

ALFREDO RAUL ABOT

Avaliação da Resistência de *Anticarsia gemmatalis* Hübner,  
1818 (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu Vírus de Poliedrose  
Nuclear, *Baculovirus anticarsia*.

Dissertação apresentada à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Ciências Bio-  
lógicas da Universidade Federal do Paraná,  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas, área de concentração,  
Entomologia.

CURITIBA  
1993

TITULO: MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TITULO DA TESE: "Avaliação da resistência de *Anticarsia gemmatarsis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu vírus de poliedrose nuclear *Baculovirus anticarsia*"

MESTRANDA: ALFREDO RAUL ABOT

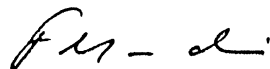
COMISSÃO EXAMINADORA: Prof. Dr. FLÁVIO MOSCARDI  
Prof. Dra. LÚCIA MASSUTTI DE ALMEIDA  
Prof. Dra. SONIA MARIA NOEMBERG LÁZZARI

P A R E C E R

A Comissão Examinadora considerou que a Tese do Candidato cumpriu os objetivos propostos e foi aprovada com o grau " *A* ", com distinção e louvor.

O Candidato deverá atender às sugestões feitas pela Comissão Examinadora para a futura publicação.

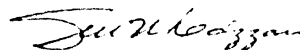
Curitiba, 12 de março de 1992.



Prof. Dr. FLÁVIO MOSCARDI



Prof. Dra. LÚCIA MASSUTTI DE ALMEIDA



Prof. Dra. SONIA MARIA NOEMBERG LÁZZARI

*A Deus*

*AGRADEÇO*

*A Lilia, minha mãe, e Rodolfo, meu pai ( in memoria ) por me ensinar, com amor e exemplo, o caminho certo da vida.*

*A Amélia e Guilhermina, minha esposa e filha, que renunciaram a muitos benefícios pessoais para me apoiar neste trabalho.*

*DEDICO*

### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Flávio Moscardi, Chefe do Centro Nacional de Pesquisa de Soja ( CNPSo) da EMBRAPA, Londrina, pela amizade, incentivo e orientação na condução desta pesquisa.

Ao Dr. Daniel R. Sosa-Gomez, Coordenador da equipe de Entomologia do CNPSo-EMBRAPA, Londrina, pela amizade e valioso apoio na sua condição de co-orientador deste trabalho.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pela oportunidade de realização do experimento e facilidades oferecidas na condução deste trabalho.

Ao Professor Zundir José Buzzi, ex-Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR, pela oportunidade de realizar o trabalho de tese no CNPSo-EMBRAPA.

A Dra. Lúcia Massutti de Almeida, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR, pelo interesse e apoio no decorrer desta pesquisa.

Aos funcionários dos Laboratórios de Patologia e Criação de insetos do CNPSo-EMBRAPA, por seu ilimitado esforço e sincera amizade ao longo desta pesquisa.

Aos meus colegas do Curso de Pós-Graduação em Entomologia: Vanda Pietrowski, Aziz Abou Hatem, Mari Inês C. Boff, Samira Shahad, Ronaldo Toma, Nora D. F. de Fortes, Simone B. Pinto, Márcia Sanches e Sérgio Arce Gomes.

A minha amiga Vanda Pietrowski, pela sincera amizade, incentivo e especial colaboração na confecção desta tese.

As autoridades da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

As autoridades do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) de Balcarce, Argentina, e em especial aos Eng<sup>o</sup>s Agr<sup>o</sup>s Oscar Costamagna, Jorge Fangio e Antonio Gualati, pelo apoio e incentivo para a realização do Curso de Pós-Graduação.

A todos aqueles que de uma ou outra forma colaboraram com esta pesquisa.

## SUMARIO

LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
RESUMO .....	xi
SUMMARY .....	xiv
CAPITULO I	
INTRODUÇÃO .....	1
CAPITULO II	
AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner AO SEU VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR.	
1. REVISAO BIBLIOGRAFICA .....	4
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	9
2.1. Coleta de <i>Anticarsia gemmatalis</i> e implanta- ção de colônias em laboratório .....	9
2.2. Inóculo de vírus de poliedrose nuclear(VPN) utilizado.....	10
2.3. Bioensaios com o VPN em populações de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	11

2.4. Análise dos dados .....	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
CAPITULO III	
INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM POPULAÇÕES DE <i>Anticarsia</i>	
<i>gemmatalis</i> Hübner AO SEU VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR,	
MEDIANTE PRESSÃO DE SELEÇÃO EM LABORATÓRIO .	
1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	35
CAPITULO IV	
REVERSAO DA RESISTENCIA AO VIRUS DE POLIEDROSE	
NUCLEAR EM POPULAÇÕES DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner	
1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
CAPITULO V	
CONCLUSOES .....	66
CAPITULO VI	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Concentração letal média ( $CL_{50}$ ) (CIP/ml), tempo letal médio ( $TL_{50}$ )(dias) (dias), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) referentes a bioensaios com vírus da poliedrose nuclear (VPN) em larvas da segunda geração de populações de *Anticarsia gemmatalis* coletadas em áreas expostas ao patógeno..... 15
- Tabela 2: Concentração letal média ( $CL_{50}$ )(CIP/ml), tempo letal médio ( $TL_{50}$ )(dias), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) referentes a bioensaios com vírus da poliedrose nuclear (VPN) em larvas da segunda geração de populações de *Anticarsia gemmatalis* coletadas em áreas não expostas ao patógeno ..... 17
- Tabela 3: Concentração letal média( $CL_{50}$ )(CIP/ml) das populações resistentes e suscetível de *Anticarsia gemmatalis* e taxa de resistência durante a pressão de seleção com o vírus da poliedrose nuclear (VPN)..... 38
- Tabela 4: Concentração letal média( $CL_{50}$ )(CIP/ml), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) das populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente e suscetível, inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN)..... 38

Tabela 5: Tempo letal médio (  $TL_{50}$  ), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) das populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente e suscetível, inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN)..... 39

Tabela 6: Concentração letal média ( $CL_{50}$ )(CIP/ml), tempo letal médio ( $TL_{50}$ )(dias), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) para larvas oriundas do cruzamento das populações de resistente e suscetível de *Anticarsia gemmatalis*, inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN)..... 57

Tabela 7: Concentração letal média ( $CL_{50}$ )(CIP/ml), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) para populações de *Anticarsia gemmatalis*, resistente e livre de pressão de seleção, inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN)..... 59

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Regressão entre o log da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas de segunda geração de *Anticarsia gemmatalis* de áreas expostas (A) e não expostas (B), ao vírus da poliedrose nuclear (VPN)..... 18
- Figura 2: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas de segunda geração de *Anticarsia gemmatalis* de áreas expostas (A) e não expostas (B), ao vírus da poliedrose nuclear (VPN)..... 19
- Figura 3: Regressão entre o log da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* submetidas a pressão de seleção ( $CL_{80}$ )..... 40
- Figura 4: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* submetidas a pressão de seleção ( $CL_{80}$ )..... 41
- Figura 5: Regressão entre o log da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* mantidas sem pressão de seleção (testemunha)..... 42
- Figura 6: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade (Probites), de larvas de *Anticarsia gemmatalis* mantidas sem pressão de seleção (testemunha)..... 43

- Figura 7: Regressão entre o log da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probitas) de larvas oriundas do cruzamento das populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente e suscetível..... 60
- Figura 8: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade (Probitas), de larvas oriundas do cruzamento das populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente e suscetível..... 61
- Figura 9: Regressão entre o log da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probitas) de larvas da população resistente de *Anticarsia gemmatalis*, livre de pressão de seleção..... 62
- Figura 10: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade ( Probitas ), de larvas da população resistente de *Anticarsia gemmatalis*, livre de pressão de seleção..... 63

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818  
( LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE ) AO SEU VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR,  
*Baculovirus anticarsia*.**

**RESUMO**

Com o objetivo de avaliar a suscetibilidade natural de *Anticarsia gemmatalis* ao seu vírus de poliedrose nuclear (VPN), *Baculovirus anticarsia*, foram coletadas populações do inseto com histórico de exposição e não exposição a aplicações do vírus nas regiões de Dourados (MS), Passo Fundo (RS) e Londrina e Rancho Alegre (PR). Na segunda geração, estas foram comparadas por duas gerações mediante bioensaios com o VPN, sendo os dados referentes ao logaritmo da dose e a percentagem de mortalidade submetidos a análise de regressão ( Probites ). Não foram

encontradas diferenças significativas entre elas, concluindo-se, portanto, que as referidas populações de *A. gemmatalis* não apresentam resistência natural ao vírus, apesar de até oito anos de exposição a aplicações do patógeno, dependendo do local. A população de Dourados (MS) não exposta ao vírus foi mantida, com o objetivo de submetê-la a uma pressão de seleção por dez gerações, para determinar se esta espécie é potencialmente capacitada a desenvolver resistência ao vírus. Em cada geração foi montado um bioensaio com a finalidade de estabelecer a concentração letal 80 (CL<sub>80</sub>) a ser utilizada na geração seguinte. Paralelamente, foi realizado um teste visando uma sobrevivência de 20% das larvas. *A. gemmatalis* demonstrou capacidade para desenvolver resistência quando a população foi mantida isolada em condições de laboratório. A taxa final de resistência (CL<sub>50</sub> da população resistente dividido pela CL<sub>50</sub> da população suscetível) foi de 109.18 vezes, após 10 gerações. Com o objetivo de avaliar a possibilidade de reversão da resistência, a população resistente foi dividida em duas sub-populações. Uma delas foi deixada livre de pressão de seleção, verificando-se que, após quatro gerações, a resistência manteve-se estável, mas com tendência a diminuir. A outra subpopulação foi cruzada sucessivamente com a população testemunha (suscetível),

observando-se perda total da resistência ao vírus após quatro gerações. Concluiu-se que, quando comparados os comportamentos das populações livres de pressão de seleção com o cruzamento de resistentes x testemunha, o aporte do caráter de suscetibilidade da população suscetível contribui de forma importante para a não manifestação de resistência o que poderia explicar a não verificação de resistência em populações naturais de *A. gemmatilis*, mesmo para aquelas expostas há vários anos a aplicações do vírus.

EVALUATION OF RESISTANCE OF *Anticarsia gemmatalis* Hübner,  
1818 ( LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE ) TO ITS NUCLEAR POLYHEDROSIS  
VIRUS, *Baculovirus anticarsia*.

SUMMARY

In order to evaluate the natural susceptibility of *Anticarsia gemmatalis* to its nuclear polyhedrosis virus (NPV), *Baculovirus anticarsia*, populations of the insect, with history of exposition and non exposition to field applications of the NPV, were collected in the regions of Dourados, MS, Londrina and Rancho Alegre, PR, and Passo Fundo, RS. These were submitted to bioassays with the NPV in the second generation, and no significant differences were found among the test populations regarding the susceptibility to the virus. The colony from

Dourados (non exposed) was maintained under continuous laboratory rearing in order to conduct selection pressure experiments to determine the potential capacity of *A. gemmatalis* to develop resistance to the NPV. After 10 generations the selected colony showed a 109.2 fold increase in resistance to the NPV when compared to the non exposed (control) colony. The possibility of reversion of resistance was also evaluated by splitting the selected colony in two: one of them was left free from the selection pressure, and another was bred successively with the susceptible colony. In the first case, the resistance remained stable after four generations, although with a tendency to decrease. In the second, the resistance was completely lost after four generations, showing that the susceptibility character in the control colony strongly contributed for the reversion of resistance in the selected colony. This finding may help to explain the non detection of resistance to the NPV in natural populations of *A. gemmatalis*, even those exposed for several years to field applications of the pathogen.

## CAPITULO 1

### INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das espécies cultivadas de maior importância no Brasil, tanto na elaboração de subprodutos quanto na exportação de grãos, colocando o país numa posição privilegiada como abastecedor no mercado mundial.

Esta leguminosa é atacada por várias insetos capazes de causar dano econômico à cultura, como percevejos e larvas de lepidópteros. Dentre estas, a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner 1818; constitui-se em praga chave nas diversas regiões produtoras de soja, atuando como desfolhadora e demandando, geralmente, aplicações de agrotóxicos para seu controle.

Para reduzir os custos com produtos químicos e o impacto destes no meio ambiente, estudos vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos pelo Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO) da EMBRAPA e outras instituições de pesquisa no país. Neste

contexto, constituem-se em exemplos de sucesso o controle de percevejos com parasitóides, a redução das dosagens de inseticidas quando utilizados em mistura com sal de cozinha, bem como a aplicação do vírus de poliedrose nuclear (VPN) *Baculovirus anticarsia* para o controle de *A. gemmatalis*.

Em 1977, iniciou-se no CNPSo um programa de pesquisa visando obter dados básicos sobre o VPN da lagarta da soja. Desde a safra 1982/83 este vem sendo empregado pelo produtor de soja, sendo atualmente comercializado por empresas privadas, com o controle de qualidade feito pela EMBRAPA. A superfície tratada no Paraná atinge atualmente mais de 200.000 ha, sendo que no Brasil supera 1.000.000 ha, constituindo-se no maior programa de uso de vírus entomopatogênicos a nível mundial.

Dada a extensão da área tratada com este agente biológico e sua utilização por mais de 10 anos no país, tornam-se necessários estudos básicos sobre a relação patógeno-hospedeiro, especialmente aqueles que busquem avaliar a possibilidade do inseto adquirir resistência ao VPN, uma vez que a nível mundial não existem referências de pesquisas realizadas a este respeito com *A. gemmatalis*.

Uma vez elucidada a possibilidade de resistência do inseto ao VPN, estes estudos certamente permitirão definir

estratégias apropriadas para contornar uma eventual constatação de resistência, de forma a possibilitar a continuidade do programa de uso do *B. anticarsia* ao nível do agricultor, cujos benefícios econômicos e ambientais tem sido relevantes ao país.

Em função do exposto, a presente pesquisa foi realizada com os seguintes objetivos:

1. Avaliar a suscetibilidade de populações naturais de *A. gemmatalis*, de distintas regiões, ao seu VPN;
2. Determinar a possibilidade de indução de resistência em população de *A. gemmatalis* ao seu VPN, mediante pressão de seleção em laboratório; e
3. Avaliar a possibilidade de reversão de resistência ao VPN, uma vez detectada em população de *A. gemmatalis* selecionada em condições de laboratório.

## CAPITULO 11

### AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Anticarsia gemmatalis* AO SEU VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR.

#### 1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Desde os primeiros tempos, o homem observou que os insetos sofrem infecções provocadas por microrganismos. Aristóteles foi o primeiro a mencionar que as abelhas sofriam de doenças (BURGES & HUSSEY, 1971).

Em 1935, Agostino Bassi, citado por aqueles autores, demonstrou que doenças em insetos poderiam ser causadas por microrganismos, quando mostrou que o fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. era o agente causal de uma doença no bicho-da-seda *Bombyx mori* L.

Os primeiros estudos com entomopatógenos foram orientados principalmente a insetos benéficos domesticados, como a abelha, *Apis mellifera* L., e o bicho-da-seda, *B. mori*.

