

TALITA MORETTO ALEXANDRE

**ESTRATÉGIAS PARA O MANEJO INTEGRADO DA *Pseudoplusia includens* (WALKER)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE, PLUSIINAE) EM SOJA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de “Doutor em Ciências” no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Entomologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Flávio Moscardi

Curitiba – PR

2010

Aos meus pais, Sônia e José Ruy.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque sem ele não teria conseguido chegar até aqui.

Ao Dr. Flávio Moscardi, meu orientador, a quem tenho grande admiração pelo exemplo de dedicação à Entomologia.

Ao programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal do Paraná, a todo seu corpo docente.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja), especialmente a equipe de Entomologia pela amizade e colaboração.

Aos pesquisadores da Embrapa Cenargen: Dra. Maria Elita Batista de Castro, pela colaboração direta na elaboração deste trabalho.

Aos pesquisadores da Embrapa Soja, Dra. Beatriz Corrêa Ferreira e Adeney de Freitas Bueno pela colaboração na elaboração desse trabalho.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Entomologia, Fábio Paro, Ivanilda Sodório, Jairo, Jovenil pela ajuda, sem eles não seria possível concluir esse trabalho.

Aos funcionários de campo, Antônio Pavão, Elias, Walter, Wilson, Nivaldo pela ajuda nos trabalhos de campo.

A Regiane Bueno, sempre prestativa, pela colaboração desse trabalho.

Às amigas: Maria Helena Brustolin, Lilian Mayer, Ghislaine Bordin, que apesar da distância sempre se fizeram presentes em minha vida.

A Simone Prado pelos bons momentos que passamos juntos e pela ajuda nesse trabalho sempre muito prestativa.

As amigas: Rose, Tânia, Patrícia Santoro, Beatriz, Dania por me ajudar nos momentos mais difíceis sempre me apoiando, ouvindo minhas choradeiras.

Ao amigo Fábio Paro por me ouvir, me dar conselhos e sempre foi meu segundo orientador.

A amiga e colega de trabalho Fabiane Cunha pela amizade e ajuda direta na realização desse trabalho.

Aos meus pais Sônia e José Ruy, à minha irmã Tarcila e meu sobrinho Vinícius, por representarem em minha vida, a verdadeira essência do amor.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOSiii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xv

CAPÍTULO 1

Introdução geral e Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução	1
1.2. Objetivos	3
1.3. Revisão Bibliográfica	4
1.4. Literatura citada	18

CAPÍTULO 2

Práticas de controle utilizadas na cultura da soja e seu impacto na população de *Pseudoplusia includens* (Walker) e seus inimigos naturais.

2.1. Introdução.....	31
2.2. Material e métodos	35
2.3. Resultados e discussão	36
2.4. Literatura citada	47

CAPÍTULO 3

Atividade de um Nucleopoliedrovirus e de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra a lagarta-falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker).

3.1. Introdução	51
3.2. Material e métodos	53
3.3. Resultados e discussão	58
3.4. Literatura citada	72

CAPÍTULO 4

Avaliação de sete isolados virais como potenciais agentes de biocontrole em *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae).

4.1. Introdução	79
4.2. Material e métodos	81
4.3. Resultados e discussão	86
4.4. Literatura citada	95
Considerações finais	103

RESUMO

Com o objetivo verificar o potencial do nucleopoliedrovirus de *P. includens* (PsinNPV) em campo e laboratório, bem como o desenvolvimento de táticas de controle que sejam compatíveis com o programa de controle biológico de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner); Foram realizados diferentes experimentos, incluindo a determinação da influência de práticas de controle de pragas sobre a população de *Pseudoplusia includens* e seus inimigos naturais, avaliação de alguns parâmetros de virulência do vírus em laboratório, determinação do potencial do vírus e alguns inseticidas em campo, avaliação da virulência de algumas proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), e a comparação de isolados do PsinNPV em relação aos aspectos morfológicos, moleculares e atividade biológica. Através dos experimentos utilizando diferentes táticas de manejo da soja, em Londrina, PR: i) Produtor, ii) MIP e iii) Controle Biológico, verificou-se que o tratamento do Produtor nas três safras avaliadas apresentou maior número de *P. includens* e em algumas safras o número de inimigos naturais foi menor para esse tratamento. A concentração letal média (CL₅₀) do PsinNPV para lagartas de 2º e 3º instar foram, respectivamente, 3770, 4234 CPI/ml. O tempo letal médio (TL₅₀) para lagartas de 2º instares foi menor que para de 3º instar, com uma diferença de aproximadamente dois dias. Os resultados da CL₅₀ em casa de vegetação foram semelhantes aos obtidos em laboratório. Resultados de campo com o PsinNPV e inseticidas químicos, de um modo geral, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ou então tiveram baixa a média eficiência, principalmente ao longo das datas de amostragem após aplicação dos produtos. As proteínas de *B. thuringiensis* testadas, com exceção da Cry 2A, foram tóxicas a *P. includens*. Em relação à morfologia dos baculovírus de diferentes localidades, verificou-se pela microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos corpos de oclusão (OBs) do PsinNPV a presença de até 21

vírions que exibem nitidamente a presença de um único nucleocapsídeo. Com relação à CL_{50} e o TL_{50} dos sete isolados avaliados, observou-se que os isolados IA (da Guatemala), IE (de Iguaraçu, PR, Brasil, safra 2006/07) e IF (de Dourados-MS, Brasil) foram os mais virulentos, ou seja, com a menor CL_{50} contra *P. includens* em relação aos demais isolados testados. Os isolados IA, IE, e IF apresentaram o menor TL_{50} (variando entre 9,18 e 9,50 dias) para matar o inseto hospedeiro, em comparação com os outros isolados (variando entre 10,13 e 13,39 dias).

Palavras-chave: Manejo integrado de pragas; lagarta-falsa-medideira; Baculovírus; controle biológico.

ABSTRACT

This work had the objectives of evaluating the potential of the nucleopolyhedrovirus of *P. includens* (PsinNPV) under field and laboratory conditions, as well as the development of control tactics compatible with the biological control program against the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner). Different experiments were carried out, including the determination of the influence of current control practices on *P. includens* populations and its natural enemies during three consecutive soybean seasons, evaluation of PsinNPV virulence parameters in the laboratory, determination of the potential of this virus and some chemical insecticides in the field, evaluation of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* (Berliner), and comparison of PsinNPV isolates as related to morphological, molecular and biological activity aspects. Regarding experiments comparing control tactics : i) Farmer's Perception, ii) Integrated Pest Management (MIP), and iii) MIP-Biological Control, the former treatment had the highest *P. includens* during the three consecutive seasons and lowest natural enemy numbers. The PsinNPV mean lethal time (LC₅₀) for second and third instar *P. includens* larvae were 3.770 and 4.234 occlusion bodies (OB)/ml. The mean lethal time (LT₅₀) for second instar larvae was lower than that for third instar larvae, with a difference of approximately two days. LC₅₀ values obtained inside the greenhouse were similar to those gotten in the laboratory. Field results with the PsinNPV and some chemical insecticides, as a whole, did not present significant differences among treatments or had low to medium efficiency, mainly throughout the sampling dates after application of the products. The tested toxins of *B. thuringiensis*, with the exception of the Cry 2A, had toxic activity against *P. includens* larvae. All PsinNPV isolates collected in different sites or regions presented several virions (up to 21) per OB and each virion had only one nucleocapsid. The isolates IA (from Guatemala), IE (from Iguaraçu, PR, Brazil), and

IF (from Dourados, MS, Brazil) were the most virulent and presented lower LT_{50} (from 9.18 to 9.50 days), in comparison to the other four tested isolates (from 10.13 to 13.39 days).

Key words: Integrated pest management, soybean looper, Baculovirus, biological control.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1. Inseticidas utilizados em lavoura de soja submetidas a diferentes táticas de manejo nas safras de 2006-2009, em Iguaraçu, PR.	36
Tabela 2.2. Média da produtividade bruta de grãos de soja (kg ha^{-1}) em três safras da soja utilizando diferentes táticas de manejo.	37
Tabela 2.3. Média da produtividade líquida de grãos de soja (kg ha^{-1}) em três safras da soja utilizando diferentes táticas de manejo.	37
Tabela 2.4. Peso médio de 100 sementes em três safras da soja utilizando diferentes táticas de manejo.	38
Tabela 2.5. Número médio de lagartas de <i>Pseudoplusia includens</i> durante três safras, com diferentes táticas de manejo.	42

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1. Concentração letal média (CL_{50}) do PsinVPN em lagartas de 2° e 3° ínstar de <i>Pseudoplusia includens</i>	59
Tabela 3.2. Tempo letal médio (TL_{50}) do PsinVPN em lagartas de 2° e 3° ínstar de <i>Pseudoplusia includens</i> , na concentração de 10,000 CPI/mL de dieta.	59

Tabela 3.3. Número médio de lagartas mortas e percentual de mortalidade de <i>Pseudoplusia includens</i> após aplicação de diferentes dosagens do vírus do inseto e dois inseticidas químicos, em casa de vegetação.	61
Tabela 3.4. Concentração letal média (CL ₅₀) do VPN em lagartas de 3º instar de <i>Pseudoplusia includens</i> em casa de vegetação.	61
Tabela 3.5. Número médio de <i>Pseudoplusia includens</i> em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Iguaraçu-PR (área 1) na safra de 2007-2008.	65
Tabela 3.6. Número médio de <i>Pseudoplusia includens</i> em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Goiás- GO (área 2) na safra de 2007-2008.	66
Tabela 3.7. Número médio de <i>Pseudoplusia includens</i> em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Goiás- GO,(área 3) na safra de 2008-2009.	67
Tabela 3.8. Número médio de <i>Pseudoplusia includens</i> em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Iguaraçu-PR, (área 4) na safra de 2008-2009.	68
Tabela 3.9. Número médio de <i>Pseudoplusia includens</i> em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Goiás-Go,(área 5) na safra de 2008-2009.	69
Tabela 3.10. Concentração letal média (CL 50) de diferentes proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> em lagartas de 3º instar de <i>Pseudoplusia includens</i>	71
Tabela 3.11. Mortalidade e Peso médio de proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> em lagartas de 3º instar de <i>Pseudoplusia includens</i>	71

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1. Isolados virais obtidos a partir de lagartas infectadas de <i>Pseudoplusia includens</i>	82
Tabela 4.2. Média das concentrações letais (CL ₅₀) obtidos de lagartas de terceiro ínstar de <i>Pseudoplusia includens</i> infectados com diferentes isolados (PsinSVPN).	93
Tabela 4.3. Tempo Letal Médio (TL ₅₀) obtido para lagartas de terceiro ínstar <i>Pseudoplusia includens</i> infectados com diferentes isolados (PsinNPV) na concentração de 2,500 OB/mL de dieta.	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1. Etapas do ciclo biológico e características de injúria na folha de soja por *Pseudoplusia includens*. A– Lagarta; B – Pupa; C – Adulto; D – Sintomas de ataque e injúria causada por lagarta de *P. includens* em folhas de soja. Fotos: Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno. 8
- Figura 1.2. Estrutura do corpo de oclusão do baculovírus. A) Micrografia eletrônica de varredura da superfície de corpos de oclusão (poliedros) de um *nucleopolyhedrovirus*; B) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando múltiplas partículas virais envelopadas (ODV), no interior de um poliedro; C) Desenho esquemático da organização interna de um poliedro. 11

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1. Flutuação populacional ao longo do tempo de *Pseudoplusia includens* na safra de 2006-2007 utilizando diferentes táticas de manejo. 39
- Figura 2.2. Flutuação populacional ao longo do tempo de *Pseudoplusia includens* na safra de 2007-2008 utilizando diferentes táticas de manejo. 40
- Figura 2.3. Flutuação populacional ao longo do tempo de *Pseudoplusia includens* na safra de 2008-2009 utilizando diferentes táticas de manejo. 41

Figura 2.4. Número médio de inimigos naturais da <i>Pseudoplusia includens</i> na safra de 2006-2007 utilizando diferentes táticas de manejo. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.	44
Figura 2.5. Número médio de inimigos naturais da <i>Pseudoplusia includens</i> na safra de 2007-2008 utilizando diferentes táticas de manejo. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.	45
Figura 2.6. Número médio de inimigos naturais da <i>Pseudoplusia includens</i> na safra de 2008-2009 utilizando diferentes táticas de manejo. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.	46

CAPÍTULO 3

Figura 3.1. Gaiola de acrílico das mariposas de <i>Pseudoplusia includens</i>	54
Figura 3.2. Pupas em caixa de Gerbox dentro da gaiola.....	54
Figura 3.3. Copo contendo dieta e na tampa papel com ovos de <i>Pseudoplusia includens</i>	54
Figura 34. Prateleiras com copos contendo lagartas de <i>Pseudoplusia includens</i>	54

CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Microscopia eletrônica de transmissão de corpos de oclusão (OB) do baculovirus <i>Pseudoplusia includens</i> nucleopoliedrovírus simples (PsinSVPN). Barra representa 2 μ m (a). Corpo de oclusão mostrando vírions contendo um único nucleocapsídeo (NC) por envelope (S - simples).	87
---	----

Figura 4.2. Banda intensa detectada no perfil de cada isolado correspondente a proteína poliedrina (P), similar a do baculovirus AgMVPN (Ag2D) de aproximadamente 33kDa.
..... 88

Figura 4.3. Análise de DNA de sete isolados virais de *Pseudoplusia includens* clivado com enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I. Eletroforese em gel de agarose 1%. Isolados virais: I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F e I-G. M: marcadores – 1kb plus DNA Ladder (a, b, c) e DNA λ /PstI (d). 90

CAPÍTULO 1

1.1. Introdução Geral

A soja, *Glycine max* (Merril) (Fabaceae), é um dos mais importantes produtos de exportação do Brasil e tem como principal praga desfolhadora a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hubner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) (Embrapa 2006). No entanto, atualmente, nas principais regiões do país, outras lagartas vêm causando danos expressivos à cultura, incluindo a lagarta-falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker 1857) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-enroladeira-das-folhas, *Omiodes indicata* (Fabricius 1775) (Lepidoptera: Pyralidae) e várias espécies do gênero *Spodoptera* como a lagarta-das-vagens, *S. eridania* (Cramer 1782), a lagarta-do-cartucho-do-milho, *S. frugiperda* (Smith 1797) e *S. cosmioides* (Walker 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) (Embrapa 2006).

A lagarta-falsa-medideira era considerada de menor importância, pois era controlada naturalmente por parasitóides e fungos entomopatogênicos. Entretanto, com o aumento do plantio direto no País, a maioria dos produtores de soja, quando aplicam herbicidas pós emergentes na soja, logo no início do desenvolvimento da cultura, têm utilizado a tecnologia equivocada de misturar com o herbicida, inseticidas de amplo espectro de ação, como os piretróides, afetando todo o complexo de inimigos naturais presentes na cultura, desencadeando surtos de altas populações de insetos, como a *P. includens*, em várias regiões, demandando várias aplicações posteriores de inseticidas de amplo espectro na cultura, impossibilitando, em muitos casos o uso de inseticida

biológico a base de um Baculovírus (AgMVPN) contra a lagarta-da-soja, *A. gemmatalis* (Moscardi 2008).

Além disso, com a crescente utilização de fungicidas para o controle da ferrugem asiática e outros fitopatógenos em soja, esses produtos podem estar contribuindo também para a redução de fungos entomopatógenos importantes para o controle natural de *P. includens* e outros Plusiinae (Livingston *et al.* 1980; Sosa-Gómez 2006), levando ao aumento populacional desses insetos em várias regiões do País. Entre as safras de 2003/2004 a 2007/2008 vários surtos foram constatados em diversos estados brasileiros (MS, GO, SP e PR), ocorrendo isoladamente ou associados à lagarta-da-soja, onerando os custos de produção e os riscos de intoxicação e de poluição do meio ambiente.

O controle químico da *P. includens*, a principal tática de controle utilizada pelos agricultores, não tem sido eficiente em algumas regiões, principalmente pelo hábito dela permanecer na porção inferior da planta e assim calda inseticida não atingi-la. Dessa forma, o controle exige o uso de produtos em doses elevadas, o que diminui ainda mais a população dos inimigos naturais que permanecem na cultura. Como consequência desse desequilíbrio biológico, a lagarta falsa-medideira, que sempre teve importância secundária na cultura, agora está se tornando um grande problema à produtividade da soja (Molina 2007).

Para o controle de pragas, diante desse quadro, deve-se optar por uma visão inter e multidisciplinar integrando-se diversos métodos de controle menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente. Nesse contexto, a adoção de táticas complementares para o êxito no controle de insetos-pragas pode ser incorporada no sistema, dentro da filosofia do Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Panizzi 2006). A utilização de entomopatógenos para o controle da lagarta-falsa-medideira apresenta-se como alternativa desejável. Um Nucleopolidrovírus (VPN) de *P. includens* foi isolado

de espécimes coletados na Guatemala em algodoeiro por Livingston & Yearian (1972), o qual se encontra disponível na coleção de vírus entomopatogênicos da Embrapa Soja, Londrina, PR. Por outro lado, há relatos sobre o controle do inseto pela bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Berliner) em outros países. Ambos agentes de controle biológico têm sido pouco estudados no Brasil para o controle do inseto.

Assim este trabalho estudou em laboratório e campo o potencial do baculovírus da *P. includens*, bem como o desenvolvimento de táticas de controle que sejam compatíveis com o programa de controle biológico de *A. gemmatalis*.

1.2. Objetivos

O estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a influência de práticas de controle de pragas sobre a população de *Pseudoplusia includens* e seus inimigos naturais na cultura da soja;
- Determinar parâmetros de virulência, em laboratório, do vírus poliedrose nuclear (VPN) de *Pseudoplusia includens*;
- Determinar parâmetros de virulência, em casa de vegetação, do vírus poliedrose nuclear (VPN) em lagartas de *Pseudoplusia includens*;
- Avaliar, em campo, a eficiência do vírus (VPN) e diferentes inseticidas para o controle de *Pseudoplusia includens*;

- Determinar parâmetros de virulência, em laboratório, do diferentes proteínas Cry em lagartas de *Pseudoplusia includens*;
- Avaliar e comparar os isolados virais de diferentes localidades em relação aos aspectos morfológicos, moleculares e atividade biológica em *Pseudoplusia includens*;

1.3. Revisão Bibliográfica

1.3.1. Distribuição geográfica e hospedeiros de *Pseudoplusia includens*

A subfamília Plusiinae compreende espécies que são importantes pragas agrícolas, sendo que das lagartas que atacam a soja, *P. includens* é a espécie mais abundante, tendo distribuição restrita ao hemisfério ocidental, ocorrendo desde o norte dos EUA até o sul da América do Sul (Alford & Hammond Junior 1982; Eichlin & Cunningham 1978). A sua importância resulta do grande número de hospedeiros, que pode chegar a 73 espécies de plantas pertencentes a 29 famílias. Dentre as plantas hospedeiras, há culturas de grande importância econômica, como a soja, o algodoeiro, o feijoeiro, o fumo, o girassol e várias hortaliças (Herzog 1980; Eichlin & Cunningham 1978). Apesar de somente a uns seis anos *P. includens* ter assumido importância na cultura da soja no Brasil, o inseto é considerado nos EUA, há muito tempo, praga-chave da cultura, principalmente no Sudeste, pois seus danos geralmente são grandes, exigindo medidas de controle em várias épocas durante todo o ciclo da planta (Kogan & Turnipseed 1987).

1.3.2. Aspectos biológicos de *Pseudoplusia includens*

As lagartas, nos primeiros ínstaes, selecionam as folhas mais tenras, alimentand-se o daquelas com pequena quantidade de fibra (Kogan & Cope 1974) (Fig. 1.1), tornando-se menos exigentes à medida que se desenvolvem. Até o terceiro ínstar, as lagartas deixam intactas regiões da epiderme; entretanto, a partir do quarto ínstar, consomem grandes áreas, mantendo, porém, íntegras as nervuras principais, o que confere um aspecto rendilhado característico às folhas atacadas

(Herzog 1980). Em trabalhos realizados na Geórgia, EUA, *P. includens* apresentou período de desenvolvimento lagarta-adulto de 26,5 e 31,7 dias, quando alimentada com folhas de soja e algodoeiro, respectivamente (Mitchel 1967).

O tempo de desenvolvimento, peso das pupas e consumo de área foliar de soja, foram estudados na Florida, EUA, por Reid & Greene (1973), em laboratório mantido a 29°C e 14 h de fotofase. A duração do estágio larval foi de 13,7 dias, com total de seis ínstaes larvais. O peso das pupas com 24 h de idade, foi de 193,4 mg, similar ao obtido quando os insetos foram criados em dieta artificial (183,3 mg), porém, ambos menores do que quando as pupas eram coletadas no campo (214 mg).

No Brasil, em criações de laboratório, foi observado que o ovo de *P. includens* é depositado de forma isolada, com diâmetro de 0,52 mm a 0,53 mm, de cor amarelo brilhante com 31 a 33 cristas radiais e distintas costas transversais, sendo que a alimentação em dieta artificial pode alterar a coloração dos ovos. O período de incubação, a 25°C, é de três dias. A viabilidade dos ovos pode variar de 39,7% a 100%, sendo essas diferenças, relacionadas, principalmente, às metodologias utilizadas nas pesquisas (Young & Yearian 1982; Jensen; Newsom; Gibbens 1974; Mitchel 1967; Beach & Tood 1985).

O início para transformação em pré-pupa é visualizado por uma acentuada mudança de coloração. Nesta transformação em pré-pupa ocorrem alterações no sistema hormonal, envolvendo: parada na alimentação, mudança para coloração verde amarelada uniforme, liberação do último “pellet” fecal de coloração amarelo brilhante, início da construção do casulo, perda de mobilidade e transformação em pupa (Vázquez 1986).

No campo, para transformar-se em pupa, *P. includens* geralmente enrola-se nas folhas e tece um fino casulo de seda (Shorey *et al.* 1962) (Fig. 1.1). A pupa é de coloração verde clara brilhante,

mantendo esta coloração até 48 horas antes da emergência, quando adquire a coloração marrom escura (Vázquez 1986).

A longevidade dos adultos é muito variável podendo variar de 9,8 até 18,2 dias (Mason & Mack 1984). O número total médio de ovos pode variar de 144 a 1953 ovos, sendo que 80 a 90% do total de ovos são colocados até o sétimo dia (Vázquez 1986) (Fig. 1.1).

Paralelamente à infestação do complexo de lagartas, um grande número de inimigos naturais está normalmente presente em lavouras de soja, sendo responsáveis muitas vezes, pela manutenção das populações dos insetos-pragas em níveis reduzidos, sem que haja a necessidade de se tomarem medidas de controle na cultura (Embrapa 2000).

