sup>	0	0	10,00	93,33 C
10 <sup>9</sup>	0	6,67	26,67	96,67 C

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

GRÁFICO 1 – MORTALIDADE vs. CONCENTRAÇÃO (PROBABILIDADE / LOG (CONCENTRAÇÃO)) EM LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *C.vestigialis*, INFECTADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VÍRUS.



*Modelo de regressão logística*

Modelo:  $P[Y=1] = p = \exp\{\alpha + \beta \cdot \logdose\} / (1 + \exp\{\alpha + \beta \cdot \logdose\})$

$\text{Log (Dose) Letal } 50 = -\alpha / \beta = 12.4232 / 0.7809 = 15.90 \text{ com IC95\%} = (15.2 ; 16.6)$

$\text{Dose letal } 50 = \exp(15.90) = 8111716 = 0,81 \times 10^7 \text{ pol/mL de suspensão aquosa.}$

Analisando os dados da tabela 2 é possível verificar que lagartas infectadas com concentrações virais de  $10^6$  CPI/mL de suspensão aquosa não diferiram estatisticamente da testemunha, isto significa que esta concentração tem baixa eficiência para o controle de *C.vestigialis*. A concentração de  $10^7$  CPI/mL de suspensão aquosa está dentro do intervalo de confiança indicado pela análise estatística, provocando 50% de mortalidade, diferindo das concentrações de  $10^8$  e  $10^9$  CPI/mL de suspensão aquosa, que provocaram respectivamente 93,33% e 96,67% de mortalidade e não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

Diante dessas informações a solução de  $10^9$  CPI/mL pode ser considerada como a melhor para o controle de *C.vestigialis*. Porém, esse não deve ser o único fator para a definição da melhor concentração. Com soluções virais, outro fator de grande importância é a produção destas, pois o processo é “in vivo”, ou seja, é necessária a produção nas próprias lagartas. Portanto o processo de criação de lagartas é imprescindível para a produção das soluções e a conseqüente eficiência.

Ao comparar as concentrações testadas ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  CPI/mL), esta questão que envolve a produção das soluções fica bem clara. A solução de  $10^6$  CPI/mL é dez vezes menos concentrada que a solução de  $10^7$  CPI/mL, que é 10 vezes menos concentrada que a solução de  $10^8$  CPI/mL, que por sua vez é dez vezes menor que a concentração de  $10^9$  CPI/mL. Ou seja, para a produção da solução de  $10^9$  CPI/mL, foram utilizadas 30 vezes mais lagartas de *C.vestigialis* do que para a produção da solução de  $10^6$  CPI/mL. Evidentemente que entre outros parâmetros, essas proporções têm influência direta no custo final das soluções.

Assim comparando as concentrações testadas nessa mesma linha de raciocínio, constata-se que as doses de  $10^8$  e  $10^9$  CPI/mL de suspensão aquosa foram em média 45% mais eficientes que a dose de  $10^7$  CPI/mL de suspensão aquosa, consumindo dez e vinte vezes mais lagartas. Entretanto, entre as dose de  $10^8$  e  $10^9$  CPI/mL, constata-se que a dose de  $10^9$  CPI/mL tem uma eficiência de apenas 3,34% em relação a dose de  $10^8$  CPI/mL. Porém, para a sua produção foram utilizadas 10 vezes mais lagartas. Conseqüentemente o custo de produção dessa solução é mais elevado e comprova a premissa de que o processo de produção deve ser considerado para a definição da melhor concentração, juntamente com a eficiência.

Na Tabela 2 observa-se ainda, que o período de mortalidade das lagartas variou de seis a oito dias após a infecção, sendo que os maiores índices de mortalidade ocorreram entre o sétimo e oitavo dias, para todas as concentrações.

O tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) obtido foi de 7,48 dias (I.C.<sub>95%</sub> 7,18 – 7,83 dias) calculado para a concentração de 10<sup>9</sup> CPI/mL de suspensão aquosa, que provocou o maior índice de mortalidade de *C. vestigialis* (96,67%).

Analisando este resultado, constata-se que a morte dos insetos com dose de 10<sup>9</sup> CPI/mL de solução aquosa demora em média 7,48 dias para acontecer. Em uma comparação com inseticidas químicos de contato, esse período de 7 dias pode parecer elevado, visto que a maioria dos inseticidas químicos de contato agem rapidamente, bem como pode induzir a sensação de que a virose em questão não é viável. Entretanto, é preciso considerar que após a ingestão dos poliedros inicia-se rapidamente a multiplicação dos mesmos nos núcleos das células dos tecidos, segundo ALVES (1986), após a ingestão e dissolução dos poliedros pelas substâncias alcalinas (pH acima de 7,5) existentes no tubo digestivo, os virions são liberados passando através do epitélio intestinal para atingir os diversos tecidos susceptíveis, alterando o comportamento e o consumo alimentar dos insetos infectados.

No caso do baculovírus associado à lagarta-da-soja MOSCARDI (1983), relata que 4 dias após a ingestão de folhas contaminada, as lagartas mudam seu comportamento, reduzindo a mobilidade e o consumo de alimento. Comportamento que também foi observado em *C. vestigialis*, pois 4 dias depois da ingestão das folhas contaminadas as lagartas começaram a ficar amareladas, diminuíram a mobilidade e o consumo foliar.

Outra observação que também coincide com as observações feitas por MOSCARDI (1983), é que após as alterações de comportamento as lagartas infectadas de *C. vestigialis*, procedem como as lagartas de *A. gemmatalis* dirigindo-se para a parte superior da planta, onde morrem de cabeça para baixo, penduradas pelas falsas pernas abdominais (Figura 11A).

Outros sintomas da infecção por vírus observados em *C. vestigialis* também são parecidos com sintomas descritos por MOSCARDI (1983), para a infecção por vírus na lagarta-da-soja. São eles: amarelecimento no início da infecção com posterior escurecimento do tegumento até atingir a coloração marrom escura (Figura 11B); e a

liberação de grandes quantidades de poliedros quando ocorre o rompimento do corpo da lagarta morta.

FIGURA 11 – LAGARTAS MORTAS DE *C.vestigialis* COM SINTOMAS TÍPICOS DA AÇÃO DO CvMNPV.