Gradualmente, esses estudos foram abrangendo insetos pragas e, dessa forma, nascia o conceito da utilização de patógenos no controle de insetos (BURGES & HUSSEY, 1971).

BURGES (1971) cita que o controle biológico surgiu não por uma verdadeira compreensão do homem de todas as vantagens deste recurso, mas sim por razões econômicas. Por um lado, o uso intensivo de agrotóxicos obrigava, devido ao fenômeno da resistência, ao aumento das doses com maiores custos, e, por outro, a fitotoxicidade de alguns produtos levava a uma redução da produção.

A partir da década de 1940, a utilização de vírus para o controle de insetos recebeu um grande impulso com os trabalhos de Balch & Bird e de Steinhaus e Thompson (IGNOFFO, 1973).

MOSCARDI (1986) afirma que dentre os patógenos de insetos, os vírus, principalmente do grupo dos Baculovirus (poliedroses e granuloses), possuem um grande potencial para sua utilização no controle de insetos pragas. Por serem eficientes, específicos e seguros para o homem e outros animais, estes preenchem todos os requisitos básicos como alternativa aos inseticidas tradicionalmente utilizados na proteção de culturas.

Os Baculovirus têm sido extensivamente pesquisados para o controle de insetos. Três das suas características, segundo

FUXA (1991), são principalmente atrativas: especificidade para o hospedeiro, não poluição do ambiente e capacidade de causar doenças com elevados valores de prevalência. O mesmo autor reportou que a atividade biológica destes vírus é influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos e, por isso, podem-se esperar comportamentos diferentes de acordo com condições específicas dos vários sistemas vírus-hospedeiros-plantas. Este ainda observou diferenças entre raças de vírus originárias de vários locais.

Alguns trabalhos têm demonstrado diferenças entre populações geográficas de insetos a um mesmo vírus (REICHELDERFER & BENTON, 1974). Estes autores citaram que Hunter & Hoffman (1973) encontraram valores de concentração letal média (CL<sub>50</sub>) diferentes em mais de sete vezes entre duas populações de *Plodia interpunctella* F. (Lepidoptera: Phycitidae).

FUXA & RICHTER (1989), citam que o vírus da poliedrose nuclear (VPN) de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é muito dinâmico com respeito à suscetibilidade do hospedeiro. Em populações naturais, a CL<sub>50</sub> variou de 1 a 16 corpos de inclusão poliédricos (cip)/ml, dependendo da época e da região de coleta tanto do vírus quanto do inseto. A heterogeneidade de *S. frugiperda* com respeito à

suscetibilidade ao VPN, segundo os mesmos autores, pode variar significativamente ainda dentro de uma mesma estação do ano.

FUXA (1987) afirma que a atividade migratória de *S. frugiperda* pode ser estudada através da análise dos padrões de suscetibilidade ao VPN. Pode-se assumir que existem diferenças genéticas entre isolados geográficos de VPN, uma vez que o vírus tem sido encontrado na América do Norte, América do Sul e Caribe.

No Brasil, diversos estudos têm sido realizados com o fim de avaliar a suscetibilidade de diferentes insetos a microrganismos. Com relação às pragas da soja, MOSCARDI & SOSA-GOMEZ (1992) citam que numerosos entomopatógenos estão associados a insetos desta cultura, especialmente fungos e vírus. Dentre estes últimos, principalmente os do grupo dos Baculovirus são habitualmente encontrados em lepidópteros, especialmente em *Anticarsia gemmatalis* Hübner, o qual é considerado como praga chave em diversas regiões.

Um VPN de *A. gemmatalis*, denominado *Baculovirus anticarsia*, se encontra entre os mais estudados, sendo observado pela primeira vez na região de Campinas, Estado de São Paulo, em 1972, sobre larvas infectadas em culturas de soja (MOSCARDI, 1986). Os primeiros resultados com este patógeno, obtidos através

de testes de campo, indicaram um alto potencial para seu uso como inseticida viral para *A. gemmatalis* (MOSCARDI et al., 1981).

No início de 1979, o Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO), da EMBRAPA, começou um programa de desenvolvimento deste VPN como inseticida microbiano. Atualmente é amplamente utilizado no Brasil com 1.000.000 de hectares pulverizados, tendo se transformado no maior programa de utilização de vírus de insetos a nível mundial (MOSCARDI & SOSA-GOMEZ, 1992). Este patógeno vem sendo também aplicado com sucesso em vários outros países sulamericanos, como Argentina, Paraguai e Bolívia.

Em estudos realizados quanto a patogenicidade do *B. anticarsia* de diferentes regiões do Brasil, foram observadas diferenças de atividade biológica entre os isolados, embora estas diferenças não tenham sido significativas (MOSCARDI & SOSA GOMEZ, comunicação pessoal). No entanto, não existem, até o presente, trabalhos de pesquisa com o fim de avaliar a possibilidade de resistência por populações de *A. gemmatalis* ao seu VPN, apesar deste vir sendo empregado intensivamente como inseticida biológico no país há mais de dez anos. Estes estudos tornam-se, portanto, importantes para o conhecimento do estado atual da relação entre o VPN e *A. gemmatalis*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta de *Anticarsia gemmatalis* e implantação de colônias em laboratório.

Populações naturais de *A. gemmatalis* foram coletadas a partir de janeiro de 1991, nas localidades de Dourados (MS), Passo Fundo (RS), Londrina e Rancho Alegre (PR). Em cada região foram escolhidas áreas onde o *Baculovirus anticarsia* vem sendo aplicado há vários anos (populações "expostas") e outras onde não existe registro da sua utilização como inseticida biológico (populações "não expostas" ao vírus).

A coleta das lagartas nas lavouras foi realizada manualmente, sendo as mesmas colocadas em gaiolas de madeira teladas de 20x20x40 cm contendo folhas de soja de cada respectivo local como alimento. Em cada local foram obtidos entre 800 e 1500 indivíduos. Posteriormente, no laboratório do CNPSo-EMBRAPA, grupos de 15 larvas foram acondicionados em caixas plásticas tipo Gerbox<sup>R</sup> (2,5x13x13 cm) contendo papel de filtro, o qual era

umedecido diariamente com água destilada. Para a alimentação das larvas, foram utilizados folíolos de soja da mesma lavoura onde foi realizada a coleta de cada população.

Com as populações coletadas nas diferentes áreas foram estabelecidas colônias, mantidas separadamente em sala do laboratório de criação de insetos do CNPSO a temperatura de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas, seguindo-se os procedimentos de criação de *A. gemmatalis* descritos por HOFFMAN-CAMPO et al. (1985).

## 2.2. Inóculo de vírus da poliedrose nuclear utilizado

A partir da cepa LDB-79, isolada no CNPSO-EMBRAPA, de larvas de *A. gemmatalis* coletadas em culturas de soja da região de Londrina, PR, em 1979, foi preparada uma suspensão estoque do patógeno para a realização dos experimentos.

Para a obtenção do inóculo purificado, um grupo de larvas foi infectado em laboratório. Quando mortas, foram maceradas, adicionando-se água destilada esterilizada, e coadas em camadas de gaze. O material obtido foi centrifugado a 1000 rpm durante um minuto; o sobrenadante foi submetido a nova

centrifugação a 6000 rpm por 15 minutos, descartando-se a parte líquida. O precipitado aderido no fundo dos tubos foi homogeneizado em água destilada estéril, sendo a suspensão viral distribuída em pequenos tubos e armazenada em freezer até seu uso.

### 2.3. Bioensaios com o VPN em populações de *Anticarsia gemmatalis*.

A primeira geração, a partir das larvas coletadas no campo, foi mantida sobre folhas de soja por não aceitar facilmente a dieta artificial. Na segunda geração, as larvas foram criadas em dieta artificial (GREENE et al. 1976), sendo submetidas a bioensaios com o VPN de *A. gemmatalis*.

Para obtenção das diferentes concentrações do VPN, preparou-se uma suspensão inicial de concentração conhecida, utilizando-se uma alíquota de 0,5 ml de suspensão do vírus a qual foi homogeneizada em um Ehlermayer contendo 20 ml de água destilada e autoclavada. Para determinar a concentração de corpos de inclusão poliédricos (CIP) do vírus, uma alíquota foi retirada com auxílio de pipeta tipo Pasteur e colocada em câmara tipo

Neubauer, contando-se os CIP em microscópico ótico com aumento de 400x.

Foram utilizadas 60 larvas em final de segundo instar ( $\pm 1,0$  cm) para cada uma das seguintes concentrações utilizadas: 0 (testemunha), 20, 60, 180, 540, 1600 e 4860 cip/ml de dieta.

Na preparação da dieta, esta foi deixada no fogo por cinco minutos após início da fervura, sendo em seguida resfriada até 50°C. Ao atingir esta temperatura, 20 ml de suspensão viral, previamente diluída para proporcionar cada concentração desejada, foram homogeneizados com 180 ml da dieta em Becker esterilizado.

Esta quantidade (200 ml) de dieta contaminada pelo VPN foi suficiente para 20 copos por concentração, cada copo representando uma repetição. Para a testemunha foram utilizados 180 ml de dieta mais 20 ml de água destilada estéril. Quando o conteúdo dos copos atingiu a temperatura ambiente, foram colocadas três larvas/copo com auxílio de pincel fino, para evitar danificar as mesmas e diminuir o estresse pelo manuseio.

Cada copo foi fechado com tampa de cartolina, identificando-se data, concentração do VPN e número do copo. Aquelas larvas que morreram dentro das 72 horas após a inoculação não foram consideradas na análise, uma vez que a morte devido a vírus geralmente ocorre a partir do quarto dia após a inoculação

(MOSCARDI, 1986). A partir do quarto dia foi registrada a mortalidade diária, até que a última larva morresse ou empupas-se.

Toda vez que ocorreu mortalidade na testemunha (tanto por vírus quanto por causas não determinadas), os dados foram corrigidos pela fórmula de Abbott (ABBOTT, 1925).

#### 2.4. Análise dos dados

Os dados acumulados e corrigidos foram analisados pelo programa Microprobit 3.0, de Sparks & Sparks (1987), Lily Research Labs., Greenfield, Indiana, E.U.A., para análise de probites. Obteve-se, assim, as concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) e tempos letais médios (TL<sub>50</sub>) das populações expostas e não expostas de cada região, visando comparar a suscetibilidade destas populações ao VPN e, conseqüentemente determinar a presença ou ausência de resistência em populações de *A. gemmatilis* das distintas regiões.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na segunda geração as populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner das diversas regiões não demonstraram diferenças significativas de suscetibilidade ao *Baculovirus anticarsia*.

Os dados obtidos com insetos de segunda geração, para as áreas expostas a aplicações do vírus de poliedrose nuclear (VPN), (Tabela 1), permitem verificar que as populações não diferiram significativamente entre si quanto à concentração letal média ( $CL_{50}$ ) do patógeno, considerando que existiu sobreposição dos respectivos intervalos de confiança, embora os valores obtidos com a população de Passo Fundo tenham sido superiores aos demais. Nesta região o VPN vem sendo aplicado há mais de 8 anos.

No que se refere ao tempo letal médio ( $TL_{50}$ ), não foram detectadas diferenças significativas entre as populações de Dourados, Londrina e Passo Fundo. Contudo, a população de Rancho Alegre apresentou valores significativamente menores. Não foi possível obter população não exposta ao vírus da região de Rancho Alegre, por ser uma área muito próxima a fazendas onde o vírus vem sendo utilizado intensivamente desde 1986.

Tabela 1: Concentração letal média (CL<sub>50</sub>) (CIP/ml), tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) (dias), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) referentes a bioensaios com vírus da poliedrose nuclear (VPN) em larvas da segunda geração de populações de *Anticarsia gemmatalis* coletadas em áreas expostas ao vírus.

Parâmetros	Dourados	Londrina	R. Alegre	P. Fundo
CL <sub>50</sub>	297	515	431	754
I.C.	117-779	370-741	317-598	557-1054
Inclin. (b)	1,32(0,10)	1,01(0,90)	1,16(0,11)	1,16(0,11)
TL <sub>50</sub>	12,10	10,90	8,68	11,07
I.C.	11,0-14,4	10,9-12,4	7,86-9,91	10,1-13,2
Inclin. (b)	5,92(0,98)	5,17(0,83)	7,14(0,78)	4,64(0,84)

As populações de áreas não expostas a aplicações do VPN (Tabela 2), a exemplo das coletadas em áreas expostas ao vírus, não apresentaram  $CL_{50}$  significativamente diferentes entre si. Também neste caso a população de Passo Fundo mostrou valores superiores aos demais. O maior  $TL_{50}$  foi detectado na população de Passo Fundo, diferindo significativamente do obtido na população de Londrina, mas não na de Dourados. Os limites fiduciais entre os valores de Dourados e Londrina apresentaram sobreposição e, portanto, a diferença não foi significativa.

As linhas de regressão do logaritmo da concentração de *B. antircarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probites) permitem observar a semelhança dos valores de suscetibilidade entre as populações (figura 1). As diferenças no tempo letal, embora significativas para população de Rancho Alegre, não foram muito acentuadas, como é demonstrado na análise de regressão entre o tempo letal e a probabilidade de mortalidade (figura 2).

A variabilidade dos valores pode ser atribuída às condições próprias dos bioensaios ou a existência de indivíduos com diferentes graus de suscetibilidade nas populações. A este respeito, HABIB (1986), discute sobre outros fatores que podem afetar o grau de precisão de um bioensaio, tais como: patógeno, inseto teste e os procedimentos dos bioensaios.

Tabela 2: Concentração letal médio (CL<sub>50</sub>)(CIP/ml), tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) (dias), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) referentes a bioensaios com vírus da poliedrose nuclear (VPN) em larvas da segunda geração de populações de *Anticarsia gemmatalis* coletadas em áreas não expostas ao vírus.