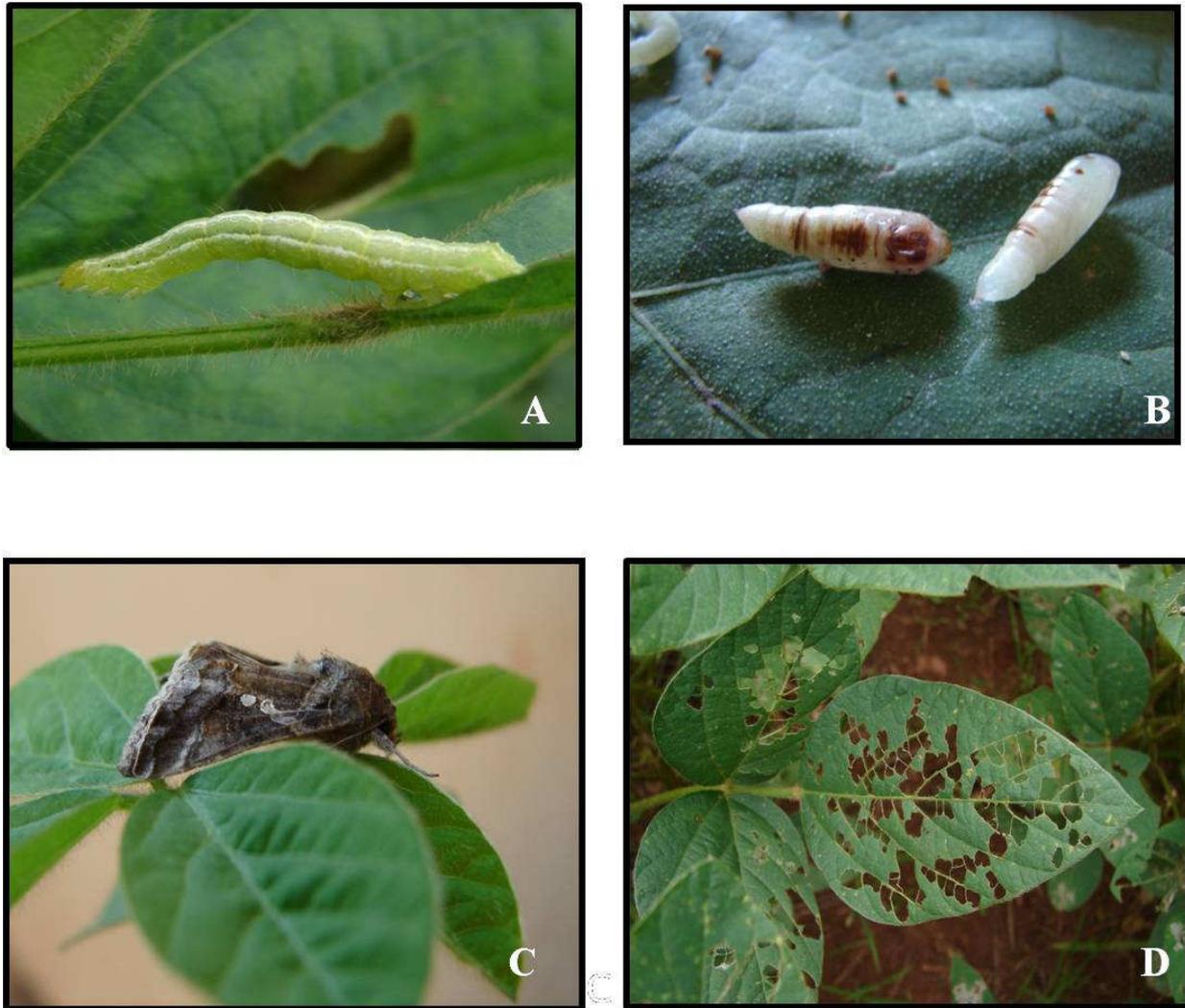


Figura 1.1. Etapas do ciclo biológico e características de injúria na folha de soja por *Pseudoplusia includens*. A– Lagarta; B – Pupa; C – Adulto; D – Sintomas de ataque e injúria causada por lagarta de *P. includens* em folhas de soja. Fotos: Regiane Cristina Oliveira de Freitas Bueno.

1.3.3. Inimigos naturais associados à *Pseudoplusia includens*

Dentre os grupos de inimigos naturais que ocorrem em *P. includens* estão referidos os predadores *Orius* sp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Nabis* sp., *Tropiconabis* sp. (Hemiptera: Nabidae),

Geocoris sp. (Hemiptera: Lygaeidae), *Calosoma granulatum* (Pentz, 1830), *Lebia* sp., *Callida* sp. (Coleoptera: Carabidae), *Podisus* sp. (Hemiptera: Pentatomidae), *Eriopis* sp. (Coleoptera: Coccinellidae), *Chrysopa* sp. (Neuroptera: Chrysopidae) e *Doru lineare* (Eschscholtz, 1822) (Dermaptera: Forficulidae), os parasitóides *P. similis*, *Euplectrus chapadae* (Ashmead 1904) (Hymenoptera: Eulophidae), *Microcharops* spp. (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Copidosoma truncatellum* (Dalman) (Hymenoptera: Encyrtidae), parasitóides de ovos do gênero *Trichogramma* (Trichogrammatidae) e os entomopatógenos, representados principalmente por baculovírus (vírus de poliedrose nuclear da *A. gemmatilis* – (AgMVPN) e de *P. includens*- (PsinSVPN) e pelo fungo *Nomuraea rileyi* (doença branca) (Farlow), *Entomophthorales* tais como *Pandora* sp. e *Zoophthora* sp. (doença marrom). (Embrapa 2000).

Entre os inimigos naturais, os parasitóides de ovos de *Trichogramma* spp são agentes de controle biológico com potencial de uso no manejo integrado de *P. includens*. Estudos com esses parasitóides vêm sendo conduzidos em mais de 50 países e liberações inundativas realizadas comercialmente em cerca de 32 milhões de hectares todo ano (Parra *et al.* 2002). No Brasil, pesquisas visando à utilização desse parasitóide no controle da lagarta-falsa-medideira vêm sendo realizadas (Bueno *et al.* 2009a; Bueno *et al.* 2009b).

1.3.4. Características gerais dos vírus

A virologia teve seu início no final do século XIX, com o conhecimento de agentes infecciosos capazes de passar através de filtros que retinham bactérias. Verificou-se, posteriormente, que dos agentes filtráveis apenas alguns podiam ser classificados como vírus, visto

que apenas estes, além de serem parasitos intracelulares obrigatórios, possuem organização e composição estrutural características e processo único de replicação (Candeias 1991). Existem diferenças fundamentais entre os vírus e as células vivas. O genoma celular é constituído pelo DNA e RNA, enquanto o genoma viral possui apenas um desses ácidos nucléicos; ao contrário da célula, o vírus não possui um sistema enzimático próprio (Candeias 1991; Azevedo 1998a; 1998b). A célula forma-se por divisão binária de elementos preexistentes, ao passo que a replicação viral se dá exclusivamente à custa de processos anabólicos da célula hospedeira (Falke 1979).

O vírus é composto de um ácido nucléico (estruturalmente circular ou linear) envolvido por proteínas formadas por subunidades chamadas capsômeros, que formam uma camada denominada capsídeo. Esse conjunto recebe o nome de nucleocapsídeo (Azevedo 1998a). Seqüencialmente a essa formação, o nucleocapsídeo é envolto por uma membrana (envelope), normalmente construída a partir de material celular específico do artrópodo hospedeiro. O conjunto formado pelo envelope mais o nucleocapsídeo é chamado de vírion, constituindo a unidade infectiva do vírus (Crook 1991; Van Regenmortel *et al.* 2000). Os diferentes vírus possuem tamanho entre 20 nm e 300 nm (Bilimoria 1991) (Fig. 1.2).

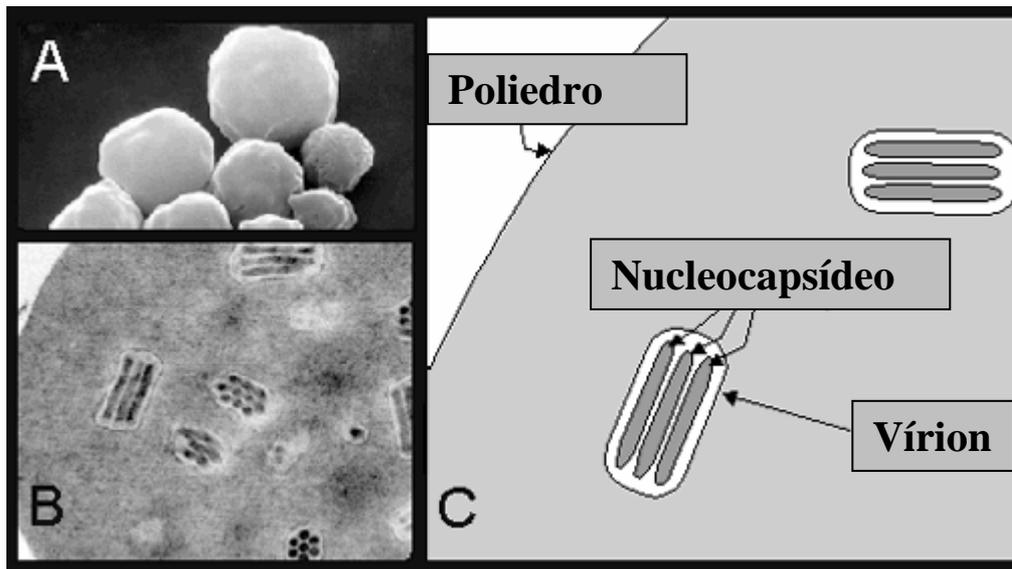


Figura 1.2. Estrutura do corpo de oclusão do baculovírus. A) Micrografia eletrônica de varredura da superfície de corpos de oclusão (poliedros) de um *nucleopolyhedrovírus*; B) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando múltiplas partículas virais envelopadas (OBV), no interior de um poliedro; C) Desenho esquemático da organização interna de um poliedro.

1.3.5. Vírus entomopatogênicos

Dentre os agentes causadores de doenças em insetos, tais como, bactérias, fungos, espiroquetas, protozoários, helmintos e vírus (Alves 1998), as viroses estão entre as mais investigadas pela ciência (Moscardi 1991; Valadares-Inglis *et al.* 1998; Alves 1998; Richards *et al.* 1998; Azevedo & Wolf 2000), devido ao grande potencial que esses agentes possuem para emprego em programas de manejo integrado de pragas (Tinsley 1979; Fuxa 1987; Moscardi 1999). Isto se deve à sua especificidade e virulência ao inseto hospedeiro, e por não afetarem inimigos naturais e a fisiologia das plantas (Moscardi 1991) e serem inócuos aos vertebrados (Burges *et al.* 1980).

Os vírus entomopatogênicos apresentam a característica de especificidade aos seus respectivos hospedeiros (Burgess *et al.* 1980). Entretanto, alguns vírus foram observados apresentando certa atividade patogênica sobre insetos de outras espécies (Morales *et al.* 1993; Ignoffo & Garcia 1997; Harrison & Bonning 2001). Apesar da existência de um grande número de vírus entomopatogênicos, dois grupos têm sido os mais estudados como agentes de controle de insetos-praga: os Baculovirus (família Baculoviridae) e os vírus de poliedrose citoplasmática (VPC) (família Reoviridae) (Tinsley 1979; Fuxa 1987; De Nardo & Capalbo 1998; Moscardi 1999). A família Baculoviridae é a mais pesquisada e utilizada como agente controladores de insetos (Tinsley 1979; Moscardi 1989; 1999).

A família Baculoviridae é diversificada e está, atualmente, taxonomicamente dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus*, que contém os vírus de poliedrose nuclear (VPNs) e *Granulovirus*, contendo os vírus de granulose (VGs) (Ribeiro *et al.* 1998). Os VPNs e VGs são organismos biologicamente complexos e parasitos celulares obrigatórios, pois dependem, necessariamente, de um hospedeiro para a sua replicação no meio ambiente (Miller 1988). Os vírus dessa família, com poucas exceções, têm como característica o fato de as partículas virais estarem associadas a corpos de oclusão de natureza protéica, que conferem, de modo geral, uma proteção contra a desativação no meio ambiente, principalmente pela ação de raios solares e não permitem facilmente a sua degradação por ação de microrganismos do solo (Van Regenmortel *et al.* 2000).

Os Baculovirus são vírus encontrados exclusivamente em invertebrados (Ribeiro & Pinedo 2001), formando um grupo de vírus cuja maioria são isolados da classe Insecta, principalmente da ordem Lepidoptera (Granados & Federici 1986; Blissard & Rohrmann 1990) podendo ser encontrados, também, associados à Himenoptera, Diptera, Coleoptera e Trichoptera (Blissard & Rohrmann 1990). A especificidade e a segurança no seu emprego constituem vantagens que

favorecem o interesse na sua utilização em programas de manejo integrado de pragas, havendo diversas revisões sobre Baculovirus, relativas à sua biologia e emprego como bioinseticida (Tinsley 1979; Maeda 1989; Blissard & Rohrmann 1990, Richards *et al.* 1998, Moscardi 1999).

Uma característica importante dos VPNs é o seu grande tamanho, devido ao cristal de proteína que envolve os vírions. O principal componente desse cristal é a poliedrina, que confere a forma de um poliedro para o vírus. Essa estrutura é responsável pela proteção dos nucleocapsídeos nele ocluídos (Valadares-Inglis *et al.* 1998). O vírion, unidade infectiva do vírus, contém uma molécula de ácido nucléico (DNA) de fita dupla e circular variando de 80 a 220 kilobases (kb), empacotado em nucleocapsídios em forma de bastonetes, que adquirem envelope através da membrana plasmática (Miller 1988, Ribeiro & Pinedo 2001).

Os vírus entomopatogênicos contaminam os insetos basicamente por via oral, sendo ingeridos juntamente com o alimento, geralmente constituído pelas folhas das plantas (Moscardi 1983, Alves 1986). 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. 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). Outras formas possíveis de acontecer contaminação são pelos fatores climáticos como chuvas e ventos sobre as plantas, fatores físicos como máquinas agrícolas transitando pelas lavouras, canibalismo de insetos doentes (Alves & Lecuona 1998), animais e insetos predadores (Lautenschlager & Podgwaite 1979).

O ciclo da doença é iniciado após a ingestão do poliedro contendo as partículas infectivas e os vírions, ocorrendo à digestão do poliedro juntamente com o alimento. A matriz protéica do cristal é dissolvida no lúmen do intestino médio (região do mesêntero) devido ao pH alcalino, geralmente entre 9,5 e 11,5 (Moscardi 1991), sucos gástricos e por degradação enzimática (Valadares-Inglis *et al.* 1998), liberando os vírions. Essas partículas infectivas, entrando em contato com as microvilosidades das células do intestino, liberam os nucleocapsídios nas células epiteliais. Nestas ocorre à infecção primária, caracterizada pela multiplicação viral sem produção de cristais (poliedros) (Ribeiro & Pinedo 2001). Posteriormente, as partículas de vírus podem atingir outros tecidos suscetíveis, tal como o adiposo, reprodutivo, epitélio da traquéia, ocorrendo a infecção secundária ou sistêmica, caracterizada pela formação de grande quantidade de nucleocapsídios e, posteriormente, a grande produção de poliedros virais (Alves 1986; Moscardi 1991; Granados & Williams 1986; Alves 1998). O acúmulo de poliedros no núcleo é o fator responsável pela lise celular, ocorrendo a morte da célula por ação tóxica do cristal da poliedrina (Valadares-Inglis *et al.* 1998).

1.3.6. Utilização de vírus como bioinseticida

A permanente constatação de problemas ambientais e de saúde pública associados à utilização de inseticidas químicos nas lavouras (Corbett 1974; Kogan 1998; Gallo *et al.* 2002) tem conferido aos entomopatógenos um lugar de destaque nos estudos para implementação de programas de manejo integrado de pragas em diversos cultivos (Alves 1998; Kogan 1998; Moscardi 1999), com destaque para o uso dos vírus (Tinsley 1979; Moscardi & Sosa-Gómez 1996; Azevedo & Wolff 2000). Diversos programas para a utilização do baculovirus têm sido desenvolvidos em

vários países, envolvendo pragas em vários cultivos agrícolas e florestais (Moscardi 1991, 1998, 1999).

No Brasil existem ou existiram alguns programas de desenvolvimento e utilização em diversas culturas de alguns vírus pelo produtor, como é o caso do VG de *Erinnys ello* (L.1758) (Lepidoptera, Sphingidae) em cultivos de mandioca (Schmitt 1985), do VPN de *Spodoptera frugiperda* (Smith 1797) na cultura do milho (Cruz 2000) e aquele que é o maior programa mundial de produção e comércio de bioinseticida microbiano, o VPN da lagarta-da-soja *A. gemmatalis* na cultura da soja (Moscardi 1983; 1999; Moscardi & Souza 2002). Livingston & Yearian (1972) citaram pela primeira vez um vírus ocorrendo em lagartas de *P. includens*, tendo sido isolado de exemplares de lagartas provenientes de uma cultura de algodão na Guatemala. Os autores o descreveram como sendo um vírus de poliedrose nuclear (VPN). Os sintomas externos nas lagartas doentes foram similares aos descritos anteriormente para outros Plusiinae, sendo a infecção dos tecidos idêntica à descrita para outras lagartas de lepidópteros.

A possibilidade de persistência desse VPN no solo foi avaliada por Young & Yearian (1979). A mortalidade no primeiro ano foi de 100% na maior dose utilizada (247 lagartas equivalente por hectare), seis meses após iniciada a introdução de lagartas nas gaiolas tratadas. No ano seguinte, a mortalidade nesse mesmo tratamento foi de 90,3%. Avaliando a suscetibilidade de lagartas de *P. includens* submetidas a infecção provocada pelo vírus, Livingston *et al.* (1980) constataram que lagartas de 3º estágio foram mais afetadas. O tempo letal médio, entretanto, foi similar para todas as idades, variando de 6,9 a 8,1 dias. Teste de campo, utilizando 62, 124, 248, 496 CPI/ha, resultou em diminuição significativa da população das lagartas, sendo que nesses testes predominaram indivíduos de 1º e 2º estádios.

A mortalidade de pupas de *P. includens*, quando lagartas foram infectadas pelo VPN nos 4º, 5º e 6º estádios, foram constatados por Young & Yearian (1982), sendo que a maior mortalidade observada foi de 15,2%. Verificaram, ainda, uma redução na fecundidade e na viabilidade dos ovos, quando a infecção ocorreu em lagartas de 6º instar, embora a longevidade dos adultos não tenha sido afetada. Como a mortalidade das lagartas infectadas com VPN de *P. includens* só ocorre após alguns dias de infecção, o conhecimento do consumo de alimento pelo inseto infectado é importante para o uso do patógeno como inseticida biológico. Lagartas infectadas no 1º estágio consumiram 99,72% menos alimento que as lagartas sadias, de acordo com Morales & Moscardi (1993), indicando que o controle de *P. includens* pelo VPN deve ser realizado quando a maioria das lagartas presentes na lavoura for pequena. Morales & Moscardi (1993) testaram o VPN em lagartas de 2º estágio de *P. includens* e constataram que o vírus da própria lagarta é menos virulento do que o VPN de *A. californica*, quando este último é passado sucessivamente por *P. includens*.

1.3.7. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Bt é uma bactéria de solo, aeróbica, Gram positiva, da família *Bacillaceae*, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas durante a fase de esporulação, durante a fase estacionária do ciclo de crescimento. É uma bactéria de ocorrência ubíqua (Krywunczyk & Fast 1980) em vários substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Miralles & Pérez 2004).

Embora o termo *Bacillus thuringiensis* geralmente seja empregado para uma única espécie, na verdade ele pode denominar um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanesis*). *Bt* e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas

comuns, mas por definição, *Bt* pode ser diferenciado pela presença dos cristais (Luth & Wolfersberger 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase, embora este seja um critério com pouco valor taxonômico (Lysenko 1983). Os métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolipídios, comparação de sequências 16S rRNA, entre outros, mostram que estas duas espécies são, na verdade, somente uma. Esta semelhança é devida à transferência de plasmídeos que codificam as proteínas Cry de *Bt* para *B. cereus* e, por outro lado, *Bt* pode perder a capacidade de produzir estas toxinas, tornando-se *B. cereus*. Portanto, a distinção entre espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (Glare & O'Callaghan 2000; Hansen & Salamitou 2000; Schnepf *et al.* 1998).

Bt pode produzir várias proteínas com atividade inseticida como a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hansen & Salamitou 2000). Por outro lado, estudos têm demonstrado que o esporo também pode contribuir para a patogenicidade, através da ação sinérgica com as proteínas Cry (Johnson & McGaughey 1996).

Os sintomas observados quando as lagartas dos insetos suscetíveis consomem os cristais e esporos de *Bt* são: paralisia do intestino, regurgitação e finalmente a morte (Aronson & Shai 2001). Estudos histopatológicos têm mostrado que as células colunares do intestino médio afetadas inicialmente e suas microvilosidades apicais, são praticamente destruídas (Bravo *et al.* 1992).

Existem alguns produtos comerciais à base de *Bt* que são utilizados no controle de insetos pragas e vetores de doenças (Borén 2005; Vilas-Boas *et al.* 2007) e alguns de seus genes estão sendo inseridos em culturas de algodão, milho, soja, dentre outros, chamadas plantas *Bt* (Barroso & Hoffmann 2007).

1.4. Literatura citada

Alford, A.R. & A. N. Hammond Junior. 1982. Plusinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with looplure-baited traps. *J. Econ. Entomol.* 75: 647-650.

Alves, S.B. 1986. Vírus entomopatogênicos. In: Alves, S.B. (ed). *Controle microbiano de insetos.* Manole, São Paulo, Brasil, 407p.

Alves, S.B. 1998. Microrganismos associados a insetos. In: Alves, S.B. (ed). *Controle microbiano de insetos.* Fealq, Piracicaba, Brasil, 1163p.

Alves, S.B. & R.E. Lecuona. 1998. Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves, S.B. (ed). *Controle microbiano de insetos.* Fealq, Piracicaba, Brasil, 1163p.

Aronson, A.I. & Y. Shai. 2001. *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective unique of their mode of action. *Fems Microbiol Letters.* 195: 1-8.

Azevedo J.L. & J.L.C. Wolff. 2000. A moderna tecnologia como auxiliar no controle microbiológico de pragas da agricultura. In: Melo, I.S. & J.L. Azevedo (eds.). *Controle biológico.* Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente. 387p.