Assim, em função de toda essa sintomatologia, percebe-se que o fato da lagarta não morrer imediatamente não é propriamente uma desvantagem, pois 4 dias após a ingestão dos poliedros a alimentação do inseto é reduzida. Se compararmos este período de 4 dias com os dados obtidos por SOUSA (2002), constata-se que este autor determinou que a mortalidade média de lagartas de *C. vestigialis* contaminadas com uma formulação comercial de *B. thuringiensis* foi de 4 dias. Ou seja, mesmo quando se trata de uma formulação do produto biológico comercial amplamente difundido, a morte do inseto não é imediata, pois essa é uma das características do agente biológico, que sempre terá um efeito mais lento que os inseticidas químicos. Porém o efeito pode ser mais duradouro dependendo do agente utilizado.

Em outra análise, se compararmos inseticidas químicos de contato com o baculovírus, é possível constatar que formulações de baculovírus podem levar a resultados mais eficientes a médio prazo, pois ajustando-se o momento da aplicação para quando a população de lagartas é inicial e composta principalmente de indivíduos dos dois primeiros ínstares, constata-se que quando o inseto atingir o estágio em que o consumo é elevado ele já está parando de se alimentar, não causando dano econômico.

No caso específico do vírus utilizado nesse trabalho, deve ser considerado também a redução das pressões ambientais relacionadas ao uso de inseticidas de contato e a proteção ambiental positiva por se utilizar uma forma de controle compatível com outras técnicas que levem ao manejo integrado de *C.vestigialis*.

## 5.2 CONCENTRAÇÃO DE POLIEDROS POR GRAMA DE LAGARTA INFECTADA.

Com os resultados obtidos nesse bioensaio foi possível concluir que um grama de lagartas mortas pelo vírus apresenta, em média,  $10^{10}$  poliedros (I.C<sub>95%</sub> -  $0,893 \times 10^{10}$  -  $1,04 \times 10^{10}$  CPI/gr).

É importante considerar essa informação ao relacionar a quantidade de vírus em gramas de lagarta por ha. Caso este valor em gramas seja elevado, pode tornar o uso do agente biológico inviável porque a produção de vírus, embora seja em laboratório, conforme foi comentado no ítem 5.2, trata-se de um processo “in vivo”, isto é, utilizam-se lagartas do inseto hospedeiro para produção do agente patogênico, neste caso lagartas de *C.vestigialis*, que com 8 dias após a infecção pesam em média 0,07g. Sendo então necessárias 14 lagartas para obtermos um grama. Assim, quanto maior for a quantidade de lagartas para tratar um ha, maior será o custo e a dificuldade de produção.

Quando comparam-se esses resultados, com os obtidos por MOSCARDI (1983), verifica-se que uma lagarta de *A.gemmatalis* morta e infectada por vírus pesa sete vezes mais que uma lagarta de *C.vestigialis* nas mesmas condições. Diante desta informação, é possível compreender que a dose do vírus para lagarta da soja é mensurada em lagartas

equivalentes (LE), pois se trata de uma lagarta relativamente grande. Para o vírus de *C.vestigialis*, a mensuração deve ser feita em poliedros por grama de lagarta morta, como já foi mencionado no item 4.3.2.

Dessa forma, de acordo com a citação de MOSCARDI (1983), um grama de lagartas mortas de *A.gemmatalis* apresenta em média  $0,6 \times 10^{10}$  poliedros, quando essa informação é comparada com os resultados obtidos nesse bioensaio verificamos que um grama de lagartas mortas de *C.vestigialis* apresenta uma maior quantidade de poliedros por grama ( $10^{10}$  CPI/g).

Porém há evidências que a CL50 para lagartas de *A.gemmatalis* é menor que para *C.vestigialis*. Isto em termos práticos relacionados à utilização do vírus em campo, significa que embora *C. vestigialis* apresente uma maior quantidade de poliedros por grama, a concentração de vírus por ha deverá ser maior do que para *A. gemmatalis*, conseqüentemente uma maior quantidade em peso será necessária para *C.vestigiais* quando comparada a *A. gemmatalis*, dessa forma necessita-se de um número bem maior de lagartas de *C.vestigialis* para tratamento de um ha.

Evidentemente, que nesse contexto não pode ser esquecido o detalhe de que se tratam de culturas muito diferentes, enquanto a cultura da soja é de rotação curta com densidade elevada por ha e mas porte baixo, o Álamo é uma cultura de ciclo longo (12 anos), com poucas plantas por ha (321 árvores), porém com altura elevada (23 m).

Assim, comparar o uso de virose nessas culturas, tem apenas o objetivo de ilustrar os dados obtidos para *C.vestigialis*, pois o uso de *Baculovirus anticarsia* é considerado o maior exemplo de sucesso com esse tipo de agente no contexto mundial.

No aspecto prático tratam-se de razões e proporções diferentes que não devem ser comparadas, tanto em relação as características das culturas, quanto no comportamento das soluções virais em campo, visto que pouco se conhece sobre esse tema em relação a virose associada a *C.vestigialis*.

### 5.3 SUSCEPTIBILIDADE DE ÍNSTARES LARVAIS DE *C. vestigialis* AO CvMNPV

Analisando os resultados referentes à mortalidade de lagartas de *C. vestigialis* de diferentes instares (2° a 5°) inoculadas com o CvMNPV na concentração de  $10^8$  CPI/mL de suspensão aquosa, foi possível verificar que houve diferença significativa entre os tratamentos, levando a formação de dois grupos, lagartas de 2° e 3° instares separados de lagartas de 4° e 5° instares (Tabela 3).

Os resultados obtidos neste bioensaio, sugerem que um melhor controle da praga pode ser atingido quando as pulverizações forem realizadas contra populações de lagartas até o 3° instar, pois somente 10% das lagartas de 4° instar morreram e para o 5° instar não foi observado mortalidade de lagartas.

Em relação aos sintomas típicos da virose (alterações na coloração e no comportamento das lagartas de *C. vestigialis* contaminadas), observou-se que esses sintomas ocorreram a partir do segundo dia para lagartas de 2° instar e terceiro dia para lagartas de 3° instar.