Parâmetros	Dourados	Londrina	R. Alegre	P. Fundo
CL <sub>50</sub>	333	326	-	527
I.C.	180-561	247-431	-	380-740
Inclin. (b)	1.45(0.11)	1.30(0.11)	-	1.03(0.10)
TL <sub>50</sub>	10.2	9.07	-	10.08
I.C.	9.1-14.9	8.5-9.9	-	10.0-12.0
Inclin. (b)	8.8(1.00)	4.67(0.80)	-	5.60(0.86)

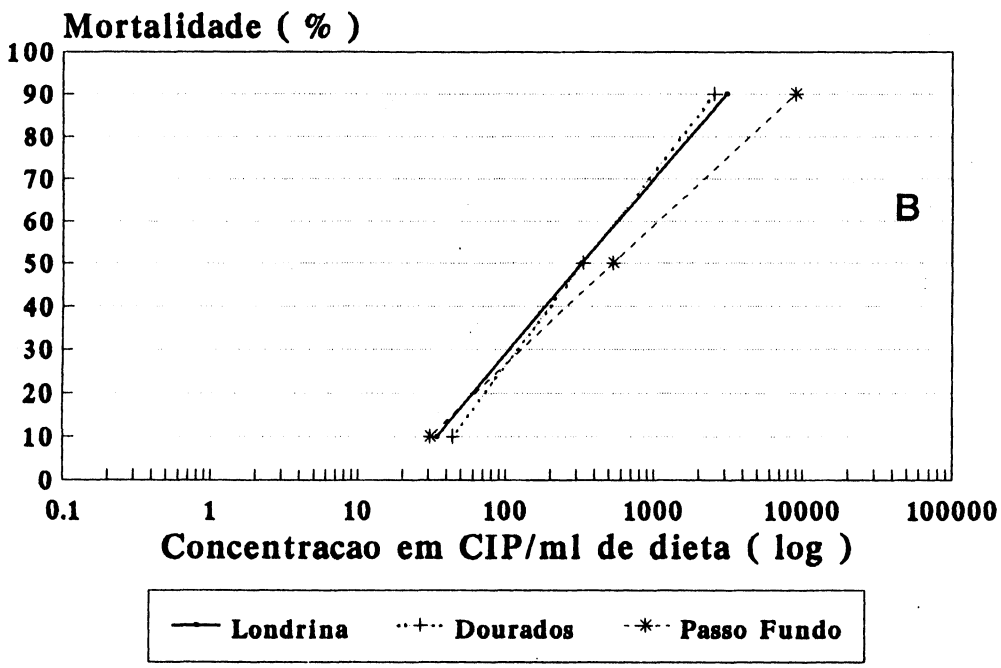
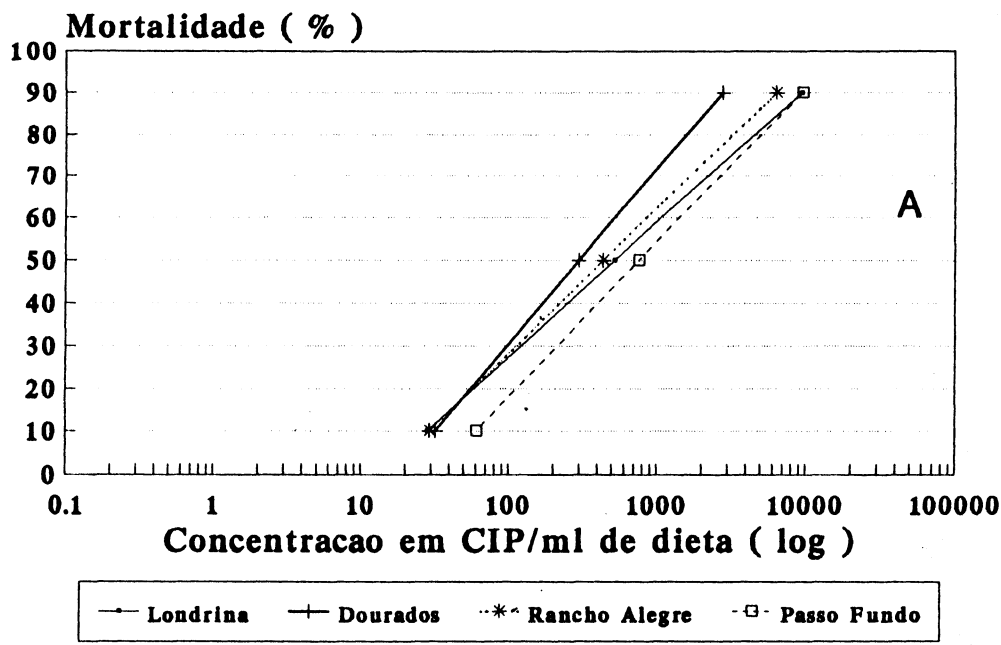


Figura 1: Regressão entre o log da concentração de **Baculovirus anticarsia** e a probabilidade de mortalidade (Probitas) de larvas de segunda geração de **Anticarsia gemmatalis** de áreas expostas (A) e não expostas (B).

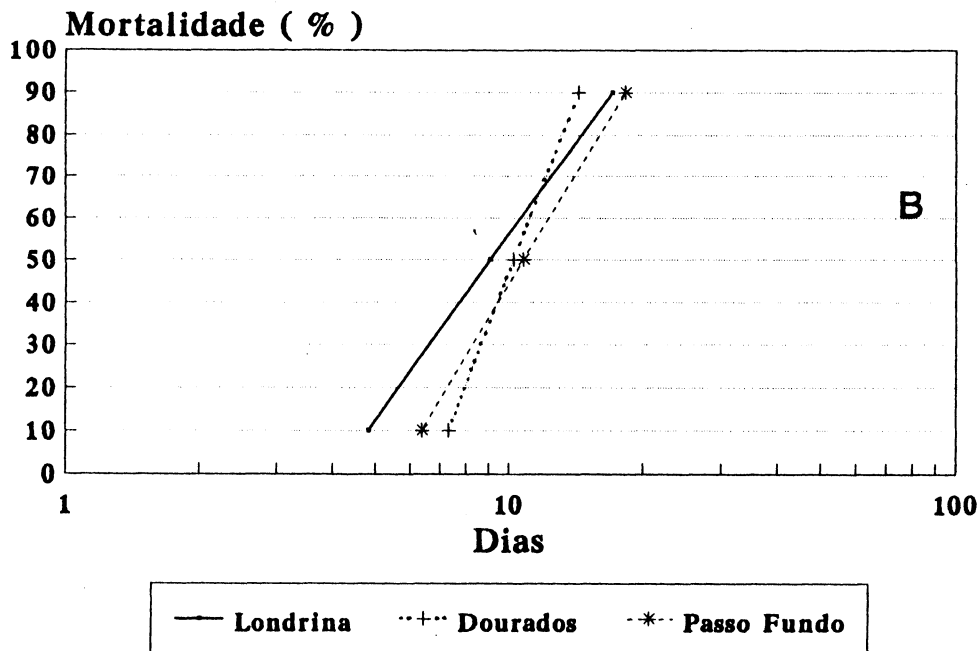
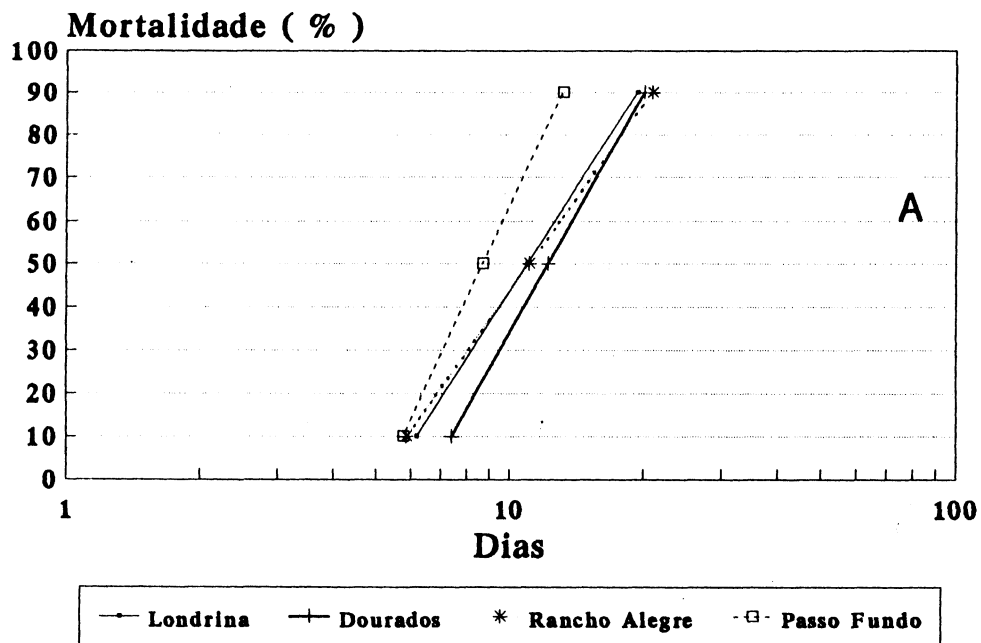


Figura 2: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas de segunda geração de *Anticarsia gemmatalis* de áreas expostas (A) e não expostas (B).

O fato de não ter sido detectada resistência em populações oriundas de locais intensivamente expostos ao VPN é particularmente significativo, pois garante o uso contínuo e adequado deste microrganismo no contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Aparentemente, o intercâmbio genético entre populações expostas e não expostas ao VPN dificulta o aparecimento de resistência a campo, fato favorecido pelo hábito migratório das espécies (FUXA, 1992).

FUXA (Louisiana State University, trabalho em andamento) analisou o comportamento de *B. anticarsia* em populações de *A. gemmatalis* do Texas e da Louisiana, nos Estados Unidos, locais estes sem histórico de exposição ao vírus, não encontrando diferenças significativas na susceptibilidade das populações, tanto para a  $CL_{50}$  quanto para o  $TL_{50}$ . Contudo, resultados contrários aos obtidos no presente trabalho tem sido relatados para outras espécies e regiões. REICHELDERFER & BENIGNI (1974) avaliaram a susceptibilidade de duas populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) de regiões diferentes frente a três isolados de VPN. Os dados encontrados por esses autores são contrastantes com aqueles obtidos neste trabalho, pois demonstraram diferenças significativas em todos os casos e, através de bioensaios, não observaram mortalidade diferencial de

machos e fêmeas.

Variações na suscetibilidade de algumas espécies foram descritas por FUXA (1992). A taxa de resistência oscilou de 5 a 800 vezes, sendo que em *Bombyx mori* (L.) a variação foi de 13<sup>80</sup> até mais de 10<sup>5</sup> vezes. Segundo o autor, essa diferença na suscetibilidade das espécies pode ser explicada pelo fato que o gen para resistência estaria presente em determinados insetos e em outros não. Essa hipótese não se ajusta no caso de *A. gemmatalis*, pois inicialmente não foram observadas diferenças na suscetibilidade entre isolados, mas quando submetidas a pressão de seleção demonstraram capacidade para adquirir resistência (capítulo III).

Martignoni (1957), citado por FUXA (1992), detectou a nível de campo uma taxa de resistência de 38 vezes para *Lucosoma griseana* Hübner ao seu vírus da granulose, após uma epizootia. Segundo SOSA-GOMEZ (comunicação pessoal) no caso de *B. mori*, os resultados devem ser avaliados com cuidado, pois suas populações são totalmente domesticadas e seu comportamento pode não corresponder ao das populações naturais de outras espécies.

A ação de diferentes isolados de VPN em diversas populações de *S. frugiperda* foram avaliados por FUXA (1987). Este autor observou diferenças significativas em relação às doses

## CAPITULO 111

### INDUÇÃO DE RESISTENCIA EM POPULAÇÕES DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 AO SEU VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR, MEDIANTE PRESSÃO DE SELEÇÃO EM LABORATÓRIO.

#### 1. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

O uso intensivo de vírus e sua contínua aplicação no controle de diversas espécies pragas tem gerado, a nível mundial, inclusive no Brasil, a necessidade de se estudar o estado atual da relação hospedeiro-microrganismo visando detectar possível aparecimento de resistência no inseto.

A suscetibilidade de uma determinada população de insetos varia em função do estado de desenvolvimento do mesmo, fato este demonstrado por MOSCARDI (1986) com *Anticarsia gemmatalis* Hübner, onde larvas do quinto instar apresentaram uma concentração letal média (CL<sub>50</sub>) 48 vezes superior àquela verificada para larvas do segundo instar.

Esta relação hospedeiro-microrganismo tem sido estudada por diversos autores, abordando principalmente os seguintes aspectos: diferenças na suscetibilidade das populações, seleção para resistência em laboratório, desenvolvimento de resistência em populações de campo, mecanismos e genética da resistência (FUXA, 1992).

Este mesmo autor menciona que há evidências que a resistência pode ser um aspecto importante no uso de vírus e outros patógenos. Isto não seria surpreendente, considerando a resistência de outros animais a vírus e o desenvolvimento de resistência a agrotóxicos pelos insetos. Também MCGAUGHEY (1985) fez referência a resistência à bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berl.

O Expert Committee of insecticides (1957), citado por FUXA (1992), define resistência como "desenvolvimento da habilidade por uma população de insetos em tolerar doses de tóxicos, as quais poderiam ser letais para a maioria dos indivíduos de uma população normal da mesma espécie".

A resistência de uma população de insetos a um determinado patógeno é reconhecida através de bioensaios, utilizando uma amostra da população e comparando-a com um estoque suscetível (BURGES, 1971). Segundo este autor, a resistência

pode ser demonstrada pelo deslocamento da linha de probites, sendo caracterizada pelo RF (fator de resistência), isto é, a relação entre os valores de CL<sub>50</sub> das populações resistente e suscetível.

A inclinação das retas, segundo Dyte & Blackman (1967), citado por BURGES (1971), é muito importante, sendo que algumas vezes a linha da população resistente tende mais a vertical do que a da suscetível. Este caso não necessariamente significa aumento da resistência, pois pode representar apenas a eliminação dos indivíduos mais suscetíveis da população. O mesmo autor menciona que a resistência de insetos a agentes microbianos em laboratório pode ser induzida de forma experimental. Cita, como exemplo, que Pasteur obteve um estoque de *Bombyx mori* (L.) resistente a um microsporidio (*Nosema* sp), através de seleção de indivíduos imunes à doença, criando-os isoladamente. Esta descoberta salvou a indústria da seda na França.

Por outro lado, existem casos em que as espécies estudadas não têm demonstrado aumento da resistência, apesar de terem sido submetidas a pressão de seleção, como observado com cinco populações naturais de *Helicoverpa zea* Boddie em resposta ao *Baculovirus heliothis*, com pressão de seleção de CL<sub>50-70</sub> por 20-25 gerações. Estas populações foram tão suscetíveis quanto as

não selecionadas (IGNOFFO & ALLEN, 1972).

Da mesma forma, WHITLOCK (1977) inoculou por 22 gerações larvas do terceiro instar de *Heliothis armigera* Hübner com um vírus de poliedrose nuclear (VPN) e um vírus de granulose (VG), através da contaminação do alimento, sem ter obtido nenhuma evidência de aparecimento de resistência. O autor refere que, caso esta espécie desenvolvesse resistência, esta ocorreria em um prazo mais longo do que com inseticidas, possivelmente pelo fato da resistência a patógenos ser mais complexa e envolver resposta imunológica.

FUXA, (1992) fazendo uma revisão sobre o tema relatou que para alguns insetos o aumento da resistência foi de mais de 10 vezes, a exemplo de *B. mori*, *Epyphias postvittana*(walker), *Limantria dispar* (L.), *Phthorimaea operculella* (Zeller), *Pieris brassicae* (L.), *Plodia interpunctella* (F.) , *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) e *Spodoptera littoralis* (Boisd.). No geral, a taxa de resistência variou de 3 até 140 vezes com pressão de seleção de 60%, e o período necessário para desenvolver resistência foi, em média, equivalente a 6,8 gerações.

A indução de resistência em *B. mori* foi estudada por WATANABE (1967), que observou um aumento da resistência até a

quinta geração, a qual estabilizou a partir da sexta geração. A taxa de resistência foi de 16 vezes com pressão de seleção de 60%

Estudos de avaliação da resistência de *S. frugiperda* ao seu VPN foram realizados por FUXA (1988), com populações do Texas e da Louisiana, USA. As doses letais médias (DL<sub>50</sub>) variaram de 1,8 até 16,3 corpos de inclusão poliédricos (cip)/larva, sendo que a DL<sub>50</sub> de larvas expostas ao vírus em condições de laboratório teve um incremento de 4,1 até 18,7 cip/larva, com pressão de seleção de 80% por sete gerações.