- Azevedo, J.L. 1998a.** Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: Alves, S.B. (ed.). Controle microbiano de insetos. Fealq, Piracicaba, Brasil, 1163p.
- Azevedo, J.L. 1998b.** Recombinação nos vírus, protozoários e algas. In: Azevedo, J.L. (ed.). Genética de microrganismos. Goiânia, UFG. 354p.
- Barroso, P.A.V. & L.V. Hoffmann. 2007.** Algodoeiro geneticamente modificado. In: E.C. Freire (ed). Algodão no Cerrado do Brasil. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, Brasília, 141-174p.
- Beach, R.M. & J.W. Tood. 1985.** Toxicity of Avermectin to caterpillar and adult soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) and influence on caterpillar feeding and adult fertility and fecundity. J. Econ. Entomol. 78:1125-1128.
- Bilimoria, S.L. 1991.** The biology nuclear polyedrosis viruses. In: E. Kurstak. (ed.). Viruses of invertebrates. Macerl Dekker, New York, 1-72p.
- Blissard, G.W. & G.F. Rohrmann. 1990.** Baculovirus diversity and molecular biology. Ann. Rev. Entomol. 35: 127-55.
- Borém, A. 2005.** Biotecnologia e meio ambiente. Viçosa: Folha de Viçosa, 425p

- Bravo, A.; S. Jansens; M. Peferoen. 1992.** Immunocytochemical analyses of specif binding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran an coleopteran midgut membrances. J. Invert. Pathol. 60: 247-253.
- Bueno, R.C.O.F.; J.R.P. Parra; A.F. Bueno. 2009a.** Biological characteristics and thermal requirements of a Brazilian strain of parasitoid *Trichogramma pretiosum* reared on eggs of *Pseudoplusia includens* and *Anticarsia gemmatalis*. Neotrop. Entomol. 51: 355-361.
- Bueno, R.C.O.F.; J.R.P. Parra; A.F. Bueno; M.L. Haddad. 2009b.** Desempenho de Tricogramatídeos como potenciais agents de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). Biol. Control. 38: 389-394.
- Burges, H.D.; G. Croizier; J. Huber.1980.** A review of safety tests on baculoviruses. Entomophaga, 25: 329-39.
- Candeias, J.A.N. 1991.** Vírus - Viróides e Prions. In: Microbiologia. Atheneu. São Paulo, 295p.
- Corbett, J.R. 1974.** The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, London, 330p.
- Crook, N.E. 1991.** Baculoviridae: sub-group B: comparative aspects of granulosis viruses Dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. J. Virol. 79:853-859.

Cruz, I. 2000. Utilização do *Baculovirus* no controle da lagarta do milho, *Spodoptera frugiperda*.

In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (eds.). Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente. 308p.

De Nardo, E.A.B.; D.M.F. Capalbo; M.C.B. Oliveira; G.J. Moraes. 1995. Análise de risco e avaliação do impacto ambiental decorrente do uso de agentes de controle biológico: Memória do Workshop. Maara/Embrapa/CNPMA, Jaguariúna. 112p.

Eichlin, T.D. & H.B. Cunningham. 1978. The Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) of America North of Mexico, emphasizing genitalia and larval morphology. Technical Bulletin, Idaho.1567: 1-122.

Embrapa. 2000. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja. 70 p.

Embrapa 2006. Tecnologia de produção de Soja: região central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados; Embrapa Agropecuária Oeste. 225 p.

Falke, D. 1979. Virologia geral. In: Virologia. Edusp, São Paulo, p. 1-21.

Fuxa, J.R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Ann. Rev. Entomol. 32: 225-51.

- Gallo, D.; O. Nakano; S.S. Neto; R.P.L. Carvalho; G.C. Batista; E.B. Filho; J.R.P. Parra; R.A. Zuchi; S.B. Alves; J.G. Vendramin; J.R.S. Lopes; C. Omoto. 2002.** Entomologia Agrícola. Agronômica Ceres, Piracicaba, Brasil, 920p.
- Glare, T.R. & M. O'Callaghan. 2000.** *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester. 350p.
- Granados, R.R. & B.A. Federici. 1986.** The biology of baculovirus. Boca Raton, CRC Press. 275p.
- Granados, R.R. & K.A. Williams. 1986.** In vivo infection and replication of baculoviruses. In: Gramado, R.R. & Federici, B.A. (eds.). The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology. Boca Raton, CRC Press, 125p.
- Hansen, B.M. & S. Salamitou. 2000.** Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: J.F. Charles; A. Delécluse; C. Nielsen-Leuroux (ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluster Academic Publishers, 41-64p.
- Harrison, R.L. & B.C. Bonning. 2001.** Use of proteases to improve the insecticidal activity of Baculoviruses. Biol. Control. 20: 199-209.
- Herzog, D.C. 1980.** Sampling soybean looper on soybean. In: Kogan, M. & D.C. Herzog (eds.). Sampling methods in soybean entomology. Springer-Verlag, New York, p. 140-168.

Ignoffo, C.M.; C. Garcia. 1997. Effect of viral concentration and body weight on mortality of lagartae of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to wild-type or recombinant strains of the nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae). Biol. Control. 26: 955-60.

Jensen, R.L.; L.D. Newsom; J. Gibbens. 1974. The soybean looper: effects of adult nutrition on oviposition, mating frequency, and longevity. J. Econ.Entomol. 67: 467-470.

Johnson, D.E. & W.H. McGaughey. 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth lagartae. Current Microbiol. 33: 49-54.

Kogan, M. & D. Cope. 1974. Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. 3. Food intake, utilization and growth in the soybean looper, *Pseudoplusia includens*. Ann. Entomol Soc.America. 67: 66-72.

Kogan, M. & S.G. Turnpseed. 1987. Ecology and management of soybean arthropods. Ann. Rev. Entomol. 32: 507-538.

- Kogan, M. 1998.** Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 243-70.
- Krywunczyr, J. & P.G. Fast. 1980.** Sorological relationships of the crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invert.Pathol.* 36: 139-140.
- Lautenschlager, R.A. & J.D. Podgwaite. 1979.** Passage of nucleopolyhedrosis virus by mammalian predators of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Environ. Entomol.* 8: 210-14.
- Livingston, J.M. & W.C. Yearian. 1972.** A nuclear polyhedrosis virus of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invert. Pathol.* 19:107-112.
- Livingston, J.M.; P.J. McLeod; W.C. Yearian; S.Y. Young. 1980.** Laboratory and field evaluation of nuclear polyhedrosis virus of the soybean looper *Pseudoplusia includens*. *J. Georgia Entomol. Soc.* 15:134-139.
- Luthy, P. & M.G. Wolsfersberger. 2000.** Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin. In: J.F. Charles; A. Delecluse; C. Nielsen-Le Roux (ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application.* Klumer Academic Publishers, 167-180p.
- Lysenko, O. 1983.** *Bacillus thuringiensis*: evolutions of taxonomic conception. *J. Invert. Pathol.* 41: 295-298.

- Maeda, S. 1989.** Expression of foreign genes in insects using baculovirus vector. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 351-5.
- Mason, L.J. & T.P. Mack. 1984.** Influence of temperature on oviposition and adult female longevity for the soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 13: 379-383.
- Miller, L.K. 1988.** Baculovirus as gene expression vectors. *Ann. Rev. Entomol.* 42: 177-99.
- Miralles, M.P. & V.J. Pérez. 2004.** Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In: A. Bravo & J. Ceron (ed.). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, 207-232p.
- Mitchel, E.R. 1967.** Life history of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Georgia Entomol. Soc.* 2: 53-57.
- Molina, A. 2007.** Soja: expectativa x frustração. Disponível em: <www.embrapa.br/Famasul.htm>.
- Morales, L. & F. Moscardi. 1993.** Virulência pra lagartas de *Crysoideixis includens* (Walker) e *Rachiplusia nu* (Guenée) do vírus de *Autographa californica* (Speyer) após a passagem seriada em *C. includens* (Lep.: Noctuidae). *An. Soc. Ent. Brasil.* 22:19- 27.

- Morales, L.C.; F. Moscardi; S. Gravena. 1993.** Potencial do baculovirus de *Autographa californica* (Speyer) no controle de *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 28: 237-43.
- Moscardi, F. 1983.** Utilização de *Baculovirus Anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 21p. (Comunicado Técnico, Embrapa/CNPSo, 23).
- Moscardi, F. 1989.** The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Mem. Instit. Oswaldo Cruz, 4: 51-6.
- Moscardi, F. 1991.** Vírus entomopatogênicos. Informe Agropecuário. 15: 5-20.
- Moscardi, F & D.R. Sosa-Gómez. 1996.** Utilización de virus a campo. In: Lecuona, R.E. (ed.), Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Talleres Gráficos Mariano Mass, Buenos Aires, 338 p.
- Moscardi, F. 1998.** Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Alves, S.B. (ed.). Controle microbiano de insetos. Fealq, Piracicaba, Brasil, 1163p.

Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 257-89.

Moscardi, F. & M.L. Souza. 2002. Baculovirus para o controle de pragas. *Biotec. Ciência. Desenvol.* 22: 22-9.

Moscardi, F. 2008. Problemática das populações dos insetos pragas em desequilíbrio e a retomada do MIP. XXX Reunião de Pesquisa de soja da região ceental do Brasil, Rio Verde.

Panizzi, A. R. 2006. O Manejo integrado de pragas (MIP) em soja e o compromisso com o meio ambiente. En 3º Congreso de Soja del Mercosul. Foro Insumos. Rosário (Sta.Fe) Argentina. 27-30/06/2006. p.144-149.

Parra, J.R.P.; P.S.M. Botelho; B.S. Côrrea-Ferreira; J.M.S. Bento. 2002. Controle biológico uma visão inter e multidisciplinar. In: J.R.P. Parra; P.S.M. Botelho; B.S. Côrrea-Ferreira; J.M.S. Bento (eds.). *Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores.* Manole, São Paulo, 125-142p.

Reid, J.C. & G.L. Greene. 1973. The soybean looper pupal weight, development time and consumption of soybean foliage. *Flor. Entomol.* 56: 203-206.

Ribeiro, B.M. & F.J.R. Pinedo. 2001. Baculovirus recombinante para controle de pragas. *Biotec. Ciência. Desenvol.* 22: 50-8.

Ribeiro, B.M.; M.L. Souza; E.W. Kitajima. 1998. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: Alves, S.B. (ed.). Controle microbiano de insetos. Fealq, Piracicaba, Brasil, 1163p.

Richards, A.; M. Matheus; P. Christian. 1998. Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 493-517.

Schmitt, A.T. 1985. Eficiência da aplicação de *Baculovirus erinnyis* no controle do mandarová da mandioca. Itajaí, EMPASC (Comunicado Técnico 88, EMPASC), 7p.

Schnepf, E.; N. Crickmore; J. van Rie; D. Lereclus; J. Baum; J. Feitelson; D.R. Zeigler; D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol.Mol. Biol.Rev.*62: 775-806.

Shorey, H.H.; L.A. Andres; R.L. Hale. 1962. The biology of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). I. Life history and behavior. *Ann. Entomol. Soc. America.* 55: 591-597.

Sosa-Gómez, D.R. 2006. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. <http://cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf>

Tinsley, T.W. 1979. The potencial of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. *Ann. Rev. Entomol.* 24: 63-87.

Valadares-Inglis, M.C.; W. Shiler; M.T. De-Souza. 1998. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (eds.). Controle Biológico. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente. 262 p.

Van Regenmortel, M.H.V.; C.M. Fauquet; D.H.L. Bishop; E.B. Cartens; M.K. Estes; S.M. Lemon; J. Maniloff; M.A. Mayo; D.J. Mcgeoch; C.R. Pringle; R.B. Wickner.2000. Vírus Taxonomy. Seventh report of Internacional Committee on Taxonomy Viruses. Academic Press, San Diego.

Vázquez, W.R.C. 1986. Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua mortalidade e no consumo da área foliar da soja. 164 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Vilas-Boas, G.F.L.T.; A.P.S Peruca; O.M.N. Arantes. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. Canadian J. Microbiol. 53: 673-687.

Young, S.Y. & Yearian, W.C. 1979. Soil application of *Pseudoplusia includens* VPN: Persistence and incidence of infection in soybean looper caged on soybean. Environ. Entomol. 8: 860-864.

Young, S.Y. & W.C. Yearian. 1982. Nuclear polyhedrosis virus infection of *Pseudoplusia includens* (Lep.: Noctuidae) lagartae effect on post lagartal stages and transmission. Entomophaga. 27: 61-66.

CAPÍTULO 2

Práticas de controle utilizadas na cultura da soja e seu impacto na população de *Pseudoplusia includens* (Walker) e seus inimigos naturais.

2.1. Introdução

O uso de agrotóxicos (inseticidas, fungicidas e acaricidas) que tem um maior ou menor impacto sobre os insetos (pragas ou benéficos), sofreu um incremento substancial em soja nos últimos anos. Do ano de 2000 a 2004, o aumento da área cultivada não chegou a duplicar, entretanto, o total de agrotóxicos comercializado/ano mais que triplicou no período (Panizzi 2006). A escolha do inseticida e da dose a usar deve ser criteriosa, tendo sempre em mente a conservação do controle biológico natural. Às vezes, somente o controle biológico é suficiente para manter as pragas em baixas populações (Roa 1989). O uso abusivo e errôneo de agrotóxicos trazem problemas, tais como: a baixa eficiência dos produtos, o aparecimento de surtos de outras pragas e a ressurgência de pragas-principais e secundárias, em função do desequilíbrio biológico. O controle químico deve ser visto como um fator associado ao controle biológico e não como uma medida antagônica, para se obter resultados satisfatórios e mais duradouros. Por exemplo, para controlar a lagarta-da-soja, deve-se dar preferência ao baculovírus ou a produtos seletivos preservem os inimigos naturais, deixando de lado produtos não seletivos que causam desequilíbrio biológico (Panizzi *et al.* 1977a).

O impacto ambiental dos agrotóxicos causa destruição de predadores e parasitóides benéficos, seleciona populações de pragas resistentes aos inseticidas utilizados além de contaminar a água da superfície e do subsolo, contaminação de pássaros, mamíferos selvagens e domesticados e impacto nos polinizadores (abelhas domesticadas ou não) (Quintela *et al.* 2006).

Com a ferrugem asiática, o uso de fungicidas na soja também aumentou, afetando negativamente os entomopatógenos (Sosa-Gómez *et al.* 2006). Caso que deverá ser examinado mais atentamente, se for considerado que apenas 0,1% dos agrotóxicos aplicados atingem o alvo e que 99,9% impactam o ambiente ao redor (Hart & Pimentel 2002).

Cientistas do Departamento de Agricultura Norte-americano (USDA) afirmam que a maioria dos herbicidas e inseticidas pode destruir os microorganismos do solo ou suprimir atividades se aplicados em doses excessivas. Contudo, quando aplicados nas doses recomendadas é improvável que os agroquímicos causem problemas reais. Porém, com o aumento da dose e frequência de aplicação, é possível que aumente a persistência de alguns desses problemas e/ou degradação de seus produtos. Neste caso, em virtude de resíduos químicos, é possível que apareçam efeitos desfavoráveis na microflora do solo, bem como efeitos fitotóxicos em algumas culturas (Kogan 1998).

De acordo com Samways (1989), são três os mecanismos sobre os quais a aplicação de inseticidas tem causado um efeito oposto ao desejado, isto é, aumento da população de pragas. São elas a ressurgência, explosão de pragas secundárias e resistência química.

O fenômeno de ressurgência ocorre quando, após a aplicação de um agroquímico a população da praga alcança densidades populacionais superiores as observadas nas áreas que não receberam tratamento (Hardin *et al.* 1995). Segundo Sosa-Gómez (2006) outro conceito semelhante é a erupção de praga, ou surto de praga secundária, que implica o aumento da população de uma praga de menor importância, tornando-se praga principal. Os mecanismos pelos quais ocorrem esses surtos podem ser devidos as seguintes causas: 1) eliminação de seus inimigos naturais; 2) remoção de espécies antagonistas; 3) estímulo direto à fecundidade da praga (hormoligose); e 4) estímulo indireto à fecundidade da praga (trofobiose).

No final dos anos 60 vários trabalhos demonstraram a ressurgência de pragas. Falcon *et al.* (1968) indicando que populações de *Trichoplusia ni* (Hubner 1803) foram maiores e parcelas de algodão tratadas com certos inseticidas que na testemunha. Turnipseed (1972) refere-se ao efeito do monocrotófos na ressurgência de *Heliothis zea* (Boddie 1850) em soja. Vinte um dias após o tratamento, o número de lagartas foi significamente maior na área tratada que na testemunha. Indica também que baixas dosagens de certos inseticidas controlam as pragas e permitem a sobrevivência de espécies benéficas. Inseticidas sistêmicos e nematicidas, pulverizados em plantações de soja, provocam reaparecimento de populações de *Pseudoplusia includens* e *H. zea*. (Todd *et al.* 1972).

Panizzi *et al* (1977b) observaram que as populações de *Anticarsia gemmatalis* e *Plusia* spp. alcançaram o maior pico no final de janeiro nas parcelas não tratadas, mas, a partir desta data as populações foram diminuindo até atingirem níveis insignificantes atribuída a ação dos inimigos naturais. Nas parcelas tratadas com inseticidas, 29 dias após a aplicação ocorreu o pico das populações ressurgentes de *A. gemmatalis* e *Plusia* spp. As populações de *Piezodorus guildinii* nas parcelas não pulverizadas atingiram o máximo de 16 percevejos/10m, enquanto naquelas tratadas com inseticidas as populações atingiram 46 percevejos/10 m.

Certas pragas antes de atingirem níveis de controle, tendem a diminuir, permanecendo em níveis baixos até o final do ciclo da cultura. Entretanto, a pulverização de campos de soja no início da estação, quando as populações de insetos estão começando a aparecer, pode causar um surgimento anormal de pragas (Panizzi *et al.* 1977b). Além disso, o uso crescente de inseticidas e a aplicação de produtos não-seletivos como os piretróides, por exemplo, principalmente em misturas com herbicidas na dessecação e na aplicação de herbicidas pós-emergentes em sistema de plantio direto, também estão contribuindo para o desequilíbrio no agroecossistema, prejudicando o controle biológico natural de insetos por parasitóides e predadores, visto que, além dos entomopatógenos, a

lagarta *P. includens* é também mantida em equilíbrio por um complexo importante de parasitóides e predadores (Bueno *et al.* 2007; Moscardi 2008).

Casos de ressurgências têm sido determinados após a aplicação de inseticidas e acaricidas em diversas culturas tais como citros (Luck 1986), algodão (Trichilo & Wilson 1993), quiabo (Kumar & Singh 2002) Na soja, tem sido observado a ressurgência de pragas, como a *P. includens*, há quatro safras consecutivas.

O uso de inseticidas de largo espectro (piretróides) é capaz de matar um número maior de inimigos naturais do que da própria praga contra a qual eles são aplicados. A praga então, livre de seus predadores e parasitóides, aumenta novamente e reinvasa a área pulverizada, atingindo proporções maiores do que antes da aplicação de inseticida (Hoffmann-Campo *et al.* 2000).

Na cultura da soja, tem sido constatado que aplicações de certos piretróides ocasionam surtos de populações de ácaros como *Tetranychus urticae* Koch, *Mononychellus planki* (McGregor) e *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), sendo um exemplo de “surto de pragas secundárias”. Experimentos de campo têm demonstrado que aplicações de fungicidas na cultura da soja podem estimular a incidência de maior número de lagartas nas áreas tratadas com benomil ou difenoconazole, por supressão de um dos inimigos mais importantes das lagartas, o fungo *Nomureae rileyi* (Johnson *et al.* 1976; Sosa-Gómez *et al.* 2003).

O objetivo desta pesquisa foi determinar a influência de práticas de controle de pragas sobre a população de *Pseudoplusia includens* e de seus inimigos naturais na cultura da soja.

2.2. Material e métodos

Áreas pareadas de soja, na região de Iguaraçu, PR, submetidas a diferentes práticas de manejo de pragas, foram avaliadas por três safras consecutivas (2006-2009) quanto à influência dessas práticas na incidência populacional de *P. includens* e de seus inimigos naturais. Foram analisados os seguintes tratamentos: 1. Manejo do produtor (MP) (prática comumente adotada pelos sojicultores); 2. Manejo integrado de pragas (MIP) (uso de inseticidas químicos seletivos, considerando os níveis de ação) e 3. Manejo Biológico (MIP com o uso de *Baculovirus*), sendo os produtos utilizados em cada local nos diferentes tratamentos, destacados na Tabela 2.1. Os demais tratamentos culturais e fitossanitários foram realizados de maneira semelhante nas três áreas-tratamento/local. Foram utilizadas parcelas pareadas 5000 m² cada, com espaçamento de 0,45 m entre linhas. Durante todo o período de desenvolvimento da cultura, sendo as áreas monitoradas semanalmente, ao acaso, com pano-de-batida (10 amostras/ tratamento), com registros do estágio de desenvolvimento das plantas, segundo a escala de Fehr *et al.* (1971). Paralelamente, amostras de larvas de *P. includens* foram coletadas, ao acaso, em cada área-tratamento e, no laboratório, individualizadas em Gerbox e acompanhadas, para registro da presença ou não de patógenos e/ou parasitóides.

Por ocasião da colheita, amostras de plantas de soja (duas fileiras adjacentes de 5 m 10 repetições/tratamento) foram coletadas, ao acaso, para avaliações de produtividade e peso de 100 sementes padronizadas para 13% de umidade, sendo calculada a produtividade bruta e líquida considerando o número de aplicações e os custos decorrentes de cada tratamento em quilos de soja.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2.1. Inseticidas utilizados em lavoura de soja submetidas a diferentes táticas de manejo nas safras de 2006-2009, em Iguaraçu, PR.

Tratamentos	Iguaraçu-PR		
	Safra 2006/07	Safra 2007/08	Safra 2008/09
Manejo Biológico	TL-Baculovirus (1x)(20 g/ha)	TL-Baculovirus (1x) (20 g/ha)	TL-Baculovirus (1x) (20 g/ha)
Manejo Integrado (MIP)	TL-Diflubenzuron (1x) (60 g/ha)	TL- Diflubenzuron (2x) (60 g/ha)	TL-Diflubenzuron (2x) (60 g/ha)
Manejo do Produtor	TL-Karate Zeon® (120mL/ha)- (3x)	TL- Karate Zeon® (120mL/ha) (5x)	TL- Karate Zeon® (120mL/ha) (3x)

TL = Tratamento para lagartas

2.3. Resultados e Discussão

A produtividade bruta de grãos de soja (Tabela 2.2) apresentou diferença significativa na safra de 2007-08 no tratamento do manejo do produtor. Na produtividade líquida foram observadas diferenças significativas em função dos tratamentos, sendo que o manejo do produtor nas safras de 06-07 e 07-08 apresentou menor produtividade líquida. Isso ocorreu principalmente em função do número de aplicações que na área do produtor variou de três a cinco aplicações de piretróide, enquanto que na área Controle Biológico apenas uma aplicação de Baculovirus nas três safras analisadas (Tabela 2.3).

No que se refere aos resultados do peso médio de 100 sementes, não houve diferença significativa entre os tratamentos, isto porque, provavelmente, as plantas de soja produziram mais grãos/planta para resultar em maiores produtividades nos tratamentos MIP e Controle Biológico (Tabela 2.4).

Tabela 2.2. Média da produtividade bruta de grãos de soja (kg ha^{-1}) em três safras da soja utilizando diferentes táticas de manejo.

Tratamentos ¹	Produtividade bruta (kg ha^{-1})		
	Safra 06-07	Safra 07-08	Safra 08-09
Manejo Produtor	3945,13a	3303,20 b	3337,70 a
Manejo Integrado (MIP)	4052,05 a	3729,00 a	3705,00 a
Manejo Biológico	4227,53 a	3880,80 a	3516,00 a
C.V.(%)	7,60	8,07	11,57

¹ Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 2.3. Média da produtividade líquida de grãos de soja (kg ha^{-1}) em três safras da soja utilizando diferentes táticas de manejo.