Outro fator observado foi que o tempo para atingir mortalidade  $\geq 80\%$  para lagartas de 2° instar, foi de seis dias e para lagartas de 3° instar foi de sete dias. Indicando que o tempo para que a virose se manifeste aumenta com o passar dos instares, isso é, quanto mais jovem a lagarta mais rápida será a ação do patógeno, pois existe uma redução na suscetibilidade ao vírus com o aumento da idade do inseto no momento da inoculação.

Também, quanto mais cedo as lagartas ingerem o vírus menos danos elas irão causar, pois com a ingestão dos poliedros nos primeiros instares, o consumo foliar é reduzido antes que as lagartas tenham atingido alto índice de desfolha. Esse parâmetro deve ser considerado quando no momento de uso do agente biológico em campo. Segundo MOSCARDI (1998), a aplicação de vírus entomopatogênico deve ser dirigida, geralmente contra a fase larval do hospedeiro, uma vez que esses agentes têm pouco ou nenhum efeito sobre adultos.

Portanto a composição etária da população da praga constitui-se em fator limitante para o emprego de vírus em campo. Assim, fica claro que o monitoramento é uma necessidade, pois dessa forma é possível aplicar as suspensões virais no momento biológico mais susceptível das lagartas de *C. vestigialis*, que é quando essas estão entre o 1º e o 3º ínstar larval.

TABELA 3 - MORTALIDADE DE LAGARTAS DE *C. vestigialis* INFECTADAS EM DIFERENTES ÍNSTARES COM VÍRUS DA POLIEDROSE NUCLEAR NA CONCENTRAÇÃO DE  $10^8$  CPI/ML DE SOLUÇÃO AQUOSA

INSTAR	Nº DE LAGARTAS	MORTALIDADE ACUMULADA (%)*				
		Dias Após a Infecção				
		5	6	7	8	9
2º	30	0	26 (86,66%)	28 (93,33%)	28 (93,33%)	28 (93,33%)
3º	30	0	3 (10%)	27 (90%)	28 (93,33%)	28 (93,33%)
4º	30	0	0	0	3(10%)	3(10%)
5º	30	0	0	0	0	0

\*Não houve mortalidade nas testemunhas utilizadas para cada ínstar

O conhecimento da suscetibilidade dos instares larvais ao vírus, também é importante quando se planeja um processo de produção do agente biológico em laboratório, pois se lagartas muito pequenas forem infectadas com o vírus, será necessário um número muito elevado de insetos para se obter uma concentração adequada de poliedros. Bem como, se a contaminação for realizada em instares larvais que são menos susceptíveis, a produção também será ineficiente, pois a grande maioria atingirá o estágio de pupa antes da ação do vírus.

Assim, os resultados obtidos nesse bioensaio além de determinar qual é o ínstar mais susceptível a ação do vírus também indicam que para se obter sucesso na produção do vírus de *C. vestigialis* em laboratório, devem ser utilizadas lagartas de terceiro ínstar na fase de inoculação do vírus. Pois com esse procedimento será possível obter o máximo de mortalidade pelo vírus, com lagartas que terão alta concentração de poliedros, gerando um inseticida biológico adequado para o controle do inseto.

#### 5.4 EFEITO DE DIFERENTES DOSES DO VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR NO CONSUMO DE ALIMENTO (FOLHAS DE ÁLAMO) POR LAGARTAS DE *C.vestigialis*.

Os dados obtidos nesse bioensaio, quando submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (teste de Tukey), indicaram que as doses de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  CPI/mL de solução aquosa, reduziram significativamente o consumo foliar médio total, em relação a testemunha que não foi tratada com soluções virais. O consumo foliar médio diário por lagartas de terceiro instar de *C.vestigialis* infectadas com vírus nas doses de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  CPI/mL de suspensão aquosa são apresentados na Tabela 4.

No segundo dia após a infecção todos os tratamentos apresentaram uma redução no consumo foliar que variou entre 34,36% (para a concentração de  $10^4$  CPI/mL) e 46% (para a concentração de  $10^5$  CPI/mL) em relação a testemunha. Porém uma diminuição gradativa e contínua no consumo foliar aconteceu a partir do quarto dia após a infecção para as concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  CPI/mL de suspensão aquosa (Tabela 4). Também foi possível determinar que a diminuição do consumo foliar ocorreu mais acentuadamente para as doses de  $10^7$  e  $10^8$  CPI/mL de solução aquosa, cerca de 53,72% e 66,85% respectivamente, em relação a testemunha (considerando o consumo da testemunha que foi de 100%).

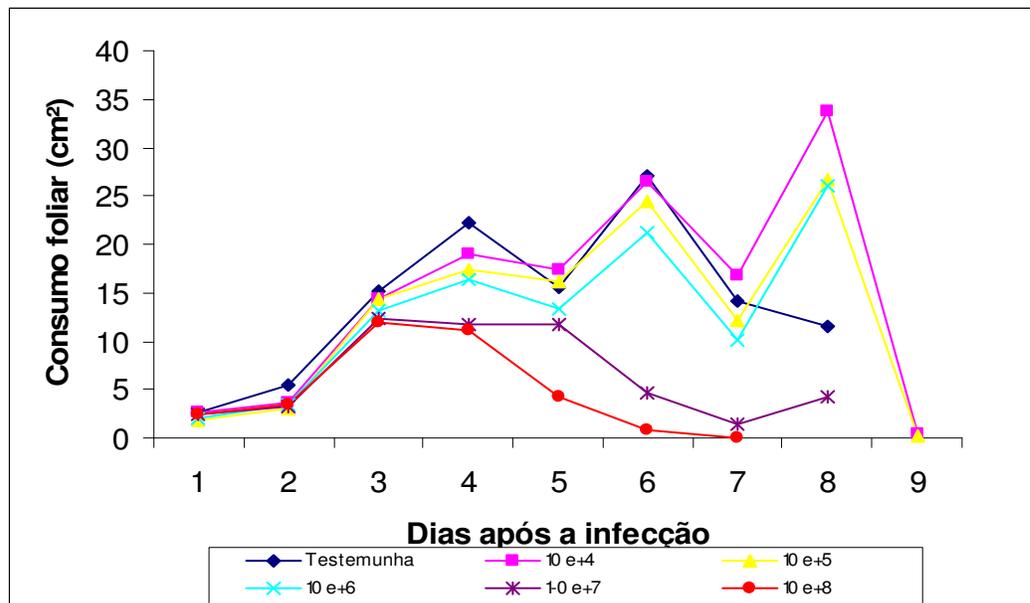
A análise dos resultados da Tabela 4, indicam que as diferenças no consumo foliar diário entre as concentrações de  $10^8$  CPI/mL e  $10^7$  CPI/mL de suspensão aquosa, foram mais evidentes a partir do quinto dia após a infecção (48,72%), aumentando gradativamente com o passar do tempo. Com isso é possível concluir que concentrações mais elevadas do vírus podem antecipar o início da redução do consumo de folhas por lagartas infectadas, justificativa semelhante foi relatada por <sup>5</sup>TATCHELL, apud ZONTA, 1987.