A resistência também foi avaliada a nível de campo por Martignoni (1957), citado por FUXA (1992). A espécie *Eucosoma griseana* Hübner aumentou em 38 vezes sua resistência a um VG.

A possibilidade de desenvolver resistência em *E. postvittana* ao seu VPN foi estudada por BRIESE et al. (1980), em populações de campo e laboratório. Esses autores encontraram que a resistência desenvolvida na população selecionada foi de 160 vezes mais do que a população de campo, e 50 vezes mais que a população suscetível de laboratório.

Um outro fator importante a ser considerado em relação a resistência de insetos é o comportamento frente a outros microrganismos, fato conhecido como resistência cruzada. FUXA & RICHTER (1989) trabalharam com populações resistentes e

21

suscetíveis de *S. frugiperda* para avaliar seu comportamento frente a outros patógenos e inseticidas químicos. Estes autores observaram que a população resistente demonstrou resistência cruzada a um VG e a um VPN de *Autographa californica* (Speyer), com base na  $CL_{50}$ ; porém, foi significativamente mais suscetível a Paration Metílico, quando comparada com a população não selecionada. Com respeito a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, as populações resistente e suscetível não diferiram significativamente.

Estudos semelhantes foram desenvolvidos por SOSA-GOMEZ et al. (1992) com populações de *A. gemmatalis* resistentes e suscetíveis ao VPN, visando avaliar seu comportamento frente a *B. thuringiensis*. Os autores não encontraram evidências de resistência cruzada.

Outro aspecto de relevante importância nos estudos de resistência de insetos é o conhecimento dos mecanismos envolvidos neste processo. Vários autores tem postulado hipóteses a este respeito. FUXA (1992), por exemplo, cita que alguns mecanismos de resistência a vírus tem sido detectados em populações de insetos, incluindo inativação de virions no intestino (como ocorre no caso de *B. mori* infectado por vírus de poliedrose citoplasmática), ausência de ataque às células do intestino e

inibição de replicação do vírus em *B. mori*, infectado por denso núcleo vírus), descarga de células infectadas do intestino médio (*B. mori*, vs. vírus de partículas livres), e a destruição de virions na hemolinfa (*L. dispar* vs. VPN).

A resistência de *S. frugiperda* envolve sistemas desconhecidos associados ao intestino do inseto (FUXA e RICHTER, 1990). Entretanto, David (1978), citado por FUXA (1992), menciona um outro mecanismo não identificado pós-invasão em *P. brassicae*.

O pH tem sido referido como outro fator envolvido no mecanismo de resistência. IGNOFFO & GARCIA (1966) atribuíram uma grande importância ao pH na atividade do VPN de *Heliothis*. A maior mortalidade do inseto foi registrada em pH 7.0, com os autores afirmando que suspensões de vírus para controle de insetos devem ser mantidas em pH neutro.

A importância da atividade enzimática foi estudada com uma protease alcalina de atividade antiviral por FUNAKOSHI & AIZAWA (1989), os quais demonstraram sua presença no suco gástrico de *B. mori*. No suco gástrico desta mesma espécie, UCHIDA et al. (1984) encontraram uma proteína inativadora do VPN, a qual pode precipitar os poliedros *in vitro*. Estes autores, através de observações no microscópio eletrônico, detectaram um material amorfo sobre a superfície dos envelopes virais proporcionando o

aparente desaparecimento dos nucleocapsídeos. Segundo eles, esta proteína pode apresentar atividade enzimática, por ter sido isolada do tubo digestivo.

A possibilidade de algum mecanismo de resistência estar relacionado ao intestino da larva é reforçado por FUXA e RICHTER (1990). Estes autores obtiveram diferenças significativas na mortalidade de uma população resistente em relação a uma suscetível, quando a contaminação foi via oral; no entanto, essa diferença não existiu quando o vírus foi injetado na hemocele. Os autores concluíram que o mecanismo de resistência atua a nível intestinal.

A este respeito, GRANADOS (1980) reporta que a membrana peritrófica do intestino representa uma barreira capaz de inibir a infecção. Segundo o autor, muitos insetos possuem esta membrana, composta principalmente de quitina e outras proteínas, formando um mecanismo de defesa para a entrada dos virions.

Segundo outros autores, o mecanismo genético está envolvido na aquisição de resistência. BRIESE et al. (1980) estudaram a resistência de *E. postvittana* ao seu VPN, avaliando o comportamento dos pais de forma isolada, dos híbridos e das retrocruzadas. A comparação das linhas de probites permitiram observar diferenças marcantes entre eles, com os autores

concluindo que a resistência é geneticamente determinada.

Alguns aspectos genéticos da resistência de *S. frugiperda* ao seu VPN foram estudados por REICHELDERFER & BENTON (1974). Estes autores encontraram que a mesma é controlada por um gen ou gens, os quais mostram dominância parcial ou incompleta. Os mesmos citam que Watanabe (1965), trabalhando com duas populações de *B. mori*, determinou que a resistência esteve controlada por um simples fator genético dominante.

A resistência de *P. operculella* ao seu VG é controlada por um gen simples, altamente dominante, autosômico, com homozigose tanto para resistência quanto para suscetibilidade, segregando segundo a proporção Mendeliana (BRIESE, 1982). Segundo o autor, este pode ser apenas um dos numerosos gens que influenciam a expressão fenotípica da resistência e contribui para a ampla variabilidade da resposta ao vírus em populações de campo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Devido ao fato das populações não terem apresentado diferenças significativas quanto a resistência (Capítulo 11), selecionou-se a de Dourados (MS) "não exposta" ao vírus, desde que esta apresentou maior fecundidade em laboratório, facilitando a obtenção de grandes quantidades de larvas para os experimentos. As outras foram descartadas, pois não seria possível trabalhar com três populações simultaneamente.

Com as concentrações de 0 (testemunha), 20, 60, 180, 540, 1600 e 4860 cip/ml foram montados bioensaios utilizando 60 larvas de fim de segundo instar por tratamento, distribuídas em grupos de 3 por recipiente, com a finalidade de avaliar a mortalidade de *A. gemmatalis* e determinar as concentrações letais 50 (CL<sub>50</sub>), e 80 (CL<sub>80</sub>) bem como o tempo letal 50 (TL<sub>50</sub>). Para aumentar o tamanho da colônia, na geração F4 a partir da coletada no campo foi utilizada uma parcela das larvas para os bioensaios com o VPN. Este procedimento foi repetido com as sobreviventes por 10 gerações.

Para obter a população resistente, foram realizadas

pressões de seleção através das várias gerações, utilizando-se em cada uma delas aproximadamente 10.000 larvas. Para tanto, as mesmas foram inoculadas com uma dose suficiente para causar 80 % de mortalidade ( $CL_{80}$ ), determinada mediante os bioensaios realizados com as gerações progenitoras. Esta concentração permitiu a sobrevivência de 20% dos indivíduos, quantidade apropriada para continuar com a pressão de seleção por 10 gerações.

Os testes de mortalidade e bioensaios foram desenvolvidos segundo a metodologia descrita no capítulo II, sendo que a mortalidade diária foi registrada a partir do quarto dia após a inoculação.

Nos testes de mortalidade, quando as larvas sobreviventes atingiram o estágio de pré-pupa, estas foram acondicionadas em caixas plásticas (30x15x12 cm), com tampa, contendo vermiculita autoclavada para empuparem. Após quatro dias do empupamento, avaliou-se a mortalidade e as sobreviventes foram sexadas, montando-se gaiolas com 80 casais cada uma. Paralelamente, uma parte desta população foi mantida sem pressão de seleção e denominada "suscetível", com a finalidade de servir como testemunha. Na avaliação dos bioensaios, para obtenção da  $CL_{80}$  a ser aplicada nos sobreviventes de cada geração posterior,

foi incluída também a mortalidade das pupas para o cálculo da mortalidade total.

Como as avaliações dos bioensaios se estenderam até a última larva morrer ou empupar, demorando em alguns casos mais de 18 dias após a inoculação, ocorreu mortalidade na testemunha, principalmente por estresse, sendo mais evidente na população suscetível. Este fato impossibilitou analisar os dados pelo programa Probit 3.0 utilizado nas outras fases do trabalho, sendo então processados pelo programa SAEG (Universidade Federal de Viçosa, MG), também para análise de probites. Foram feitas comparações entre os dois programas, não encontrando-se diferenças significativas entre os resultados obtidos com cada um deles.

Devido a mortalidade da F5 ter sido superior à esperada, a F6 foi inoculada com uma dosagem menor segundo a análise do bioensaio da geração anterior. A partir da F7 foi aumentado o número de larvas inoculadas, para evitar o risco de uma alta mortalidade ou um número de sobreviventes insuficiente para a continuidade do experimento.

As concentrações de VPN utilizadas nos bioensaios foram modificadas em função do aumento da resistência, passando a ser a partir da F<sub>11</sub> de: 0 (testemunha), 180, 450, 1125, 2812, 7032 e

17580 cip/ml. Devido a uma alta mortalidade ocorrida na F13, para a F14 inoculou-se um grupo de 6309 larvas com uma concentração de 30.000 cip/ml e outro de 3510 larvas com 10.000 cip/ml para garantir a continuidade da população, caso ocorresse alta mortalidade no primeiro grupo. Na geração F14 foram considerados encerrados os trabalhos correspondentes ao Capítulo III.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios na geração F4 determinaram uma  $CL_{80}$  de 540 corpos de inclusão poliédricos (cip)/ml para a F5, obtendo-se, no entanto, uma pressão de seleção de 90%. Devido a pressão ter sido superior à esperada, na F6 preparou-se uma concentração de 250 cip/ml, determinada pelo bioensaio, obtendo-se um resultado dentro do esperado, uma vez que a pressão foi de 75%. Os resultados do bioensaio determinaram uma concentração de 300 cip/ml para a F7, sendo obtida uma pressão de seleção de 79%.

Na F8 a pressão foi de 69%, sendo neste caso a dieta inoculada com 500 cip/ml. Para a F9 observou-se um aumento da resistência, uma vez que para obter 77% de pressão de seleção foram necessários 1600 cip/ml, o que representa uma concentração cerca de três vezes superior à anterior. O teste de mortalidade montado com a geração F10, teve um resultado considerado dentro do estabelecido pelo bioteste, com uma pressão de seleção de 83%. A geração F11 demonstrou comportamento semelhante, observando-se uma pressão de seleção de 87%. Contudo, na F12 a pressão foi muito superior à estabelecida, uma vez que a mortalidade foi de 93%. A geração F13 mostrou uma pressão de 81%, considerada normal. A última geração submetida a pressão de seleção,

apresentou uma mortalidade de 68%, inferior a esperada.

Com este experimento foi considerada encerrada esta etapa, desde que o objetivo foi induzir resistência em *Anticarsia gemmatalis* Hübner por 10 gerações. A taxa final de aumento da resistência (Tabela 3) foi de 109 vezes, tendendo a um aumento no decorrer das gerações, embora nas F7 e F12 ocorreram inversão dos valores.

As linhas de regressão entre o logaritmo da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probites), bem como o tempo letal para as gerações de ambas as populações são apresentadas nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

Os valores de  $CL_{50}$  para cada uma das gerações resistente e suscetível (Tabela 4) permitem observar que nas primeiras duas gerações submetidas a pressão de seleção, as  $CL_{50}$  não diferiram significativamente. O aumento da resistência começou se manifestar a partir da terceira geração obtendo-se valores significativamente diferentes entre a população suscetível e resistente.

Com respeito a  $TL_{50}$  (Tabela 5), somente na F6 os valores não diferiram significativamente, entre a população suscetível e resistente. Na F12 os mesmos apresentaram inversão, que pode ser atribuída a variações próprias dos bioensaios mais

do que a uma resposta direta da população frente ao VPN.

Diversos pesquisadores têm avaliado a possibilidade de induzir resistência em várias espécies, através de pressão de seleção. WATANABE (1967) trabalhou com *Bombyx mori* (L.) selecionando sobreviventes de larvas alimentadas com dieta inoculada com VPN, através de oito gerações. A taxa de resistência obtida foi de 16x, portanto inferior à verificada com *A. gemmatalis* no presente trabalho (109.18x). Este autor estimou que uma pressão de seleção superior a 60% foi necessária para induzir e manter a resistência em *B. mori*, atribuindo a falta de resistência nas primeiras gerações à pressão de seleção menor que 60%. Também, referiu trabalhos que confirmam seus resultados, como no caso de Feigin (1963) com *Bacillus thuringiensis* (Berliner) em *Musca domestica* (L.), onde depois de 27 gerações não foi possível induzir resistência, sendo os resultados negativos atribuídos ao fato de ter sido exercida uma pressão de seleção de apenas 40%.

O comportamento de *A. gemmatalis* diferiu daquele demonstrado por *B. mori*, uma vez que o aumento da resistência não atingiu um patamar, mas continuou aumentando em cada geração. As oscilações observadas em algumas gerações podem ser decorrentes de diversas causas, como variações próprias dos bioensaios.

Tabela 3: Concentração letal média (CL<sub>50</sub>) (CIP/ml) das populações resistente (R) e suscetível (S) de *Anticarsia gemmatalis* e taxa de resistência durante a pressão de seleção com o vírus da poliedrose nuclear (VPN).

Geração	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>7</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>9</sub>	F <sub>10</sub>	F <sub>11</sub>	F <sub>12</sub>	F <sub>13</sub>	F <sub>14</sub>
CL <sub>50</sub> R	97	71	**	231	847	2662	1624	**	1750	5350
CL <sub>50</sub> S	-	66	**	17	29	54	42	**	54	49
Taxa *	-	1,08	**	13,59	29,20	49,30	38,67	**	32,41	109,18

\* CL<sub>50</sub> Resistente/CL<sub>50</sub> Suscetível

\*\* Valores não considerados devido a taxa de resistência ser menor que um.

Tabela 4: Concentração letal média (CL<sub>50</sub>) (CIP/ml), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) das populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente (R) e suscetível (S), inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN).

Geração	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>9</sub>	F <sub>10</sub>	F <sub>11</sub>	F <sub>13</sub>	F <sub>14</sub>
CL <sub>50</sub> R	97	71	231	847	2662	1624	1750	5350
I.C.	73-126	51-94	168-314	559-1401	1225-10122	1056-2466	1393-2197	3722-8489
Inclin.(b)	1,07	1,02	0,82	0,60	0,37	0,58	1,14	0,72
CL <sub>50</sub> S	-	66	17	29	54	42	54	49
I.C.	-	55-80	11-23	19-42	43-67	26-60	38-74	37-61
Inclin.(b)	-	1,44	1,59	1,02	1,50	0,83	0,98	1,45

Tabela 5: Tempo letal médio ( TL<sub>50</sub> ) (dias), intervalos de confiança (I.C.)(95 %) e inclinação das linhas de probites (b) das populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente (R) e suscetível (S), inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN).