Tratamentos ¹	Produtividade líquida (kg ha^{-1})		
	Safra 2006/07	Safra 2007/08	Safra 2008/09
Manejo Produtor	3790,84 b	3046,10 b	3183,50 a
Manejo Integrado (MIP)	4000,62 ab	3626,08 a	3464,55 a
Manejo Biológico	4176,11 a	3829,42 a	3602,24 a
C.V.(%)	7,7	8,39	11,92

¹ Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 2.4. Peso médio de 100 sementes em três safras da soja utilizando diferentes táticas de manejo.

Tratamentos ¹	Peso (g) 100 sementes		
	Safra 06-07	Safra 07-08	Safra 08-09
Manejo Produtor	7,23 a	13,20 a	13,95 a
Manejo Integrado (MIP)	8,40 a	13,80 a	13,36 ab
Manejo Biológico	7,63 a	13,90 a	12,71 b
C.V.(%)	17,91	12,79	4,43

¹ Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

A população de *P. includens* alcançou o maior pico em 10/01/2007 na área do Produtor (Fig. 2.1). Nas datas anteriores observou-se também que nessa área o número de lagartas foi maior que nas demais áreas. A partir dessa data do pico populacional as populações foram diminuindo até atingirem níveis insignificantes.

A população de *P. includens* na safra de 2007-2008 se apresentou semelhante à safra anterior, diferindo no fato das lagartas atingiram maior pico no final de janeiro, 30/01/2008 e permaneceu em alta até 6/02/2008, principalmente na área do Produtor (Fig. 2.2).

Comparando as três safras, a de 2009 o pico da população de *P. includens* apareceu mais tarde, em 10/02/2009 estendendo-se até final de fevereiro. Observou-se também que na área do Produtor foi a que apresentou maior população de lagartas, repetindo o resultado dos anos anteriores (Fig. 2.3).

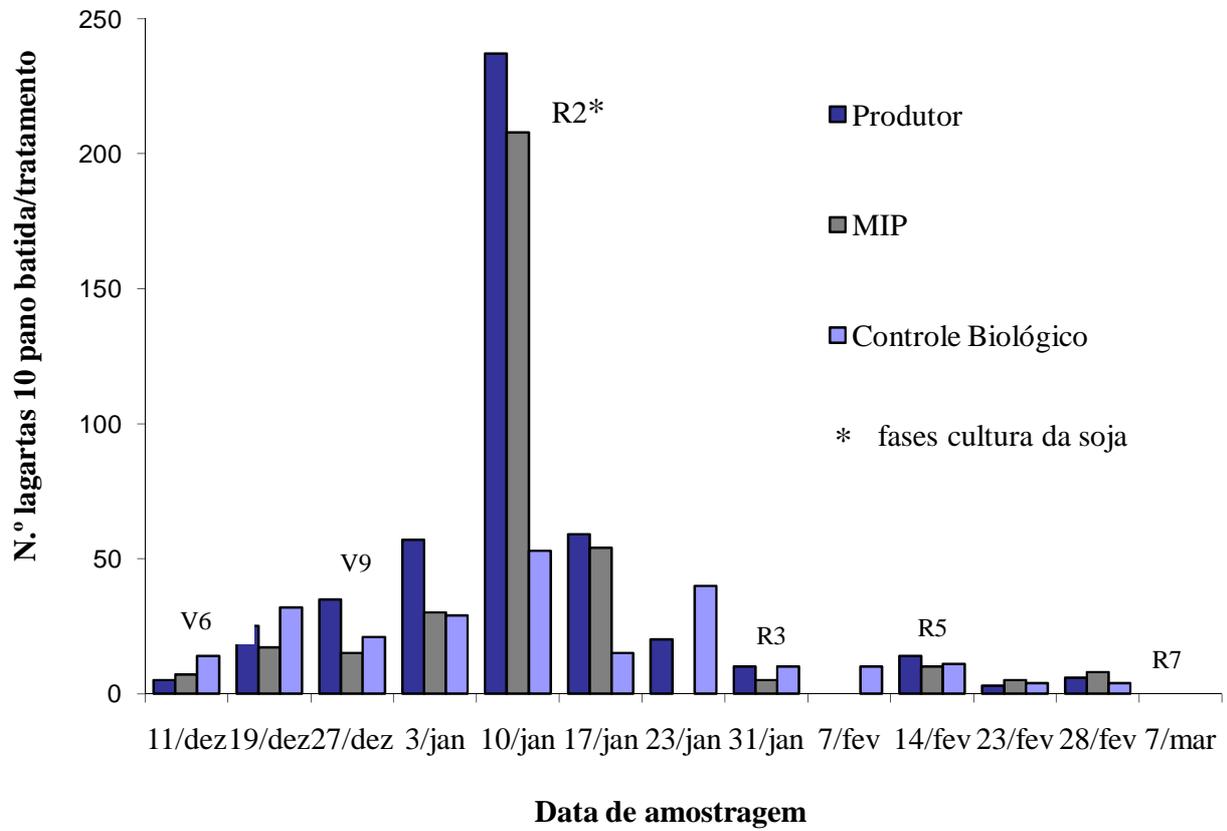


Figura 2.1. Flutuação populacional ao longo do tempo de *Pseudoplusia includens* na safra de 2006-2007 utilizando diferentes táticas de manejo.

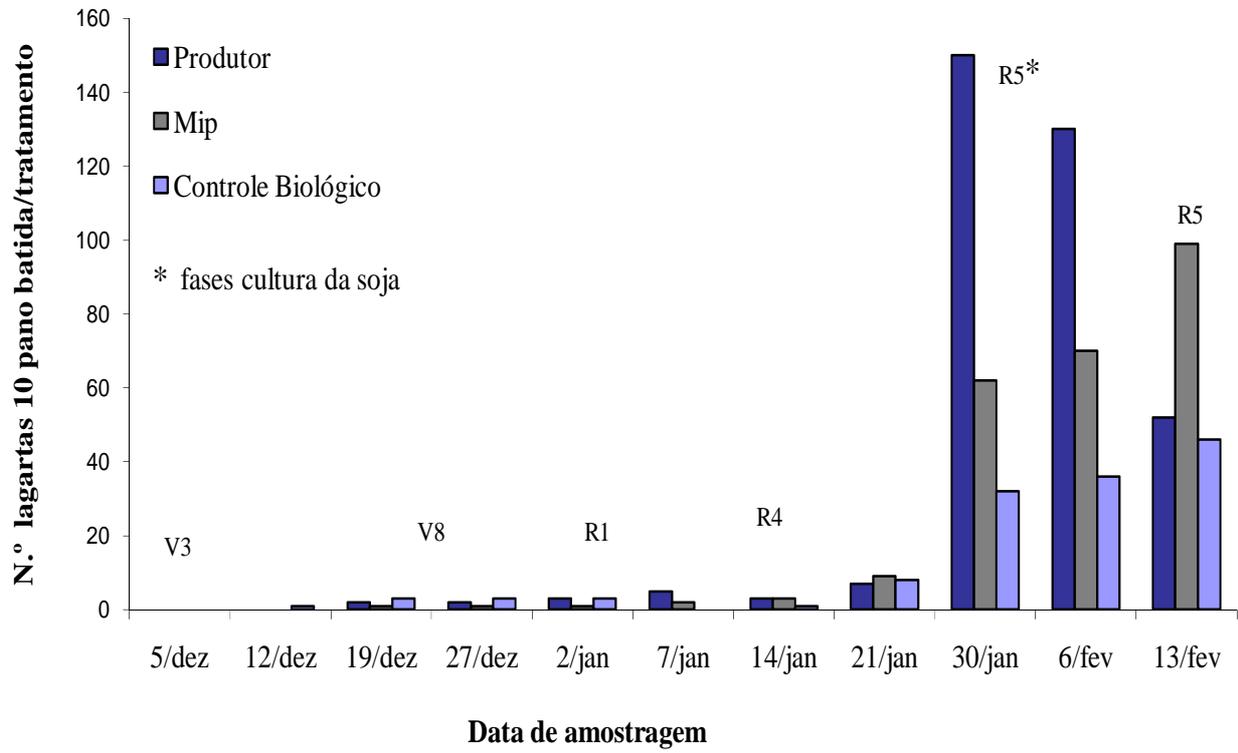


Figura 2.2. Flutuação populacional ao longo do tempo de *Pseudopiusia includens* na safra de 2007-2008 utilizando diferentes táticas de manejo.

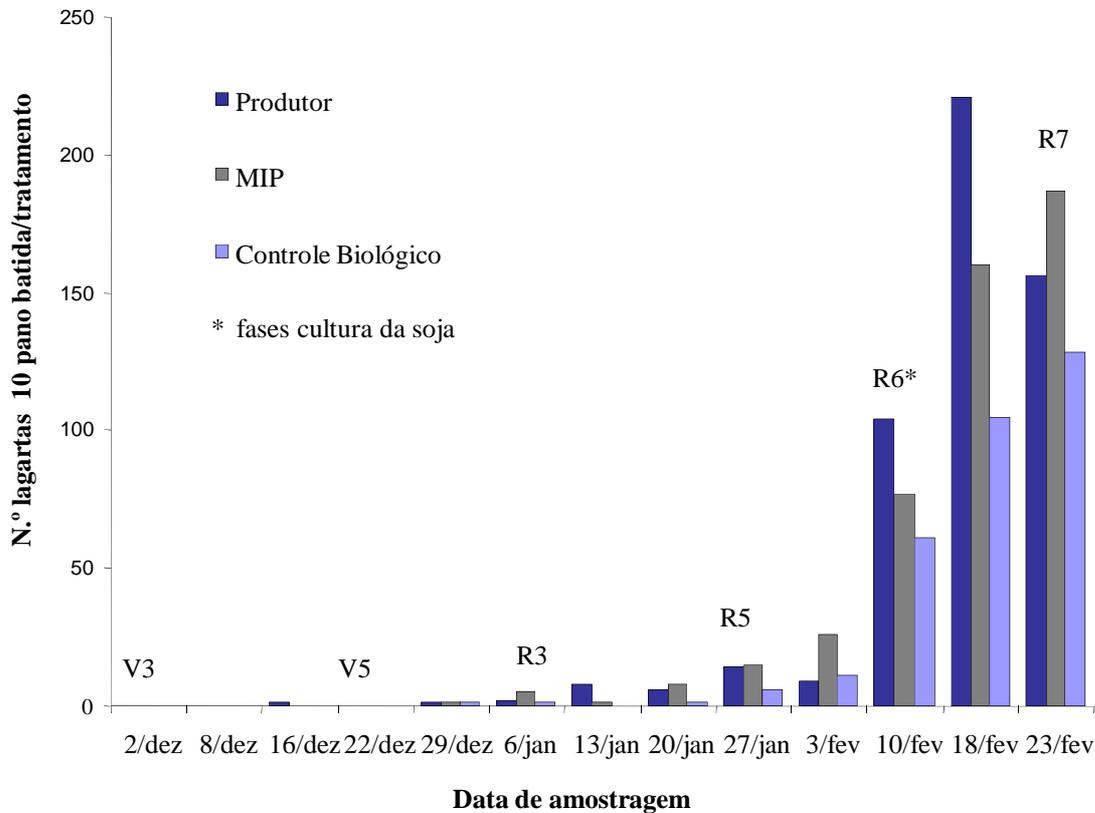


Figura 2.3. Flutuação populacional ao longo do tempo de *Pseudoplusia includens* na safra de 2008-2009 utilizando diferentes táticas de manejo.

As figuras (2.1; 2.2 e 2.3) demonstraram como a população da *P.includens* ocorreu durante todo o ciclo da soja nos diferentes tratamentos. Já os resultados ilustrados na Tabela 2.5. mostram, de um modo geral, a diferença entre os tratamentos. Nas três safras o tratamento Controle Biológico apresentou menor número de lagartas diferindo estatisticamente do tratamento do Produtor. Esses resultados demonstram que aplicações de produtos não seletivos aumentam a incidência da lagarta.

Tabela 2.5. Número médio de lagartas de *Pseudoplusia includens* durante três safras, com diferentes táticas de manejo.

Tratamento	Número médio de lagartas 10 pano batida/tratamento ¹		
	Safra 06-07 ^a	Safra 07-08 ^b	Safra 08-09 ^c
Produtor	3,55 b	3,80 b	5,80 b
MIP	2,12 a	3,35 b	5,33 b
Controle Biológico	1,53 a	1,53 a	3,50 a
C.V. (%)	60,02	49,04	19,04

¹Médias seguidas pela mestra letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey. ^a Dados transformados em Pot (1-0,54289); ^b Dados transformados em log10; ^c Dados transformados em Pot (1-0,57252) para análise de comparação.

A população de inimigos naturais foi maior na área de Controle Biológico seguido da área MIP. Já a área do Produtor foi que apresentou menor número de *Nomuraea rileyi*, VPN de *P. includens* e do parasitóide *Capidosoma truncatellun*. O número total de inimigos naturais foi aproximadamente o dobro (37 lagartas mortas por inimigos naturais, 15% do número total de lagartas coletadas) na área de Controle Biológico quando comparado à área do Produtor (Fig. 2.4).

Os dados são semelhantes à safra anterior, sendo a área de Controle Biológico com maior número de inimigos naturais, o número total foi o dobro quando comparado à área do Produtor (41 lagartas mortas por inimigos naturais, 30% do número total de lagartas coletadas) (Fig. 2.5).

Nesta última safra, além de entomopatógenos, foi avaliado número de predadores. Encontrou-se aranhas, *Geocoris* sp., *Nabis* sp., *Orius* sp., *Podisus* sp., *Callida* sp. O número dos quatro primeiros predadores foi estatisticamente menores na área do Produtor do que na área do MIP e Controle Biológico. Na área Controle Biológico foi observado maior número total de inimigos naturais, seguido da área MIP, a área do Produtor apresentou menor número de inimigos

naturais (Fig. 2.6). Foi observado, maior incidência de aranhas e *Geocoris* sp. entre os inimigos naturais em todos os tratamentos e principalmente na área Controle Biológico.

As lagartas *A. gemmatalis* e *P. includens* são atacadas pelo fungo *N. rileyi* bem como ocorre predação por *Nabis* sp., *Geocoris* sp., *Orius* sp. e ainda por aranhas (Corrêa *et al.* 1977). Souza (2009) também realizou levantamento de inimigos naturais e observou a ocorrência de predadores como as aranhas em todas as amostragens, com maior densidade populacional a partir dos 48 dias da emergência da soja, *Lebia concina* (Carabidae), percevejos do gênero *Geocoris* foram observados dos 15 aos 90 dias da emergência, com maiores populações aos 15, 83 e 90 dias. As lagartas *A. gemmatalis* e *P. includens* são atacadas pelo fungo *N. rileyi* bem como ocorre predação por *Nabis* sp., *Geocoris* sp., *Orius* sp. e ainda por aranhas.

Os resultados deste trabalho mostram o efeito da aplicação de inseticidas de amplo espectro de ação (como os piretróides) nas populações de *P. includens* e inimigos naturais. Como foi observado, a pulverização de campos de soja no início da estação, quando as populações de insetos estão começando a aparecer, pode causar um surgimento anormal de pragas. O uso de inseticidas antes da presença de insetos, além de gastos desnecessários, também diminui o potencial dos agentes de controle natural.

No contexto do controle de pragas, através da utilização do manejo, fica evidenciada a importância de se revisar a tomada de decisões na aplicação de inseticidas. Isto proporcionará ao agricultor condições de diminuir o número de aplicações, sem prejuízos na produção. Salienta-se também o aspecto de se utilizar inseticidas de ação seletiva e que afetam o menos possível o ambiente.

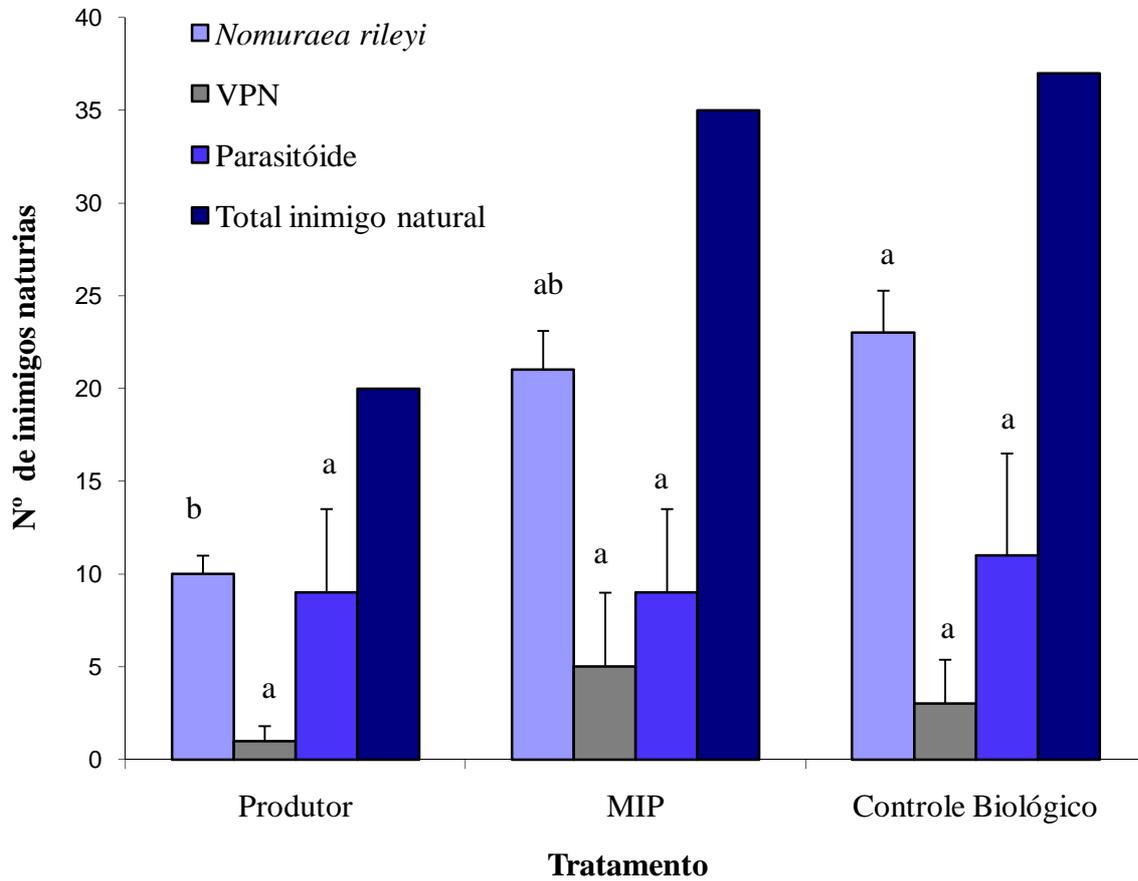


Figura 2.4. Número médio de inimigos naturais da *Pseudoplusia includens* na safra de 2006-2007 utilizando diferentes táticas de manejo. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.

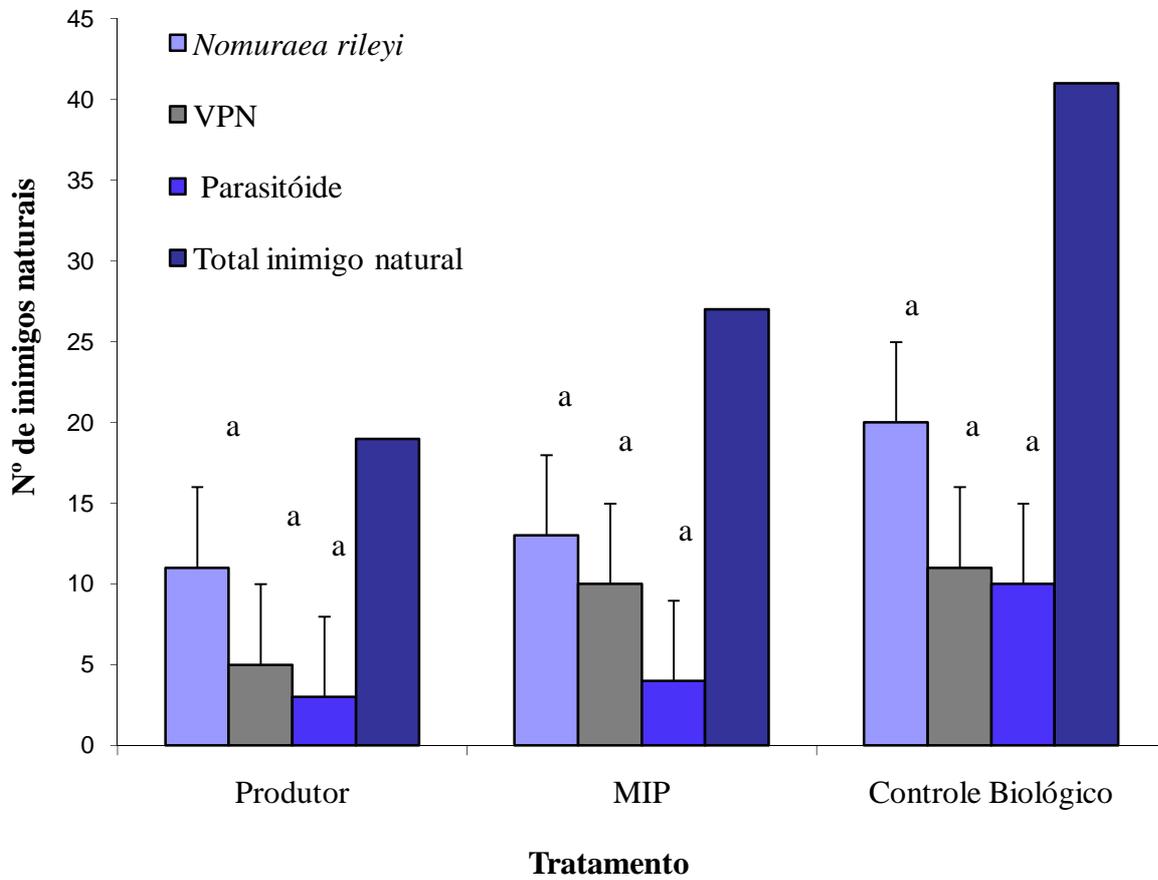


Figura 2.5. Número médio de inimigos naturais da *Pseudoplusia includens* na safra de 2007-2008 utilizando diferentes táticas de manejo. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.