<sup>5</sup>TATCHELL, G.M. The effects of granulovirus infection and temperature on the consumption of *Pieris rapae* (lep.: Pieridae). *Entomophaga*, 26(3): 291-9, 1981

Porém em termos de redução no consumo alimentar total, a concentração de  $10^8$  CPI/mL em relação a concentração de  $10^7$  CPI/mL é mais eficiente em apenas 13,33%.

Em relação ao tempo de alimentação das lagartas infectadas em relação as lagartas sadias, a concentração de  $10^8$  CPI/mL reduziu em aproximadamente três dias o consumo foliar (Gráfico 2). Pois entre o quinto até o oitavo dia, o tratamento provocou respectivamente 73,3%, 96,7%, 99,8% e 100% de redução no consumo foliar diário em relação à testemunha. Esses resultados, devem ser analisados com atenção, pois tem relação direta com a produtividade dos povoamentos, visto que o incremento anual tem relação direta com a área foliar. Dessa forma, quanto antes a desfolha for interrompida menor será o impacto sobre o incremento do povoamento, pois a parada de consumo foliar indica que não haverá mais desfolha ocasionada pelas lagartas.

GRÁFICO 2 – CONSUMO MÉDIO DIÁRIO DE FOLHAS DE ÁLAMO, POR LAGARTAS DE *C. vestigialis* SADIAS E INFECTADAS, NO TERCEIRO ÍNSTAR, COM DIFERENTES DOSES DE VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR (CvMNPV).



Quanto aos efeitos da concentração de  $10^6$  CPI/mL de suspensão aquosa, dentro da mesma lógica do parágrafo anterior, verifica-se que essa concentração causou 13,33%

de mortalidade, num período de oito dias após a infecção (dados obtidos no item 5.2), e 20% nesse experimento. Em relação ao consumo foliar, essa dose provocou uma redução de 21% na área foliar consumida em relação a testemunha. Esse resultado merece destaque, pois mesmo uma concentração 10 vezes menor que a concentração letal média, gera 20% de mortalidade larval e 21% de redução no consumo foliar, conseqüentemente 21% de redução no índice de desfolha nas árvores.

Para a concentração de  $10^4$  CPI/mL de suspensão aquosa, observou-se que o consumo foliar médio total foi semelhante ao da testemunha. Entretanto, verificando-se o consumo foliar médio diário após a infecção (Tabela 4), constatou-se que as lagartas infectadas apresentaram consumo foliar diferente ao da testemunha, o que pode ter ocorrido por influência do patógeno. Assim, considerando-se o consumo foliar após a infecção viral das lagartas, verifica-se que mesmo com baixas concentrações de vírus esse índice foi afetado.

Outro fator que não pode deixar de ser considerado na avaliação geral do experimento, é o desenvolvimento biológico larval normal das lagartas de *C. vestigialis*, pois esse explica o fato da testemunha ter consumido menos área foliar do que os tratamentos no oitavo dia de observação. Nas observações constatou-se que as lagartas da testemunha, por não terem sofrido infecção, transformaram-se em pré-pupa entre o oitavo e nono dias de observações, com isso o consumo foliar foi afetado, mesmo quando comparado aos tratamentos (Tabela 4).

O fato das menores dose testadas ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  CPI/mL) induzirem a um consumo foliar elevado em relação aos outros tratamentos após a infecção, especialmente para a dose de  $10^4$  CPI/mL, bem como apresentarem mortalidade inferior as doses de  $10^7$  e  $10^8$  CPI/mL, podem estar associadas a baixa concentração de poliedros que as lagartas ingeriram.

Em relação a mortalidade das lagartas de *C. vestigialis*, constatou-se que no 8º dia após a infecção, a concentração de  $10^8$  CPI/mL foi mais eficiente que a concentração de

TABELA 4 - CONSUMO MÉDIO DIÁRIO E TOTAL DE FOLHAS DE ÁLAMO POR LAGARTAS DE *C.vestigialis*, SADIAS E INFECTADAS, NO TERCEIRO ÍNSTAR, COM QUATRO DIFERENTES DOSES DE VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR.

TRATAMENTO	DOSES VÍRUS (cpi/ml)	CONSUMO MÉDIO DIÁRIO (cm <sup>2</sup> ) *										CONSUMO MÉDIO TOTAL* (X±EP)
		Dias Após a Infecção										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Testemunha	0	2,70 A	5,50 A	15,21 A	22,28 A	15,64 AB	27,08A	14,09 A	11,60 C	--		103,16±1,62 A
1	10 <sup>4</sup>	2,57 A	3,61 B	14,41 AB	19,06 AB	17,34 A	26,38A	16,84 B	33,70 A	0,35 A		103,23±1,81 A
2	10 <sup>5</sup>	1,78 A	2,97 B	14,37 AB	17,45 B	16,26 AB	24,38 B	12,09 BC	26,70 B	0,29 A		91,22±2,58 B
3	10 <sup>6</sup>	2,07 A	3,51 B	13,09 ABC	16,30 B	13,42 BC	21,19 C	10,17 C	26,00 B	--		81,46±1,11 C
4	10 <sup>7</sup>	2,52 A	3,19 B	12,36 BC	11,64 C	11,80 C	4,64 D	1,37 D	4,33 C	--		47,75±1,89 D
5	10 <sup>8</sup>	2,50 A	3,46 B	12,00 C	11,14 C	4,18 D	0,89 E	0,02 D	--	--		34,20±0,93 E