Geração	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>9</sub>	F <sub>10</sub>	F <sub>11</sub>	F <sub>13</sub>	F <sub>14</sub>
TL <sub>50</sub> R	5,5	4,6	8,6	10,1	15,5	11,2	6,2	12,5
I.C.	4,1-6,1	4,0-5,1	7,5-9,3	9,4-10,7	14,5-16,9	10,8-11,9	5,8-6,5	11,7-13,4
Inclin.	5,00	3,34	3,95	3,67	2,65	3,41	4,85	2,84
TL <sub>50</sub> S	-	5,9	6,8	4,4	6,0	6,9	6,6	-
I.C.	-	5,0-6,6	6,3-7,1	3,2-5,3	5,7-6,2	6,5-7,2	6,0-7,0	-
Inclin.	-	2,58	7,39	4,58	10,5	5,93	6,0	-

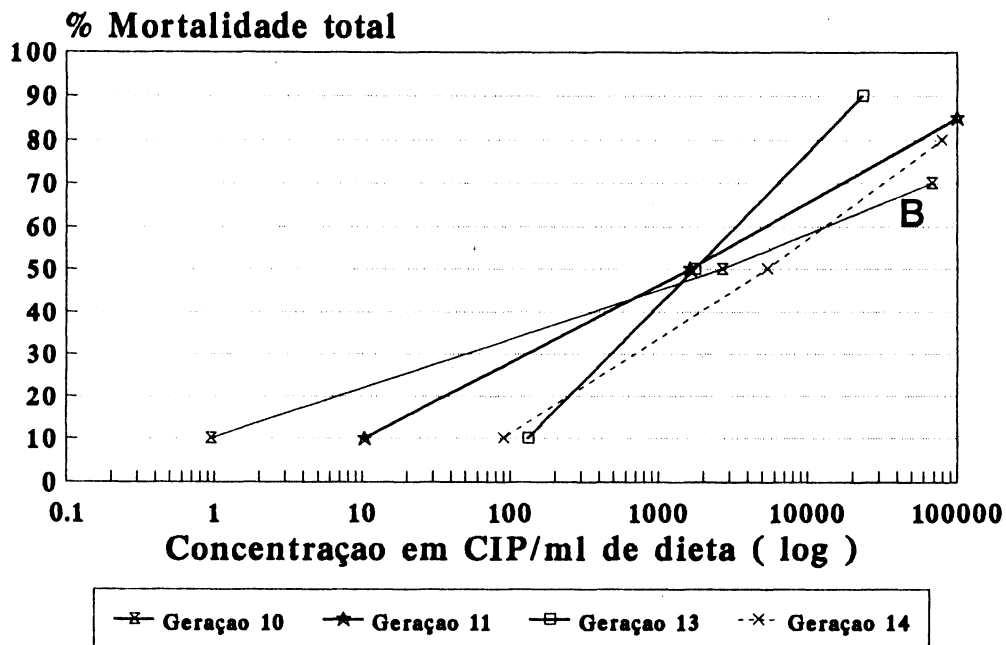
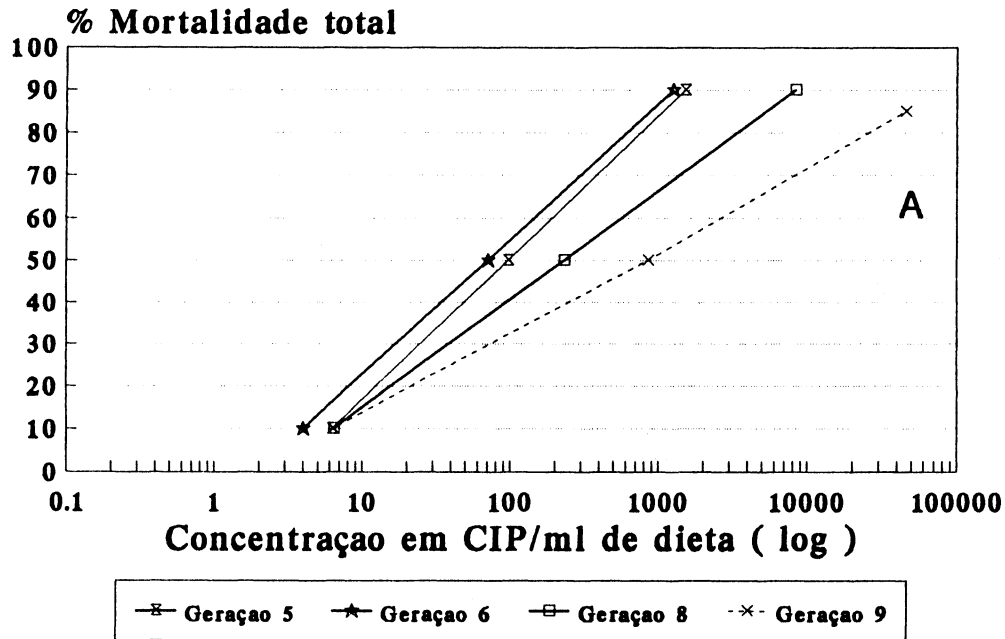


Figura 3: Regressão entre o log da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* submetidas a pressão de seleção ( $CL_{80}$ ).

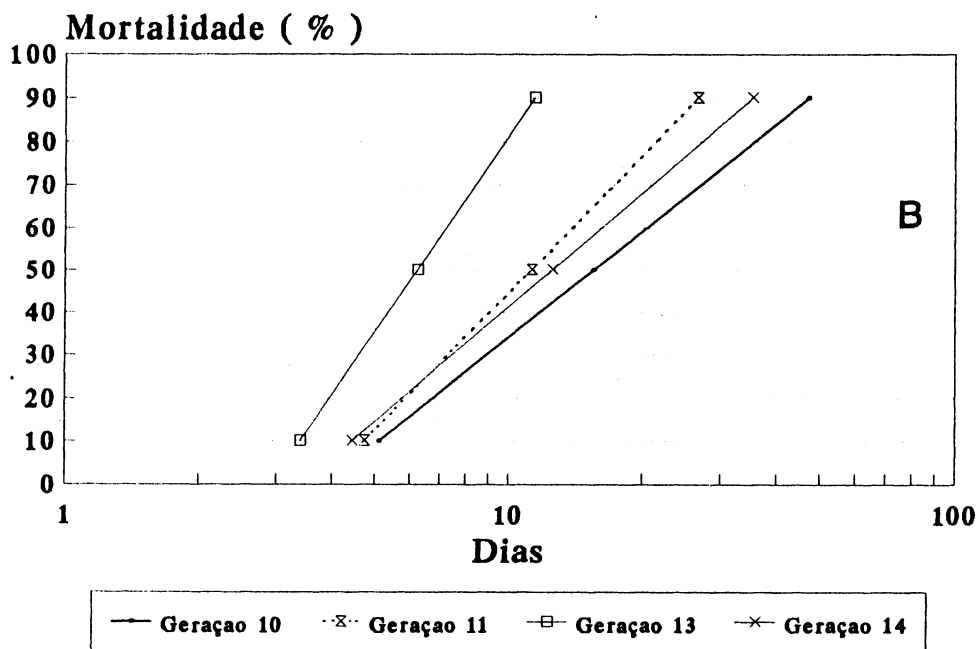
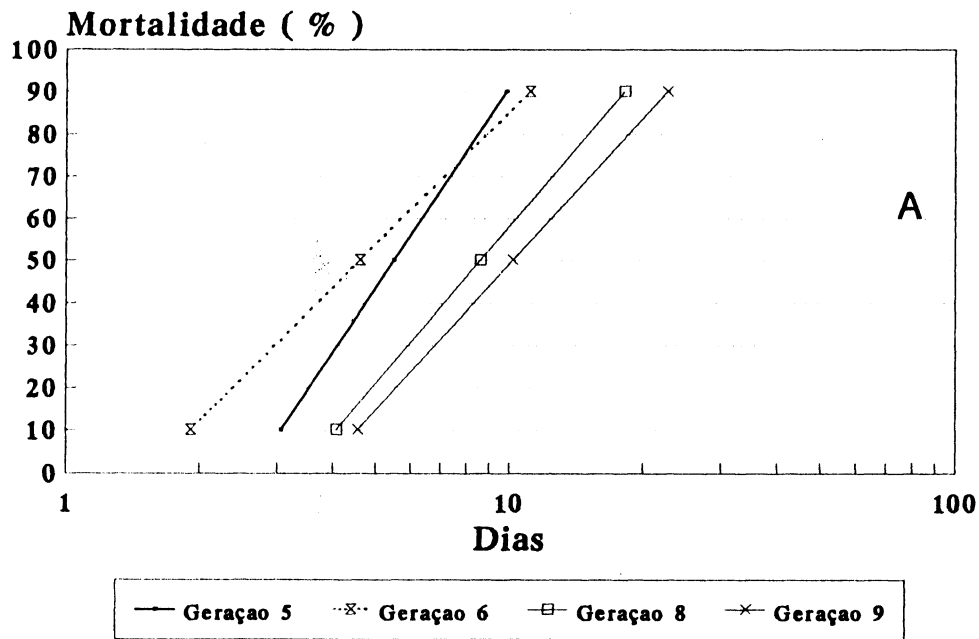


figura 4: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade ( Probites ) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* submetidas a pressão de seleção ( $CL_{80}$ ).

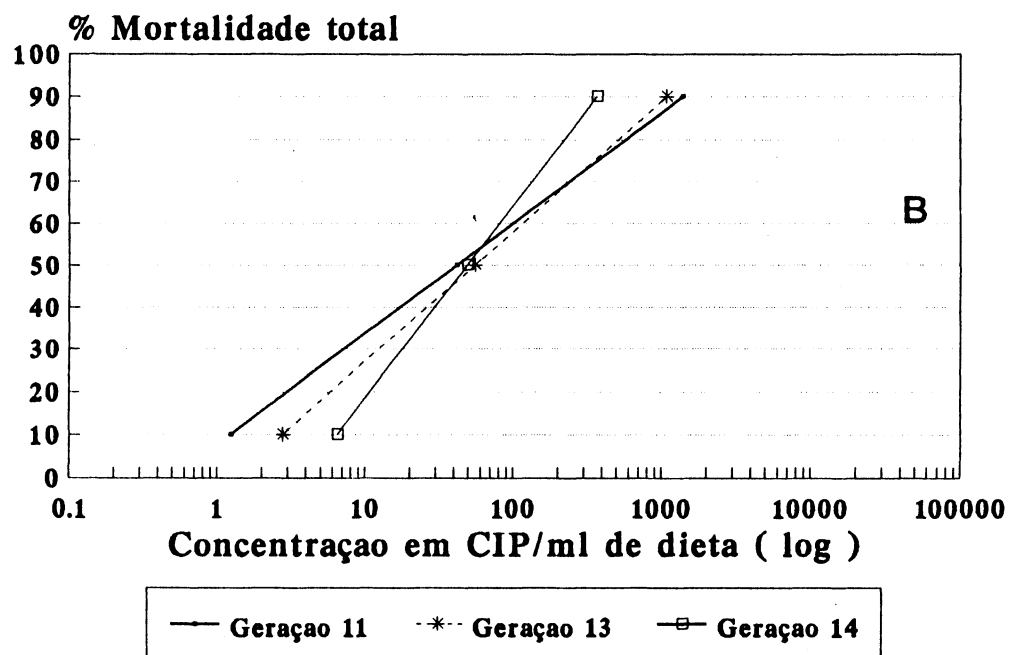
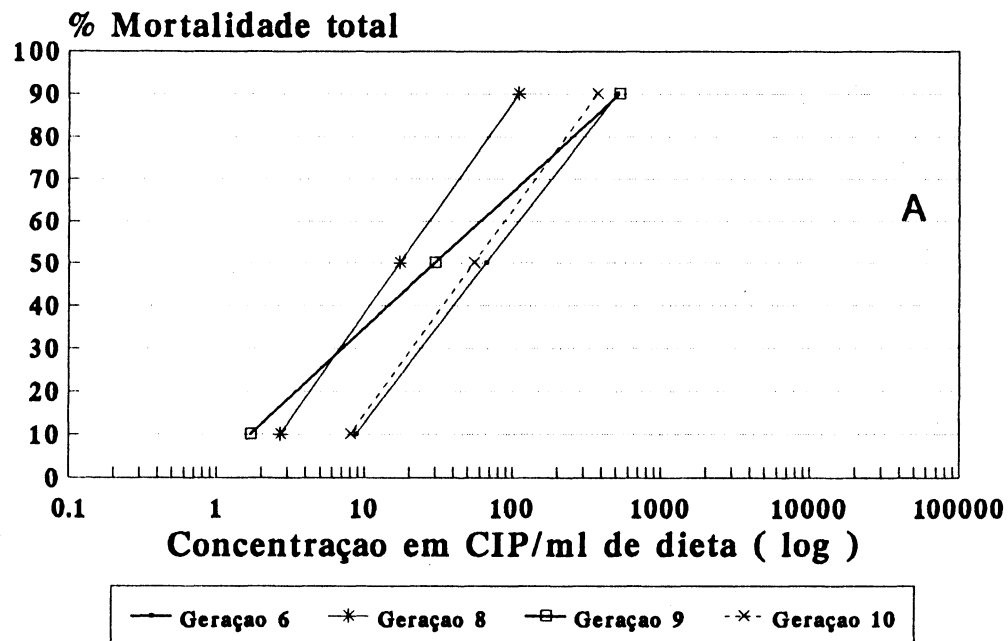


Figura 5: Regressão entre o log da concentração de *Baculovirus anticarsia* e a probabilidade de mortalidade (Probitas) de larvas de *Anticarsia gemmatalis* mantidas sem pressão de seleção (testemunha).