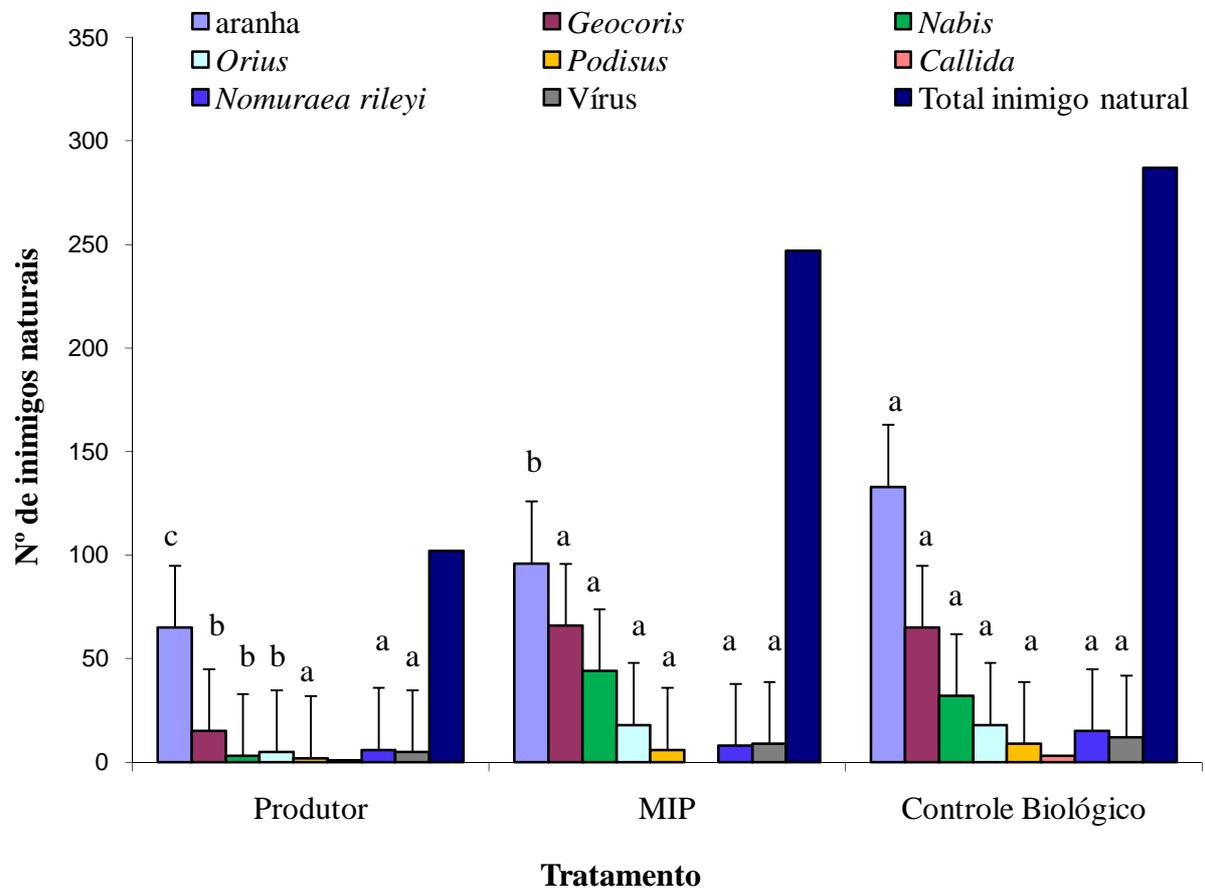


Figura 2.6. Número médio de inimigos naturais da *Pseudopiusia includens* na safra de 2008-2009 utilizando diferentes táticas de manejo. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos, não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5%.

2.4. Literatura citada

Bueno, R.C.O.F.; J.R.P. Parra; A.F. Bueno; F. Moscardi; J.R.G. Oliveira; M.F. Camillo.

2007. Sem barreira. Rev. Cultivar. 55:12-15.

Corrêa, B.S.; A.R. Panizzi; C.G. Newman; S.G. Turnipseed. 1977. Distribuição geográfica e abundância estacional dos principais insetos-pragas da soja e seus predadores. An. Soc. Entomol. Brasil. 6: 40-50.

Falcon, L.A.; R. Van Den Bosch, C.A. Ferris; L.K. Stromberg; L.K. Etzel; R.E.; T.F. Leigh.

1968. A comparison of season- long cotton-pest-control programs in California during 1966. J. Econ. Entomol. 61:633-642.

Fehr, W.R.; C.E. Caviness; D.T. Burmood; J.S. Pennington. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. Crop Science. 2: 929-931.

Hardin, M.R., B. Benrey; M. Coll; W.O Lamp; G.K. Roderick; P. Barbosa. 1995. Arthropod pest resurgence: an overview of potential mechanisms. Crop Protection.14: 3-18.

Hart, K.A. & D. Pimentel. 2002. Environmental and economic costs of pesticide use, p. 237-239.

In: Pimentel, D. (ed.). Encyclopedia of Pest Management. Marcel Dekker, New York, 927p.

Hoffmann-Campo, C.B., F. Moscardi, B.S. Corrêa-Ferreira; L.J. Oliveira; D.R. Sosa-Gomez; A.R. Panizzi; I.C. Corso; D.L. Gazzoni; E.B. Oliveira. 2000. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Embrapa Soja, Circular Técnica número 30, 70p.

Johnson, D.W.; L.P. Kish; Allen, G.E. 1976. Field evaluation of selected pesticides on the natural development of the entomopathogen, *Nomuraea rileyi*, on the velvetbean caterpillar in soybean. Environ. Entomol. 5: 964-966.

Kogan, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. Ann. Rev. Entomol 43: 243-270.

Kumar S. & R.N. Singh. 2002. Resurgence of spider mite, *Tetranychus urticae* Koch on okra. Resist. Pest Manag. Newsletter. .11: 8-11.

Luck, R.F. 1986. Biological Control of California red scale. In: Ecological knowledge and environmental problem solving. Concepts and case studies. National Academy Press, Washington DC. p. 165-189.

Moscardi, F. 2008. Problemática das populações dos insetos pragas em desequilíbrio e a retomada do MIP.XXX Reunião de Pesquisa de soja da região ceateal do Brasil, Rio Verde.

Panizzi, A.R.; Corrêa, B.S., Newman, G.G. & Turnipseed, S.G. 1977a. Efeito de inseticidas na população das principais pragas da soja. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 6: 264-275.

Panizzi, A.R., Corrêa, B.S., Gazzoni, D.L., Oliveira, E.B., Newman, G.G. & Turnipseed, S.G. 1977b. Insetos da soja no Brasil. Embrapa, CNPSo, Londrina, PR, Boletim Técnico 1, 20p.

Panizzi, A. R. 2006. O Manejo integrado de pragas (MIP) em soja e o compromisso com o meio ambiente. En 3º Congreso de Soja del Mercosul. Foro Insumos. Rosário (Sta.Fe) Argentina. 27-30/06/2006. p.144-149.

Quintela, E.D., S.B. Ferreira; W.F.F. Guimarães; L.F.C. Oliveira; Oliveira A.C. 2006. Desafios do MIP em soja em grandes propriedades do Brasil Central. *Anais do IV Congresso Brasileiro de Soja*, Londrina, PR.

Roa, F.G. 1989. Biological and microbiological control of some insect pests of soybeans in the Cauca Valley, p. 1567-1571. In: Pascale, A.J. (Ed.). *Proceedings World Soybean Research Conference IV*, Orientación Gráfica Editora S.R.L., Buenos Aires, 2388p.

Samways, M. J. 1989. Controle biológico de pragas e ervas daninhas. Tradução de Regina Célia Mingnone Neto. São Paulo: EPU.

Sosa-Gómez, D.R.; K.E. Delpin; F. Moscardi; M.H. Nozaki. 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. Neotrop. Entomol. 32: 287-291.

Sosa-Gomez, D.R. 2006. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. <http://cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf>

Souza, B. H. S. 2009. Ocorrência de pragas e inimigos naturais ao longo do ciclo da cultura de soja transgênica. Grupo Cultivar. 1-4p.

Todd, J.W.; N.A. Milton; P.D. Dukes. 1972. Infestations of phytophagous insects on soybean following applications of DuPont 1410 foliar sprays and other insecticides applied to the soil. J. Econ. Entomol. 65: 295-296.

Trichilo, P.J.; L.T. Wilson. 1993. An ecosystem analysis of spider mite outbreaks:physiological stimulation or natural enemy suppression. Exp. Appl. Acarol. 17: 291-314.

Turnipseed, S.G. 1972. Management of insect pest of soybean, Proc. Tall Timbers Conf. Ecol. Anim. Contr. Habitat Manage. 4: 189-203.

CAPÍTULO 3

Atividade de um Nucleopoliedrovírus e de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra a lagarta-falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker).

3.1. Introdução

A família Baculoviridae engloba o maior grupo de vírus de insetos. Esses vírus têm grande potencial como agentes de controle biológico de insetos pragas em agricultura e áreas florestais (Martignoni 1984; Payne 1986; Moscardi & Sosa-Gómez 1992, 1993; Moscardi 1998). São específicos a uma ou poucas espécies relacionadas (Gröner 1986) e sua proteção em cristais protéicos permite a formulação de bioinseticidas, representando maior economia e biossegurança em relação aos inseticidas químicos.

Os baculovírus têm sido estudados como agentes de controle biológico de insetos desde a década de 60 (Payne 1986). Devido a sua alta especificidade e ocorrência natural, os baculovírus são ótimos candidatos a serem usados em programas de manejo integrado de pragas (Moscardi 1990; Funderburk *et al.* 1992; Tanada & Kaya 1993), pois em diversos testes de segurança foi estabelecido que o vírus é inofensivo a microrganismos, outros invertebrados, vertebrados e plantas (Payne 1986; Gröner 1989). Os baculovírus têm-se tornado um modelo em virologia animal, pois os insetos possuem um ciclo de vida curto que permite sua multiplicação massal em laboratório.

O Nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMVPN) tem sido utilizado para o controle da lagarta-da-soja, com significativos benefícios econômicos e ecológicos ao país (Moscardi & Sosa-Gómez 1992, 1996; Moscardi 1999). A partir de 1979, por um esforço de

pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, na Embrapa Soja, em Londrina, PR, foi desenvolvido um programa para o uso de um baculovírus, isolado de lagartas mortas de *A. gemmatalis* na região de Londrina, PR, caracterizado como um vírus de poliedrose nuclear (AgMVPN), para o controle da lagarta da soja (Moscardi 1986).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados com esse baculovírus, sendo o AgMVPN de alta especificidade para *A. gemmatalis*, não afetando outras lagartas como a *Pseudoplusia includens* (Walker) (lagarta-falsa-medideira). Por exemplo, a cada safra, nos últimos seis anos, têm ocorrido novos surtos de altas populações de *P. includens* em várias regiões do país. Além dos VPNs, produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) são utilizados no controle de insetos pragas e vetores de doenças (Borém 2005; Vilas-Boas *et al.* 2007) e alguns dos seus genes estão sendo inseridos em culturas como o algodão, milho, soja, dentre outras, chamadas plantas *Bt* (Barroso & Hoffmann 2007). Devido à sua importância dentre as espécies do gênero, muitos trabalhos têm sido realizados para selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros da família Noctuidae (Hernandez 1988; López-Edwards *et al.* 1999; Monnerat *et al.* 2007). Portanto, o presente trabalho, considerando a crescente importância de *P. includens* na cultura da soja, a possibilidade de uso de um Nucleopoliedrovírus de *P. includens* (PsinVPN) em laboratório, em casa de vegetação e em campo, foram realizados ainda estudos em laboratório com linhagens e proteínas Cry de *B. thuringiensis*.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Criação e manutenção da *Pseudoplusia includens*

A criação de *P. includens* teve início em Janeiro de 2006 no laboratório de criação massal de lagartas da Embrapa soja, em Londrina, PR. Para manutenção da colônia utilizou-se os procedimentos de rotina citados a seguir.

Preparo da dieta

Foi adotada a dieta artificial desenvolvida por Greene *et al.* (1976) a base de levedura de cerveja, proteína de soja, caseína e germe de trigo. Uma vez preparada, a dieta era transferida, ainda quente, para copos plásticos (50 mL). Após o resfriamento, a dieta foi armazenada em geladeira, e os copos etiquetados de acordo com a data de preparo.

Transferência das lagartas para a dieta

Com auxílio de um pincel, lagartas recém-eclodidas eram colocadas em cada copo e armazenadas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e 14 h de fotofase, até a transformação em pupas (Fig. 3.4). Estas eram retiradas dos copos e colocadas em caixa tipo Gerbox, dentro de gaiolas acrílicas (38 cm de largura x 45 cm de altura) (Fig. 3.2), forradas internamente com papel sulfite A4 umedecido diariamente. Para alimentação dos adultos, era fornecida solução aquosa de mel e cerveja (Fig. 3.1).

O papel sulfite revestindo a gaiola era trocado diariamente, a fim de se retirar os ovos aí depositados. Esses papéis eram recortados (3 cm x 5 cm) e colados na parte interna da tampa dos copos com dieta até a eclosão das lagartas (Fig. 3.3).



Figura 3.1. Gaiola de acrílico das mariposas de *Pseudoplusia includens*.



Figura 3.3. Copo contendo dieta e na tampa papel com ovos de *Pseudoplusia includens*.



Figura 3.2. Pupas em caixa Gerbox dentro da gaiola.



Figura 3.4. Prateleiras com copos contendo lagartas de *Pseudoplusia includens*.

3.2.2. Bioensaios, em laboratório, com o Nucleopoliedrovirus de *Pseudoplusia includens* (PsinVPN)

Para todos os bioensaios utilizou-se um isolado do Nucleopoliedrovirus de *P. includens* (PsinVPN) coletado na Guatemala em algodoeiro (Livingston & Yearian 1972), o qual se encontra disponível na coleção de vírus entomopatogênicos da Embrapa Soja. Para a condução dos experimentos, foram utilizadas lagartas de *P. includens* de 2º para 3º ínstar (2º pré-muda) e de 3º para 4º ínstar (3º pré-muda), cada tratamento com 60 indivíduos. Os tratamentos utilizados para determinar a concentração letal média (CL₅₀) para lagartas de 2º ínstar foram: uma testemunha (tratada apenas com água incorporada à dieta), 156; 625; 2.500; 10.000; 40.000 e 160.000 corpos poliédricos de inclusão do vírus (CPI/mL). Para lagartas de 3º ínstar foram: uma testemunha, 625; 2.500; 10.000; 40.000; 160.000 e 640.000 CPI/mL.

A suspensão viral foi incorporada à dieta segundo Morales & Moscardi (2003), sendo que 90 mL da mesma foram resfriados até 50°C em temperatura ambiente, acrescentando-se, em seguida, 10 mL da suspensão, previamente calculada para se obter as concentrações desejadas por mL de dieta artificial do inseto. Após a homogeneização, aproximadamente 10 mL do alimento contaminado foram colocados em copos plásticos de 45 mL, sendo colocadas três lagartas em cada copo e mantidas em câmaras climatizada (B.O.D) a 26°C, 70% de umidade relativa (UR) e 14 h de fotofase. Os bioensaios foram avaliados diariamente durante 13 dias, sendo os resultados de mortalidade submetidos à análise de Próbit para a estimativa da concentração letal.

3.2.3. Avaliação, em casa de vegetação, do VPN de *Pseudoplusia includens*

Plantas de soja foram cultivadas em vasos (5 L) contendo mistura em partes iguais de areia, solo e matéria orgânica, previamente esterilizados. Quando as plantas (3/vaso) atingiram o estágio de floração (R1) quatro vasos/repetição/tratamento foram separados e pulverizados com as diferentes dosagens do VPN. Essas dosagens foram: $2,0 \times 10^{11}$, $4,0 \times 10^{11}$, $6,0 \times 10^{11}$, $8,0 \times 10^{11}$ e 10×10^{11} CPI/ha; diflubenzuron (Dimilin®) (90 g. i.a/ha), metomil (Lannate®) (800 mL p.c/ha) e uma testemunha com aplicação apenas de água, sendo os tratamentos distribuídos em delineamento de blocos ao acaso. Folhas do terço superior foram retiradas ao tempo zero (imediatamente após a aplicação e secagem do produto aplicado e 48 h após a aplicação dos tratamentos (DAT). As folhas provenientes de cada repetição foram levadas para o laboratório e oferecidas a lagartas de 3º instar de *P. includens*. A mortalidade e o agente causal foram avaliados diariamente até a completa mortalidade ou pupação do inseto. Para estimativa da concentração letal média (CL₅₀), os dados foram submetidos à análise de Próbit. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

3.2.4. Avaliação, em campo, da eficiência do vírus (VPN) e diferentes inseticidas químicos para o controle de *Pseudoplusia includens*

Foram realizados cinco ensaios: dois em Iguaraçu-PR, próximo a Londrina-PR (áreas 1 e 4) e os outros três no Estado de Goiás (áreas 2, 3, 5), com os experimentos das áreas 1 e 2 sendo realizados na safra de 07-08 e os demais na safra 08-09. Todos os experimentos tiveram os mesmos tratamentos (dosagens/ha) conforme discriminados no item 3.2.3 e uma testemunha (com aplicação

apenas de água). Entretanto, os tratamentos a base de inseticidas químicos variaram de acordo com a área: área 1: metomil (Lannate® 800 mL p.c/ha) e diflubenzuron (Dimilin® 90 g i.a/ha); área 2: metoxifenoziata (Intrepid® 150 mL p.c/ha); área 3 e 5: Intrepid® 120, 135 e 150 mL p.c/ha, Lannate (800 mL p.c/ha), acefato (Orthene® 0,6 Kg i.a/ha); espinosade (Tracer® 25 mL pc/ha) + vírus 8×10^{11} e Tracer 50 mL p.c/ha + vírus 8×10^{11} ; e área 4: Lannate (800 mL p.c/ha) e Dimilin (120 g i.a/ha)

Os tratamentos foram distribuídos em delineamento de blocos ao acaso com quatro repetições e parcelas de 10 linhas/10m. Utilizou-se uma única aplicação com bico cônico (TXVK-4) com vazão de 150 L/ha. Foram realizadas no mínimo cinco avaliações após aplicação para cada área, utilizando-se o pano de batida (4 batidas/parcela). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de significância.

3.2.5. Bioensaio, em laboratório, com diferentes proteínas Cry de *B. thuringiensis* em lagartas de *Pseudoplusia includens*

Foram utilizadas lagartas de *P. includens* de 3° para 4° ínstar (3° pré-muda), com 60 lagartas/tratamento. Os tratamentos utilizados para determinar a concentração letal média (CL₅₀) foram: uma testemunha (tratada apenas com água), 43, 87, 172, 343, 686 e 1372 µg/mL de suspensão aquosa de cinco tipos diferentes de proteínas Cry: 1Ab; 2A; 1Aa; 1Ac e Btk (utilizado como um padrão). Submergiu-se cubinhos de dieta nas suspensões das diferentes proteínas, sendo colocadas três lagartas em cada copo e mantidas câmaras climatizadas (B.O.D) a 26°C, 70% de umidade relativa (UR) e 14 h de fotofase. Após 48 h, as lagartas foram transferidas para uma dieta

normal (sem as proteínas). O bioensaio foi avaliado diariamente durante 10 dias e os resultados de mortalidade foram submetidos a análise de Próbit para a estimativa da CL_{50} .

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Bioensaios, em laboratório, com o Nucleopoliedrovirus de *Pseudoplusia includens* (PsinVPN)

Os valores de Qui-quadrado (χ^2) relacionados com os diferentes ínstars para determinar a concentração letal média (CL_{50}) e o tempo letal médio (TL_{50}) não foram significativos, indicando que os dados foram homogêneos e ajustou-se ao modelo de análise Próbit (Finney 1971) (Tabela 3.1). O valor da CL_{50} para lagartas de 2° e 3° ínstars foram, respectivamente, 3770 e 4234 CPI/mL, não se observando diferença substancial da CL_{50} entre os ínstars, que foi apenas 1,12 vezes menor para lagartas de 2° ínstar. O TL_{50} para lagartas de 2° ínstar foi de 8,73 dias e de 11,09 dias para lagartas de 3° ínstar (Tabela 3.1 e 3.2).

Tabela 3.1. Concentração letal média (CL₅₀) do PsinVPN em lagartas de 2º e 3º ínstar de *Pseudoplusia includens*.

Ínstar larval	CL ₅₀ (CPI/ml de dieta)	Intervalo de confiança (95%)		Slope (b) ± SE	χ^2
		Mínimo	Máximo		
2º	3770	2442	6103	0,82 ± 0,10	5,02 ns ¹
3º	4234	2818	6309	1,31 ± 0,19	1,65 ns

¹Valor do χ^2 não significativo.

Tabela 3.2. Tempo letal médio (TL₅₀) do PsinVPN em lagartas de 2º e 3º ínstar de *Pseudoplusia includens*, na concentração de 10,000 CPI/mL de dieta.

Ínstar larval	TL ₅₀ (dias)	Intervalo de confiança (95%)		Slope ± SE	χ^2
		Mínimo	Máximo		
2º	8,733	7,99	9,34	5,25 ± 0,90	6,08 ns ¹
3º	11,10	10,66	8,66	8,66 ± 0,65	5,03 ns

¹Valor do χ^2 não significativo.

2.3.2. Avaliação, em casa de vegetação, do VPN de *Pseudoplusia includens*

A mortalidade das lagartas nas duas maiores concentrações do VPN para folhas coletadas logo após os tratamentos (dia da aplicação) chegou a 70%, permanecendo alta para as coletadas 48 h após a aplicação, com 65% de mortalidade para a maior concentração do vírus (Tabela 3.3).

Vários trabalhos realizados nos E.U.A ressaltam a eficiência do vírus de *P. includens*, abordando como dosagem e resposta da temperatura, persistência em campo e a eficácia de controle (Livingston *et al.* 1980; Zou & Young 1996; Kunimi *et al.* 1997; Ali & Young 1991; Young 2001).

O inseticida metomil (Lannate®), no dia da aplicação, apresentou uma grande eficiência com mortalidade das lagartas acima de 70%, mas com redução para 45% com 48 h após a aplicação. Já o inseticida diflubenzuron (Dimilin®) apresentou baixa eficiência, causando apenas 3% de mortalidade nas duas datas de avaliação. A dose recomendada do Dimilin para *A.gemmatalis* é de 30 a 60 g do produto comercial/ha. Bueno *et al.* (2007) ressaltam que é necessário doses até duas vezes maiores de inseticida para se obter controle aceitável da praga, em relação a *A.gemmatalis*. No entanto, para este experimento houve essa relação foi de três vezes a mais e mesmo assim não foi suficiente para se obter resultados satisfatórios no controle de *P. includens* (Tabela 3.3).

Os valores de Qui-quadrado (χ^2) para determinar a CL_{50} não foram significativos, indicando que os dados foram homogêneos. Não houve diferença significativa entre as CL_{50} nas duas datas de avaliação (Tabela 3.4).

Tabela 3.3. Número médio de lagartas mortas e percentual de mortalidade de *Pseudoplusia includens* após aplicação de diferentes dosagens do vírus do inseto e dois inseticidas químicos, em casa de vegetação.