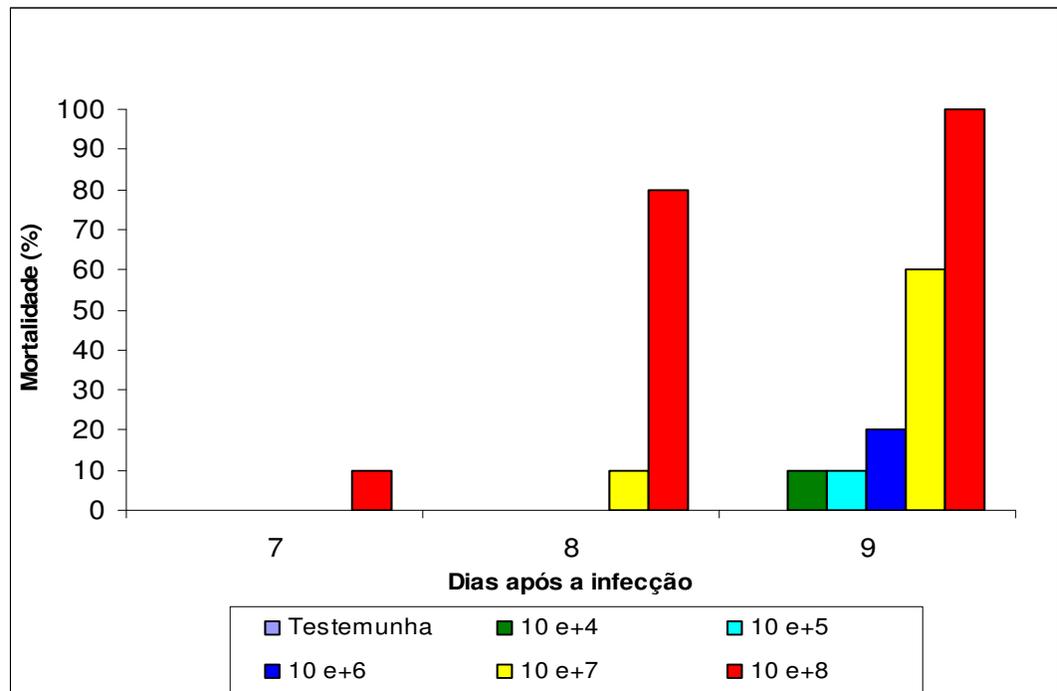
\* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

$10^7$  CPI/mL, apresentando 80% de mortalidade contra 10% de mortalidade da concentração de  $10^7$  CPI/mL, ou seja foi 70% mais eficiente (Gráfico 3).

Com nove dias, a dose de  $10^8$  CPI/mL, atingiu 100% de mortalidade, a dose de  $10^7$  CPI/mL teve 60% de eficiência, a dose de  $10^6$  CPI/mL teve 20% de mortalidade e as doses de  $10^5$  e  $10^4$  tiveram índices de 10% de mortalidade, enquanto a testemunha não apresentou mortalidade de lagartas de *C. vestigialis* (Gráfico 3).

Comparando os dados relativos a mortalidade, com os dados obtidos no item 5.1, constata-se que naquele experimento e nesse, a dose de  $10^8$  CPI/mL apresentou indicativos de que é a mais apropriada para o controle da *C. vestigialis*, a diferença é que no experimento anteriormente referido, a mortalidade para essa dose foi de 93,33%, enquanto nesse experimento a mortalidade foi de 100%.

GRÁFICO 3 – MORTALIDADE (%) DE LAGARTAS DE *C. vestigialis* SADIAS E INFECTADAS, NO TERCEIRO ÍNSTAR, COM DIFERENTES DOSES DE VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR (CvMNPV)



### 5.5 EFICIÊNCIA EM CAMPO DE DIFERENTES DOSES DO CvMNPV SOBRE LAGARTAS DE *C. vestigialis*.

Os resultados obtidos com a análise de variância dos dados referentes à avaliação preliminar, indicaram homogeneidade da distribuição do número de lagartas na área analisada ( $F=0,2716$ ,  $p\text{-valor} = 0,8947$ ) (Tabela 5). Essa informação facilitou a instalação do experimento em faixas, visto que para a utilização do delineamento de blocos ao acaso que é indicado para experimentos de campo, seria necessária uma área bem maior, dificultando a execução desse bioensaio.

TABELA 5 – MÉDIA DAS PROPORÇÕES EM CADA UMA DAS ÁREAS (NÚMERO TOTAL DE LAGARTAS / NÚMERO DE FOLHAS COM LAGARTAS), OBTIDAS NA PRÉ-AVALIAÇÃO.

TRATAMENTO	MÉDIA (NT LAGARTAS /NTF COM LAGARTAS) (%)
Testemunha	1,9247
Virus 1 - dose $3 \times 10^{11}$ CPI/ha	1,9247
Virus 2 - dose $6 \times 10^{11}$ CPI/ha	2,0036
Virus 3 - dose $9 \times 10^{11}$ CPI/ha	1,9928
Prod.quím. Methoxifenoziide(16,8gi.a/ha)	1,8519

Os resultados obtidos pelo teste de Shapiro-Wilk ( $w = 0,96$  e  $p\text{-valor} = 0,12$ ) referente a análise exploratória dos dados, coletados na avaliação realizada sete dias após as pulverizações, indicaram que os mesmos podem ser estudados, pois apresentaram distribuição normal.

Na tabela 6, encontram-se os resultados quanto a proporção de lagartas de *C. vestigialis*, mortas por diferentes concentrações de vírus, por um produto químico e a testemunha sem aplicação.

TABELA 6 – LAGARTAS *DE C.vestigialis* MORTAS POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CvMNPV, COMPARADAS COM UM PRODUTO QUÍMICO.