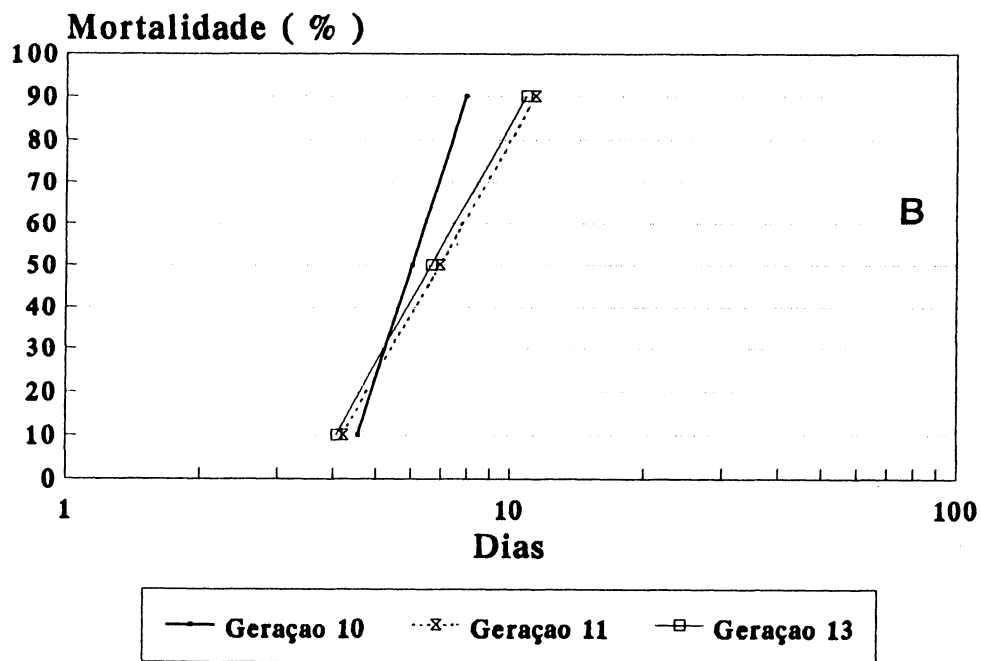
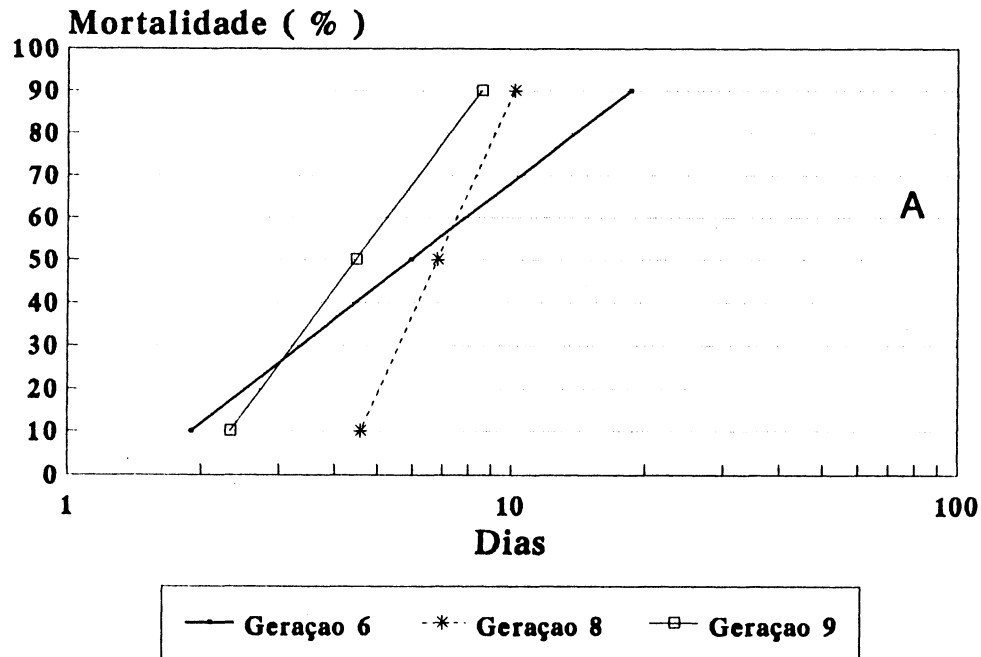


Figura 6: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade ( Probites ), de larvas de *Anticarsia gemmatalis* mantidas sem pressão de seleção (testemunha).

estresse ou reacomodamento da base genética como resposta à pressão de seleção, entre outras.

BURGES (1971) cita que na linha de probites a inclinação é muito importante. Algumas vezes, a inclinação para uma população resistente é maior do que a suscetível; embora a taxa de resistência seja evidente, não necessariamente é uma manifestação de resistência, podendo se tratar da simples eliminação dos indivíduos suscetíveis, pois nas populações normalmente existe variabilidade. Pode não existir diferenças entre o comportamento dos indivíduos resistentes e aqueles menos suscetíveis da população não selecionada.

O mesmo autor cita que a resistência verdadeira habitualmente é acompanhada por uma diminuição da inclinação da linha de probites, indicando variabilidade. Isto pode ser causado por um ou mais gens para resistência semi-dominantes, presentes mais frequentemente em estado heterozigótico, em um complexo não totalmente adaptado a sua presença ou por uma mistura de insetos resistentes e suscetíveis na população. Argumenta, também, que a  $CL_{99}$  deve ser analisada, citando como exemplo o trabalho de Martignoni (1957) com *Eucosoma griseana* Hübner, a qual, durante uma epizootia de vírus de granulose, apresentou  $DL_{99}$  variando de 0,0067 ug/larva para 0,254 e 0,291 ug/larva, em duas gerações

consecutivas, o que indicou um possível aumento da resistência. No entanto, os ângulos das linhas mudaram de 0,5 para 1,2 e 1,3 respectivamente. Na segunda geração as  $DL_{99}$  foram inferiores aos da primeira, indicando que não existiu resistência verdadeira mas sim morte dos indivíduos mais suscetíveis.

Outros autores também tem conseguido obter populações de insetos resistentes a microrganismos em laboratório. WATANABE (1967) conseguiu obter em *B. mori* uma taxa de resistência de 16x para um vírus de poliedrose citoplasmática. BURGESS (1971) refere que Rothenbulher e Thompson (1956) obtiveram grandes diferenças entre linhas selecionadas e não selecionadas de *Apis mellifera* (L.), para *Bacillus larvae*. Também cita que *Aedes aegypti* (Erichson) foi selecionado como resistente a *Dirofilaria immitis* (Pillar and Smith) em oito gerações.

Uma taxa de resistência maior que 100x a *B. thuringiensis* foi conseguida por McGAUGHEY (1985), trabalhando com *Plodia interpunctella* (F.), praga de grãos armazenados. Neste caso, o comportamento da população diferiu dos obtidos no presente trabalho com *A. gemmatalis*, uma vez que a resistência atingiu um patamar depois de 15 gerações. É possível que *A. gemmatalis* demonstre esse comportamento em gerações futuras, pois é pouco provável que a taxa de resistência continue a crescer

indefinidamente.

Sobre indução de resistência em *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith), FUXA et al. (1988) exerceram pressão de seleção com seu VPN, utilizando a CL<sub>80</sub>, mostrando que depois de sete gerações a população exposta ao VPN estabilizou em uma taxa de resistência três vezes superior à população suscetível, demonstrando um comportamento diferente daquele obtido com *A. gemmatalis* no presente estudo. Os mesmos autores, indicaram que a resistência de *S. frugiperda* ao VPN é controlada por um simples gen ou gens com dominância incompleta.

BRIESE et al. (1980), induziram resistência em uma população de *Epiphyas postvittana* Walker, praga da macieira, obtendo resultados superiores aos obtidos com *A. gemmatalis*. Neste caso, a taxa de resistência foi de 160 vezes com relação à população suscetível de campo e 50 vezes comparada com uma de laboratório. Estes autores referem que a resistência não é determinada por um gen simples totalmente dominante ou totalmente recessivo, mas é difícil caracterizar se a faixa intermediária está determinada por um gen ou um complexo de gens, pois o híbrido apresentou valores intermediários aos dos pais. Estes resultados concordam com aqueles obtidos em cruzamentos de populações resistente e suscetível de *A. gemmatalis* (Capítulo

IV, experimento I).

Para *Heliothis subflexa* Hübner, IGNOFFO et al. (1985) afirmaram que a resistência poderia ser controlada por um simples gen, mas que os mecanismos e bases bioquímicas e fisiológicas ainda deveriam ser estabelecidos.

Em trabalhos realizados com um baculovirus do grupo das granuloses, BRIESE (1982) exerceu pressão de seleção em *Phthorimaea operculella* (Zeller) com a finalidade de induzir resistência. A semelhança do presente trabalho, submeteu o inseto ao contato com o vírus por 10 gerações, encontrando que o híbrido da F1 foi 300 vezes mais resistente do que seu pai suscetível. Esses resultados levaram o autor a considerar que um gen dominante pode estar envolvido na manifestação de resistência, sugerindo que a resistência ao VG por esta espécie é determinada por um gen simples altamente dominante, com homozigose para resistência e para suscetibilidade.

O mesmo autor refere que o desenvolvimento de resistência pode ser explicado pelo possível contato prévio da população coletada com seu vírus. Esta afirmação parece não se correlacionar com os resultados do presente trabalho, uma vez que tanto as populações de *A. gemmatalis* com contato prévio ("expostas") quanto as de regiões livres de vírus (não

expostas") não diferiram significativamente quanto a suscetibilidade ao VPN. No entanto, cabe ressaltar que a ocorrência natural do VPN de *A. gemmatalis* no Brasil não permite descartar a hipótese de contato prévio de suas populações com o patógeno.

Algumas tentativas para induzir resistência ao VPN não atingiram resultados satisfatórios, como foi o caso de WHITLOCK (1977) com populações de *Heliothis armigera* Hübner. A mortalidade alcançada por larvas previamente expostas ao vírus foi de 75.4%; no entanto, para as não expostas foi de 64%. Ao contrário de *A. gemmatalis*, esta espécie não manifestou capacidade para gerar resistência a nível de laboratório.

A este respeito, IGNOFFO & ALLEN (1972) também relataram que também não conseguiram induzir resistência em *Heliothis zea* Boddie depois de 25 gerações sob pressão de 50 a 70% de mortalidade a seu VPN. Os autores fizeram referência, no entanto, que Carter & Phillips (1968) obtiveram um incremento de oito vezes na  $CL_{50}$ , submetendo a população em estudo a pressão de seleção com Paration Metílico por 10 gerações. Estes autores demonstraram o comportamento típico de verdadeira resistência, desde que explicam um decréscimo na inclinação da linha de probites acompanhado de um incremento da  $CL_{50}$  e retorno aos

valores iniciais de inclinação. Nossos resultados são concordantes quanto a esses aspectos.

Segundo FUXA (1992), as taxas de aumento da resistência obtidas com lepidópteros, por diversos autores a nível mundial, tem variado entre 3 e 140 vezes, sendo a pressão de seleção de 60% em média, com um número médio de 6,8 gerações para o desenvolvimento de resistência. Considerando estes resultados, os dados obtidos no presente trabalho enquadram-se entre os maiores níveis de resistência conseguidos, tanto com respeito a taxa (109,18 vezes) quanto a pressão de seleção (80% em média, por 10 gerações). É importante mencionar, também, que o aumento da resistência foi detectado já a partir da terceira geração.

A nível de campo, existe somente um dado documentado de resistência. Martignoni (1957), citado por FUXA (1992), refere que detectou uma taxa de 38 vezes na resistência de *E. griseana* ao VPN. Pela análise de probites, detectou-se diferenças na inclinação da reta a nível de  $CL_{50}$  mas não de  $CL_{99}$ ; pode-se inferir, portanto, que não se trata de um caso de resistência verdadeira e que a mortalidade maior aconteceu com os indivíduos mais suscetíveis da população.

Pelos resultados obtidos no capítulo II, sabe-se que *A. gemmatalis* não tem manifestado resistência a nível de campo,

apesar de vários anos de aplicação de seu VPN; contudo, pelos resultados obtidos neste experimento, verifica-se que esta espécie tem capacidade para desenvolver resistência quando submetida a pressão de seleção. Isto evidencia que alguns fatores estão influenciando para que a resistência não se manifeste no campo.

Estudos são necessários para conhecer estes aspectos, considerados de fundamental importância para delinear novas estratégias de manejo ante o possível aparecimento de resistência em populações de *A. gemmatalis*.

## CAPITULO IV

### REVERSAO DA RESISTENCIA AO VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR EM POPULACOES DE *Anticarsia gemmatalis* HUBNER.

#### 1. REVISAO BIBLIOGRAFICA

Relativamente poucos são os trabalhos com o objetivo de estudar os aspectos envolvidos na resistência de insetos a entomopatógenos; e deles, apenas alguns abordam a possibilidade de reversão da mesma. Com relação a *Anticarsia gemmatalis* Hübner não se tem conhecimento de estudos sobre resistência anteriores a este.

Com *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH), FUXA & RICHTER (1989) estudaram, em condições de laboratório, o comportamento de larvas de diversas gerações inoculadas com seu vírus de poliedrose nuclear (VPN). Estes autores selecionaram uma população como resistente, através de pressão de seleção pela concentração letal 80 (CL<sub>80</sub>) do patógeno. A população resistente foi dividida, sendo que uma parte continuou sob exposição e a

outra foi mantida livre da ação do vírus. Esta última não mostrou reversão da resistência nas primeiras gerações, e apenas na F<sub>8</sub> os valores da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) foram semelhantes aos da testemunha (população suscetível).

Possíveis causas para a reversão da resistência são apontadas como a seleção de gens por ausência de VPN e a imigração de insetos suscetíveis provenientes de áreas não expostas ao VPN (FUXA, 1992). Segundo este autor, outro parâmetro a ser considerado na avaliação da resistência é a performance reprodutiva, a partir de observações que populações suscetíveis de *S. frugiperda* produziram 550% mais ovos que a população resistente, além da constatação que a percentagem de eclosão foi de 85% e 50%, para a suscetível e a resistente respectivamente.

A reversão de resistência e os dados de performance biológica parecem indicar que, quando a exposição ao vírus é interrompida, a reorganização dos gens para a resistência poderia provocar redução da fecundidade das fêmeas. A seleção de *Aedis aegypti* (Erichson) para resistência a DDT também mostrou comportamento semelhante, com redução da capacidade reprodutiva das fêmeas ( ABEDI & BROWN, 1960 ).

Resultados semelhantes foram obtidos por CURTIS (1978),

o qual considera que a reversão da resistência pode ser resultado da seleção de gens na ausência de vírus, da imigração de insetos suscetíveis para áreas com população resistente, ou da combinação dos dois fatores.

Se a pressão de seleção é continuamente aplicada e relaxada, o grau de reversão pode se perder a cada ciclo (Wood & Bishop, 1981, citados por FUXA, 1992).

Estudos de reversão da resistência em *Epiphyas postvittana* (Walker) foram desenvolvidos por BRIESE et al. (1980), os quais trabalharam com três populações: resistente e suscetível de laboratório e uma de campo, realizando cruzamentos entre elas. Verificaram que as linhas de probites dos híbridos e retrocruzamentos tiveram comportamento intermediário com respeito aos pais. BRIESE (1982), trabalhando com o vírus de granulose (VG) de *Phthorimaea operculella* (Zeller), esclareceu alguns aspectos genéticos no aparecimento de resistência, sendo que ao realizar o cruzamento da população resistente com a suscetível, a progênie teve um comportamento intermediário entre os pais. Estudos deste tipo são considerados essenciais para o conhecimento da co-evolução hospedeiro-microrganismo (FUXA, 1992).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para o experimento 1, uma parte da população resistente foi cruzada com aquela que não foi submetida a pressão de seleção ("suscetível"), em uma proporção de 50% cada uma. Com as larvas provenientes deste cruzamento (RxS) montou-se um bioensaio com as seguintes concentrações: 180, 450, 1125, 2812, 7032, 17580 e 43950 corpos de inclusão poliedrica (cip)/ml, mais uma testemunha sem vírus. O número de larvas por concentração, instar e condições do experimento foram os mesmos que os utilizados no capítulo 11.

Os adultos provenientes do primeiro cruzamento entre as populações resistente e suscetível foram novamente cruzados com os da população suscetível, repetindo-se esta seqüência por quatro gerações sucessivas, sendo as larvas submetidas a bioensaios com o VPN para determinação da concentração letal média ( $CL_{50}$ ). Paralelamente outra parte da população resistente foi subdividida em mais duas subpopulações: uma delas continuou exposta a pressão de seleção pela  $CL_{80}$  para conhecer o limiar de incremento da taxa de resistência, e a outra foi destinada para o segundo experimento deste capítulo, descrito a seguir.

No experimento 2, a subpopulação resistente foi deixada livre de pressão de seleção, para comparar com a resposta da população híbrida (resistente x suscetível), já que a diferença entre ambas permitiria quantificar o aporte do caráter de suscetibilidade para o decréscimo da resistência. Neste caso, os estudos tiveram continuidade até que os valores de resistência ficassem próximos aos da população testemunha.

A cada geração foram montados bioensaios com as concentrações de: 0 (testemunha), 2812, 7032, 17580, 43950, 109900 e 274700 cip/ml de dieta, para conhecer o comportamento da população e avaliar a possível perda da resistência. Os dados de mortalidade de larvas dos bioensaios foram analisados pelo programa Micro probites 3.0 de SPARKS & Sparks, (1987), Lily Research Labs., Greenfield, Indiana, E.U.A., até o 11<sup>o</sup> dia considerado suficiente uma vez que, o pico de mortalidade ocorre entre o 7<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dia após a inoculação.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o experimento 1, a análise dos dados de concentração letal média (CL<sub>50</sub>) de *Baculovirus anticarsia* para larvas provenientes do cruzamento entre as populações resistente e suscetível (Tabela 6) permite inferir que houve uma drástica perda de resistência por *Anticarsia gemmatalis* Hübner. Quando comparada a CL<sub>50</sub> da população dos pais resistentes com a F<sub>1</sub>, os intervalos de confiança não apresentaram sobreposição, o que indica que tal diferença foi significativa.

A geração F<sub>2</sub> manteve a mesma tendência de queda da resistência, sendo a CL<sub>50</sub> de 1002 cip/ml, apresentando diferença significativa da F<sub>1</sub> (9034 cip/ml). Comparando o tempo letal médio (TL<sub>50</sub>), observou-se sobreposição dos intervalos, que demonstra a não significância dos valores obtidos.

Resultados semelhantes foram verificados para a geração F<sub>3</sub>, observando-se diferenças significativas tanto com respeito a F<sub>2</sub> quanto a F<sub>1</sub>. No que se refere ao TL<sub>50</sub>, também não foram observadas diferenças significativas em relação às duas gerações anteriores.

Tabela 6: Concentração letal média (CL<sub>50</sub>)(CIP/ml), tempo letal médio (TL<sub>50</sub>)(dias), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) para larvas oriundas do cruzamento das populações resistente e suscetível de *Anticarsia gemmatilis*, inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN).

Cruzamento	I	II	III	IV
CL <sub>50</sub>	9034	1002	585	121
I.C.	6926-12169	758-1298	444-748	44-304
Inclin. (b)	1,3	1,3	1,5	1,1
TL <sub>50</sub>	11,6	9,1	10,9	9,5
I.C.	10,4-14,8	8,7-9,7	9,5-24,5	9,1-9,9
Inclin. (b)	4,6	6,1	7,2	9,6

Na geração  $F_4$  o comportamento foi semelhante aos obtidos com as gerações anteriores, sendo que, quando comparadas as  $CL_{50}$  de todas as gerações entre si, a diferença foi significativa. Em relação ao  $TL_{50}$ , observaram-se diferenças significativas somente quando comparadas a  $F_1$  com a  $F_4$ . As análises de regressão do logaritmo da concentração com relação a mortalidade (Probites), bem como o tempo letal são mostrados nas Figuras 7 e 8. Nesta geração, os valores de  $CL_{50}$  estiveram próximos aos da população suscetível, configurando-se, portanto, a perda total da resistência.

Comparando-se os dados de  $CL_{50}$  do cruzamento das populações resistente e suscetível com a população resistente "livre de vírus", o comportamento desta última em relação à perda da resistência demonstra que, uma vez estabelecida, esta permanece estável por um determinado período na ausência de exposição ao vírus (Tabela 7).

Esta "estabilidade" possivelmente se mantenha somente nas primeiras gerações diminuindo com o tempo, pois, embora não significativa, foi observada uma discreta queda da resistência na segunda geração, a partir da retirada da pressão de seleção (Figuras 9 e 10). Comportamento semelhante foi obtido por FUXA & RICHTER (1989) com *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) a qual,

quando deixada livre de vírus, manteve inicialmente sua resistência estável. Gradativamente as  $CL_{50}$  foram diminuindo até atingir, na  $F_8$ , valores próximos à testemunha.

Tabela 7: Concentração letal média ( $CL_{50}$ ) (CIP/ml), intervalos de confiança (I.C.) (95 %) e inclinação das linhas de probites (b) para a populações de *Anticarsia gemmatalis*, resistente e livre de pressão de seleção, inoculadas com o vírus da poliedrose nuclear (VPN).

Geração	$F_1$	$F_2$	$F_3$	$F_4$
$CL_{50}$	7782	7840	48231	24088
I.C.	(5132-10856)	(5461-10521)	(20533-96661)	(16874-33781)
Inclin.(b)	1,14	1,22	1,58	0,96
$TL_{50}$	11,4	-	12,8	-
I.C.	(10,0-15,5)	-	(11,2-18,2)	-
Inclin.(b)	7,12	-	5,15	-

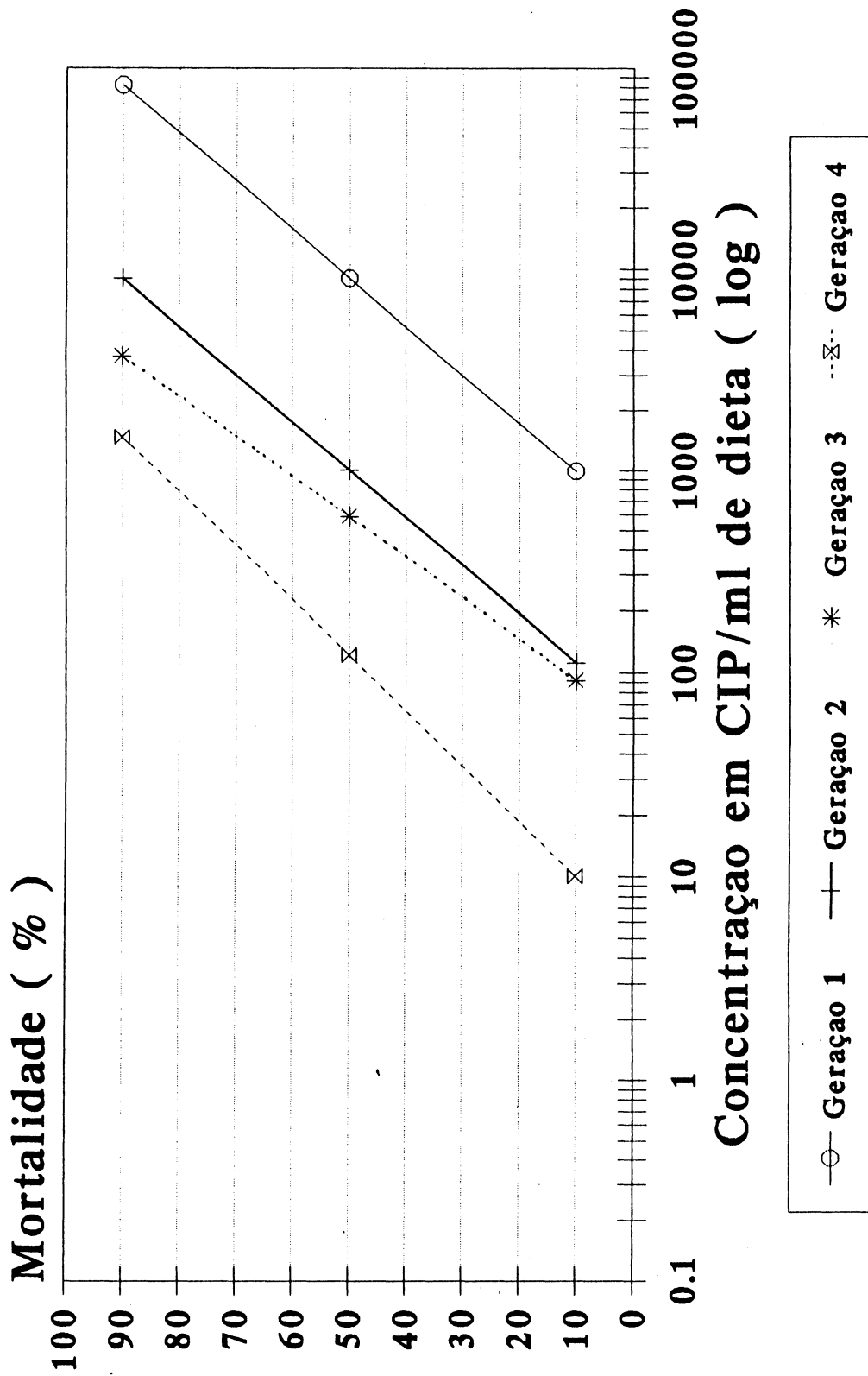


Figura 7: Regressão entre o log da concentração de Baculovirus anticarsia e a probabilidade de mortalidade (Probites) de larvas do cruzamento das populações de Anticarsia gemmatalis resistente e suscetível.

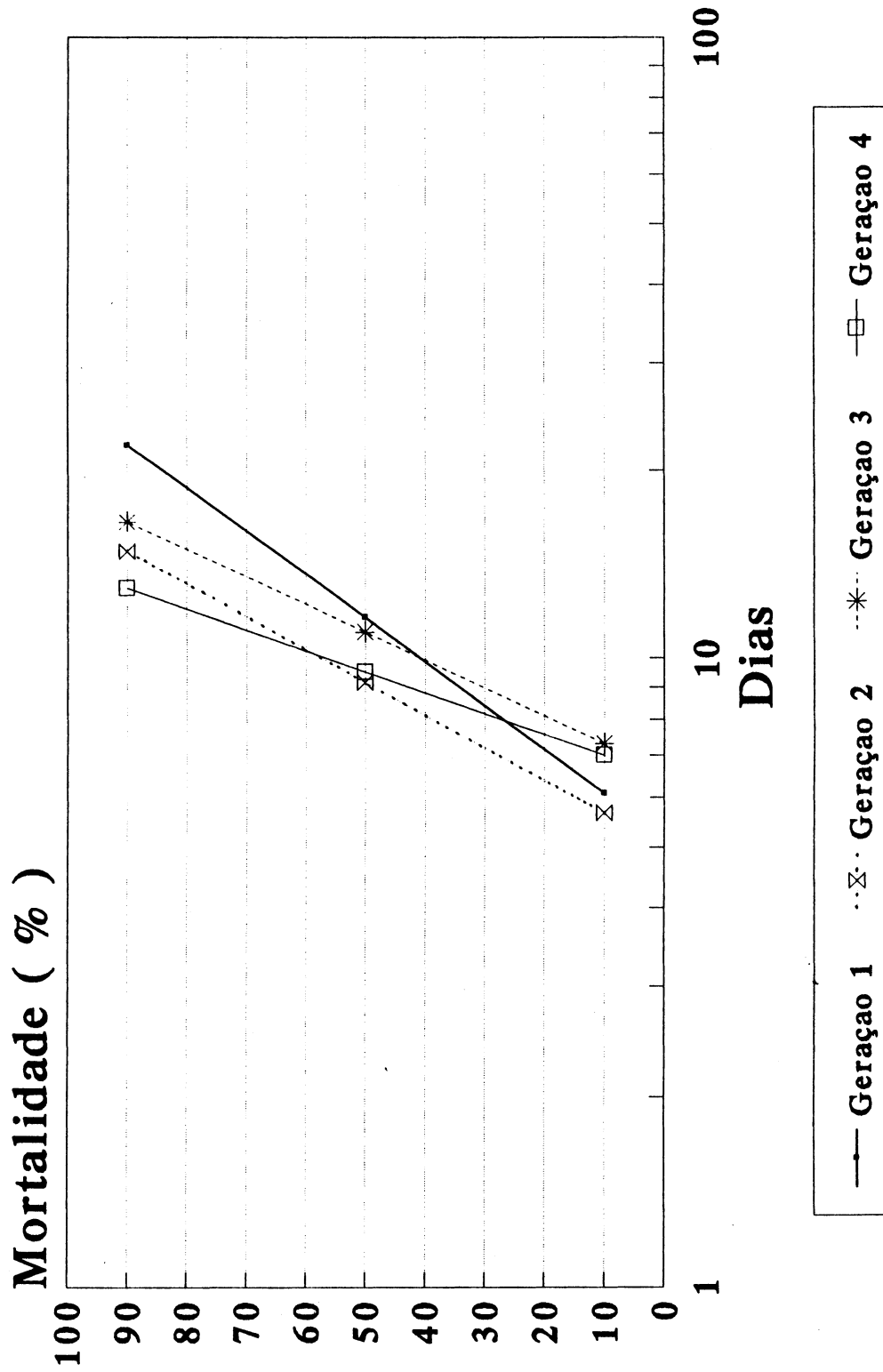


Figura 8: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade (Probites), de larvas do cruzamento das populações de *Anticarsia gemmatalis* resistente e suscetível.