Tratamentos	Mortalidade média de lagartas ¹ (N= 40)			
	dia aplicação	(%)	48 h após aplicação	(%)
Testemunha	0,50 a	1,25	4,75 a	12,00
vírus 2x10 ¹¹	8,00 ab	20,00	8,50 ab	21,25
vírus 4x10 ¹¹	16,25 bc	41,00	16,50 cd	41,25
vírus 6 x10 ¹¹	18,75 cd	41,00	14,00 cd	35,00
vírus 8x10 ¹¹	27,75 de	70,00	22,00 de	55,00
vírus 10 x10 ¹¹	27,75 de	70,00	25,75 e	65,00
Lannate (800 mL/ha)	28,25 e	72,00	18,25 cde	46,00
Dimilin (90 g/ha)	1,25 a	3,10	1,00 a	2,50
C.V. (%)	24,82		23,51	

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Tabela 3.4. Concentração letal média (CL₅₀) do VPN em lagartas de 3º ínstar de *Pseudoplusia includens* em casa de vegetação.

Dia da aplicação	CL ₅₀ (CPI/ha)	Intervalo de confiança (95%)		Slope ± SE	χ^2
		Mínimo	Máximo		
0 horas	3,482	2,705	4,152	3,24 ± 0,50	4,73 ns ¹
48 horas	3,979	0,503	6,400	2,69 ± 0,46	9,49 ns

¹Valor do χ^2 não significativo.

3.3.3. Avaliação, em campo, da eficiência do vírus (VPN) e diferentes inseticidas químicos para o controle de *Pseudoplusia includens*

Os inseticidas avaliados neste experimento foram: Dimilin®, Lannate®, Intrepid®, Orthene®, e Tracer®. Além das diferentes doses do Baculovírus de *P. includens*. O inseticida Dimilin® (diflubenzuron) é um exemplo de inseticidas reguladores de crescimento que inibem a síntese de quitina, que apresentam ação lenta no inseto e que interferem, especificamente, na deposição de quitina na cutícula de insetos (Reynolds 1987).

O Inseticida Lannate (metomil) controla todas as fases da vida das lagartas, quebra seu ciclo de vida, porque tem ação ovicida para lepidópteros. O Intrepid (metoxifenoazida) é um inseticida acelerador de ecdise que imita o hormônio natural da muda dos insetos, a ecdisona, e que age especificamente sobre larvas de lepidópteros. Atua ligando-se fortemente à proteína receptora de ecdisona, ativando-a e iniciando o processo da muda. Imediatamente após a ligação do Intrepid com o receptor de ecdisona, as lagartas param de se alimentar e produzem uma nova, porém mal formada cutícula por baixo da antiga, sendo que as lagartas morrem por inanição e desidratação. O acefato (Orthene) inibidor da enzima acetilcolinesterase nas sinapses nervosas, provoca a passagem contínua dos impulsos nervosos, levando o inseto à fadiga e conseqüentemente à morte. O inseticida espinosade (Tracer) é derivado da fermentação do actinomiceto *Sacharopolyspora spinosa* (Agrofit 2010).

Através dos resultados apresentados na Tabela 3.5, observou-se que, no geral, não houve diferença estatística entre os tratamentos em todas as datas de avaliação, não se observando, portanto, eficácia dos tratamentos a base do PsinVPN, nas dosagens testadas e mesmo dos inseticidas químicos metomil (Lannate) e diflubenzuron (Dimilin) para o controle de *P. includens*.

Apenas o metomil, na segunda data de amostragem, promoveu redução significativa na população do inseto, mas somente de 41% de PE (percentual de eficiência em relação à testemunha). Este inseticida apresentou desempenho melhor em outros experimentos, na Tabela 3.7 no 7 DAT (dia após o tratamento) o PE chegou a 90% e 80% na Tabela 3.9 no 5 DAT na população de *P. includens*.

No Brasil não há relatos de trabalhos de campo com o VPN da *Pseudoplusia includens*. Nos Estados Unidos (EUA) avaliaram a eficiência do VPN da *P. includens* e do produto metomil, todos os tratamentos reduziram a população de lagartas em relação à testemunha, mas nenhum tratamento com VPN foi mais eficaz que metomil (Livingston *et al.* 1980). Young & Yearian (1979) demonstraram que o VPN da *P. includens* persisti no solo, de ano para ano e pode iniciar uma epizootia. Já Mcleod *et al.* (1982) avaliaram a eficiência e a persistência do VPN em campo, a redução do número da lagartas não foi observada antes de 13 dias após o tratamento, a concentração viral no solo não foi suficiente para dar início a uma epizootia em *P. includens* na safra seguinte.

No geral, considerando todos os experimentos (Tabelas 3.5 a 3.9), verificou-se que o PsinVPN não apresentou eficiência no controle da praga em relação ao tratamento testemunha, com exceções do experimento conduzido em Iguaraçu (Tabela 3.5) com 14 DAT onde a dosagem de $10,0 \times 10^{11}$ reduziu a população em 45% PE e em Goiás (Tabela 3.9) com 5 DAT, onde a dosagem de $8,0 \times 10^{11}$ promoveu cerca de 47% PE. Dentre os produtos químicos testados, observou-se que o metoxifenoazide (Intrepid – 135 a 150 mL p.c/ha) foi o que proporcionou os melhores resultados quanto à redução populacional de *P. includens*, mas, mesmo assim com valores médios ao redor de 70% PE ou inferiores (Tabelas 3.6, 3.7 e 3.9). O produto Orthene (0,6 kg i.a/ha) mostrou-se

ineficiente para o controle da praga e o Tracer (25 e 50 mL p.c/ha) teve baixa eficiência, no geral abaixo de 50% PE.

Os resultados de um modo geral não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ou então tiveram baixa a média eficiência, principalmente ao longo das datas de amostragem após aplicação dos produtos. Provavelmente, um dos fatores relacionados é a tecnologia de aplicação, uma vez que a lagarta-falsa-medideira tem o hábito de se alimentar de brotações secundárias na parte inferior da planta, aliado ao fato da maior incidência do inseto ocorrer quando a soja está bem desenvolvida fechada nas entrelinhas, dificultando os produtos atingirem a lagarta. Isso é agravado pelo fato do vírus do inseto precisar ser ingerido para infectar as lagartas de *P. includens*. Além disso, no período de janeiro-fevereiro ocorrem períodos prolongados de chuva, promovendo elevada mortalidade natural, principalmente, pelo fungo *Nomuraea rileyi*, levando aos resultados negativos dos testes. Um exemplo disso, em Iguaraçu na safra 08-09 a cada data de amostragem observou-se em média 20 % de lagartas mortas pelo fungo (dados observados em campo). A elevada incidência de fungos, como *N. rileyi* e os do grupo dos Entomophthorales, e parasitóides tendem também a mascarar o efeito de produtos aplicados, especialmente nas últimas avaliações, quando a mortalidade natural do inseto é muito elevada.

Tabela 3.5. Número médio de *Pseudoplusia includens* em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação,

Tratamentos	Número médio de lagartas ¹ / Data de amostragem após aplicação (DAT) ²									
	0 DAT	PE (%) ³	3 DAT	PE (%)	7 DAT	PE (%)	11 DAT	PE (%)	14 DAT	PE (%)
Testemunha	13,00 a	—	16,50 a	—	18,12 a	—	8,12 a	—	3,37 ab	—
Lannate (800mL/ha)	14,62 a	—	9,75 b	41	13,25 a	27	6,75 a	17	3,75 ab	—
Dimilin (90mL/ha)	15,00 a	—	15,00 a	10	15,62 a	14	8,37 a	—	2,37 ab	30
virus 2,0x10 ¹¹	16,37 a	—	14,25 a	14	16,87 a	7,0	6,62 a	19	3,00 ab	11
virus 4,0x10 ¹¹	14,12 a	—	15,00 a	10	17,62 a	3,0	6,50 a	20	2,62 ab	23
virus 6,0x10 ¹¹	15,25 a	—	17,12 a	—	15,62 a	14	8,50 a	—	2,62 ab	23
virus 8,0x10 ¹¹	13,37 a	—	17,75 a	—	16,00 a	12	8,50 a	—	4,75 a	—
virus 10x10 ¹¹	15,62 a	—	14,37 a	13	15,62 a	14	7,75 a	5,0	1,87 b	45
C.V.(%)	23,03		19,3		22,84		26,98		48,33	

em Iguaraçu-PR (área 1) na safra de 2007-2008.

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%;

² Dia após o tratamento, data aplicação: 23 janeiro de 2008.

³ Percentual de eficiência dos tratamentos em relação a testemunha: (nº de insetos do tratamento/ nº de insetos da testemunha)*100.

Tabela 3.6. Número médio de *Pseudoplusia includens* em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Goiás- GO (área 2) na safra de 2007-2008.

Tratamentos	Número médio de lagartas ¹ / Data de amostragem após aplicação (DAT) ²									
	0 DAT	PE (%) ³	3 DAT	PE (%)	5 DAT	PE (%)	8 DAT	PE (%)	13 DAT	PE (%)
Testemunha	10,50 a	—	21,00 b	—	18,75 a	—	7,00 a	—	2,50 a	—
Intrepid (150 mL)	9,00 a	15	6,25 c	71	5,75 b	70	2,00 b	72	1,00 a	60
vírus 2,0 x 10 ¹¹	11,50 a	—	21,00 b	—	15,25 ab	19	1,66 b	77	0,66 a	76
vírus 4,0 x 10 ¹¹	10,00 a	—	33,25 a	—	17,25 a	8,0	5,25 ab	25	1,50 a	40
vírus 6,0 x 10 ¹¹	15,00 a	—	31,25 a	—	18,50 a	—	6,75 a	—	1,50 a	40
vírus 8,0 x 10 ¹¹	11,00 a	—	20,00 b	—	15,00 ab	20	4,00 ab	47	1,50 a	40
vírus 10,0 x 10 ¹¹	10,50 a	—	32,00 a	—	23,75 a	—	7,00 a	—	1,25 a	50
C.V.(%)	37,18	—	17,43	—	43,86	—	25,62	—	97,31	—

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%;

² Dia após o tratamento, data aplicação: 10 janeiro de 2008.

³ Percentual de eficiência dos tratamentos em relação a testemunha: (n° de insetos do tratamento/ n° de insetos da testemunha)*100.

Tabela 3.7. Número médio de *Pseudoplusia includens* em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Goiás-GO,(área 3) na safra de 2008-2009.

Tratamentos	Número médio de lagartas ^{1/} Data de amostragem após aplicação (DAT) ²													
	0 DAT	PE	2 DAT	PE	4 DAT	PE	7 DAT	PE	9 DAT	PE	12 DAT	PE	14DAT	PE
Testemunha	24,75 a	—	17,00 a	—	25,00 ab	—	14,00 ab	—	17,50 a	—	6,25 ab	—	4,25 a	—
vírus 2,0 x 10 ¹¹	16,50 a	34	13,50 ab	21	19,00 bc	—	12,00 abc	15	16,75 ab	5	8,50 a	—	3,75 a	12
vírus 4,0 x 10 ¹¹	22,50 a	10	12,00 ab	30	27,25 a	—	15,50 a	—	15,00 ab	15	6,00 ab	—	5,00 a	—
vírus 6,0 x 10 ¹¹	21,50 a	14	15,25 a	11	25,75 ab	—	13,25 ab	—	14,25 ab	19	5,00 ab	20	3,25 a	24
vírus 8,0 x 10 ¹¹	22,25 a	11	16,00 a	6	18,75 bc	25	11,50 abc	18	12,50 ab	29	6,50 ab	—	4,25 a	—
vírus 10,0 x 10 ¹¹	18,00 a	28	13,50 ab	11	23,50 ab	6	10,33 ab	27	13,00 ab	26	4,25 ab	32	2,75 a	36
Intrepid (120)	16,33 a	35	12,00 ab	30	14,00 c	44	6,33 d	55	11,25 b	36	6,00 ab	—	3,25 a	24
Intrepid (135)	16,50 a	34	9,00 b	48	15,25 c	39	6,75 cd	52	10,50 b	40	5,25 ab	16	2,00 a	53
Intrepid (150)	20,25 a	19	8,75 b	49	12,50 c	50	6,50 cd	54	10,50 b	40	5,25 ab	16	4,00 a	—
Lannate	23,75 a	5	8,75 b	49	18,50 bc	26	11,25 abc	20	16,75 ab	5	8,25 a	—	2,75 a	36
Orthene	26,00 a	—	14,50 ab	15	25,50 ab	—	13,25 ab	—	18,25 ab	—	7,50 ab	—	5,00 a	—
Tracer 25 + vírus	27,50 a	—	11,50 ab	33	24,50 ab	—	9,50 bcd	33	16,50 a	6	3,50 b	44	3,50 a	18
Tracer 50 + vírus	25,25 a	—	8,50 b	50	14,00 c	44	13,00 ab	8	12,25 ab	30	4,00 ab	36	3,00 a	30
C.V. (%)	33,25		29,76		22,39		30,63		26,15		46,74		68,65	

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%;

² Dia após o tratamento, data aplicação: 04 janeiro de 2009.

³ Percentual de eficiência dos tratamentos em relação a testemunha: (nº de insetos do tratamento/ nº de insetos da testemunha)*100.

Tabela 3.8. Número médio de *Pseudoplusia includens* em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Iguaraçu-PR, (área 4) na safra de 2008-2009.

Tratamentos	Número médio de lagartas ¹ / Data de amostragem após aplicação (DAT) ²									
	0 DAT	PE (%)	5 DAT	PE (%)	7 DAT	PE (%)	10 DAT	PE (%)	14 DAT	PE (%)
Testemunha	3,37 a	—	10,62 a	—	8,75 ab	—	8,00 a	—	8,75 a	—
Lannate (800mL/ha)	3,62 a	—	10,37 a	—	6,00 b	32	8,75 a	—	5,87 a	33
Dimilin (90mL/ha)	3,12 a	—	8,37 a	22	8,62 ab	—	7,5 a	—	7,87 a	11
virus 2,0x10 ¹¹	3,50 a	—	9,12 a	15	9,87 ab	—	8,87 a	—	9,62 a	—
virus 4,0x10 ¹¹	3,87 a	—	9,12 a	15	9,50 ab	—	7,62 a	—	7,12 a	19
virus 6,0x10 ¹¹	3,12 a	—	12,12 a	—	10,75 a	—	8,87 a	—	7,37 a	16
virus 8,0x10 ¹¹	4,00 a	—	10,75 a	—	8,62 ab	—	7,12 a	11	7,75 a	12
virus 10x10 ¹¹	2,12 a	38	11,00 a	—	9,12 ab	—	8,12 a	—	10,00 a	—
C.V.(%)	39,27		28,42		28,02		30,56		29,91	

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%;

² Dia após o tratamento, data aplicação: 13 janeiro de 2009.

³ Percentual de eficiência dos tratamentos em relação a testemunha: (n° de insetos do tratamento/ n° de insetos da testemunha)*100.

Tabela 3.9. Número médio de *Pseudoplusia includens* em 4 batidas/parcela (4 metros de linha) em diferentes dias após aplicação, em Goiás-Go,(área 5) na safra de 2008-2009.

Tratamentos	Número médio de lagartas ¹ / Data de amostragem após aplicação (DAT) ²											
	0 DAT	PE(%)	3 DAT	PE (%)	5 DAT	PE(%)	8 DAT	PE(%)	10 DAT	PE(%)	15 DAT	PE(%)
Testemunha	12,00 b	—	12,50 ab	—	10,75 a	—	6,00 a	—	2,50 a	—	0,75 ab	—
vírus 2,0 x 10 ¹¹	11,50 b	5	15,50 a	—	7,75 abc	28	3,75 a	38	1,50 ab	40	0,00 c	—
vírus 4,0 x 10 ¹¹	25,00 a	—	7,50 cd	40	7,75 abc	28	4,50 abc	25	1,50 ab	40	0,00 c	—
vírus 6,0 x 10 ¹¹	16,50 b	—	9,00 bc	28	10,00 ab	—	2,75 abc	65	2,50 a	—	0,00 c	—
vírus 8,0 x 10 ¹¹	17,00 b	—	11,00 bc	12	5,75 cd	47	5,25 ab	13	2,00 ab	—	0,00 c	—
vírus 10,0 x 10 ¹¹	16,00 b	—	11,50 b	8	11,00 a	—	4,50 abc	25	2,75 a	—	1,25 a	—
Intrepid (120)	12,50 b	—	5,00 d	60	1,00 e	90	1,25 ac	80	0,75 b	70	0,00 c	—
Intrepid (135)	11,00 b	8	10,00 bc	20	2,75 de	75	0,75 c	87	0,50 b	80	0,00 c	—
Intrepid (150)	13,50 b	—	4,00 d	68	2,75 de	75	2,00 abc	67	0,75 b	70	0,00 c	—
Lannate	10,00 b	17	5,00 d	60	5,25 cd	52	3,50 abc	42	1,25 ab	50	0,00 c	—
Orthene	16,00 b	—	12,00 b	—	7,25 abc	33	4,50 abc	25	1,25 ab	50	0,00 c	—
Tracer 25 + vírus	16,50 b	—	12,00 b	—	7,25 abc	33	4,00 abc	34	2,00 ab	—	0,25 bc	67
Tracer 50 + vírus	13,00 b	—	9,66 bc	23	5,00 cd	54	5,00 ab	17	0,75 b	70	0,00 b	—
C.V. (%)	31,52		23,28		40,89		66,64		59,9		227,4	

¹ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

² Dia após o tratamento, data aplicação: 08 janeiro de 2009.

³ Percentual de eficiência dos tratamentos em relação a testemunha: (nº de insetos do tratamento/nº de insetos da testemunha)*100

3.3.4. Bioensaio, em laboratório, com diferentes proteínas Cry de *B. thuringiensis* em lagartas de *Pseudoplusia includens*.

Os valores de Qui-quadrado (χ^2) relacionados com as cinco proteínas Cry para determinar a CL₅₀ foram não-significativo, mostrando homogeneidade dos dados. A maior CL₅₀ foi observada para a proteína Cry 2 A e a menor foi do Btk, respectivamente, 600 e 37 $\mu\text{g/mL}$. A proteína Cry 1Ac, depois do Btk foi a mais tóxica a *P. includens* com CL₅₀ de 76 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3.10).

A Cry 2A apresentou a menor mortalidade, estatisticamente igual ao resultado da testemunha, sendo que esta mesma proteína obteve a maior CL₅₀ e as lagartas apresentaram maior peso quando tratadas com essa proteína. Isso mostra que a Cry 2A obteve baixa eficiência para o controle de *P. includens* (Tabela 3.11). Os resultados de mortalidade não diferiram estatisticamente para as proteínas Cry1Ac, 1Ab e 1Aa em *P. includens*, já o menor peso de lagarta foi observado no tratamento com a Cry1Aa, com peso médio de 0,04g.

Os resultados observados na Tabela 3.11 mostraram que a maior mortalidade foi com o Btk. Atualmente estão disponíveis no mercado bioensetecidas à base de Btk, que contém proteínas Cry 1Aa, Cry1Ab, Cry 1Ac, Cry 2A e Cry1B, que são tóxicas em nível variável às lagartas da família Noctuidae (Santos *et al.* 2008). Neste trabalho observou-se que o Btk também foi eficiente a *P. includens* em todos os parâmetros analisados como, mortalidade, peso/lagarta e concentração letal.

Tabela 3.10. Concentração letal média (CL 50) de diferentes proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de 3º ínstar de *Pseudoplusia includens*.

Proteínas	CL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança (95%)		Slope ± SE ²	χ ² ¹
		Mínimo	Maximo		
Cry 2A	606	505	704	2,25 ± 0,24	4,25 ns
Cry 1Ac	76	62	93	2,18 ± 0,22	0,64 ns
Cry 1 Ab	300	255	352	2,45 ± 0,26	4,89 ns
Cry 1Aa	105	90	122	2,85 ± 0,31	4,18 ns
Btk	37	32	43	3,26 ± 0,33	4,01 ns

¹ Valor do χ² não-significativo

² SE- Erro padrão

Tabela 3.11. Mortalidade e Peso médio de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de 3º ínstar de *Pseudoplusia includens*.

Tratamento	Mortalidade Média ¹	Peso Médio/lagarta (g) ¹
Testemunha	0,00 a	0,15 a
Cry 2A	1,50 a	0,13 a
Cry 1Ac	2,75 c	0,11 ab
Cry 1 Ab	2,75 c	0,07 bc
Cry 1Aa	2,40 c	0,04 c
Btk	2,80 b	0,06 bc
C.V. (%)	32,73	6,38

¹Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%;

2.4. Literatura citada

Agrofit. 2010. Relatório de agrotóxico. Consultado em 25 de Janeiro de 2010. <<http://www.agrofit.com.br>>.

Ali, A.; S. Young. 1991. Influence of caterpillar age and temperature on effectiveness of a nuclear polyhedrosis virus in the soybean Looper, *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean. Biol. Control. 1: 334-338.

Ashfaq, S.Y.; S.Y. Young; R.W. McNew. 2001. Caterpillar mortality and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on a transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton cultivar expressing Cry1 AC insecticidal protein. J. Econ. Entomol. 94: 1053-1058.

Barroso, P.A.V. & L.V. Hoffmann. 2007. Algodoeiro geneticamente modificado. In: E.C. Freire (ed). Algodão no Cerrado do Brasil. Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, Brasília, 141-174p.

Borém, A. 2005. Biotecnologia e meio ambiente. Viçosa: Folha de Viçosa, 425p.

Bueno, R.C.O.F.; J.R.P. Parra; A.F. Bueno; F. Moscardi; J.R.G. Oliveira; M.F. Camillo. 2007. Sem barreira. Rev. Cultivar. 55:12-15.

Chitkowski, R.L.; S.G. Turnipseed; M.J. Sullivan; W.C. Bridges. 2003. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki Berliner proteins for management of Noctuid (Lepidoptera) pest. *J. Econ. Entomol.* 96: 755-762.

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge, Univ. Press, London, New York, 333p.

Funderburk, J.; J. Maruniak; D. Boucias; A. Garcia-Canedo. 1992. Efficacy of baculoviruses and their impact on pest management programs. In: L.G. Copping; M. Green; R. Rees (eds.). *Pest management in soybean.* Elsevier, London, 88-97p.

Greene, G.L.; N.C. Leppla; W.A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69: 487-488.

Gröner, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses. In: R.R. Granados; B.A. Federici (eds.). *The biology of baculoviruses.* Boca Raton, CRC, 177-202p.

Gröner, A. 1989. Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. In: L. Lacey; E.W. Davison. (eds.). *Safety of microbial insecticides.* CRC, Boca Raton, 135-147p.

- Hernandez, J.L.L. 1988.** Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. *Entomophaga*. 33:163-177.
- Kunimi, Y., J.R. Fuxa; A.R. Richter. 1997.** Survival time and lethal doses for wild and recombination *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viruses in different instar of *Pseudoplusia includens*. *Biol. Control*. 9: 129-135.
- Livingston, J.M. & W.C. Yearian. 1972.** A nuclear polyhedrosis virus of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invert. Pathol.*19:107-112.
- Livingston, J.M., P.J. Mcleod; W.C. Yearian; S.Y. Young. 1980.** Laboratory and field evaluation of nuclear polyhedrosis virus of the soybean Looper, *Pseudoplusia includens*. *J. Georgia Entomol. Soc.* 15: 94-199.
- López-Edwards, M.; J.L. Hernández-Mendoza; A. Pescador-Rubio; J. Molina-Ochoa; R. Lezama-Gutiérrez; J.J. Hamm; B.R. Wiseman. 1999.** Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collect from corn in México. *Florida Entomol.* 82: 254-262.
- Macrae, T.C.; E.B. Matthew; D.J. Boethel; B.J. Fitzpatrick; A.G. Gao; J.C. Gamundi; L.A. Harrison; V.T. Kabuye; R.M. Mcpherson; J.A. Miklos; M.S. Paradise. 2005.** Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high dose expression of a synthetic of *Lepidoptera*. 96: 577-587.

- Martignoni, M.E. 1984.** Baculovirus: an attractive biological alternative. In: W.Y. Garner; J. Harvey Junior. (eds.). Chemical and biological controls in forestry. Washington, D.C.: American Chemical Society, 55-67p.
- Mcleod, P.J.; S.Y. Young; W.C. Yearian. 1982.** Applications of a baculovirus of *Pseudoplusia includens* to soybean: Efficacy and Seasonal Persistence. Environ. Entomol. 11: 412-416.
- Monnerat, R.G.; A.C. Batista, P.T.S. Medeiros; E. Martins; V. Mellati; L. Praça; V. Dumas; C. Demo; A.C.M. Gomes; R. Falcão; C. Berry. 2007.** Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. Biol. Control. 41: 291-295.
- Morales, L.C.; F. Moscardi. 1993.** Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. An. Soc. Entomol. Brasil. 22: 535-540.
- Moscardi, F. 1986.** Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Manole, São Paulo, 407p.
- Moscardi, F. 1990.** Uso de entomopatógenos no manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: O.A. Fernandes; A.C.B. Correia; S.A. Bortoli (eds.). Manejo integrado de pragas e nematóides. Funep, Jaboticabal, 207- 220p.

Moscardi, F. 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: S.B. ALVES (ed.). Controle microbiano de insetos. Fealq, Piracicaba, 509-539p.

Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 257-89.

Moscardi, F.; D.R. Sosa-Gómez. 1992. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: I.G. Copping; M.B. Green; R.T. Reeds. (eds.). *Pest management in soybean.* Elsevier Applied Science, London, 98-109p.

Moscardi, F.; D.R. Sosa-Gómez. 1993. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. In: *International Crop Science Congress, Ames, Iowa, International crop science I.* Madison: Crop Science Society of America, 115-119p.

Moscardi, F.; D.R. Sosa-Gómez. 1996. Utilización de virus a campo. In: R.E. Lecuona (ed.). *Microrganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.* Taller Mariano Mass, Buenos Aires, 261-276p.

Payne, C.C. 1986. Insect pathogenic viruses as pest control agents. *Fortschritte der Zoologie.* 32: 183-200.

Reynolds, S.E. 1987. The cuticle, growth regulators and moulting in insects: the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pest. Science*. 20: 131-146.

Santos, K.B.; P. Neves; A.M. Meneguim; R.B. Santos; W.J. Santos; G.V. Boas; V. Dumas; E. Martins; L.B. Praça; R. Monnerat. 2008. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) Lepidoptera: Noctuidae. *Bol. Pesq. Desenvol.* 26p.

Tanada, Y.; H.K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic, New York, 666p.

Vilas-Boas, G.F.L.T.; A.P.S Peruca; O.M.N. Arantes. 2007. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian J. Microbiol.* 53: 673-687.

Young, S.Y. & Yearian, W.C. 1979. Soil application of *Pseudoplusia includens* VPN: Persistence and incidence of infection in soybean looper caged on soybean. *Environ. Entomol.* 8: 860-864.

Young, S.Y., 2001. Enhancement of nucleopolyhedrovirus activity in *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Pseudoplusia includens* (Walker) lagartae with a fluorescent brightener. *J. Entomol. Soc.* 36: 162-168.

Zou, Y., S. Young. 1996. Use of fluorescent brightener to improve *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus activity in the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 89: 92-96.

CAPÍTULO 4

Avaliação de sete isolados virais como potenciais agentes de biocontrole em *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae).

4.1. Introdução

A lagarta da soja, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae; Plusiinae), é uma espécie com distribuição restrita ao hemisfério ocidental, ocorrendo a partir do norte Estados Unidos da América (EUA) para o sul da América do Sul (Alford & Hammond 1982). Pode alimentar-se de um grande número de plantas hospedeiras, incluindo plantas de culturas de grande importância econômica, tais como soja, algodão, feijão, fumo e girassol (Bueno *et al.* 2007). No Brasil, esta lagarta tornou-se praga-chave da cultura da soja somente nos últimos cinco anos. Tem sido controladas principalmente por aplicações de inseticidas químicos de largo espectro (Bueno *et al.* 2007), necessitando, geralmente, de doses mais elevadas de inseticidas quando comparada com às doses utilizadas para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Morales *et al.* 1995).

Os Baculovírus pertencentes à família Baculoviridae são um grande grupo de vírus que infectam diferentes ordens de insetos, principalmente Lepidoptera. A família Baculoviridae é dividida em dois gêneros, Nucleopoliedrovirus (VPL) e Granulovirus (GV) (Theilmann *et al.* 2005) Jehle *et al.* (2006) propuseram uma revisão da classificação dividindo-se a família em quatro gêneros, o alfa-, beta-, gama e delta-baculovírus. Os Baculovírus possuem em seu genoma DNA de fita dupla covalentemente fechada (tamanho de 80-180 kbp), o qual é embalado individualmente ou

se multiplica em um envelope, apresenta o vírion em forma de bastonete. (Friesen & Miller 2001; Theilmann *et al.* 2005). Duas formas morfológicamente distintas de partículas infecciosas são geradas em seu ciclo, a oclusão derivada do vírus (OB), compreendendo vírions envolto incorporado dentro de uma matriz cristalina de proteína (poliedrina em VPN e a granulina para GV), que consiste de um único vírion envolvido por uma membrana plasmática. Devido à sua especificidade e alta virulência para algumas espécies de insetos pragas, os Baculovirus têm sido utilizados mundialmente para controlar pragas de lepidópteros em muitas culturas (Gröner 1986; Moscardi 1999; Moscardi *et al.* 2002). O nucleopoliedrovirus múltiplo (AgMVPN) de *A. gemmatalis* é um dos mais bem sucedidos e reconhecidos exemplos de utilização de vírus para o controle de insetos pelos agricultores (Moscardi 1999; 2007), sendo empregado na cultura da soja não só no Brasil, como também na Argentina, Paraguai e México.

Embora uma série de estudos com base nos padrões de restrição do DNA tem sido utilizada para investigar a variabilidade entre isolados de VPN Caballero *et al.* (1992); Richards *et al.* (1999); Takatsuka *et al.* (2003); Cory *et al.* (2005) e distinguir VPLs dos isolados de diferentes insetos Chou *et al.* (1996); Boughton *et al.* (1999); Martins *et al.* (2005), muito pouco se sabe sobre a diversidade genética de baculovírus em populações de campo.

Na Guatemala, o nucleopoliedrovirus de *P. includens* (PsinSVPN) obtido a partir do inseto do algodão, foi estudado sob condições de laboratório e de campo, em relação a aspectos como dosagem e resposta da temperatura (Livingston *et al.* 1980; Kunimi *et al.* 1997; Ali & Young 1991), efeito de potenciadores virais (branqueadores fluorescentes) (Zou & Young 1996; Young 2001), persistência em campo, a eficácia de controle (Young & Yearian 1982). Este isolado foi também utilizado em ensaios laboratoriais iniciais no Brasil como mencionados em Morales & Moscardi (1993a) e Morales *et al.* (1993). Recentemente no Brasil, alguns outros isolados do vírus foram

obtidos a partir de insetos coletados em plantas de soja. Devido à importância da lagarta-da-soja, algumas iniciativas têm sido realizadas visando avaliar o potencial desses baculovirus como inseticida biológico, mas antes do uso como inseticida é importante selecionar isolados que apresentem maior eficiência no controle de *P. includens*. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar e comparar os isolados em relação aos aspectos morfológicos, moleculares e atividade biológica.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Insetos e isolados virais

Lagartas de *P. includens* supostamente infectadas com corpos de oclusão do baculovirus coletadas em fazendas de soja de diferentes regiões foram conduzidas a Embrapa Soja, Londrina-PR, para a confirmação da presença do baculovirus foi utilizado o microscópio de contraste de fase como é mostrado na Figura 4.1. A partir das lagartas coletadas, sete isolados virais foram purificados e chamados de Psin-IA (IA), Psin-IB (IB) e assim por diante, conforme apresentado na Tabela 4.1.

4.2.2. Purificação dos corpos de oclusão viral (OBS)

Lagartas infectadas foram maceradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%, dodecil sulfato de sódio – SDS 2%, 0,01 M Tris-HCl, pH 7,8 e 0,001 M EDTA). Em seguida, as lagartas maceradas foram filtradas em seis camadas de gaze e o conteúdo foi submetido primeiro a uma agitação de baixa velocidade de rotação (400g/5 min.) para a remoção dos restos e

posteriormente, as amostras foram centrifugadas (12.000g/15 min.). Os pellets foram suspensos em tampão TE (0,01 M Tris-HCl, pH 7,8 e 0,001 M EDTA) e, em seguida, foram centrifugados (12.000g/15 min.). O OB foi novamente suspenso e lavado com SDS a 0,1% e 0,1 M NaCl. As suspensões finais de OB foram preparadas em água Milli-Q e armazenadas a -20°C.

Tabela 4.1. Isolados virais obtidos a partir de lagartas infectadas de *Pseudoplusia includens*.

Isolados	Data da coleta	Local da coleta	Instituição	Cultura
Psin-IA(I-A)	1972	Guatemala/ Central America	Universidade de Arkansas/USA	Algodão
Psin-IB(I-B)	Jan./2006	Londrina, PR	Embrapa Soja	Soja
Psin-IC(I-C)	Jan./2006	Maringá, PR	Embrapa Soja	Soja
Psin-ID(I-D)	Feb./2006	Iguaraçu, PR	Embrapa Soja	Soja
Psin-IE(I-E)	Feb./2007	Iguaraçu, PR	Embrapa Soja	Soja
Psin-IF(I-F)	Feb./2008	Dourados, MS	Campo de soja	Soja
Psin-IG(I-G)	Feb./2008	Sertanópolis, PR	Campo de soja	Soja

4.2.3. Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), os OBs purificados foram fixados em uma solução contendo glutaraldeído 2,5% e 0,02 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 2 h, e em seguida, pós-fixados em uma solução de tetróxido de ósmio 1% e 0,02 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) por 1 h. Após a fixação as amostras foram desidratadas por imersão em acetato de uranila 0,5% e uma série graduada de etanol e, em seguida, as amostras foram embebidas em resina de Spurr (Spurr 1969). Secções ultrafinas foram preparadas em um ultramicrotomo OMU3 Reichert (Reichert Supernova ultramicrotomo), corados com acetato de uranila 2%, seguido por Reynolds citrato de chumbo (Reynolds 1963), e observados em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011 at 80 kV.

4.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos corpos de oclusão (OB)

O OBs foram misturados individualmente com 2x o volume da amostra de uma mistura contendo 125 mM Tris-HCl (pH 6,7), 4% SDS, 30% de glicerol, 0,002% azul de bromofenol, e 10% do agente redutor 2- β -mercaptoetanol. Após a fervura por 5 min. e centrifugação a 14.000g/5 min., as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 16% contendo SDS, como descrito por Laemmli (1970). O gel foi então corado com Coomassie azul brilhante.

4.2.5. Purificação e extração do DNA dos Obs

A purificação do DNA foi feito com base no método padrão descrito por O'Reilly *et al.* (1992), onde os vírions foram liberados pela dissolução de 1×10^9 OB/ml de solução alcalina (0,1 M

Na₂CO₃, 0,17 M NaCl, 0,01 M EDTA, pH 10,9) a 37°C por 30 min. Em seguida, o DNA dos vírions liberados dos OBs foi extraído incubando-se a solução overnight a 37°C, com 1% de SDS e 0,5 mg/ml de proteinase K (concentração final), seguido de extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A fim de precipitar o DNA, um volume 0,1% de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto foram adicionados à fase aquosa e em seguida incubadas a -20°C, durante a noite. O DNA precipitado foi recuperado por centrifugação em microcentrífuga a 14.000g/15 min., e lavados com 70% (v/v) de etanol. O DNA seco foi ressuspenso em tampão TE estéril (pH 8,0) e armazenadas a 4°C até o uso. Concentração de DNA foi estimada por comparação com concentrações conhecidas de DNA padrão (λ DNA).

4.2.6. Clivagem do DNA viral com o uso de enzimas (endonucleases) de restrição (REN)

O DNA viral (1-2 mg) foi clivado com as endonucleases de restrição BamHI, EcoRI, HindIII e PstI nas condições recomendadas pelo fabricante (Gibco BRL ou Sigma) individualmente. Os fragmentos de DNA gerados foram analisados em 1% de gel de agarose em eletroforese de 40 V, durante a noite (14 -16 h), utilizando tampão TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA, pH 8,0). Para a exata medição do local de clivagem das enzimas foi utilizado o marcador molecular de 1kb de tamanho (1kb plus DNA ladder da Gibco BRL). Após a corrida, o gel foi corado com 0,5 mg/ml de brometo de etídio, visualizado e fotografado com o auxílio do programa Eagle Eye II (Stratagene).

4.2.7. Bioensaios com diferentes isolados virais

Diferentes isolados de SVPN (PsinSVPN) de *P. includens* obtidos em diferentes localidades do Centro e Sul do Brasil foram comparados com um isolado obtido de Guatemala utilizado anteriormente em laboratório e estudos de campo nos Estados Unidos (Tabela 4.1) através de bioensaios. Os insetos utilizados nos bioensaios foram obtidos de uma colônia existente na Embrapa Soja, Londrina, PR. Quarenta lagartas de terceiro ínstar de *P. includens* foram infectadas com os 7 diferentes isolados através da incorporação da suspensão de vírus na dieta artificial (Greene et al. 1976), de acordo com os procedimentos descritos por Morales & Moscardi (1993b). Cada isolado foi inoculado em cinco concentrações vírais diferentes (625; 2,500; 10,000; 40,000, 160,000 OB/ml de dieta). As lagartas foram colocadas em copos de plástico de 50 ml (2 lagartas/recipiente) contendo a dieta inoculada com as diferentes concentrações virais e incubada em câmaras climáticas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e 14 h de fotofase. As lagartas que receberam a dieta sem adição de suspensão viral foram usadas como controle. As lagartas foram avaliadas diariamente até oito dias após o tratamento. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit (Finney 1971), para a estimação da concentração média letal (CL_{50}) e do tempo letal médio (TL_{50}), bem como dos parâmetros associados (Intervalo de confiança (IC) de 95% e χ^2) para todos os isolados. Para significância estatística entre os isolados, a sobreposição de 95% do IC significa que os valores de comparação de CL_{50} e TL_{50} não são significativos. Caso contrário a não-sobreposição de 95% do intervalo ou limite de confiança foi considerada evidência de diferenças significativas entre os valores avaliados.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Descrição morfológica dos isolados virais (VPN) de *Pseudoplusia includens*

Amostras das suspensões de vírus dos sete isolados (PsinSVPN) foram examinadas através da microscopia de contraste de fase e através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) quanto à presença de corpos de oclusão (OB). A MET dos OBs de SVPN de *P. includens* revelou a presença de vários (até 21) vírions que exibem nitidamente a presença de um único nucleocapsídeo (Fig. 4.1). Em adição, a MET mostrou que as formas de exposição dos OBs são pleomórficas com tamanhos variando de 0,5-1,3 μm de diâmetro, sendo a maioria apresentando o tamanho em torno de 1 μm . O tamanho encontrado neste estudo é inferior a escala do tamanho (0,15 a 15 μm) relatado para VPLs (Theilmann *et al.* 2005). Porém apresentam tamanhos similares aos SVPN isolados de outras espécies de lepidópteros. Estes apresentam diâmetros de OBs variando entre 0,5-2,0 μm , como e o caso de SVPN de *Clanis bilineata* (Wang *et al.* 2008), de SVPN de *Ectropis obliqua* (Ma *et al.* 2006), de SVPN de *A. honmai* (Ishii *et al.* 2003), de SVPN de *Thysanoplusia Orichalcea* (Cheng & Carner 2000), e de outros SVPN citados por Sudhakar & Mathavan (1999).

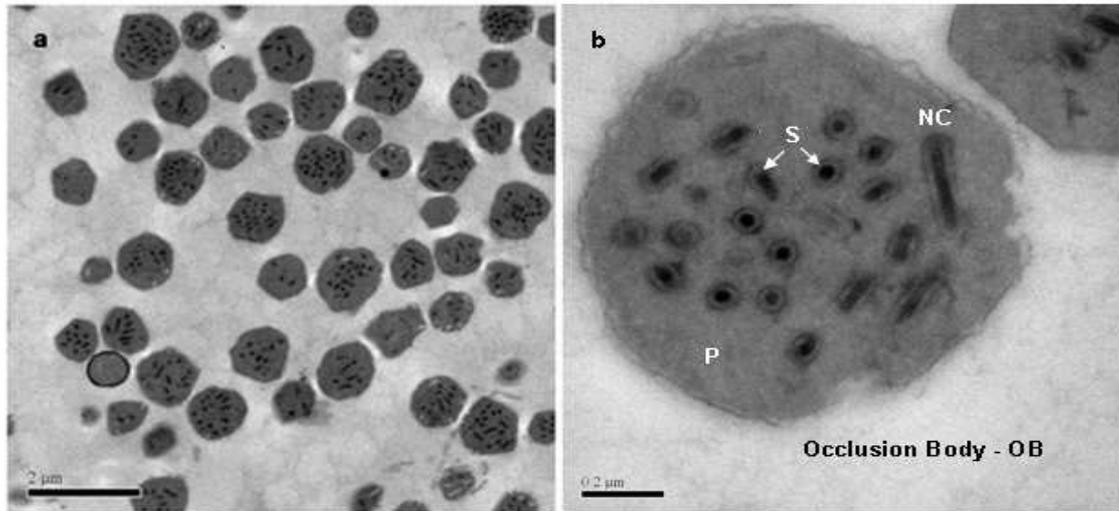


Figura 4.1. Microscopia eletrônica de transmissão de corpos de oclusão (OB) do baculovirus *Pseudoplusia includens* nucleopoliedrovírus simples (PsinSVPN). Barra representa 2 µm (a). Corpo de oclusão mostrando vírions contendo um único nucleocapsídeo (NC) por envelope (S - simples). (cortes transversal e longitudinal) oclusos em uma matriz protéica cristalina (P - poliedrina). Barra representa 0,2 µm (b).

4.3.2. Análise estrutural de proteínas virais por SDS-PAGE

O padrão eletroforético das proteínas estruturais dos sete isolados de PsinSVPN analisados foi semelhante considerando a mobilidade e intensidade das bandas (Fig. 4.2). Uma banda de brilho intenso de aproximadamente 33kDa foi detectada em todos os isolados analisados e assemelha-se a banda encontrada no nucleopoliedrovírus múltiplo de *A. gemmatalis* (AgMVPN) que corresponde à proteína poliedrina (Zanotto *et al.* 1992).

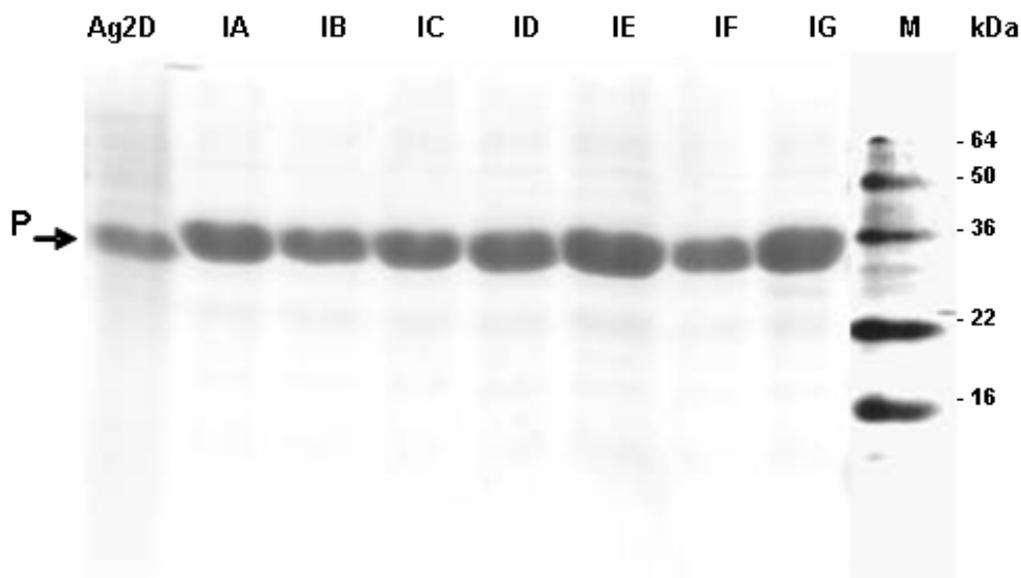


Figura 4.2. Banda intensa detectada no perfil de cada isolado correspondente a proteína poliedrina (P), similar a do baculovirus AgMVPN (Ag2D) de aproximadamente 33kDa.

4.3.3. Análise comparativa dos padrões de restrição do DNA viral

O DNA genômico de cada um dos sete PsinSVPN isolados foi clivado utilizando as enzimas BamHI, EcoRI, HindIII e PstI e o para comparar padrão de bandas (perfil de restrição) gerado entre eles foi comparado (Fig. 4.3). As análises foram feitas pela comparação de fragmentos adicionais presentes em relação ao número de fragmentos comum a todos os isolados, gerados por cada divisão. Algumas diferenças foram observadas entre os padrões de restrição dos isolados virais analisados, em especial para a digestão com a enzima EcoRI que revelou uma gama ainda maior de variação, em termos de número de fragmentos de DNA detectável (26-32 fragmentos). Além de 26 fragmentos comum a todos os isolados gerados pela clivagem com EcoRI, houve três fragmentos extra de cerca de 10, 2,7 e 1,6 ou 1,8 kbp respectivamente para os isolados IA e IB; um fragmento

de 2,7 kbp para o isolado IC; quatro fragmentos de 10, 3,7, 2,7 e 1,6 kbp para os isolados IE e IF; e seis fragmentos de 10, 3,7, 3,6, 2,7, 1,6 e 1,2 kbp para o isolado IG. Os perfis gerados pelo uso de outras enzimas de restrição somente apresentou um ou dois fragmentos extra. A combinação resultante das análises de DNA com as quatro enzimas de restrição mostraram que apenas dois isolados, IE e IF apresentaram o mesmo número e mobilidade dos fragmentos no gel, sugerindo assim, que esses isolados podem apresentar genomas semelhantes.

Portanto, a heterogeneidade observada entre os isolados pela clivagem desigual das diferentes enzimas encontrado neste estudo torna evidente a necessidade de estudos mais detalhados para verificar se estas variantes do vírus representam espécies distintas ou são apenas bandas submolares. Isolados selvagens ou nunca estudados de baculovírus podem ser considerados geneticamente heterogêneos e isso é normalmente indicado pela presença de bandas submolares nos perfis de restrição de DNA (McIntosh *et al.* 1987; Smith & Crook 1988a, 1988b).

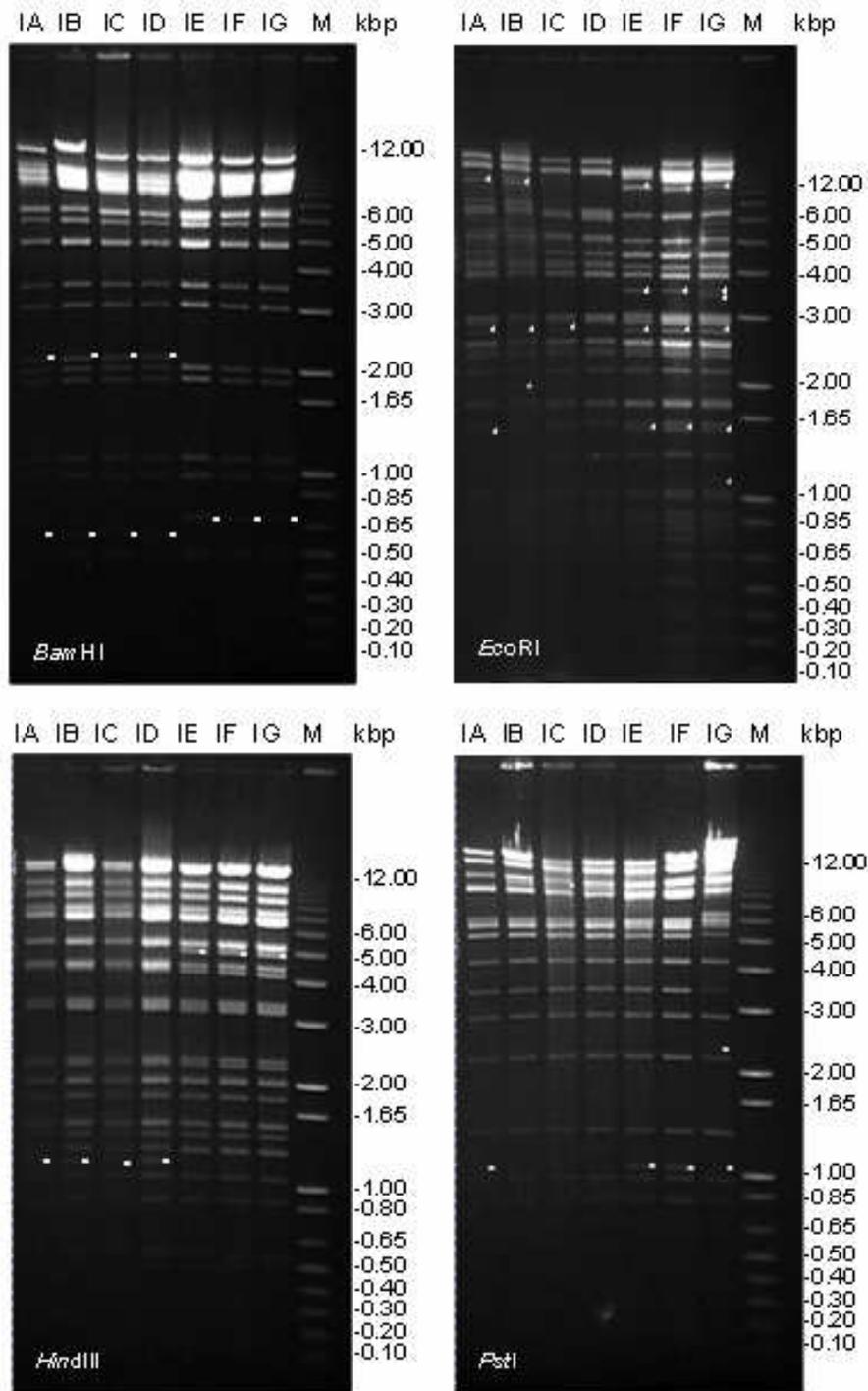


Figura 4.3. Análise de DNA de sete isolados virais de *Pseudoplusia includens* clivado com enzimas de restrição *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I. Eletroforese em gel de agarose 1%. Isolados virais: I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F e I-G. M: marcadores – 1kb plus DNA Ladder (a, b, c) e DNA λ /*Pst*I (d).

4.3.4. Atividade biológica dos isolados PsinSVPN

Os valores de Qui-quadrado (χ^2) dos diferentes isolados testando a CL₅₀ e a TL₅₀ não foram significativos, indicando a homogeneidade dos dados de todos os isolados e, principalmente, que os dados adaptaram-se ao modelo de análise Próbit utilizado (Finney 1971). Os isolados IA (da Guatemala), IE (do município de Iguaraçu, PR, Brasil, temporada de 2006/07) e IF (em Dourados-MS, Brasil) foram os mais virulentos contra *P. includens* em relação aos demais isolados testados, mas quando comparados entre si, estes isolados não foram estatisticamente diferente com base na sobreposição de 95% IC, mas significativamente diferente dos outros isolados com base na não-sobreposição de 95% IC (Tabela 4.2). Os isolados IC e IG foram os menos virulentos de *P. includens*, sendo de 3,5 a 3,8 vezes menor quando comparados com virulência dos isolados mais eficazes (IA, IE e IF). Quando o TL₅₀ dos isolados foram comparados, a mesma tendência foi observada. Os isolados IA, IE, e IF apresentaram do menor tempo (variando entre 9,18 e 9,50 dias) para matar o inseto hospedeiro, em comparação com os outros isolados (variando entre 10,13 e 13,39 dias) (Tabela 4.3).

Variações genotípicas do baculovírus têm sido relatadas como um evento comum na população de campo, e como consequência, podem propiciar diferenças nos padrões de bandas (perfis de restrição) de DNA e também em suas atividades biológicas (Caballero *et al.* 1992; Takatsuka *et al.* 2003; Cory & Myers 2003; Cory *et al.* 2005). No presente trabalho, PsinSVPN isolados de diferentes localidades foram analisados e comparados essencialmente com base em seus padrões de restrição do DNA e virulência, uma vez que todos os isolados foram semelhantes em sua morfologia geral. A clivagem do DNA utilizando quatro enzimas de restrição gerou perfis de bandas diferentes ressaltando sua variação genômica. De acordo com Cory *et al.* (2005), pequenas

alterações genômicas podem resultar em alterações significativas na atividade biológica do baculovírus. Portanto, faz-se necessária a realização de mais estudos moleculares, como o seqüenciamento, pois este, além de ser útil na identificação e caracterização dos isolados, pode ajudar a elucidar se as regiões de variação do genoma detectado neste trabalho estão relacionadas com as diferenças de CL₅₀ e TL₅₀ observadas entre os isolados avaliados.

Livingston *et al.* (1980) e Young & Yearian (1982) estudaram a mortalidade de lagartas em laboratório e no campo, bem como outros aspectos, do isolado IA (obtido na Guatemala) na década de 1980, no entanto, não há pesquisas recentes com o PsinSVPN, principalmente relacionadas com a comparação da atividade biológica de diferentes isolados virais e sua caracterização molecular, como realizado no presente trabalho.

Até cinco anos atrás *P. includens* era considerada uma praga secundária na cultura da soja no Brasil, raramente ocorrendo em um nível de densidade que exigiam medidas de controle. Com o aumento na área cultivada sob o sistema plantio direto no país, a maioria dos produtores de soja começou a misturar inseticida piretróide com herbicida de pós-emergência muito cedo no desenvolvimento da cultura. Este procedimento tem promovido a diminuição dramática de inimigos naturais (especialmente predadores e parasitóides) e como consequência, vem aumentando a incidência de *P. includens* em todo o país, exigindo maior número de aplicações de inseticidas químicos de largo espectro na cultura (Bueno *et al.* 2007; Alexandre *et al.* comunicação pessoal.). Além disso, para o controle de *P. includens*, normalmente, se requer doses elevadas de inseticidas químicos e produtos biológicos baseados em *B. thuringiensis* (Morales *et al.* 1995). Neste contexto, a utilização de um inseticida viral baseado no PsinSVPN para controlar *P. includens* seria importante para superar os problemas relacionados com a redução de inimigos naturais e possível

seleção de resistência a inseticidas químicos em populações de insetos relacionados com práticas de controle usadas no momento (Bueno *et al.* 2007).

Tabela 4.2. Média das concentrações letais (CL₅₀) obtidos de lagartas de terceiro ínstar de *Pseudoplusia includens* infectados com diferentes isolados (PsinSVPN).

Isolados ¹	CL ₅₀ (OB/ml de dieta)	95% Intervalo de confiança		Slope ± EP ²	χ^2 [*]
		Limite inferior	Limite superior		
I-A	2500	1833	3408	2.07 ± 0.31	0.00 ns ³
I-B	5800	4188	7766	2.00 ± 0.24	2.18 ns
I-C	8713	5915	14485	1.51 ± 0.24	2.08 ns
I-D	4751	3459	6424	1.98 ± 0.24	0.33 ns
I-E	2974	1797	4500	1.21 ± 0.17	3.00 ns
I-F	2811	1855	3984	1.53 ± 0.20	3.38 ns
I-G	9274	6590	13526	1.61 ± 0.21	0.03 ns

¹ A- isolado da Guatemala; B- de Londrina-PR; C- de Maringá-PR; D- de Iguaraçu-PR na safra 2005/2006, E- de Iguaraçu-PR na safra 2006/2007; F- de Dourados-MS e G- de Sertãoópolis-PR;

² EP = Erro padrão

³ valores de χ^2 não significativo.

* χ^2 = valores de qui-quadrado.

Tabela 4.3. Tempo Letal Médio (TL₅₀) obtido para lagartas de terceiro ínstar *Pseudoplusia includens* infectados com diferentes isolados (PsinVPN) na concentração de 2,500 OB/mL de dieta.

Isolados ¹	TL ₅₀ (dias)	95% Intervalo de confiança		Slope ± EP ²	χ^2 *
		Limite inferior	Limite superior		
I-A	9,18	8,62	9,88	5,41 ± 0,60	6,74 ns ³
I-B	11,96	10,75	14,23	4,14 ± 0,65	2,83 ns
I-C	13,39	11,80	16,74	4,34 ± 0,72	0,88 ns
I-D	10,13	9,53	10,96	6,05 ± 0,78	6,88 ns
I-E	9,25	8,89	9,64	9,94 ± 0,98	6,83 ns
I-F	9,50	8,95	10,17	5,99 ± 0,64	2,88 ns
I-G	10,68	10,20	11,34	9,00 ± 1,11	6,10 ns

¹ A- isolado da Guatemala; B- de Londrina-PR; C- de Maringá-PR; D- de Iguaraçu-PR na safra 2005/2006, E- de Iguaraçu-PR na safra 2006/2007; F- de Dourados-MS e G- de Sertanópolis-PR;

² EP = Erro padrão

³ valores de χ^2 não significativo.

*- χ^2 = valores de qui-quadrado.

4.4. Literatura citada

- Alford, A.R.; A.M. Hammond Jr. 1982.** Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybean ecosystems as determined with looplure-baited traps [*Pseudoplusia includens*, *Rachiplusia ou*, *Trichoplusia* spp.]. J. Econ. Entomol. 75: 647-650.
- Ali, A. & S. Young. 1991.** Influence of larval age and temperature on effectiveness of a nuclear polyhedrosis virus in the soybean Looper, *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean. Biol. Control. 1: 334-338.
- Boughton, A.J.; R.L. Harrison; L.C. Lewis; B.C. Bonning. 1999.** Characterization of a nucleopolyhedrovirus from the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invert. Pathol. 74: 289-294.
- Bueno, R.C.O.F.; J.R.P. Parra; A.F. Bueno; F. Moscardi; J.R.G. Di Oliveira; M.F. Camillo. 2007.** Sem Barreira. Cultivar Grandes Culturas 93, 12-15.
- Caballero, P.; D. Zuidema; C. Santiago-Alvarez; J.M. Vlak. 1992.** Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Biocontrol Sci. Technol 2: 145-157.

- Cheng, Xiao-Wen; G.R.Carner. 2000.** Characterization of a single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Thysanoplusia orichalcea* L. (Lepidoptera: Noctuidae) from Indonesia. *J. Invert. Pathol.* 75: 279-287.
- Chou, C.M.; C.H. Huang; C.F. Lo; G.H. Kou; C.H. Wang. 1996.** Characterization of *Perina nuda* VPN (PenuVPN) polyhedrin gene. *J. Invert. Pathol.* 67: 259–266.
- Cory, J.S.; B.M. Green; R.K. Paul; F. Hunter-Fujita. 2005.** Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *J. Invert. Pathol.* 89: 101–111.
- Cory, J.S. & J.H. Myers. 2003.** The ecology and evolution of baculoviruses. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 239-272.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. Cambridge, Univ. Press, London, New York, 333p.
- Friesen, P.D. & L.K. Miller. 2001.** Insect viruses. In: D.M. Knipe; P.M. Howley; D.E. Griffin; M.A. Martin; R.A. Lamb; B. Roizman; S.E. Straus (eds.). *Fundamental Virology*, 4 ed. Lippincott Williams and Wilkins Press, Philadelphia. 443–472 p.
- Greene, G.L.; N.C. Leppla; W.A. Dicherson. 1976.** Velvetbean caterpillar: a rearing produced and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 4: 487-488.

- Gröner, A. 1986.** Specificity and safety of baculoviruses. In: Granados, R.R. & B.A. Federici, (eds.). *The Biology of Baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Academic Press, San Diego, Calif. 177-202 p.
- Ishii, T.; M. Nakai; S. Okuno; J.Takatsuka; Y. Kunimi. 2003.** Characterization of *Adoxophyes honmai* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus: morphology, structure, and effects on lagartae. *J. Invert. Pathol.* 83, 206-214.
- Jehle, J.A.; G.W. Blissard; B.C. Bonning; J.S. Cory; E.A. Herniou; G.F. Rohrmann; D.A. Theilmann; S.M. Thiem; J.M. Vlak. 2006.** On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch.Virol.* 151: 1257-1266.
- Kunimi, Y.; J.R. Fuxa; A.R. Richter. 1997.** Survival time and lethal doses for wild and recombination *Autographa californica* nuclear polyhedrosis viruses in different instar of *Pseudoplusia includens*. *Biol. Control.* 9: 129-135.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Livingston, J.M.; P.J. Mcleod; W.C. Yearian; S.Y. Young. 1980.** Laboratory and field evaluation of nuclear polyhedrosis virus of the soybean Looper, *Pseudoplusia includens*. *J. Georgia Entomol. Soc.* 15: 94-199.

Ma, Xiu-cui; Xu, Hai-Jun, Tang, Mei-Jun, Xiao, Q., Hong, J., Zhang, Chuan-Xi., 2006.

Morphological, phylogenetic and biological characteristics of *Ectropis obliqua* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. The J. Microbiol. 44: 77-82.

Martins, T.; R. Montiel; J. Medeiros; L. Oliveira; N. Simões. 2005.

Occurrence and characterization of a nucleopolyhedrovirus from *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) isolated in the azores. J. Invert. Pathol. 89: 185–192.

McIntosh, A.H.; W.C Rice; C.M. Ignoffo.1987.

Genotypic variants in wild-type populations of baculoviruses. In: Maramorosch, K. (ed.), Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture. Academic Press. Inc., San Diego, 305-325p.

Morales, L.; F. Moscardi. 1993a.

Virulência para lagartas de *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Rachiplusia nu* (Guenée) do vírus de *Autographa californica* (Speyer) após passagem seriada em *C. includens* (Lep.: Noctuidae). An. Soc. Entomol. Brasil. 22: 19-27.

Morales, L.; F. Moscardi. 1993b.

Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. An. Soc. Entomol. Brasil. 22:535-540.

Morales, L.; Moscardi, F., S. Gravena. 1993.

Potencial do baculovirus de *Autographa californica* (Speyer) no controle de *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae). Pesq. Agrop. Brasileira. 28: 237-243.

- Morales, L.; F. Moscardi; J.G. Kastelic; D.R. Sosa-Gomez; F.R. Paro; I.L. Soldorio.1995.** Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hubner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Ann. Soc. Entomol. Brasil. 24: 593–598.
- Moscardi, F. 1999.** Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Ann. Rev. Entomol. 44: 257-289.
- Moscardi, F. 2007.** A Nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in brazilian soybeans. In: Vincent, C., M. Goettel; G. Lazarovits (eds.). Biological Control: a global perspective. Wallingford, CAB International, 344-352p.
- Moscardi, F.; L. Morales; B. Santos. 2002.** The successful use of AgMVPN for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil. In: 35th Annual Meeting of the SIP. Foz do Iguaçu, Brasil, 86-91p.
- O'Reilly, D.R.; L.K. Miller; V.A. Luckow. 1992.** Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. Salt Lake City, Utah, 1-347p.
- Reynolds, E.S. 1963.** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. The J. Cell. Biol. 17: 208-212.

- Richards, A.; M. Speight; J. Cory. 1999.** Characterization of a nucleopolyhedrovirus from the vapourer moth *Orgyia antiqua* (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Invert. Pathol.* 74: 137-142.
- Smith, I.R.L. & N.E. Crook. 1988a.** Physical maps of the genomes of four variants of *Artogeia rapae* granulosis virus. *J. Gen. Virol.* 69: 1741-1747.
- Smith, I.R.L. & N.E. Crook. 1988b.** *In vivo* isolation of baculovirus genotypes. *Virol.* 166: 240-244.
- Spurr, A.R. 1969.** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrast. Res.* 26: 31-43.
- Sudhakar, S. & S. Mathavan. 1999.** Electron microscopical studies and restriction analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrosis virus. *J. Biosciences.* 24: 361-370.
- Takatsuka, J.; S. Okuno; M. Nakai; Y. Kunimi. 2003.** Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 26: 32-39.
- Theilmann, D.A.; G.W. Blissard; B. Bonning; J.A. Jehle; D.R. O'Reilly; G.F. Rohrmann; S. Thiem; J.M. Vlak. 2005.** Baculoviridae. In: Fauquet, C.M., M.A. Mayo; J. Maniloff; D U. Esselberger; L.A. Ball. (eds.), *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses:*

Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Elsevier, New York, 177-185 p.

Wang, L.; J. Yi; S. Zhu; B. Li; Y. Chen; W. Shen; W. Wang. 2008. Identification of a single-nucleocapsid baculovirus isolated from *Clanis bilineata tsingtauica* (Lepidoptera: Sphingidae). Arch. Virol. 153: 1557-1561.

Young, S.Y. & W.C. Yearian. 1982. Nuclear polyhedrosis virus infection of *Pseudoplusia includens* (Lep.: Noctuidae) lagartae: effect on post lagartal stages and transmission. Entomophaga. 27: 61-66.

Young, S.Y. 2001. Enhancement of nucleopolyhedrovirus activity in *Helicoverpa zea* (Boddie) and *Pseudoplusia includens* (Walker) lagartae with a fluorescent brightener. J. Entomol. Soc. 36: 162-168.

Zanotto, P.M.A.; M.J.A. Sampaio; D.W. Johnson; T.L. Rocha; J.E. Maruniak. 1992. The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region sequence analysis gene product and structural comparisons. J. Gen. Virol. 73:1049-1056.

Zou, Y. & S. Young. 1996. Use of fluorescent brightener to improve *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus activity in the laboratory and field. J. Econ. Entomol. 89: 92-96.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A soja é um dos mais importantes produtos da exportação brasileira, sendo cultivada desde o extremo Sul do país, no Rio Grande do Sul, até o Maranhão, na região Nordeste, e Norte (partes de Rondônia, Pará e Roraima). Entretanto, surtos de pragas que eram antes consideradas sem importância econômica (como é o caso da lagarta-falsa-medideira, *Pseudoplusia includens*) têm ocorrido nas últimas safras, colocando em risco a produtividade e o futuro desse importante agronegócio.

Este trabalho mostrou como as diferentes táticas de manejo são importantes e influenciam na flutuação populacional de *P. includens* e de seus inimigos naturais. Na área conduzida de acordo com práticas do produtor houve de três a cinco aplicações de inseticidas de amplo espectro (como piretróides); no entanto, nessa área, houve maior número de lagartas e, na maioria das vezes, menor número de inimigos naturais nas três safras analisadas. Isso mostra que, geralmente, não há necessidade de inúmeras aplicações de inseticidas não seletivos, que só ocasionam um desequilíbrio nesse ecossistema, além do aumento de custo para o produtor, que ficaram evidentes quando a área do produtor foi comparada com a área de manejo integrado de pragas (MIP) com uso de inseticida seletivo ou com a área de MIP com o uso de inseticida biológico a base do Baculovírus da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*.

Os agroquímicos representam uma importante “ferramenta” para o produtor e têm papel significativo no sucesso da produção agrícola. No entanto, os inseticidas mais adequados para serem utilizados no MIP-soja são aqueles que combinem um bom controle do alvo biológico com o mínimo de impacto sobre os inimigos naturais, sendo a integração de produtos químicos com o controle biológico, na maioria dos casos, crucial para o sucesso do MIP-soja. A conservação dos

inimigos naturais é muito importante, não só no manejo da *P. includens*, mas também para todos os demais insetos- pragas da cultura.

Os resultados demonstraram o grande potencial do baculovírus da *P. includens* tanto em teste de laboratório (parâmetros de virulência, CL₅₀, TL₅₀) como em casa de vegetação, com mortalidade acima de 70%. O mesmo foi observado com proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*; com exceção da proteína 2A, as demais foram tóxicas às lagartas de *P. includens*. O modo de ação das proteínas Cry difere completamente dos modos de ação dos conhecidos inseticidas químicos sintéticos, fazendo com que essas proteínas sejam elementos chaves para auxiliar no MIP, através de sua aplicação foliar sobre as plantas ou, como mais recentemente, através da expressão dessas toxinas em plantas transgênicas.

Os resultados dos testes de campo não foram muito satisfatórios, pois o vírus, nas diferentes dosagens, mostrou-se ineficiente, em relação aos produtos químicos testados, como o metomil (Lannate) e o metoxifenoazida (Intrepid), que foram os que apresentaram os melhores resultados, porém, mesmo assim, com valores médios ao redor de 70% de mortalidade ou inferiores. Diferente da lagarta-da-soja, *A. gemmatilis*, a *P. includens* habita a parte inferior das plantas, expondo-se menos aos inseticidas aplicados. Além disso, esta espécie é em geral mais tolerante às dosagens usuais dos defensivos, quando comparada com a lagarta-da-soja. Devido a esses fatores, a qualidade da aplicação passa a ser fundamental, visando atingir com eficiência o alvo, ou seja, as lagartas que ficam no baixeiro e interior das plantas.

Observou-se, também, a importância de análises moleculares do baculovírus, que auxiliam esclarecer diferenças na virulência dos isolados, sendo que pequenas alterações genômicas podem resultar em alterações significativas na atividade biológica do baculovírus. Portanto, as diferenças de virulência devido à heterogeneidade intra-específica, como encontrado no presente trabalho,

podem representar uma importante ferramenta para desenvolver o PsinSVPN como inseticida biológico.