TRATAMENTO	(MÉDIA DA PROPORÇÃO NÚMERO LAGARTAS MORTAS / NÚMERO TOTAL DE LAGARTAS)*
Testemunha	9,53% A
Virus dose 1 - $3 \times 10^{11}$ CPI/ha	67,12% B
Virus dose 2 - $6 \times 10^{11}$ CPI/ha	68,32% B
Virus dose 3 - $9 \times 10^{11}$ CPI/ha	93,43% C
Prod. quím. – Methoxifenoziide 16,8g i.a/ha	87,91% C

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

Na testemunha, 9,53% das lagartas encontradas apresentaram algum tipo de alteração morfológica (tegumento amarelado ou escuro) ou estavam mortas. Esse índice de mortalidade pode ter ocorrido por uma eventual deriva no momento das pulverizações (embora a distância entre os tratamentos fosse maior que a distância da projeção da calda liberada pelo canhão acoplado ao trator), ou ainda pela ação de outros inimigos naturais de *C. vestigialis*, que não foram determinados nesse estudo.

No sétimo dia após as pulverizações, nenhum dos tratamentos testados apresentou eficiência máxima, ou seja, 100% de mortalidade para as lagartas de *C. vestigialis* avaliadas. No entanto, foi possível verificar que mesmo a menor concentração viral ( $3 \times 10^{11}$  CPI/ha), provocou uma mortalidade de 67,12%, que não diferiu significativamente da segunda concentração ( $6 \times 10^{11}$  CPI/ha), que provocou 68,32% de mortalidade.

Esses resultados porém, diferiram significativamente da maior concentração ( $9 \times 10^{11}$  CPI/ha), que resultou em 93,43% de mortalidade, que por sua vez igualou-se estatisticamente ao produto químico (methoxifenoziide), que apresentou 87,91% de mortalidade, demonstrando a eficiência do vírus em condições de campo, mesmo com a ocorrência de uma chuva de 12 mm a 1:10 h após o término das pulverizações.

Os dados obtidos nesse bioensaio, confirmam os resultados obtidos no item 5.1, quanto ao tempo letal médio de ação do vírus de 7,48 dias. Pois sete dias após as pulverizações, foi possível encontrar lagartas mortas e lagartas que apresentavam alguns movimentos e sintomas típicos de virose, que conseqüentemente iriam causar a morte das lagartas infectadas.

Outro dado observado nesse bioensaio, que é condizente com os experimentos de laboratório, diz respeito ao tamanho das lagartas e ação do vírus. Foi possível verificar que, embora não tenha sido realizada avaliação quanto ao tamanho das lagartas relacionando esses com ínstars, as lagartas maiores eram as que ainda apresentavam movimentos, enquanto as menores já estavam mortas, confirmando também que a ação do vírus é diferente de acordo com o ínstar (item 5.4), ou seja, quanto mais jovem a lagarta, no momento da aplicação do vírus, mais rápida a ação do mesmo.

Uma observação que deve ser salientada é que não existem informações quanto ao tempo de permanência ou viabilidade do CvMNPV em campo. Fato que precisa ser estudado, pois será de grande importância no planejamento das atividades práticas de controle, bem como poderá ser constatada a influência de parâmetros climáticos (chuva, luz, radiação UV, etc.) sobre o vírus.

No caso específico desse bioensaio, existe uma evidência de que a chuva de 12 mm ocorrida 1 hora após a aplicação, não teve influência sobre as doses testadas, pois ocorreu um nível expressivo de mortalidade, havendo indícios de que mesmo com chuva as suspensões virais ficaram aderidas às folhas. Tudo indica que isso ocorreu por influência da maneira como as suspensões foram preparadas, que foi a semi-purificação, que não eliminou as partículas de gordura do inseto hospedeiro. Com isso, é provável que essas partículas de gordura tenham facilitado a aderência do vírus na folha, reduzindo o impacto da chuva, bem como, dificultaram a ação dos raios UV sobre partículas virais, conforme observações feitas por BATISTA FILHO et al. (2001).

Também deve ser considerada a arquitetura frondosa das copas das plantas do gênero *Populus*, que pode ter dificultado a entrada e ação dos raios UV. Outro fato

relevante que pode ter influenciado a persistência do vírus, foi a observação de lagartas pequenas mortas e lagartas pequenas ainda com movimentos. É provável que as lagartas que ainda apresentavam movimentos se infectaram mais tardiamente que as lagartas que já estavam mortas. Fato que pode indicar que as lagartas que eclodiram após a aplicação do vírus também vieram a ser infectadas.

Essa infecção pode ter ocorrido pela persistência do vírus nas folhas ou ainda por uma contaminação das folhas a partir de lagartas que morreram em um período menor de tempo e que tiveram seu tegumento rompido pela ação mecânica do vírus, liberando assim novas partículas virais. Se isso de fato aconteceu, esse protocolo está de acordo com as observações de SECCHI (2002), que em estudos realizados para a lagarta-da-soja, afirma que uma aplicação bem sucedida de baculovírus é suficiente para manter o controle durante o ciclo da cultura, porque há uma reposição e redistribuição do vírus, devido aos focos deixados pelas lagartas mortas e pela grande quantidade de inóculos depositados na lavoura.

Dessa forma, é importante ressaltar que a permanência e persistência no meio ambiente, é uma das principais vantagens do inseticida biológico à base de vírus sobre a maioria dos inseticidas químicos, principalmente os de ação de contato que possuem um poder residual muito curto. Constatação que também é demonstrada por MOSCARDI (1998), que cita que os vírus possuem a capacidade de se multiplicar no hospedeiro, o que permite sua prevalência e disseminação no ambiente da praga, podendo mantê-la abaixo de níveis críticos para a cultura, após sua aplicação.

Também deve ser considerado que ao contrário da maioria dos produtos químicos, os vírus entomopatogênicos não se acumulam em cadeias alimentares nem são degradados em substâncias secundárias indesejáveis, além disso, são agentes seletivos que agem somente sobre a praga-alvo, trazendo a população dessa para o nível de equilíbrio.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, concluiu-se que:

- O vírus entomopatogênico CvMNPV é eficiente no controle da *C. vestigialis* em condições de laboratório e campo;
- A concentração letal ( $CL_{50}$ ) de CvMNPV para lagartas de *C. vestigialis* de 3º instar é de  $0,8 \times 10^7$  CPI/mL de solução aquosa e o tempo letal ( $TL_{50}$ ) de ação é de 7,48 dias;
- O vírus (CvMNPV) é patogênico a lagartas de *C. vestigialis*, sendo que ínstaes iniciais são os mais suscetíveis;
- Um grama de lagartas mortas pelo vírus apresenta, em média,  $10^{10}$  corpos poliédricos de inclusão do vírus;
- Lagartas de terceiro ínstar de *C. vestigialis* infectadas por concentrações de  $10^7$  e  $10^8$  CPI/mL de suspensão aquosa, tem redução acentuada no consumo foliar, quando comparadas com lagartas sadias;
- Ocorre redução de três dias no tempo de alimentação de lagartas de terceiro ínstar infectadas com suspensão viral aquosa de  $10^8$  CPI/mL, em relação a lagartas sadias;
- Suspensões aquosas na concentração de  $9 \times 10^{11}$  CPI/ha de vírus (CvMNPV), quando aplicados via atomizador tipo canhão (200L/ha) controlam eficientemente lagartas de *C. vestigialis*;
- Para a preparação e utilização em condições de campo da concentração viral de  $9 \times 10^{11}$  CPI/ha, seriam necessárias 90g de lagartas mortas pelo vírus.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram isolamento, identificação e testes de viabilidade do vírus de poliedrose nuclear múltipla de *C. vestigialis*, em laboratório e em campo. No entanto, para que seja possível a obtenção de resultados mais consistentes quanto ao controle da praga em plantios de Álamo através do uso do vírus em um programa de manejo integrado, torna-se necessário a realização dos seguintes estudos complementares:

- Desenvolvimento de métodos e técnicas economicamente viáveis para a produção massal do vírus em laboratório;
- Determinação em campo do nível de dano econômico de *C. vestigialis* em plantios comerciais de álamo;
- Avaliação em campo do tempo de persistência da atividade do vírus sobre folhas de álamo;
- Testes com aplicações aéreas do vírus exclusivamente com água, com espalhante adesivo, e com mesclas com outros produtos biológicos, como o *Bacillus thuringiensis* e misturas com produtos fisiológicos;
- Estabelecimento de métodos de monitoramento de populações iniciais da praga, para determinar a aplicação do vírus no momento mais adequado para seu controle.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, S.B. Vírus entomopatogênico. In: (Coord.). In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Manole, 1986. p. 171-87.

ALVES, S.B. CONTROLE MICROBIANO DE INSETOS . In:CROCOMO,W.B.(Org.). **Manejo integrado de pragas**. São Paulo : CETESB, 1990. p.147-176.

ANDRADE, F.G.; NEGREIRO,M.C.C.; FALLEIROS, A.M.F. **Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia*(AGMNPV)**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 71, n3, p. 391 -398, jul/set 2004.

BALATINECZ,J.J., and KRETSCHMANN, D.E. Properties and utilization of poplar wood. In: DICKMANN,D.I.; ISEBRANDS,J.G.; ECKENWALDER,J.E.; RICHARDSON,J.(Ed.). **Poplar culture in North America**. Ottawa , Canada. NRC Research Press,2001. p.277-291.

BATISTA FILHO,A., ALVES,S.B., AUGUSTO,N.T., PEREIRA,R.M.ALVES,L.F.A. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). **Neotropical Entomology**,v.30,n.3, 2001. p.411-416.

BRADSHAW, H.D.,Jr. **Why study the genetics and hybrid poplar?** Disponível em <<http://poplar2.cfr.washington.edu/pmgc/whypopgen.htm> > Acesso em 23 de maio de 2005.

CASTRO, M.E.B. ; SOUZA, M.L.; SIHLER,W.; RODRIGUES,J.C.M.; RIBEIRO,B.M. **Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil**. Pesq.agropec.bras.,Brasília,v.34,n.10, p. 1733-1761, out.1999.

CASTRO, M.E.B.; RIBEIRO, Z.M.A.; SOUZA,M.L.;SOUSA,N.J.; MOSCARDI, F. **Identificação do baculovirus da lagarta-do-álamo *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera:Pyralidae)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 9p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 87).

CASTRO, M.E.B.; SANTOS, A.C.B.; RIBEIRO, Z.M.A.; SOUZA, M.L.; SOUSA, N.J. **Análise de proteínas estruturais e de DNA do baculovírus *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 17p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 62).

COYLE, D.R.; et al . Cottonwood leaf beetle defoliation impact on Populus growth. In: ISEBRANDS, J.G and RICHARDSON, J. (Comp.). **21<sup>st</sup> Session of International Poplar Commission (IPC2000) Poplar and Willow Culture: Meeting the needs of Society and the Environment**. North Central Research Station , USDA Forest Service , St. Paul, Minnesota , 2000. p.42.

CORY, J.S.; MYERS, J. **The ecology and evolution of insect baculovirus**. Annu. Rev. Ecol. Syst. 2003. 34: 239-72

CORRÊA, F.A.S.F. **Criação em laboratório de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) com diferentes dietas artificiais**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Curso de Pós –Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

CROCOMO, W. B. O que é Manejo de Pragas. In: CROCOMO, W. B. (Org.) **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: CETESB, 1990. p. 9-34

DICKMANN , D.I. An overview of the genus *Populus*. In: DICKMANN, D.I.; ISEBRANDS, J.G.; ECKENWALDER, J.E.; RICHARDSON, J. (Ed.). **Poplar culture in North America**. Ottawa , Canada. NRC Research Press, 2001. p.1-42.

DIODATO, M. **Bioecologia, aspectos morfológicos e consumo de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) em *Populus deltoides* Bart. ex Marsh. (Salicaceae)**. Curitiba, 1999. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós – Graduação em Entomologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

DIODATO, M.A. & PEDROSA-MACEDO, J.H. **Presencia de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera : Crambidae) sobre *Populus spp.* en el Brasil**. Quebracho, Santiago del Estero, Argentina, n. 4, p.17-19, out.1996.

FAO. **Poplars and willows in wood production and land use**. Roma, Itália, 1979. 328p.

FAO. Síntesis de los informes nacionales de progreso recibidos, elaborados para a 22ª Reunión de la Comisión Internacional del Álamo, organizada conjuntamente por la FAO y las Comisiones Nacionales del Álamo de Chile e Argentina; Santiago de Chile 2004. 43p.

FEDERICI, B.A. Ultrastructure of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A. (Eds). **The biology of baculoviruses**. Florida : CRC Press, 1986, V 1. p. 61 - 88.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L.K. (Ed.) **The Baculoviruses**. New York : Plenum press, 1997. p.33-59.