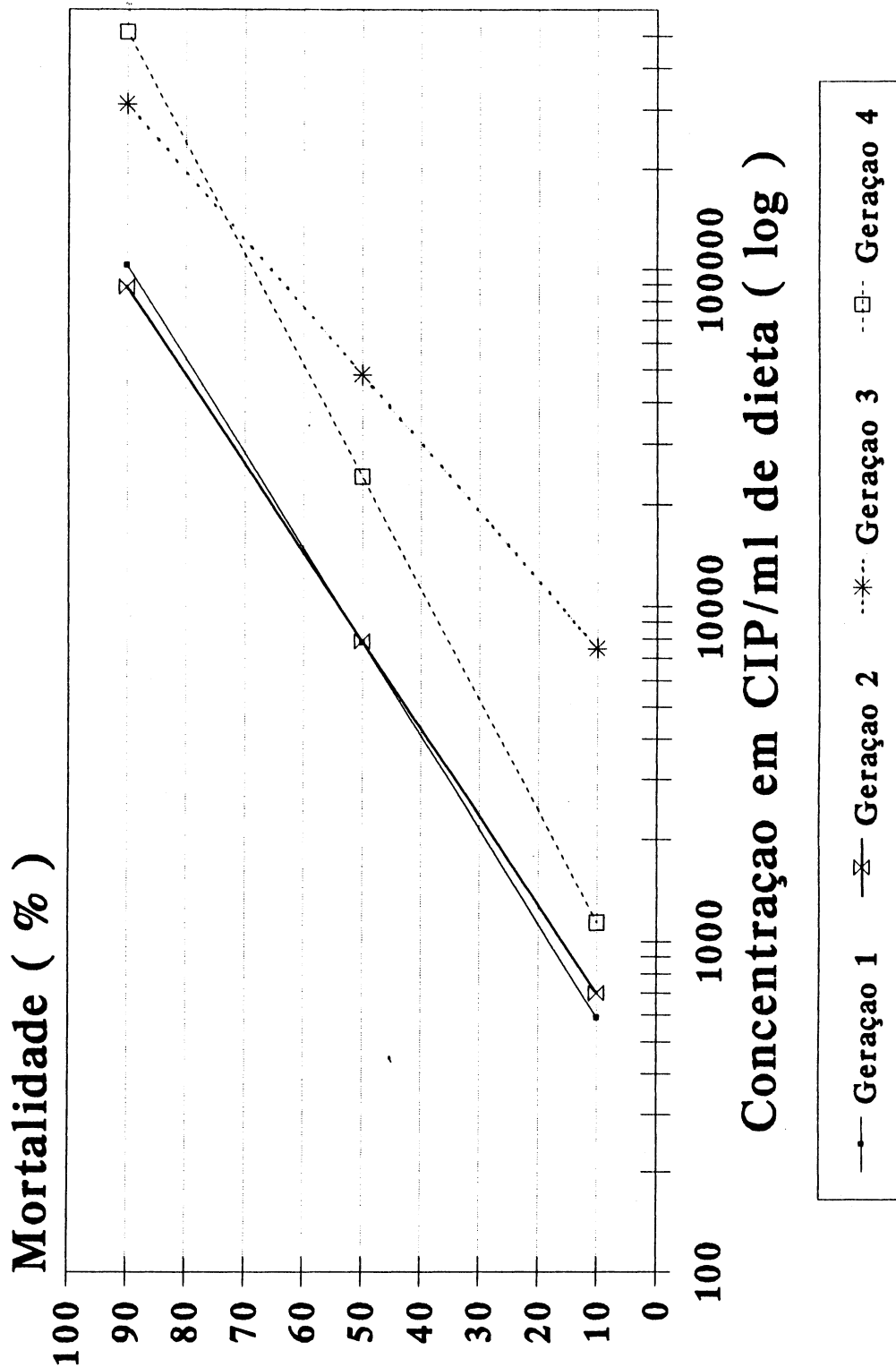


Figura 9: Regressão entre o log da concentração de Baculovirus anticarsia e a probabilidade de mortalidade ( Probites ) de larvas da população resistente de Anticarsia gemmatalis deixada livre de pressão de seleção.

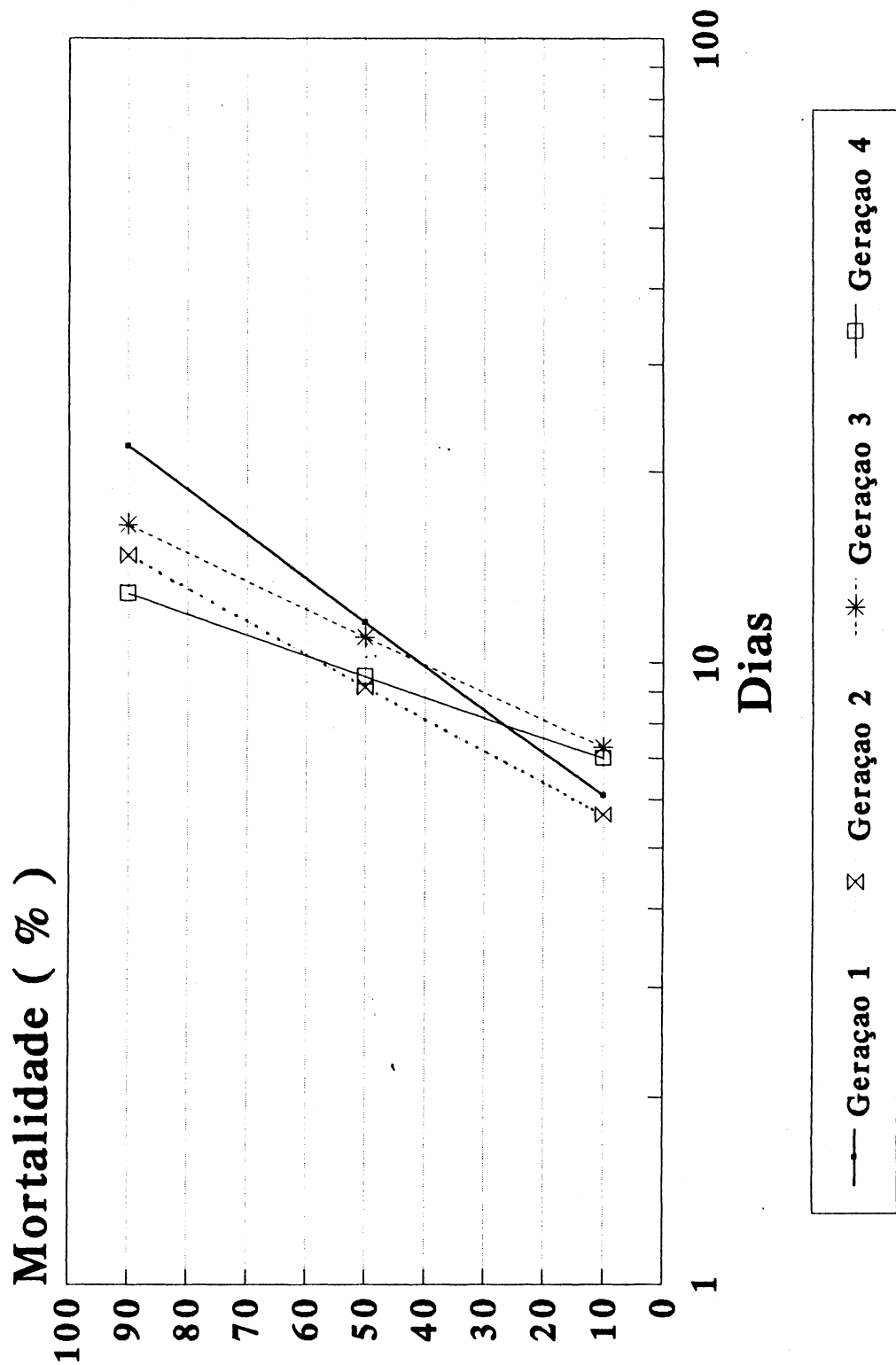


Figura 10: Regressão entre o log do tempo letal e a probabilidade de mortalidade ( Probites ), de larvas da população de **Anticarsia gemmatalis** resistente deixada livre de pressão de seleção.

A diminuição dos valores da  $CL_{50}$  para híbridos entre as populações resistente e suscetível concordam com aqueles demonstrados por BRIESE et. al. (1980) com o VPN de *Epiphyas postvittana* (Walker). Os valores de  $DL_{50}$  obtidos por este autor foram de  $1.83 \times 10^6$  cip/ml para a população resistente de laboratório e de  $0.01 \times 10^6$  cip/ml para a suscetível. Observaram também que, quando indivíduos de ambas populações foram cruzados, valores intermediários de  $CL_{50}$  foram obtidos, com diferenças significativas entre elas.

Estudos sobre cruzamentos de populações resistentes e suscetíveis também foram realizados por BRIESE (1982) com *Phthorimaea operculella* (Zeller). Este autor observou que o logaritmo da  $DL_{50}$  foi de 6,35 para a população resistente, 5,16 para a suscetível e 6,25 para o híbrido. Este último diferiu significativamente do progenitor suscetível, mas não do resistente.

A queda da resistência na população selecionada, quando cruzada com a suscetível, ressalta a incidência da última na diluição da resistência. Isto permite hipotetizar que a nível de campo *A. gemmatalis* tem um comportamento similar a *S. frugiperda*, respaldando à teoria de FUXA (1992) de que a imigração de indivíduos suscetíveis é um dos fatores principais para a não

manifestação de resistência.

Estes resultados demonstram que *B. anticarsia* pode ser amplamente utilizado para o controle de *A. gemmatilis*, com poucas possibilidades de aparecimento de resistência, o que, somado ao fato de não apresentar risco para o homem, outros vertebrados e insetos benéficos, fazem deste um componente fundamental nos Programas de MIP.

*CAPITULO V**CONCLUSOES*

Nas condições em que foram conduzidos os presentes estudos, pode-se concluir que:

1. Populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner "expostas" e "não expostas" a aplicações do *Baculovirus anticarsia* coletadas em Dourados (MS), Passo Fundo (RS), Rancho Alegre e Londrina ( PR ) não são resistentes ao mesmo.
2. É possível induzir resistência em *A. gemmatalis* ao seu vírus de poliedrose nuclear (VPN), através de pressão de seleção em laboratório.
3. A população selecionada, quando deixada livre de pressão de seleção, mantém seu nível de resistência ao *B. anticarsia* durante quatro gerações.

4. A resistência de *A. gemmatalis* a seu VPN, induzida em laboratório, pode ser revertida através de cruzamentos com populações suscetíveis do inseto ao VPN. Esta constatação permite inferir que a imigração de insetos suscetíveis para áreas de aplicação intensiva do patógeno é o principal mecanismo a impedir o aparecimento de resistência ao VPN em populações naturais do inseto.

## CAPITULO VI

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journ. of Econ. Entomol.* Lanham, v.18, p. 265-267, 1925.
- ABEDI, Z.H.; BROWN, A.W.A. Development and reversion of DDT-resistance in *Aedes aegypti*. *Canad. Journ. Citol., Ontario.* v.2, p. 252-261, 1960.
- BRIESE, D.T.; MENDE, H.E.; GRACE, T.D.C.; GEIER, P.W. Resistance to a nuclear polyhedrosis virus in the light-brown apple moth *Epiphyas postvittana* (Lep.:Tortricidae). *Journ. of Invert. Pathol. New York.* v. 36, p.211-215, 1980.
- BRIESE, D.T. Genetic basis for resistance to a granulosis virus in the potato moth *Phthorimaea operculella*. *Journ. of Invert. Pathol. New York.* v. 39, p.215-218, 1982.
- BURGES, H.D. Possibilities of pest resistance to microbial control agents. IN: BURGES, H.D.; HUSSEY, N.W.(Eds). *Microbial control of insects and mites.*, New York: Academic Press, 1971. p. 445-456.
- BURGES, H.D.; HUSSEY, N.W. Introduction. IN: BURGES, H.D.; HUSSEY, N.W.(Eds). *Microbial control of insects and mites.*, New York: Academic Press, 1971. p. 1-11.
- CURTIS, C.F.; COOK, L.N.; WOOD, R.J. Selection for and against insecticide resistance and possible methods of inhibiting the evolution of resistance in mosquitoes. *Ecol. Entomol.*, v.3, p. 273-287, 1978.

- FUNAKOSHI, M.; AIZAWA, K. Antiviral substance in the silkworm gut juice against a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journ. Invert. Pathol.* New York. v. 53, 135-136, 1989.
- FUXA, J.R. *Spodoptera frugiperda* susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration. *Environ. Entomol.*, Lanham, v.16, n.1, p. 218-223, 1987.
- FUXA, J.R. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep.:Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. *Entomophaga*, Paris. v.33, n.1, p. 55-63, 1988.
- FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Reversion of resistance by *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis virus. *Journ. of invert. Pathol.*, New York, v.53, p.52-56, 1989.
- FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Response of nuclear polyhedrosis virus-resistant *Spodoptera frugiperda* larvae to other pathogens and to chemical insecticides. *Journ. of Invert. Pathol.* New York. v. 55, p. 272-277, 1990.
- FUXA, J.R. Insect control with baculoviruses. *Biotech. Adv.* v. 9, p. 425-442, 1991.
- FUXA, J.R. Insect resistance to viruses. in: BECKAGE, N.E., THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Eds). *Parasites and pathogens of insects*. New York: Academic Press, 1992. (no prelo)
- GRANADOS, R.R. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotech. and Bioengin.* v.22, p. 1377-1405, 1980.
- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journ. Econ. Entomol.* v.69, n.4, p.487-488. 1976.
- HABIB, M.E.M. Padronização de inseticidas microbianos: in: ALVES, S.B. (coord.). *Controle Microbiano de insetos*, 1<sup>a</sup> Ed., Editora Manole, 1986. p. 289-296.
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). CNPSo-EMBRAPA. Londrina. Documentos 10, 1985. 23p.

- IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. The relation of pH to the activity of inclusion bodies of a *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *Journ. of Invert. Pathol. New York*. v. 8, p. 426-427, 1966.
- IGNOFFO, C.M.; ALLEN, G.E. Selection for resistance to a nuclear polyhedrosis virus in laboratory populations of the cotton bollworm, *Heliothis zea*. *Journ. of Invert. Pathol. New York*. v. 20, p. 187-192, 1972.
- IGNOFFO, C.M. Development of a viral insecticide: concept and commercialization. *Experim. Parasitol.* v. 33, p. 380-406, 1973.
- IGNOFFO, C.M.; HUEITEL, M.D.; INTOSH, A.H.; GARCIA, C.; WILKENING, P. Genetics of resistance of *Heliothis subflexa* (Lep.: Noct.) to *Baculovirus heliothis*. *Ann. Entomol. Soc. Am., Lanham*. v.78, p. 468-473, 1985.
- McGAUGHEY, W.H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, n. 229, p. 193-195, 1985.
- MOSCARDI, F.; ALLEN, G.E.; GREENE, G.L. Control of the velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact of treatments on natural incidence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Journ. Econ. Entomol. Lanham*, v.74. p. 480-485. 1981.
- MOSCARDI, F. Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*. EMBRAPA, CNPSo, Com. téc. n. 23, 13p, 1986.
- MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D.R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. IN: COPPING, L.G.; GREEN, M.B.; REES, R.T. (Eds). *Pest Management in Soybean*. 1<sup>a</sup> Ed. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 98-109.
- REICHELDERFER, C.F.; BENTON, C.V. Some genetic aspects of the resistance of *Spodoptera frugiperda* to a nuclear polyhedrosis virus. *Journ. of Invert. Pathol. New York*. v. 23, p. 378-382, 1974.

- SOSA-GOMEZ, D.R.; ABOT, A.; MOSCARDI, F.; PARO, F.; SOLDORIO, I. Susceptibilidade de diferentes instares de *Anticarsia gemmatalis* ao *Baculovirus thuringiensis* e avaliação da resistência cruzada em populações ao *Baculovirus anticarsia*. IN: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO (3.: 1992: Aguas de Lindóia). Anais... Aguas de Lindóia: CNPDA/EMBRAPA, 1992. p.193.
- UCHIDA, Y.; KAWAMOTO, F.; HIMENO, M.; HAYASHIYA, K. A virus-inactivating protein isolated from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journ. of Invert. Pathol. New York.* v. 43, p. 182-189, 1984.
- WATANABE, H. Development of resistance in the silkworm, *Bombyx mori*, to peroral infection of a cytoplasmic-polyhedrosis virus. *Journ. of Invert. Pathol., New York.* v. 9, p.474-479, 1967.
- WHITLOCK, V.H. Failure of a strain of *Heliothis armigera* (Hubn.) (Noct.:Lep.) to develop resistance to a nuclear polyhedrosis virus and granulosis virus. *Journ. Entomol. Soc. South Africa,* v. 4, n. 2, p.251-253, 1977.