GRANADOS, R.R. WILLIAMS, K.A., 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A. (Eds). **The biology of baculoviruses**. Florida: CRC Press, 1986 v.1 , p. 89-108.

MARACAJÁ, P.B.; OSUNA, E.V.; ÁLVAREZ, C.S. **Histopatología do vírus da poliedrose nuclear de *Heliothis armigera* (VPNH<sub>a</sub>) em larvas dos hospedeiros primários e alternativo *Spodoptera exigua***. Caatinga, Mossoró –RN, 12(1/2):35-40, dez. 1999.

MARQUES, E. N. et al. Ocorrência de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera : Pyralidae) em povoamentos de Álamo *Populus* spp. No município de São Mateus do Sul - Paraná. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**. Curitiba, v. 14. n. 1/2, p. 229-230, 1995.

MATTSON, W.J., et al. Insect pests of populus : coping with the inevitable. In: DICKMANN, D.I.; ISEBRANDS, J.G.; ECKENWALDER, J.E.; RICHARDSON, J. (Ed.). **Poplar culture in North America**. Ottawa , Canada: NRC Research Press, 2001. p.219-248.

MONTOR, W.R., et al. Insetos como biofábricas de proteínas humanas. São Paulo. In: **Ciência Hoje**, v.33, nº 196, pp.17-23, 2003.

MORRIS, R.C.; et al. **Insects and diseases of cottonwood**. Forest Service general technical report SO-8; USA, Southern Forest Experiment Station, 1975. 37p.

MOSCARDI, F. **Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis***. Comunicado Técnico 23. Embrapa – CNPSo.1983

MOSCARDI, F. **Assessment of application of baculoviruses for control of *Lepidoptera***. Annual Review of Entomology 44 : 1999. p.257-89

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênico em campo. In: ALVES,S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**.2. ed. Piracicaba: Fealq, 1998. p.509-539.

MOSCARDI, F.; et al. An overview of the program for use of nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* in soybean and recent achievements to improve the program. In : **World Soybean Research Conference, 8; International Soybean Processing and Utilization Conference, 4; Congresso Brasileiro de Soja, 3**. Londrina ; Embrapa Soja, 2004, p. 52.

NEWCOMBE, G. et al. Poplar diseases. In: DICKMANN,D.I.; ISEBRANDS,J.G.; ECKENWALDER,J.E.; .RICHARDSON,J.(Eds.). **Poplar culture in North America**. Ottawa , Canada. NRC Research Press, 2001. p. 249-276.

OLIVER, J.M.M.. **Chopos Y choperas**. Madrid, Ediciones Mundi – Prensa , 1988, 124p.

ORLATO, C. **Avaliação do TaV (Thyrinteina anobia virus) no controle de *Thyrinteina anobia* (Lepidoptera:Geometridae)**. Botucatu – SP. Dissertação (Mestrado em Agronomia ) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Agronômicas , área de concentração em Proteção de Plantas, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, 2002.

OSTRY, M.E.; et al . **A guide to insect, diseases and animal pests of poplars**. Agriculture Handbook 766. Washington, DC:U.S. Department of Agriculture, 1988. 118p.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA,E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S.B. (Coord). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba : FEALQ, 1998. p.481-504.

ROHRMANN, G.F. Evolution of occluded baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.& FEDERICI, B.A. Eds. **The Biology of baculoviruses**. Florida: CRC Press, 1986 v.1 , p. 203-215.

SANTIAGO-ALVAREZ, C.; VARGAS-OSUNA, E. Differential Mortality between male and female *Spodoptera littoralis* larvae infected with a baculovirus. **Journal of invertebrate Pathology** 47, 1986. 374 -376.

SANTOS, B. **Avanços na produção massal de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas com seu vírus de poliedrose nuclear, em laboratório e do bioinseticida à base desse vírus**. Curitiba. 2003. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas , area de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná.

SECCHI, V.A. Baculovírus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecol. e Desenv.Rur.Sustent.**, Porto Alegre, v.3, n.3, jul/set 2002 p.49-54

SOUSA, N. J. **Classificação de inseticidas e simulação de um programa de manejo de resistência para a mariposa-do-álamo ( *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) – Lepidoptera : Crambidae)**. Curitiba, 2002. Tese ( Doutorado em Ciências Florestais) – Curso de Pós –Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

SOUSA, N.J. Entrevista concedida a Edilene Buturi Machado. Curitiba, setembro, 2005.

TILESSE, V.de & NEF,. **Les insectes dommageables au peuplier**. Disponível em <<http://www.fao.org/DOCREP/004/AC489F/AC489F00.html>> Acessado em 24/10/2004.

TREFFLICH, K.; PORTELA, V. Levantamento de inimigos naturais de *Condylorrhiza vestigialis* (Lepidoptera : Pyralidae) em plantios de *Populus spp*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPR, 5., 1997, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1997. p. 187.

TREFFLICH, K. Efeito da dieta e da temperatura sobre *Condylorrhiza vestigialis* em *Populus spp*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPR, 6., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p. 215.

TREFFLICH K.; SOUSA, N. J. Estudos de alternativas de controle de *Condylorrhiza vestigialis* em plantios de *Populus spp.* In: Pesquisa Florestal Online, 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 2000a. p. 44.

TREFFLICH K.; SOUSA, N. J. Eficiência de três produtos químicos para o controle de *Condylorrhiza vestigialis* Guenée, 1854 (Lepidoptera - Pyralidae). In: SEMINÁRIO DE ATUALIDADES EM PROTEÇÃO FLORESTAL, 2000b, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPEF, 2000b. p. 182.

VALADARES –INGLIS, M. C. C. ;SHILLER,W.; DE-SOUZA, M.T. Engenharia Genética de Microorganismos agentes de controle Biológico. In: MELO,I.S. & AZEVEDO,J.L. (Eds). **Controle Biológico**. São Paulo: Embrapa, 1998. p. 201 -230.

ZONTA,R.C. **Consumo e utilização do alimento por *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 (Lepidoptera:Noctuidae) infectada com vírus de poliedrose nuclear (VPN) e *Nomurae rileyi* (Farlow) Samsom.** Curitiba, 1987. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas , área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná.