

ALFREDO RAÚL ABOT

PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DO VÍRUS  
DE POLIEDROSE NUCLEAR *Baculovirus anticarsia*, VISANDO O  
CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818  
(LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE).

Tese apresentada à Coordenação do  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná, para obtenção do título de Doutor  
em Ciências, Área de Concentração  
Entomologia.

Curitiba  
1997

PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DO VÍRUS  
DE POLIEDROSE NUCLEAR *Baculovirus anticarsia*, VISANDO O  
CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818  
(LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE).

Alfredo Raúl Abot

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora:



-----  
Orientador  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

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 Carolina, minha esposa, responsável pela força necessária para desenvolver esta pesquisa.

A Guilhermina e Gisele, minhas filhas

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Flávio Moscardi, da Embrapa Soja, Londrina-PR, pela amizade, incentivo e orientação na condução desta pesquisa.

Ao Dr. Daniel Sosa-Gómez, da Embrapa Soja, Londrina-PR, pela amizade e valioso apoio na sua condição de co-orientador.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), pela oportunidade de realização dos experimentos e facilidades oferecidas na condução deste trabalho.

Ao Fábio Paro e Ivanilda Soldório, do Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa-Soja, pela ajuda na instalação e condução dos experimentos e pelo incansável apoio.

Ao Adair V. Carneiro, Antônio Carlos Mendes, Rosimeire Choucino, Elis Miranda e Sergio da Silva, do Laboratório de criação de insetos da Embrapa Soja, permanentes colaboradores, responsáveis pelo fornecimento das larvas utilizadas nos experimentos.

Aos Estatísticos Maria C. N. de Oliveira e Erivaldo J. Pereira, da Embrapa-Soja, pela sua importante colaboração no processamento dos dados.

Ao Sr. Hlvio Zemuner, da Embrapa Soja, pela colaboração na elaboração do material audiovisual.

s autoridades da Coordenação de Aperfeioamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

 Dra. Sonia M.N. Lzzari, Coordenadora do Curso de Pos-Graduação em Entomologia da UFPR, pelo inestimável apoio no decorrer desta tese.

A todos os que, de uma ou outra forma, colaboraram para que este trabalho tenha sido possível.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiv
CAPITULO I	
Introdução.....	1
CAPITULO II	
Avaliação da patogenicidade de três isolados temporais do vírus de poliedrose nuclear <i>Baculovirus anticarsia</i> , através de passagem seriada pelo inseto hospedeiro, <i>Anticarsia gemmatalis</i> .	
1. Revisão Bibliográfica.....	6
2. Material e Métodos.....	12
2.1. Procedência das larvas.....	12
2.2. Multiplicação dos isolados do VPN.....	12
2.3. Bioensaios realizados.....	14
3. Resultados e Discussão.....	16

### CAPITULO III

Efeito de modificações na dieta de *Anticarsia gemmatalis*, quanto às proporções de ágar e caseína, sobre a produção do VPN do inseto.

1. Revisão Bibliográfica.....	20
2. Material e Métodos.....	28
2.1. Procedência das larvas utilizadas.....	28
2.2. Inóculo do vírus de poliedrose nuclear (VPN) utilizado.....	28
2.3. Bioensaios realizados com larvas de quinto instar de <i>A. gemmatalis</i> .....	29
3. Resultados e Discussão.....	31
4. CAPITULO IV	
5. Produção do vírus de poliedrose nuclear de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em função do instar, no momento da inoculação, dosagem do VPN, e temperatura.	
1. Revisão bibliográfica.....	35
2. Material e Métodos.....	42
2.1. Procedência das larvas utilizadas.....	42
2.2. Inóculo do vírus de poliedrose nuclear utilizado.....	42
2.3. Bioensaios com o VPN em populações de <i>A. gemmatalis</i> ...	43
2.4. Condições ambientais dos experimentos.....	43

2.5. Análise dos dados.....	45
3. Resultados e discussão.....	45

## CAPITULO V

Avaliação de parâmetros biológicos de uma população resistente ao VPN de *A. gemmatalis*, em relação a uma população suscetível ao patógeno.

1. Revisão bibliográfica.....	55
2. Material e Métodos.....	59
2.1. Origem das larvas utilizadas nos experimentos.....	59
2.2. Montagem dos experimentos.....	59
3. Resultados e Discussão.....	61

## CAPITULO VI

Reversão da resistência de *Anticarsia gemmatalis* ao seu VPN, através da retirada da pressão de seleção em população selecionada para resistência ao vírus, em condições de laboratório.

1 Revisão bibliográfica.....	66
2. Material de Métodos.....	69
2.1. Origem do inóculo.....	69
2.2. Origem das larvas utilizadas nos experimentos.....	69
2.3. Experimentos (bioensaios) de laboratório.....	70
3. Resultados e discussão.....	73
CONCLUSÕES.....	80
BIBLIOGRAFIA.....	81

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Concentrações letais médias (CL <sub>50</sub> ) e intervalos de confiança (IC) de três isolados temporais (43, 102 e 106) de <i>B. anticarsia</i> através de seis passagens seriadas, e do inóculo original em cada isolado.....	17
Tabela 2. Número de larvas mortas, peso/larva morta e produção de corpos de inclusão poliédricos (CIP) após inoculação de larvas de <i>A. gemmatalis</i> de início de quinto ínstar com seu VPN, incorporado na dieta. ....	32
Tabela 3. Número de larvas de 3 <sup>o</sup> , 4 <sup>o</sup> e 5 <sup>o</sup> instares de <i>A. gemmatalis</i> mortas pelo VPN, quando inoculadas com diferentes concentrações do vírus e mantidas em três temperaturas (n=12; 5 repetições).....	48
Tabela 4. Peso (g) de larvas de 3 <sup>o</sup> , 4 <sup>o</sup> e 5 <sup>o</sup> instares de <i>A. gemmatalis</i> , mortas pelo seu VPN, quando inoculadas com diferentes concentrações do vírus e mantidas em três temperaturas (n=12; 5 reps.).....	49
Tabela 5. Produção de corpos de inclusão poliédricos (CIPx10 <sup>9</sup> ) em larvas de <i>A. gemmatalis</i> inoculadas nos 3 <sup>o</sup> , 4 <sup>o</sup> e 5 <sup>o</sup> instares com seu VPN, em diferentes concentrações e mantidas em três temperaturas (n=12;5 reps).....	50
Tabela 6. Peso de pupas, períodos de oviposição, longevidade, fecundidade e fertilidade, para uma população resistente e uma população suscetível de <i>A. gemmatalis</i> ao seu VPN.....	62
Tabela 7. Concentrações letais médias (CL <sub>50</sub> ) e respectivos intervalos de confiança (IC) (95) para uma população de <i>A. gemmatalis</i> submetida a pressão de seleção por seu VPN, comparada a uma população suscetível ao patógeno.....	74
Tabela 8. Concentrações letais médias (CL <sub>50</sub> ), intervalos de confiança (IC) e taxas de resistência de uma população de <i>A. gemmatalis</i> resistente ao VPN e liberada da pressão de seleção, comparada com uma suscetível. ....	76

PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO, DO VÍRUS DE POLIEDROSE  
NUCLEAR *BACULOVIRUS ANTICARSIA*, VISANDO O CONTROLE DE  
*ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER, 1818  
(LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)

RESUMO

Foram realizados vários experimentos para estabelecer parâmetros para produção, em laboratório, do vírus da poliedrose nuclear (VPN) da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, para a utilização contra o inseto, a campo, como um inseticida biológico. Três isolados do VPNAg foram passados serialmente através do hospedeiro e comparados com os respectivos isolados originais, por seis gerações consecutivas. Não houve diferenças significativas entre as concentrações letais médias ( $CL_{50}$ ) dos isolados e esses não mostraram mudanças significativas na virulência devido às passagens seriadas através do hospedeiro. Com a finalidade de reduzir os custos de produção de VPNAg em laboratório, a dieta artificial do inseto foi modificada nas suas proporções de caseína e ágar (50/50 %; 30/50 % e 0/50 %), inoculadas com 43.700 corpos de inclusão poliédricos (CIP/ml) e oferecida a larvas de quinto instar de *gemmatalis*, as quais foram mantidas a 29 ° C. Não foram encontradas diferenças significativas entre essas dietas modificadas em relação à dieta normal do inseto, registrando-se o peso de larvas mortas por VPNAg e

número de CIP/larva, mostrando que o vírus pode ser produzido em dieta contendo 50% de ágar e sem caseína. A produção do vírus também foi avaliada em função do instar (3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup>), ao momento da inoculação pelo VPN, cinco concentrações do vírus na dieta, a três temperaturas ( 26, 29 e 32 ° C). Os parâmetros avaliados foram número médio de larvas mortas pelo VPNAg, seu peso médio e a produção média de CIP, baseado sobre 60 larvas/combinção (5 repetições de 12 larvas). Aquelas inoculadas no 3<sup>o</sup> instar resultaram em baixos valores nos parâmetros avaliados, quando comparadas às larvas de 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> instares. Os maiores pesos de larvas mortas por VPN foram obtidos para aquelas inoculadas no 5<sup>o</sup> instar e mantidas a 29 ° C, no entanto a maior produção correspondeu a larvas inoculadas no 4<sup>o</sup> instar e mantidas a 32 ° C, embora não tenha havido diferenças significativas entre os valores obtidos a 26 e 29 ° C. Em todos os casos, altos valores foram obtidos com o VPN em concentrações de 14.580 e 43.700 CIP/ml de dieta, para todos os parâmetros de produção avaliados. Duas populações de *gemmatalis* (resistente e suscetível ao VPN) foram também comparadas por três gerações consecutivas, avaliando alguns parâmetros biológicos tais como peso das pupas, período de oviposição, longevidade dos adultos, fecundidade e longevidade. O peso das pupas dos insetos resistentes foi significativamente menor que as suscetíveis. O período de oviposição e a longevidade dos adultos

resistentes foi significativamente maior do que os suscetíveis. Em função dessas diferenças, a fecundidade e fertilidade foram semelhantes para as populações resistente e suscetível. Para avaliar a capacidade de uma população de *A. gemmatalis* altamente resistente ao VPNAg (taxa de resistência maior que 3.000 vezes) de manter a resistência depois da liberação da pressão de seleção em laboratório, a população resistente foi dividida em duas na 16<sup>a</sup> geração: uma foi liberada da pressão de seleção pelo VPN, e a outra mantida sobre pressão. Nas gerações subsequentes ambas populações foram comparadas à população suscetível (não exposta ao VPN). A população liberada da pressão manteve alta resistência ao patógeno por 10 gerações posteriores, quando comparada à população suscetível. Começando a 11<sup>a</sup> geração, houve um expressivo decréscimo do nível de resistência (taxa de resistência de cerca de 13 vezes, comparada a mas de 1.000 vezes na F<sub>10</sub>), decrescendo ainda mais na F<sub>13</sub> (taxa de resistência de cerca de 5 vezes).

PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO, DO VÍRUS DE POLIEDROSE  
NUCLEAR *Baculovirus anticarsia*, VISANDO O CONTROLE DE  
*ANTICARSIA GEMMATALIS* HÜBNER, 1818  
(LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE).

ABSTRACT

Experiments were conducted to improve parameters for the laboratory production of the nuclear polyhedrosis virus (NPV) of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, for its field utilization against the insect as a biological insecticide. Three AgNPV isolates were serially passed through the host and compared to respective original isolates, for six consecutive generations. There were no significant differences among the median lethal time (TL<sub>50</sub>) of these isolates and they did not show significant changes in virulence due to the serial passages through the host. With the aim of reducing the cost of laboratory production of the AgNPV, the artificial insect diet was modified in its proportions of casein and agar (50/50 %; 30/50 % and 0/50 %), inoculated with 43,700 polyedron inclusion bodies (PIB/ml) and offered to fifth-instar *A.*

*gemmatalis* larvae, which were maintained at 29 °C. No significant differences were found among these modified diets in relation to the normal insect diet, regarding weight of AgNPV dead larvae and number of PIB/larva, showing that the virus can be produced in diet containing 50 % of the agar and no casein. Virus production was also assessed in relation to the instar (3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup>) at inoculation by the NPV, five virus concentrations in the diet, and three temperatures (26, 29 and 32 °C). Evaluated parameters were mean number of AgNPV-dead larvae, their mean weight, and mean production of PIB, based on 60 larvae/combination (5 replications of 12 larvae). Those inoculated as 3<sup>rd</sup> instar, resulted in lower values for the evaluated parameters, when compared to 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup>-instar larvae. The higher weights of NPV-dead larvae were obtained for those inoculated as 5<sup>th</sup> instar and maintained at 29 °C, while the higher PIB production corresponded to larvae inoculated as 4<sup>th</sup> instar and maintained at 32 °C, although it was not significant different from values obtained at 26 and 29 °C. In all cases, higher values were attained at NPV concentrations of 14, 580 and 43,700 PIB/ml of diet, for all evaluated production parameters. Two populations of *A. gemmatalis* (resistant and susceptible to the NPV) were also compared for three consecutive generations, regarding some biological parameters such as pupal weight, oviposition period,

adult longevity, fecundity and fertility. The pupal weight of resistant insects was significantly lower than that of susceptible ones. The oviposition period and adult longevity were significantly higher for resistant insects than for susceptible ones. In spite of these differences, fecundity and fertility were similar for resistant and susceptible populations. To evaluate the capacity of a highly resistant population of *A. gemmatilis* to the AgNPV (resistance ratio 3,000x) to maintain the resistance after released from the laboratory selection pressure, the resistant population was subdivided in two in generation 16: one was released from pressure by the NPV, and the other maintained under pressure. In the subsequent generations, both populations were compared to the susceptible population (unexposed to the NPV). The populations released from NPV pressure maintained high resistance to the pathogen for 10 generations afterwards, when compared to the susceptible population. Beginning at the 11<sup>th</sup> generation, there was a dramatic decrease in the resistance level (resistance ratio of ca. 13.0x, compared to >1,000x in F<sub>10</sub>), decreasing even more in F<sub>13</sub> (resistance ratio of ca. 5.0 x).

## CAPITULO I

### INTRODUÇÃO

Desde os primeiros tempos, o homem observou a capacidade de certos microrganismos para causar doenças em insetos. BURGESS & HUSSEY (1971) citam que Aristóteles foi o primeiro a detectar que as abelhas sofriam de doenças, relatam também que os estudos iniciais sobre microrganismos patogênicos de insetos foram orientados para espécies domesticadas, como o bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. , quando foi dizimado pelo fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Gradualmente, esses estudos foram orientados para insetos pragas, nascendo, dessa forma, o conceito da utilização de patógenos como inseticidas biológicos.

A utilização de vírus como agente de controle biológico, recebeu grande impulso a partir de 1940, com os trabalhos de Balch & Bird e Steinhaus & Thompson (IGNOFFO, 1993). MOSCARDI (1997) cita que para o controle de insetos pragas, o uso de vírus representa um grande potencial; dentre esses vírus, os de poliedrose (VPN) e granulose (VG), da família Baculoviridae, são os mais importantes. Segundo FUXA (1991), os baculovírus têm sido amplamente estudados, destacando-se por apresentar três importantes

características: especificidade para seu hospedeiro, não poluição do ambiente e capacidade para causar doenças com elevados valores de prevalência.

No contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP), a soja encontra-se entre as culturas mais estudadas. A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* HUBNER, 1818 representa uma das mais importantes causas de perda de produção. Um VPN, associado a populações naturais dessa praga, foi encontrado no Brasil, na região de Campinas, SP, em 1972 (ALLEN & KNELL 1977; MOSCARDI 1977). Os primeiros resultados com esse patógeno (VPNAg), obtidos através de testes de campo, indicaram um alto potencial para seu uso como inseticida biológico no controle de *A. gemmatalis* (CARNER & TURNIPSEED 1977; MOSCARDI et al. 1981). No início de 1979, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) no seu Centro Nacional de pesquisa de soja (CNP-Soja) de Londrina-PR, começou um programa de desenvolvimento do VPNAg como inseticida microbiano; atualmente, é amplamente utilizado no Brasil, em cerca de 1.000.000 ha por ano, constituindo-se no maior programa de utilização de vírus de insetos a nível mundial (MOSCARDI & SOSA-GÓMEZ 1992, 1996). Estes autores citam, também, que esse patógeno vem sendo utilizado em outros países sulamericanos, como Argentina, Paraguai e Bolívia.

Várias pesquisas vêm sendo realizadas para aprofundar o conhecimento da relação hospedeiro-microrganismo, entre elas destacam-se aquelas sobre a

alteração de virulência de VPN quando submetido à passagem seriada pelo hospedeiro natural (IGNOFFO **et al.** 1971, com *Heliothis sp.*; POTTER **et al.** 1978, com *Trichoplusia ni* Huebner; YAMADA **et al.** 1981, com *Helicoverpa zea* Boddie; MOSCARDI **et al.** 1988, MORALES **et al.** 1993; MORALES & MOSCARDI 1993, com *A. gemmatalis*). Pela complexidade dos fatores envolvidos, torna-se necessário realizar novas pesquisas sobre isolados geográficos, isolados temporais e passagem seriada, para aperfeiçoar as técnicas de manejo do VPN na sua aplicação tanto em programas de MIP quanto em pesquisas básicas.

Um fator importante na criação de insetos em laboratório para bioensaios, é a sua manutenção em dietas artificiais. Vários pesquisadores têm abordado esse aspecto, para diversas espécies de insetos (VAIL **et al.** 1973, com *T. ni*; SHAPIRO (1981), com *Lymantria dispar* L.; CHAUTANI & CLAUSEN 1968, com *Homeocampa pseudotsugata* Mc Dunnough). Porém, poucos desses autores abordaram a incidência da deficiência de alguns elementos dessa dieta sobre a produção de VPN; portanto, se faz necessário desenvolver novas linhas de pesquisa orientadas à redução de custos de produção do VPN em larga escala, em condições de laboratório.

Na produção de VPN em larga escala, devem ser ajustados outros fatores, como idade das larvas, temperatura e dosagem a ser inoculada. Com relação à idade ideal para inocular as larvas, visando conseguir a máxima

produção do VPN (MAGNOLER 1974; BUCHER & TURNOCK 1983; GÓMEZ 1995; MOSCARDI et al. 1997). Também, a incidência da temperatura na produção do VPN foi citada por alguns autores ( JOHNSON et al. 1982; HUNTER & HARTSELL 1970). Os efeitos da dosagem do VPN e sua relação com a produção final de vírus pelas larvas inoculadas têm sido abordados por JOHNSON et al. (1982); HEDLUND & YENDOL (1974), entre outros.

Com relação a *A. gemmatalis*, poucas pesquisas têm sido realizadas para estudar esse aspecto (MOSCARDI et al. 1997); em consequência, é necessário o desenvolvimento de métodos efetivos de produção do VPNAg em larga escala, em condições de laboratório. Na relação hospedeiro-microrganismo, os efeitos do VPN sobre os parâmetros biológicos do inseto também têm sido abordados (FUXA & RICHTER 1988, com *S. frugiperda*; VAIL & HALL 1968, com *T. ni*), mas com resultados variáveis, demandando, portanto, a realização de novos trabalhos, para o ajuste de técnicas de manejo da praga e do microrganismo.

Nos últimos anos têm sido estabelecidas novas linhas de pesquisa com o objetivo de avaliar a possibilidade de *A. gemmatalis* desenvolver resistência ao VPNAg (ABOT 1993; ABOT et al. 1995; ABOT et al. 1996) em condições de laboratório e de campo. Outras pesquisas devem ser realizadas para aprofundar os conhecimentos atuais sobre esse importante aspecto.

Pela carência de informações mais concretas sobre os temas acima, esta pesquisa foi realizada com os seguintes objetivos:

- 1 - Avaliar a patogenicidade de três isolados temporais do vírus de poliedrose nuclear de *A. gemmatalis* através de passagem seriada pelo hospedeiro;
- 2 - Estudar o efeito de modificações na dieta de *A. gemmatalis*, quanto às proporções de ágar e caseína, sobre a produção do VPNAg do inseto;
- 3 - Determinar a produção do VPN de *A. gemmatalis*, em função do instar larval, no momento da inoculação, dosagem do VPNAg e temperatura;
- 4 - Avaliar parâmetros biológicos de uma população de *A. gemmatalis* resistente ao VPNAg, em relação a uma população suscetível ao patógeno;
- 5 - Verificar a reversão da resistência de *A. gemmatalis* ao seu VPN, através da retirada da pressão de seleção em população selecionada para resistência ao vírus, em condições de laboratório.

## CAPITULO II

Patogenicidade de três isolados temporais do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg).

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Considerando que existem poucas pesquisas quanto à patogenicidade de isolados do VPNAg e ainda menos com relação a possíveis alterações de virulência quando submetidos a passagens seriadas, este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar, para três isolados do VPN de *A. gemmatalis*, se sua passagem seriada pelo inseto poderia redundar em mudanças de virulência do patógeno.

Para avaliar a consequência de passagens através de indivíduos da mesma espécie, ou de outras, por várias gerações, sobre a virulência de baculovírus, diversos estudos têm sido realizados. Em Arkansas, EUA, YOUNG & YEARIAN (1984) pesquisaram a virulência de um VPN de *Rachiplusia nu* Guenée em uma população de *R. ou* Guenée e demonstraram que foi altamente virulento para a segunda espécie. A  $DL_{50}$  foi de 1,8 corpos de inclusão poliédricos (CIP)/ $mm^3$  de dieta para o primeiro instar e de 8,6 CIP/ $mm^3$  de dieta para larvas de terceiro instar. No entanto, para o primeiro instar, *Trichoplusia ni* Hubner, *Pseudoplusia includens* Walk. , *Autographa biloba*, *Helicoverpa zea* Boddie, *Heliothis virescens* F., *Spodoptera exigua*

Hübner e *Galleria melonella* L. não foram suscetíveis ao VPN de *R. nu*, em concentrações superiores a 1.000 CIP/mm<sup>3</sup> de dieta.

Diversos trabalhos também têm sido realizados, tanto ‘in-vitro’ quanto ‘in-vivo’, sobre o comportamento de diversos vírus em passagem seriada, por várias gerações. IGNOFFO et al. (1971) realizaram pesquisas sobre a replicação e passagem seriada de um VPN em cultura de tecidos de *Heliothis* sp. Essa cultura foi feita com células de ovários de *H. zea*. Os resultados indicaram que foi possível aumentar a virulência em mais de 10<sup>3</sup> vezes com relação ao inóculo original, após sete passagens. Em outros experimentos, os mesmos autores obtiveram um incremento de virulência de 10<sup>8</sup> vezes, após sete passagens, comparado com a primeira passagem.

Passagens seriadas ‘in-vivo’ com um VPN de *T. ni* foram realizadas no Canadá, por POTTER et al. (1978). Baseados na análise de probites, determinaram que da primeira à sétima passagem a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) média foi de 77 CIP/larva; no entanto, da oitava até a décimo-quinta passagem a CL<sub>50</sub> foi de 37 CIP/larva. A análise da hemolinfa de larvas com poucos dias após a inoculação, quando comparada com a obtida de larvas com vários dias após-inoculação, permitiu estabelecer que depois de onze passagens prevaleceu o tipo do vírus mono-envelopado. Quando o vírus não ocluído foi injetado no hemocele das larvas, depois de 16 passagens não foi encontrada nenhuma mudança no mesmo. Em relação à infectividade, na

primeira passagem, a  $DL_{50}$  foi de  $1,1 \times 10^4$  CIP/ml, enquanto que na 16<sup>a</sup>. passagem foi de  $3,9 \times 10^5$  CIP/ml. Nesse caso, portanto, houve perda de virulência com a passagem seqüencial do VPN pelo hospedeiro.

Resultados semelhantes foram obtidos por YAMADA *et al.* (1981), que mostraram que, um VPN mono-ocluído de *H. zea* apresentou progressiva diminuição no número de CIP e da infectividade, medida pela  $CL_{50}$ , devido à passagem seriada. Até vinte passagens, a  $CL_{50}$  manteve-se em  $10^6$  CIP/ml de dieta; passagens posteriores resultaram em uma perda da infectividade, com posterior estabilização dos níveis de potência.

POTTER *et al.* (1976) avaliaram a passagem seriada do VPN de *T. ni* em cultura de células, com dois tipos de isolados virais; um deles, denominado MP (multiple polyhedra), que formava mais de 30 poliedros por núcleo e outro FP (few polyhedra), com menos de dez poliedros por núcleo. Foi testada a virulência tanto dos poliedros quanto dos vírus não ocluídos. Só o isolado MP foi virulento, com uma  $CL_{50}$  de 56 CIP/larva, embora o isolado FP tenha sido detectado na hemolinfa de larvas infectadas. Quando injetado no hemocele, ambos os isolados foram virulentos. Os autores ainda demonstraram, na segunda passagem seriada, que predominou o tipo MP (99%) e que, depois da 22<sup>a</sup>. passagem este atingiu 100%. Os autores citam, também, que formas aberrantes de vírus têm aparecido em passagens seriadas avançadas, o que não é frequente em passagens iniciais.

Em Londrina, Brasil, MOSCARDI et al. (1988) realizaram diversos estudos de laboratório com *A. gemmatilis*, praga da soja. Esses autores avaliaram as possíveis alterações na virulência e no genoma viral após passagens seriadas por populações do mesmo hospedeiro. Foram utilizados isolados obtidos anualmente, após aplicação do VPN a campo, sendo realizados bioensaios com larvas de quarto ínstar, obtidas de criação em laboratório. Quando realizada a regressão entre o logaritmo da dose e a mortalidade (análise de probites) as retas demonstraram que, embora tenham sido observadas algumas diferenças na virulência, estas não foram estatisticamente significativas

Trabalhos semelhantes (MOSCARDI, dados não publicados, BERINO 1995, BATISTA 1997) com variantes do VPNAg, obtidos cada ano de coletas de larvas a campo, mantidos a -20° C de 1979 a 1994, demonstraram que a virulência no hospedeiro não foi alterada após 15 anos de uso e multiplicação a campo. MOSCARDI (1997) cita que, embora não tenham sido detectadas mudanças na virulência, o monitoramento de mudanças no genoma viral e o que elas representam na prática (virulência frente ao hospedeiro, especificidade, etc.) será muito importante para a continuação do sucesso do programa de uso de VPNAg no Brasil e outros países de sulamérica.

Um VPN de *Choristoneura fumiferana* Clemens, depois de passagens seriadas por *T. ni* e *G. melonella* e posterior aplicação no hospedeiro original,

foi avaliado por STAIRS et al. (1980), não somente quanto a alterações de virulência mas também quanto a mudanças do processo de infecção e mortalidade das larvas infectadas. Segundo os autores, as diferenças encontradas podem ser devidas a mudanças fisiológicas nas membranas do vírus e proteínas de capsídeos, e que, através das diferentes passagens, os genomas virais foram selecionados. Os autores referem que este pode ser um método a ser utilizado para aumentar a virulência de um determinado isolado viral.

Pesquisas semelhantes foram realizadas por MORALES & MOSCARDI (1993), que avaliaram o potencial de uso do VPN de *Autographa californica* (Speyer), através da seleção de variantes virulentos para o controle de *Chrysodeixes includens* (Walker) e *A. gemmatalis*, comparando também a virulência dos isolados dos VPNs de *A. californica* com a virulência dos VPNs de *A. gemmatalis* e *C. includens*. Os autores demonstraram que os isolados obtidos através de passagens seriadas do VPN de *A. californica* por *C. includens* e *A. gemmatalis* são mais virulentos para estas espécies do que o VPN de *A. californica* original; verificaram, também, que o VPN de *C. includens* é menos virulento a esta espécie do que o VPN de *A. californica* após passagens sucessivas por esse inseto. De forma diferente, o VPN de *A. gemmatalis* é mais virulento ao hospedeiro original do que os isolados obtidos pela passagem seriada do VPN de *A. californica* por essa espécie. A passagem

seriada do VPN de *A. californica* disponível, selecionou variantes mais virulentos para *C. includens* e *A. gemmatalis*; entretanto, não conduziu a um isolado que controlasse simultaneamente as duas espécies.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Procedência das Larvas

Foram utilizadas larvas de *A. gemmatalis* de início de terceiro ínstar, provenientes de criação do inseto em laboratório na Embrapa Soja, Londrina. A população inicial foi obtida a partir de larvas coletadas em lavouras de soja, no município de Sertanópolis-PR. As larvas foram criadas por uma geração sobre folhas de soja e, a partir da geração seguinte, foram mantidas em dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO *et al.* 1985).

### 2.2. Multiplicação dos Isolados do VPN.

A viabilidade de três isolados temporais foi comparada através de passagens seriadas. O isolado 43, foi obtido em 1980, a partir da aplicação da cepa LDB-79 em lavoura de soja, e posterior coleta de larvas mortas pelo VPNAg, que foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}$  C; o isolado 102 foi obtido em 1994, através da aplicação em lavoura de soja, sendo um variante do LDB-79, passado sequencialmente, desde 1980, em populações de *A. gemmatalis*, até a safra de 1993. O isolado 106, foi obtido da mesma forma, em 1984,

através de um variante do LDB-79, passado sucessivamente em populações da praga até a safra de 1983. Todos os isolados foram mantidos nas mesmas condições descritas para o isolado 43.

Para multiplicação do VPN, antes da realização dos bioensaios, alíquotas de cada isolado foram purificados por centrifugação diferencial e mantidas a  $-20^{\circ}$  C em tubos tipo ependorfe. Esta prática de fracionar o material em alíquotas permite descongelar apenas o necessário para cada bioensaio, evitando-se, assim, a contaminação do material com bactérias ou a perda de virulência devido a congelamentos e descongelamentos periódicos.

A partir da alíquota descongelada, com auxílio de uma pipeta tipo Pasteur, algumas gotas foram vertidas em um recipiente de vidro contendo 20 ml de água destilada, sendo o material submetido à agitação, para homogeneização dos corpos poliédricos de inclusão (CIP) do vírus na suspensão. A quantificação dos CIP em cada suspensão foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico, com aumento de 400x.

A suspensão, assim obtida, foi diluída para incorporação na dieta do inseto (MORALES E MOSCARDI 1993), de forma a se obter uma concentração de vírus de  $4,5 \times 10^4$  CIP/ml de dieta, suficiente para provocar aproximadamente 100% de mortalidade das larvas inoculadas. A incorporação do VPN à dieta ocorreu quando esta atingiu  $50^{\circ}$  C, utilizando-se 180 ml de dieta e 20 ml da suspensão viral em um Becker (500 ml), homogeneizado

através de batedeira (Mix Wallita). Em seguida, 10 ml foram distribuídos em copos de plástico (50 ml). Após solidificação e resfriamento da dieta tratada, três larvas de início de terceiro ínstar foram colocadas em cada copo, com auxílio de pincel fino.

Após quatro dias da infecção, as larvas foram observadas diariamente para coletar aquelas mortas pelo VPN; estas foram maceradas em água e filtradas em gaze, seguindo-se uma purificação parcial do filtrado. Para isto, uma primeira centrifugação foi realizada a 1.000 rpm por um minuto, descartando-se o material precipitado. O sobrenadante, contendo o vírus, foi submetido a nova centrifugação a 6.000 rpm durante 15 minutos, retendo-se o precipitado e descartando-se o sobrenadante. Com ajuda de piceta, o precipitado foi removido, distribuído em tubos tipo ependorfe e armazenados em freezer ( -20 ° C), para uso posterior.

### 2.3. Bioensaios

Uma alíquota de cada um dos isolados temporais do VPN foi descongelada e agitada com 20 ml de água destilada esterilizada, sendo quantificado o número de CIP/ml em câmara de Neubauer. A partir de cada suspensão obtida, foram preparadas as diferentes concentrações de VPN a serem utilizadas nos bioensaios: 0 (testemunha), 20, 60, 180, 540, 1600 e 4860

CIP/ml de dieta. A incorporação do VPN à dieta de *A. gemmatalis* foi realizada conforme descrita no item 2.2.

Quando a dieta atingiu a temperatura ambiente, foram colocadas três larvas de início de terceiro ínstar em cada copo de plástico (50 ml) e fechados com tampa de cartolina. Posteriormente, os copos foram acondicionados em bandejas metálicas e mantidos em estufas incubadoras B.O.D. a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $75 \pm 10\%$  de umidade relativa e 14 horas de fotofase.

A partir do quarto dia da inoculação, o experimento foi avaliado diariamente, registrando-se a mortalidade das larvas e o agente causal. Os dados foram submetidos à análise de próbites, pelo programa Microprobits 3.0, de SPARKS & SPARKS (1987), Lily Research Labs., Greenfield, Indiana, EUA, para determinação da concentração letal média ( $CL_{50}$ ) do VPN e parâmetros associados.

Depois de registrada a mortalidade, as larvas mortas, para cada isolado do vírus, foram colocadas em copos de plástico, do mesmo tipo dos utilizados nos bioensaios, e armazenados em freezer. Posteriormente, no final do experimento, essas larvas foram submetidas à maceração, centrifugação e quantificação de CIP/larva, para preparar as dosagens a serem utilizadas na geração seguinte. Este procedimento foi repetido para cada uma das gerações avaliadas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao isolado 43, pode-se observar, através dos intervalos de confiança (95%), que houve diferenças significativas apenas para a primeira e sexta passagens em relação às demais (Tabela 1). A heterogeneidade dos dados na quinta passagem seriada impossibilitou a análise pelo programa de probites. Quando realizados os bioensaios com o isolado original (sem passagem seriada) observou-se que sua  $CL_{50}$  foi relativamente baixa, mas este resultado também pode ter sofrido o efeito das variações normais a todo experimento. Esse fato pode ser confirmado pelos valores superiores de  $CL_{50}$  obtidos na primeira passagem. O material viral utilizado nesta geração foi semelhante ao inóculo original, pois sofreu apenas uma passagem.

Possivelmente, teriam sido obtidas informações mais amplas se cada passagem seriada fosse acompanhada de outro ensaio paralelo utilizando o inóculo original.

Tabela 1. Concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) e intervalos de confiança (IC) de três isolados temporais (43, 102 e 106) de *Baculovirus anticarsia* através de seis passagens seriadas no hospedeiro *Anticarsia gemmatalis*, e do inóculo original (sem passagem seriada) de cada isolado.

Passagem	Isolado		
	43	102	106
I	252 (149-385)	124 (40-258)	141 (71-255)
II	777 (564-1.100)	1.899 (1.364-2.936)	1.584 (1.189-2.208)
III	663 (464-952)	869 (602-1.314)	785 (594-1.051)
IV	653 (530-805)	284 (197-395)	685 (532-880)
V	* *	652 (452-944)	542 (* -2.664)
VI	1.591 (1.222-2.120)	548 (204-1.311)	885 (288-2.073)
Isolado original	49 (25-70)	402 (251-742)	299 (134-575)

\* Pela heterogeneidade dos dados de mortalidade, o programa utilizado (análise de probites) não processou esses dados.

Com relação aos isolados 106 (obtido em 1984) e 102 (obtido em 1994), os valores de  $CL_{50}$  não apresentaram variações entre a primeira e última passagem, como também quando comparados com o inóculo original.

As  $CL_{50}$  nas diversas passagens seriadas mostraram certa variabilidade, possivelmente devido às diferenças de resposta dos indivíduos de cada geração frente ao VPN. Através desses resultados, observou-se que os isolados avaliados não sofreram alterações no decorrer das seis passagens seriadas, mostrando semelhança entre eles; esse fato pode ser confirmado pelos resultados obtidos na sexta passagem, onde houve sobreposição dos intervalos de confiança, caracterizando, portanto, diferenças não significativas.

Resultados semelhantes com a mesma espécie hospedeira e o mesmo inóculo original, mas com diferentes isolados obtidos a partir dele, foram obtidos por MOSCARDI et al. (1988). Através da análise de probites, detectaram algumas diferenças entre os isolados, mas quando submeteram os materiais a passagens seriadas no seu hospedeiro original (*A. gemmatalis*) não observaram variações genômicas no vírus, que levassem à conclusão que os isolados perderam virulência em consequência das passagens seriadas. Trabalhos mais recentes, com variantes do VPNAg obtidos de larvas coletadas a campo e mantidas em freezer desde 1979 a 1994 mostraram que a virulência desses vírus não sofreu alterações (MOSCARDI, dados não publicados, BERINO 1995, BATISTA 1997).

Respostas diferentes com relação a virulência de isolados de um vírus de poliedrose nuclear, foram obtidas por GÓMEZ (1995). Esse autor avaliou a suscetibilidade de larvas de segundo instar de *S. frugiperda*, encontrando valores de CL<sub>50</sub> de 5.631 CIP/ml para o isolado mais virulento e de 25.310 cip/ml para o menos virulento.

As variações nos resultados com relação a diferentes isolados poderiam ser devidas não só a mudanças no genoma viral (MOSCARDI et al.,1988), mas também ao histórico de exposição da população do hospedeiro frente ao isolado que está sendo avaliado (FUXA, 1987). O autor refere também que a virulência pode decrescer quando um inseto é infectado com um inóculo proveniente de um local distante, mas discute que podem ser encontrados comportamentos inversos.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram observar que o *B. anticarsia* não resultou alterado na sua virulência quando submetido a seis passagens seriadas no seu hospedeiro original *A. gemmatalis*. Este fato torna-se importante para a multiplicação do VPN, tanto para a realização de ensaios de pesquisa quanto para a produção de inóculo em larga escala, destinado a formulações de inseticida biológico.

## CAPITULO III

Modificações nas proporções de ágar e caseína na dieta de *Anticarsia gemmatalis*, e o efeito sobre a produção de VPN no inseto.

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em função da importância da dieta na criação de insetos e a carência de trabalhos com *A. gemmatalis*, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar possíveis alterações no desenvolvimento larval e na produção de CIP do VPN, quando os insetos foram alimentados com dietas modificadas nas suas proporções de ágar e caseína.

Uma das primeiras pesquisas referentes à utilização de dietas artificiais para insetos foi desenvolvida por IGNOFFO (1963), voltadas à criação de *Trichoplusia ni*. O mesmo autor (1966) discutiu a criação massal de outros lepidópteros, como *Helicoverpa zea*, para produzir seu vírus de poliedrose nuclear (VPN). Também, utilizou *Heliothis virescens* F. para propagar o VPN

de *H. zea* e sugeriu que as diferenças nos hábitos alimentares entre as espécies pode afetar diferencialmente o custo de produção de vírus entomopatogênicos.

Vários procedimentos têm sido avaliados para diminuir os custos de produção desses agentes, com base em insetos criados em dietas artificiais. VAIL et al. (1973) relataram que um dos aspectos importantes a serem levados em conta é o tipo de recipiente utilizado na criação de insetos, adotando o uso de copos de papel parafinado na criação de *T. ni* para a produção do seu VPN. Dessa forma, conseguiram diminuir em cerca de dez vezes as despesas para cada cem pupas produzidas. Também, testaram diversos tipos de dietas, encontrando grandes variações nos custos finais das mesmas.

SHAPIRO (1981) estudaram a produção massal in-vivo do VPN de *Portheria dispar* L. Na formulação das diferentes dietas, os autores utilizaram elementos simples e de baixo custo de produção. Também, referem que a redução do custo das dietas pode ser obtido de diferentes formas, tal como o uso de componentes de menor custo, a redução de elementos essenciais e a utilização de substitutos do ágar. A produção de insetos para obtenção de vírus requer uma dieta menos complexa do que para produzir, por exemplo, machos estéreis ou a manutenção de colônias, porque o objetivo é produzir um adequado desenvolvimento larval para avaliar larvas mortas por VPN, não interessando a produção de pupas, adultos ou ovos.

Nos componentes das dietas, o germe de trigo é geralmente um dos elementos mais utilizados. Um dos problemas mais comum era a sua contaminação, hoje resolvida através da embalagem a vácuo. Esse elemento é fonte importante de carboidratos, proteínas, minerais, lipídios, e outros (SHAPIRO 1981). Um outro elemento especialmente importante, usado como fonte de proteína, é a caseína, que faz parte de inúmeras dietas de insetos. Em diversos testes têm sido avaliadas várias substâncias alternativas à caseína, como diferentes proteínas e os seus hidrolizados. Algumas delas são a Trypticase (caseína hidrolizada), soja, fitona (soja hidrolizada) e lactalbumina. Segundo esses autores, todas são comparáveis à caseína e podem perfeitamente ser utilizadas como fontes de proteína em dietas de insetos. Citam, também, que tem aumentado consideravelmente o uso de tórula, subproduto da indústria da polpa de papel, um elemento com boa capacidade de promover fonte protéica. O custo e a disponibilidade, referem os autores, são aspectos muito importantes na seleção de fontes de proteína para a produção de vírus.

SHAPIRO et al. (1981) relatam, ainda, que, apesar da caseína ser fonte primária de proteína, o germe de trigo, também atua como tal. A questão é até que ponto a caseína pode ser substituída parcial ou totalmente pelo germe de trigo. Em uma concentração de 180 g/l deste cereal, o resultado foi comparável com aquele em que foi utilizado uma proporção de 120 g/l mais

36 g/l de caseína, em dieta normal. Os autores mencionam, também, que uma proporção de 18% de germe de trigo pode ser uma alternativa para a relação germe-caseína, especialmente do ponto de vista econômico. Destacam-se dois problemas quando se trabalha na produção massal de vírus: níveis de contaminação e alto potencial para alterações hidrolíticas e oxidativas, tornando o produto rançoso.

Com relação às vitaminas, SHAPIRO (1981) cita que as principais são a vitamina B e o ácido ascórbico. Esses materiais podem ser agregados em forma separada ou em misturas comerciais.

Com relação ao pH das dietas, tem se observado pouca resposta frente a variações normais de acidez ou alcalinidade. SHAPIRO et. al. (1981) fizeram vários experimentos, encontrando semelhança entre valores de 6 a 8 de pH. Dietas com valores de pH superiores a 8 resultaram em menor produção de vírus, mas houve incremento na produção para pH inferiores a 6.

Segundo (SPENCER et al. (1976) não têm sido observadas diferenças marcantes entre o uso de ágar e outros elementos gelificantes, embora a carragenina, quando comparada com o alginato de sódio, promoveu um aumento de 8% na eclosão e de 14% na porcentagem de ovos que produziram larvas capazes de empupar no 26º dia. Os outros parâmetros biológicos não foram afetados significativamente. A criação massal de insetos para a produção de VPN nem sempre é baseada em dietas semi-sintéticas que

garantem a continuidade da criação nas épocas em que as culturas hospedeiras não estão sendo produzidas a campo. Quando se trata de hospedeiros permanentes como as essências florestais, é possível a criação in-natura. ROLLINSON et al. (1970) trabalharam com uma das mais importantes pragas de pinus nos EUA, o himenóptero *Neodiprion sertifer* Geoffroy, que foi criado com seu hospedeiro natural na produção massal do seu VPN.

A criação de larvas de lepidópteros em dieta sintética para produção de VPN, também tem sido abordada por CHAUTANI & CLAUSEN (1967) na Califórnia, EUA, com *Homerocampa pseudotsugata* McDunnough, uma praga florestal, que naturalmente sofre de epizootias do seu vírus. A dieta permitiu uma sobrevivência de 92-97% de uma amostragem de 18.000 larvas.

A criação massal de insetos para a produção de vírus exige que as populações estejam livres de contaminação viral. Quando submetidos a ensaios prévios de avaliação de doses letais, especialmente, GETZIN (1962) estudou o problema e cita que, basicamente, a esterilização de ovos e a criação de larvas em dietas artificiais são metodologias válidas para atingir esse objetivo. Os ovos foram desinfetados por exposição a uma dose de hipoclorito de sódio 0,02% por uma hora e depois lavados para eliminar os restos do produto. Através desse método, foi possível realizar a criação massal de *T. ni* por 17 gerações, sem contaminação das populações.

A produção e virulência de um VPN de *T. ni* também foi estudada por IGNOFFO (1964). O autor reiterou que a produção de vírus em larga escala inicialmente dependia das épocas em que as culturas hospedeiras dos insetos estivessem plantadas. O advento das dietas semi-sintéticas praticamente eliminou este problema. O autor fez experimentos durante seis semanas, criando 20.521 larvas em 2.904 recipientes, com uma média de 3.420 larvas por semana, obtendo 9.153 larvas de quinto instar. As observações indicaram que 90% das larvas produzidas estavam em condições de serem utilizadas para produção do VPN. O autor testou, ainda, VPN impuro e VPN purificado nas infecções. As larvas contaminadas com o vírus impuro sofreram uma mortalidade 1,5 vezes maior do que as submetidas ao vírus purificado. Essa mortalidade maior foi atribuída à maior presença de partículas livres do VPN na preparação impura ou a maior desativação do vírus purificado em condições ambiente.

Na produção de vírus, o seu comportamento pode variar se os componentes da dieta artificial sofrerem modificações. DAVID et al. (1972) estudaram esse aspecto com um vírus da granulose (VG) de *Pieris brassicae* L. Os autores reduziram os sais (cálcio, magnésio /e potássio), como exemplos de elementos inorgânicos. Com relação a compostos orgânicos, modificaram as proporções de ácido ascórbico, mistura de vitaminas, colina, sacarose e

caseína. Em um caso, as larvas foram alimentadas desde o início com dieta normal e só quando atingiram o segundo ínstar foram alimentadas com a dieta modificada; nos outros casos, as larvas consumiram a dieta modificada desde a eclosão. De um modo geral, quando as larvas foram alimentadas com seus elementos na proporção normal e depois com a proporção incompleta ou ainda na falta de alguns desses elementos, não foram observadas grandes diferenças, tanto no seu desenvolvimento larval quanto no seu comportamento frente ao vírus. No caso do fornecimento da dieta modificada desde o início, só foi possível um desenvolvimento normal quando os elementos foram fornecidos pelo menos em dois terços da sua quantidade normal. Proporções inferiores afetaram tanto o desenvolvimento larval quanto o seu comportamento frente ao vírus. Os autores citam que, com relação ao cálcio, não existem na bibliografia muitos relatos sobre uma resposta negativa do inseto, quando sua proporção está em níveis inferiores; entretanto, parece possível que baixos níveis de íons de cálcio possam prejudicar o comportamento do vírus. O magnésio não demonstrou grande efeito, quando níveis inferiores aos recomendados foram testados. No caso da caseína, vários trabalhos são citados (PIMENTEL & SHAPIRO, 1962; DAY & DUDZINSKI, 1966) relatando que aumentos dos teores de proteína favoreceram a mortalidade das larvas pela ação de vírus. Os conteúdos de proteína nas plantas variam substancialmente, afirmam os autores, em função da hora do dia, estado da planta e condições

ambientais. Nas dietas a proteína quase sempre é constituída apenas por caseína, podendo este ser um dos motivos de mudanças da suscetibilidade de larvas frente ao seu vírus.

A função do ácido ascórbico na nutrição de insetos foi abordada por VANDERZANT et al. (1962), os quais estudaram sua ação no desenvolvimento de três pragas do algodão (*Anthonomus grandis* Boheman, *H. zea* e *Estigmene acrea* Drury). No caso do bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*), quando alimentado com dieta deficiente em ácido ascórbico, as fêmeas colocaram poucos ovos e com menor viabilidade, comparados com indivíduos criados em dieta completa. As larvas resultantes dos ovos desses adultos não sobreviveram à segunda muda. A fase de ovo apresentou os maiores níveis desse elemento. As outras duas pragas não sobreviveram em dietas carentes de ácido ascórbico. O autor refere que esse elemento é de fundamental importância na vida dos insetos, sendo um elemento essencial em dietas artificiais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Procedência das Larvas Utilizadas

Como no caso dos bioensaios anteriores (Capítulo II), as larvas utilizadas neste experimento foram provenientes do laboratório de criação de insetos da Embrapa Soja, Londrina. As larvas foram mantidas sobre dieta artificial, em copos de 150 cc de capacidade, até atingir o final do quarto ínstar (pré-muda para quinta idade) e depois transferidas para o laboratório de biotestes, para serem submetidas à experimentação.

### 2.2. Inóculo de Vírus da Poliedrose Nuclear (VPN).

O inóculo utilizado foi procedente da suspensão estoque da cepa LDB-79, obtida em 1979, em Londrina, PR, armazenada em freezer. Essa suspensão foi preparada, no início dos experimentos, em quantidade suficiente para todos os bioensaios e fracionada em pequenos tubos de plástico tipo ependorfe. Esse fracionamento teve por finalidade, como nos casos anteriores, evitar descongelar todo o material estoque por ocasião de cada bioensaio, quando são utilizados apenas alguns microlitros de suspensão viral.

No momento da sua utilização, uma alíquota foi descongelada e com ela preparada uma suspensão inicial. Em um vidro pequeno, de aproximadamente

50 cc de capacidade, foram misturados 20 ml de água destilada esterilizada com aproximadamente 05 microlitros da suspensão viral e feita a contagem em câmara tipo Neubauer, em microscópio óptico com aumento de 400x. Dessa forma, obteve-se a quantificação da suspensão inicial. A partir dela, preparou-se uma concentração de  $4,5 \times 10^4$  cip/ml de dieta como único tratamento. Esta concentração foi aquela que resultou em máxima produção do VPN/larva nos experimentos previos.

### 2.3. Bioensaios com larvas de quinto instar de *A. gemmatalis*.

As larvas de quinto instar foram colocadas em grupos de três em copos de 50 cc de capacidade, contendo 10 ml de dieta artificial mais a dosagem de VPN, a qual, na hora da sua preparação, sofreu algumas modificações quanto ao teor dos componentes ágar e caseína. Desta forma, foi preparada uma dieta normal (HOFFMAN-CAMPO *et al*, 1985) com 100% dos elementos componentes, que representou a testemunha. A dieta 2, teve o ágar e a caseína diminuídos em 50%; na dieta 3, o ágar foi reduzido para 50% e a caseína para 30%; na dieta 4, o ágar foi utilizado a 50% e a caseína a 0%.

A mortalidade foi observada diariamente, sendo os dados submetidos à análise de probites, pelo programa Microprobit 3.0 de SPARKS & SPARKS (1987), Lily Research Labs., Greenfield, Indiana, EUA, para estabelecer a  $CL_{50}$  e parâmetros associados. Uma vez registrada a mortalidade, as larvas

foram pesadas individualmente e os valores anotados em planilhas para posterior tratamento estatístico de análise de variância e comparação das médias pelo teste de Duncan ( $P=0.05$ ). Posteriormente, as larvas foram maceradas, o material resultante coado, centrifugado e, com o produto obtido, foi preparada uma suspensão em 20 ml de água destilada esterilizada, para a quantificação de CIP do vírus/ml. A partir dessa suspensão e nos casos em que a grande concentração de CIP/ml impedia a sua contagem normal, foi preparada nova diluição na proporção 1:10 ou 1:100 para a quantificação de CIP/ml em câmara de Neubauer.

Os resultados foram submetidos a análise de regressão linear simples, para estabelecer se as modificações nas proporções de ágar e caseína ocasionaram variações no peso das larvas no período pós-inoculação e na quantidade de CIP/larva. Os vinte copos de cada tratamento foram divididos em grupos de quatro, representando cada um desses grupos uma repetição.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada um dos bioensaios realizados, foram feitas análises de regressão linear simples, considerando como variável independente a porcentagem de proteína e ágar e, como variável dependente, a resposta baseada em peso médio das larvas mortas, número de larvas mortas e produção de CIP do VPNAg.

Pela análise dos resultados, pode-se considerar que, quando as larvas de *A. gemmatalis* que foram mantidas em dieta normal até o momento da inoculação, no quinto instar, e depois alimentadas com dieta modificada nas proporções de proteína (100, 50, 30 e 0%) e ágar (100 e 50%), não houve diferenças no número de larvas mortas pelo vírus, pesos dessas larvas e produção de CIP/larva (Tabela 2). O fato dos parâmetros estudados não terem sido alterados em função dos teores da caseína, possivelmente seja devido ao tempo decorrido desde a eclosão das larvas até o momento da inoculação, aproximadamente de 15 a 18 dias, que permitiu um desenvolvimento suficiente dos insetos, de forma tal que, quando foram submetidos à dieta modificada, o seu organismo apresentava reservas suficientes para suportar a carência de caseína.

Tabela 2 Número de larvas mortas, peso/larva morta e produção de corpos de inclusão poliédricos (CIP)/larva, após inoculação de larvas de *A. gemmatalis* de início de quinto instar com seu VPN, incorporado na dieta.

% agar/caseína	Teste I	Teste II	Teste III	Média
	----- Número de larvas mortas <sup>1</sup>			
100/100	54	51	59	54,7 a
50/50	52	43	57	50,7 a
50/30	51	53	58	54,0 a
50/0	51	54	54	53,0 a
	Peso/larva (g)			
100/100	0,30	0,20	0,24	0,25 a
50/50	0,23	0,33	0,22	0,26 a
50/30	0,25	0,17	0,23	0,22 a
50/0	0,26	0,25	0,26	0,26 a
	CIP/larva (x 10 <sup>9</sup> )			
100/100	2,56	2,22	2,39	2,39 a
50/50	2,72	1,78	2,25	2,25 a
50/30	2,76	2,00	2,38	2,38 a
50/0	2,60	2,47	2,53	2,53 a

<sup>1</sup> Número inicial de larvas = 60

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Por outro lado, desde a inoculação até o momento em que o vírus causou a morte das larvas, decorreram apenas uma média de sete dias, o que pode ser um período relativamente curto de alimentação com a dieta modificada para o

seu organismo sofrer alterações. Esses resultados concordam com os obtidos por DAVID et al. (1972), para larvas de *P. brassicae* alimentadas até o segundo ínstar em dieta normal e depois inoculadas com seu VG em dieta modificada quanto aos teores de caseína. Nessas condições, a redução dessa substância em dois terços não resultou em diferenças quanto ao crescimento e sobrevivência larval. No entanto, quando larvas foram alimentadas desde o primeiro ínstar com a dieta reduzida quanto a proporção de caseína, houve redução significativa na mortalidade pelo vírus.

Com relação aos diferentes níveis de proteína, DAVID et al (1972) citam resultados obtidos por Shvetzova (1950), quando a adição de proteína combinada com cera provocou um decréscimo na suscetibilidade de *Galleria melonella* a um VPN. Resultados contrários foram obtidos por PIMENTEL & SHAPIRO (1962), que encontraram que aumentos no nível de proteína favoreceram o desenvolvimento da doença. Não têm sido encontrados registros bibliográficos que possam explicar esse fenômeno, mas poderia ser decorrente dos baixos níveis de proteína no hospedeiro, prejudicando o vírus durante a sua fase final de replicação, quando precisa sintetizar a sua poliedrina, que é proveniente do hospedeiro.

Com relação ao uso de gelificantes nas dietas, a maioria deles está representado por ágar. Nesta pesquisa, verificou-se que a redução de até 50%

na sua proporção, em relação à dieta normal, demonstrou plena viabilidade para a produção do VPN (Tabela 2). Para reduzir o custo da dieta, o ágar pode também ser substituído por outros ingredientes. SHAPIRO *et al.* (1981) citam que vários pesquisadores têm utilizado alginato de cálcio e carragenina, embora a última substância tenha o inconveniente de apresentar solidificação muito rápida, o que ocasiona inconvenientes na manipulação de elevados volumes de dieta. No entanto, o uso dessa substância pode ser viável para produção de vírus em larga escala.

No caso de *A. gemmatilis*, para a inoculação de, por exemplo, 20.000 larvas por dia, seria necessário preparar 80 litros de dieta (US\$ 6,20/litro) resultando um custo aproximado de US\$ 496; dos componentes dessa dieta, o ágar e a caseína representam quase 80% do custo total. Para alimentar as larvas, após-inoculação, com dieta reduzida nos teores desses elementos (50% ágar/0% caseína), o custo total seria de aproximadamente US\$ 211 (US\$ 2,64/litro). Consequentemente, esses valores significam uma economia em torno de 60%.

Estes resultados representam um valioso aporte, desde que permitem diminuir consideravelmente os custos de produção de vírus em larga escala, sem alterar a qualidade do produto final.

## CAPITULO IV

Produção do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* em função da idade do hospedeiro no momento da inoculação, dosagem do VPN e temperatura.

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A produção de VPN em larga escala, visando sua utilização em programas de MIP, envolve o estudo de vários aspectos tanto do vírus quanto do inseto hospedeiro. A padronização do tamanho das larvas a serem inoculadas torna-se essencial, pois quando infectadas em distintas idades a sua suscetibilidade frente ao VPN será diferente, diminuindo conforme as larvas atingem os últimos ínstars ; como consequência, a produção final do VPN também sofrerá alterações. Os efeitos da idade larval no momento de serem inoculadas e sua resposta frente ao VPN têm sido abordados por vários pesquisadores, com diversas espécies (IGNOFFO 1966, com *Heliothis virescens* F.; ALLEN 1969, com *Helicoverpa zea*; MAGNOLER 1974, com *Malacosoma neustria* Hübner; BOUCIAS & NORDIN 1977, com *Hypanthria cunea* Drury; BOUCIAS et al. 1980, com *Anticarsia gemmatalis*; BUCHER

& TURNOCK 1983, com *Mamestra configurata* Walk.; YOUNG & YEARIAN 1984, com *Neodiprion taedae* Ross.; com *A. gemmatalis*; GOMEZ 1995, com *Spodoptera frugiperda*; MOSCARDI et al. 1997, com *A. gemmatalis*.

A criação de insetos em laboratório para produção de VPN, além da possibilidade de padronização do tamanho, tem a vantagem de reduzir a possibilidade desses insetos sofrerem contaminação com diversos agentes bacterianos ou vírus que podem ser comuns quando os insetos são coletados no seu ambiente natural. DOANE (1967) estudou o comportamento de larvas do lepidóptero *Portheria (Lymanthria) dispar* L. coletadas a campo. O autor adverte sobre a dificuldade de se determinar o comportamento dessas larvas coletadas no ambiente e imediatamente submetidas a experimentos, em razão de que possam ter ingerido partículas virais nas plantas hospedeiras, mascarando a resposta frente à inoculação no laboratório. Esse autor cita, ainda, que Walles (1957) observou que todas as colônias de larvas criadas a partir de ovos coletados a campo carregavam vírus, embora não tenha encontrado infecções agudas.

A resposta do inseto frente à inoculação, visando a produção do VPN, depende, ainda, de outros fatores; alguns deles foram estudados por JOHNSON et al. (1982). Os autores citam que o processo responsável pela infecção pode ser dividido em duas fases. A primeira é relacionada à

concentração do vírus no alimento e no intestino do inseto. A concentração disponível deverá ser dependente da quantidade de inóculo aplicado, bem como de certos fatores ambientais como chuva, vento, temperatura e radiação solar, que poderão contribuir para disseminar ou inativar o vírus. A segunda fase na indução da mortalidade pelo VPN refere-se à replicação do vírus na larva hospedeira, caracterizando o nível de infecção viral para o modelo de pecilotérmicos.

Por sua vez Johnson (1980), citado por JOHNSON *et al.* (1982), demonstrou que a dosagem viral inoculada afetou o tempo necessário para estimar os parâmetros do modelo para pecilotérmicos; para evitar esse inconveniente, o autor utilizou a dosagem única de  $1,06 \times 10^6$  CIP/larva.

HEDLUND & YENDOL (1973) verificaram que a produção do VPN de *P. dispar* em laboratório não foi significativamente afetado pela concentração do vírus na dieta, ou pelo peso larval quando da infecção. No entanto, o tempo de alimentação das larvas foi significativamente afetado. A maior produção de CIP aconteceu quando a menor concentração foi utilizada. Com altas concentrações durante a inoculação, a produção final de CIP sofreu uma drástica queda devido, possivelmente, ao menor tamanho das larvas no momento da sua morte.

A relação entre a dosagem inoculada e a produção final de VPN foi também abordada por MOSCARDI *et al.* (1997) com *A. gemmatilis*, em

condições de laboratório. Os autores avaliaram várias densidades de insetos/recipiente, diferentes idades larvais e diversas concentrações. Com relação a esse último parâmetro, citam que a maior produção de VPN foi obtida quando as larvas foram infectadas com a mais alta concentração de inóculo. Quando larvas de 2,5 cm foram inoculadas com  $1,0 \times 10^6$  e  $1,0 \times 10^7$  CIP/ml, a produção de VPN dessas larvas foi de  $2,21 \times 10^{10}$  e  $2,64 \times 10^{10}$  CIP/copo, respectivamente (n=25 larvas/copo).

A temperatura pode ser um importante fator de inibição da ação viral e, sobre esse fenômeno, THOMPSON (1959) discute que os VPN de *T. ni* e *H. zea* não são capazes de infectar seus hospedeiros em temperaturas superiores a  $39^{\circ} \text{C}$ ; no entanto, para *Prodenia sp.*, um lepidóptero noctuídeo onívoro, seu VPN pode se desenvolver em temperaturas de aproximadamente  $46^{\circ} \text{C}$ . A  $35^{\circ} \text{C}$  todas as espécies citadas foram efetivamente infectadas pelos seus VPN. Larvas de *T. ni* e *H. zea* expostas aos seus vírus e mantidas por dois dias a  $26.7^{\circ} \text{C}$ , antes de serem colocadas em incubadora a  $39^{\circ} \text{C}$ , desenvolveram a sintomatologia típica da poliedrose. O autor cita, todavia, que larvas de *H. zea* expostas a altas dosagens, mas mantidas a  $39^{\circ} \text{C}$ , produziram progênie totalmente livre de vírus.

JOHNSON et al. (1982) descreveram um modelo construído para explicar diferenças em tempo de desenvolvimento da infecção causadas pela

temperatura. Esse modelo é baseado no pressuposto da presença de uma enzima ‘controladora’ da infecção viral. A concentração dessa enzima define o grau de desenvolvimento viral e também o tempo requerido para a morte das larvas infectadas.

A influência da temperatura sobre a infectividade de vírus também foi abordada por HUNTER & HARTSELL (1970), os quais trabalharam com *Plodia interpunctella* F., praga de grãos armazenados, a qual foi inoculada com um VG. Os autores utilizaram de temperaturas de 22, 27, 32 e 37<sup>0</sup> C e também determinaram que a respiração larval varia com a temperatura. As larvas contaminadas com o vírus respiravam em taxas menores do que as não contaminadas. Na temperatura de 37<sup>0</sup> C não foi observada mortalidade e, portanto, concluiu-se que nessa temperatura o vírus é atenuado. As temperaturas ideais foram 27 e 32<sup>0</sup> C.

TVERMYR (1969), trabalhando com larvas do himenóptero *Neodiprion sertifer* (Geoffr.), verificou que altas temperaturas causaram desenvolvimento mais rápido da doença do que em baixas temperaturas. Larvas de cinco dias de idade contaminadas com uma dosagem de 10<sup>6</sup> CIP/ml e mantidas a 12 e 14<sup>0</sup> C, morreram entre dezesseis e vinte e seis dias após a infecção; quando mantidas a 18<sup>0</sup> C, a mortalidade ocorreu do sétimo ao décimo-primeiro dia após a inoculação; a 24<sup>0</sup> C, as primeiras larvas morreram após três dias da infecção e

todas as larvas morreram após seis dias. O autor citou que em baixas temperaturas o vírus é menos efetivo e seu uso, portanto, inadequado.

Os efeitos da temperatura e da dosagem sobre o tempo requerido para a mortalidade larval, também, foram estudados por Canerday & Arantes (1968), citados por BIEVER & HOSSETER (1971). Os autores referem que a interação hospedeiro-patógeno está diretamente relacionada à resposta hospedeiro-ambiente, e o tempo requerido para uma infecção letal é uma porcentagem constante da duração do estado larval. O autor define que, do ponto de vista prático de uso de vírus, as diferenças nos resultados dependem do estágio em que a população se encontra no momento da aplicação, da quantidade de inóculo e da temperatura ambiente, sendo este aspecto um dos mais importantes.

Na Califórnia, EUA, IGNOFFO (1966) determinou o efeito da temperatura sobre larvas de *H. zea*, quando contaminadas com o seu VPN, em doses subletais. As larvas utilizadas tinham cinco dias de idade e foram mantidas a 13, 19, 22, 29 e 35 °C; as concentrações utilizadas foram 10,5 e 1.139 CIP/mm<sup>2</sup> de dieta. A mortalidade registrada foi de 53,8 e 94,2 %, respectivamente. A mais baixa mortalidade com 1.139 CIP/mm<sup>2</sup> de dieta foi obtida em larvas expostas a 35 °C . O autor refere que a temperatura, embora não seja o fator principal, pode influenciar na mortalidade de forma significativa, em especial no tempo necessário para o vírus causar a morte das

larvas contaminadas. A mortalidade inicial, no caso, é sem dúvida um reflexo do efeito da temperatura; no entanto, altas temperaturas podem inibir a replicação do vírus. Altas ou baixas temperaturas no campo podem afetar a atividade alimentar das larvas e, em consequência, a ingestão de alimentos tratados com vírus, influenciando no seu efeito.

Com relação aos efeitos da temperatura sobre o VPN de *A. gemmatalis*, BOUCIAS et al. (1980) estudaram o comportamento e a capacidade de replicação a 15,6; 21,1; 26,7 e 32,2 °C. Os autores observaram que nas duas primeiras temperaturas a replicação foi semelhante àquela da criação tradicional (26,7 °C), mas que, a 32,2 °C, a mortalidade sofreu diminuições de 30 a 50%.

A nível mundial, são escassos os trabalhos realizados sobre estes aspectos com *A. gemmatalis*. Por tal motivo, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de estabelecer o ínstar, temperatura e dosagem ideais em que as larvas devem ser inoculadas com o VPN, para conseguir uma máxima produção de CIP do vírus.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Procedência das Larvas Utilizadas

Para este experimento, foram utilizadas larvas de *Anticarsia gemmatalis* de terceiro, quarto e quinto ínstaes de uma população proveniente da criação massal do inseto no laboratório de criação de insetos da Embrapa-Soja, segundo HOFFMAN-CAMPO et al. (1985).

#### 3.2. Inóculo de Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) Utilizado.

O inóculo utilizado nos experimentos foi obtido a partir da cepa LDB-79, isolada na Embrapa-Soja, em Londrina, em 1979, de larvas de *A. gemmatalis* coletadas em cultura de soja. Foi preparada uma suspensão estoque suficiente para todos os bioensaios, segundo o procedimento já descrito no capítulo II.

Para a obtenção do vírus purificado, um grupo de larvas foi infectado em laboratório. Quando mortas, as larvas foram colocadas em um recipiente de porcelana e maceradas, adicionando-se água destilada esterilizada, sendo coadas em várias camadas de gaze. O material obtido foi centrifugado a 1.000 rpm durante um minuto; o sobrenadante foi submetido a nova centrifugação a 6.000 rpm por 15 minutos, descartando-se a parte líquida. O precipitado foi homogeneizado em água destilada esterilizada com auxílio de piceta, com a

finalidade de retirar e suspender as partículas virais aderidas no fundo dos tubos. A suspensão obtida foi fracionada em pequenos tubos de plástico tipo ependorfe, os quais foram armazenados em freezer até seu uso nos bioensaios.

### 3.3. Bioensaios com o VPN em populações de *A. gemmatalis*.

A partir da suspensão estoque, foram preparadas várias concentrações de VPN, utilizando-se uma alíquota de 0.5 ml de suspensão de vírus, homogeneizada em Erlenmeyer contendo 20 ml de água destilada esterilizada. A quantificação dos CIP virais foi determinada conforme já descrito no Capítulo II.

Foram tratadas 60 larvas de cada instar (terceiro, quarto e quinto) com cada concentração preparada; para o terceiro instar as concentrações foram: 0 (testemunha), 180, 540, 1.600, 4.860 e 14.580 CIP/ml de dieta; para o quarto e quinto instares: 0 (testemunha), 180, 540, 1.600, 4.860, 14.580 e 43.700 CIP/ml de dieta. Na preparação da dieta, depois de atingir o ponto de fervura, foi mantida no fogo baixo por mais cinco minutos para garantir uma maior eliminação de organismos contaminantes. Em seguida, foi resfriada até atingir 50°C, homogeneizando-se 20 ml de suspensão viral, previamente diluída em quantidade suficiente de água destilada e autoclavada para proporcionar cada concentração desejada, a 180 ml de dieta, em Becker esterilizado, com auxílio

de batedeira elétrica (Mix-Wallita) (MORALES & MOSCARDI, 1993). O conteúdo do Becker foi vertido em 20 copos de plástico de 50 cc de capacidade, colocando-se 10 ml de dieta em cada copo; sendo cada um deles considerado uma repetição. Foi utilizada uma testemunha com 180 ml de dieta e 20 ml de água destilada autoclavada.

Quando a dieta contida nos copos atingiu a temperatura ambiente, três larvas de cada idade foram colocadas em cada um deles com auxílio de pincel fino. Em seguida, os copos foram fechados com tampas de cartolina, nas quais foram registrados dados sobre cada tratamento efetuado (instar, concentração, temperatura). Os copos foram acondicionados em bandejas, em estufas tipo B.O.D., cada uma das quais estava previamente regulada para 26, 29 e 32°C respectivamente, umidade relativa de  $75\pm 2\%$  e 14 horas de fotofase, para estabelecer a melhor temperatura, além da idade larval e dosagem do VPN para uma máxima produção do VPN.

No primeiro dia após a inoculação, todos os copos foram observados e retiradas aquelas larvas que morreram. Essas foram eliminadas das planilhas de registro de mortalidade por vírus, uma vez que o efeito do VPN manifesta-se a partir do quarto dia após a inoculação (MOSCARDI, 1986).

As larvas mortas pelo vírus foram pesadas individualmente e os dados registrados em planilhas. Os vinte copos foram divididos em cinco grupos de quatro repetições, para a análise estatística dos dados. Posteriormente, as

larvas foram maceradas, o material obtido centrifugado e feita a quantificação dos CIP.

### 3.5. Análise dos Dados

Os dados quanto à mortalidade diária por VPN foram analisados pelo programa Microprobit 3.0 de SPARKS & SPARKS (1987), Lily Research Labs., Greenfield, Indiana, EUA, para análise de probites, para determinação das concentrações letais médias ( $CL_{50}$ ) para cada idade e temperatura avaliadas. Também, foram estudadas as interações de concentrações do VPN, temperaturas e idade das larvas inoculadas, através de análise de regressão linear simples, sendo as médias comparadas pelo teste t ( $P=0,05$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando foi analisado o número médio de larvas mortas pelo VPN em cada repetição ( $n=12$ ), pode-se observar que, para o terceiro instar e na temperatura de 26 e 29 °C, os maiores valores foram obtidos com as dosagens de 4.860 e 14.580 CIP/ml de dieta (Tabela 3). Para 32 °C, a maior mortalidade foi obtida com 14.580 CIP/ml. Ao fixar a dosagem para avaliar o efeito das temperaturas, embora alguns valores tiveram diferenças significativas,

nenhuma delas mostrou uma clara predominância , ocorrendo alternância entre os resultados. Esses dados demonstraram que, nesse ínstar, o efeito da temperatura não foi um fator determinante sobre o número de larvas mortas.

Considerando o peso das larvas mortas pelo VPN a 26 e 29 °C (Tabela 4), pode se observar que os maiores valores foram obtidos quando as larvas foram inoculadas com as menores concentrações do vírus. A 32 °C, a resposta não seguiu a mesma tendência. Possivelmente, o fato de se obter maior peso das larvas mortas nas menores dosagens, seja devido a que permitiram um maior desenvolvimento do hospedeiro até o momento do VPN provocar a sua ação letal. Quando fixada a dosagem para avaliar a resposta frente a cada temperatura, não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

Com relação à produção do VPN (Tabela 5), valores superiores foram obtidos quando as larvas foram inoculadas com as maiores concentrações virais, permitindo considerar que existiu uma correlação positiva entre a dosagem inoculada e a produção de VPN obtida. Resultados semelhantes foram obtidos por MOSCARDI et al. (1997), que inocularam larvas de *A. gemmatalis* com o seu VPN, e obteve expressivas produções do vírus com altas concentrações ( $1.0 \times 10^7$  e  $4.0 \times 10^7$  CIP/ml de dieta). Por outro lado, resultados diferentes foram obtidos por HEDLUND & YENDOL (1973). Os autores observaram que a produção de CIP por larvas de *P. dispar* não foi significativamente afetada pela concentração do vírus na dieta, ou pelo peso

larval quando da infecção, indicando que a produção de VPN, quanto a esses parâmetros, varia de acordo com cada sistema vírus-hospedeiro.

No quarto ínstar, observou-se que em todas as temperaturas o número de larvas mortas aumentou com o incremento da concentração do VPN. Quando fixadas as dosagens para avaliar o efeito das temperaturas, pode-se observar que os valores foram semelhantes, existindo diferenças significativas apenas na dosagem de 1600 CIP/ml de dieta nas temperaturas de 29 e 32 °C, com relação a 26 °C.

Tabela 3. Número de larvas de 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> instares de *A. gemmatalis* mortas pelo seu VPN, quando inoculadas com diferentes concentrações do vírus e mantidas em três temperaturas (n=12 larvas; 5 repetições).<sup>1</sup>

Ínstar	Concentração (CIP/ml dieta)	Temperatura		
		26 <sup>o</sup> C	29 <sup>o</sup> C	32 <sup>o</sup> C
III	180	2,6 c A	3,0 b A	2,6 c A
	540	4,4 b c A	4,4 b A	1,6 c B
	1.600	6,4 b A	4,8 b B	7,0 b A
	4.860	9,0 a A	8,0 a AB	6,8 b B
	14.580	8,4 a A	6,6 a B	9,4 a A
IV	180	1,0 dA	2,4 cA	0,8 c A
	540	3,6 c A	3,2 cA	2,4 cA
	1.600	5,6 b c B	7,8 b A	5,8 b AB
	4.860	7,2 b A	8,6 a A	7,8 b A
	14.580	8,0 a A	8,0 b A	8,6 a A
	43.700	10,0 a A	10,6 a A	10,0 a A
V	180	1,6 dA	1,6 dA	1,4 cA
	540	5,0 c A	4,2 c AB	2,2 bc B
	1.600	8,2 b A	8,2 b A	4,0 b B
	4.860	10,0 a b A	10,0 ab A	8,6 a A
	14.580	10,6 a A	10,8 a A	10,6 a A
	43.700	10,4 a A	10,4 a A	9,6 a A

<sup>1</sup> Médias de mínimos quadrados para efeitos de ínstar, temperatura e dosagens de VPN seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste t (P>0,05).

Tabela 4 Peso (g) de larvas de 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> instares de *A. gemmatalis* mortas pelo seu VPN, quando inoculadas com diferentes concentrações do vírus e mantidas em três distintas temperaturas (n=12 larvas; 5 repetições).<sup>1</sup>

Ínstar	Concentração (CIP/ml dieta)	Temperatura		
		26 <sup>o</sup> C	29 <sup>o</sup> C	32 <sup>o</sup> C
III <sup>2</sup>	180	0,25 a A	0,22 a A	0,24 b
	540	0,10 b A	0,11 a A	0,17 b
	1.600	0,13 ab A	0,19 a A	0,64 a b
	4.860	0,13 ab A	0,15 a A	0,81 a b
	14.580	0,11 ab A	0,13 a A	1,04 a
IV	180	0,32 c A	0,66 b A	0,17 b A
	540	1,46 b A	0,77 b A B	0,63 b B
	1.600	1,43 b A	1,80 a A	2,15 a A
	4.860	1,70 ab A	1,93 a A	2,36 a A
	14.580	2,18 a A	1,61 a A	1,86 a A
	43.700	2,11 ab A B	1,67 a B	2,50 a A
V	180	0,46 dA	0,47 dA	0,39 c A
	540	1,23 c A	1,08 dA	0,73 bc A
	1.600	2,28 ab A	2,28 c A	1,32 b B
	4.860	2,96 a A	3,19 b A	2,73 a A
	14.580	2,25 ab B	3,86 a A	2,56 a B
	43.700	2,20 b B	3,53 a A	2,05 a B

<sup>1</sup> Médias de mínimos quadrados para os efeitos de ínstar, temperatura e dosagem seguidas da mesma letra, minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente pelo teste t (P>0,05).

<sup>2</sup> Para o terceiro ínstar, a 26 e 29<sup>o</sup> C os parâmetros foram avaliados considerando-se os totais de larvas mortas em cada dosagem, mas essas temperaturas não puderam ser comparadas a 32<sup>o</sup> C.

Tabela 5 Produção de corpos de inclusão poliédricos (CIP x 10<sup>9</sup>) em larvas de *A. gemmatalis*, inoculadas nos 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> ínstars com seu VPN, em diferentes concentrações e mantidas em três distintas temperaturas (n=12 larvas; 5 repetições).<sup>1</sup>

Ínstar	Concentração (CIP/ml dieta)	Temperatura		
		26 <sup>o</sup> C	29 <sup>o</sup> C	32 <sup>o</sup> C
III	180	5,5 b A	5,0 a A	2,6 a A
	540	4,7 b A	22,1 a A	3,7 a A
	1.600	124,4 a A	14,6 a B	10,4 a B
	4.860	27,2 b A	16,9 a A	11,4 a A
	14.580	35,5 b A	25,0 a A	19,4 a A
IV	180	4,2 c C	82,1 b B	149,7 a A
	540	8,8 c B	20,3 c B	153,0 a A
	1.600	70,3 bc A	110,5 ab A	83,4 b A
	4.860	97,7 b A	111,2 b A	119,0 ab A
	14.580	130,8 a A	138,0 a A	162,9 a A
	43.700	155,1 a A	117,9 b A	165,4 a A
V	180	38,2 b A	4,8 b A	15,0 cA
	540	13,2 b A	14,3 b A	39,8 cA
	1.600	89,1 ab A	47,2 b A	51,8 b cA
	4.860	90,4 ab A	43,6 b A	48,0 b cA
	14.580	94,2 ab B	76,4 ab B	155,1 a A
	43.700	111,0 a A	120,2 a A	90,4 b A

<sup>1</sup> Médias de mínimos quadrados para os efeitos de ínstar, temperatura e dosagem seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si pelo teste t (P>0,05).

O peso das larvas mortas foi semelhante para as três maiores dosagens, nas três temperaturas avaliadas. Observou-se que, embora com algumas variações nos valores, nas maiores concentrações, os pesos das larvas mortas foram menores. Possivelmente, essas concentrações elevadas

provocaram a morte das larvas em menor tempo, impedindo um maior desenvolvimento das mesmas até o momento da sua morte. Resultados semelhantes foram obtidos por YOUNG & YEARIAN (1984), com o VPN de *N. taedae*, onde o tempo de mortalidade decresceu de 3,9 dias na dosagem de  $10^2$  CIP/ml para 2,0 dias quando inoculadas com  $10^8$  CIP/ml.

Com relação à produção de CIP no quarto ínstar, os maiores valores foram obtidos nas dosagens superiores, coincidindo com as respostas observadas com larvas de terceiro ínstar. Ao considerar o efeito da temperatura, embora não ocorreram diferenças estatísticas significativas somente em poucos casos, em termos absolutos a maior produção foi obtida quando as larvas inoculadas foram mantidas a  $32^{\circ}$  C. Resultados semelhantes foram obtidos por HUNTER & HARTSELL (1970), com um VG de *P. interpunctella*. Os autores concluíram que as temperaturas ideais para o desenvolvimento da infecção foram  $27$  e  $32^{\circ}$ C.

No quinto ínstar, nas três temperaturas, também o número de larvas mortas foi maior nas dosagens superiores. Dentro de cada temperatura foram obtidas respostas semelhantes, com maiores variações nas três primeiras dosagens. Quando comparadas as diferentes temperaturas, dentro de uma mesma dosagem, a de  $32^{\circ}$  C mostrou os menores valores nas concentrações de 540 e 1600 CIP/ml. Não houve diferenças estatísticas significativas quando as larvas foram inoculadas com as três maiores dosagens. Quanto ao peso médio

das larvas mortas, a 26 ° e 32 °C os maiores valores foram obtidos quando as larvas foram inoculadas com 4.860 CIP/ml; no entanto, a 29 °C, os pesos superiores ocorreram na concentração de 14.580 CIP/ml, sofrendo decréscimo com 43.700 CIP/ml. Ao fixar a dosagem para avaliar o efeito da temperatura, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de 180, 540 e 4860 CIP/ml de dieta. Com 1600 CIP/ml, a 32 °C, foram obtidos os menores pesos das larvas mortas; no entanto, valores máximos resultaram com larvas inoculadas com 14.580 e 43.700 CIP/ml e mantidas a 29° C. Resultados semelhantes foram obtidos por YADAVA (1970) com *Limanthria (Portheria) dispar*, que obteve maiores valores para larvas inoculadas com VPN e mantidas a 29 °C, com decréscimos de peso a 32 °C.

A produção média de CIP também se correlacionou com o peso das larvas mortas. A 26 °C houve semelhança entre as respostas obtidas com as quatro maiores concentrações (1.600, 4.860, 14.580 e 43.700 CIP/ml), sendo que com as duas últimas foram conseguidas as máximas produções do VPN. Quando as larvas inoculadas foram mantidas a 29 °C, a maior produção de vírus foi conseguida com as duas maiores dosagens (14.580 e 43.700 CIP/ml). A 32° C o rendimento máximo foi obtido com 14.580 CIP/ml, diferindo significativamente das demais concentrações avaliadas. Ao se fixar as dosagens, o efeito da temperatura não parece ter afetado a produção do VPN,

desde que, apenas a de 32<sup>0</sup> C na dosagem de 14.580 CIP/ml resultou em produção significativamente maior do que as demais.

De uma forma geral, para cada um dos parâmetros avaliados, pode-se observar que as larvas de terceiro ínstar apresentaram os menores valores, por serem mais suscetíveis, morrendo em menor tempo, com peso e produção de VPN inferiores. Nas condições em que foram conduzidos os experimentos, não foi observada uma clara predominância na resposta do quarto ou quinto instares frente ao vírus, desde que não houve diferenças estatísticas significativas no número de larvas mortas. Os maiores pesos dessas larvas mortas foram observados no quinto ínstar a 29<sup>0</sup> C, e a maior produção de VPN, em termos absolutos, ocorreu com larvas inoculadas no quarto ínstar a 32<sup>0</sup> C, embora sem diferenças significativas com relação a 26 e 29<sup>0</sup> C. Quanto às dosagens, os melhores resultados foram conseguidos quando as larvas foram inoculadas com 14.580 e 43.700 CIP/ml. Conforme esses resultados, para conseguir os maiores pesos e produção do VPN, a melhor combinação resultou quando larvas de quinto ínstar foram inoculadas com 14.580 e 43.700 CIP/ml e mantidas na faixa de 29 a 32<sup>0</sup> C. Resultados semelhantes foram obtidos por SHAPIRO (1981). O autor cita que larvas infectadas nos últimos instares produziram mais vírus do que as infectadas nos primeiros instares. Segundo MOSCARDI et al. (1997), respostas similares foram observadas por HARPER (1970) com *Peridroma saucia* (Hbn.) infectada na metade do quinto

ínstar; Huber & Dickler (1977) com *Rhyacionia buoliana* (Schif.) inoculada no final de quarto ou início do quinto ínstar; e Shapiro (1986) com *L. dispar* inoculada no quinto ínstar.

## CAPITULO V

Avaliação de parâmetros biológicos de uma população de *Anticarsia gemmatalis* resistente ao seu VPN , em relação a uma população suscetível ao patógeno.

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Quando uma população de insetos coletada a campo é mantida em laboratório para ser submetida a pressão de seleção com seu VPN, essa sofre uma série de reações que, segundo a espécie e condições, pode afetar ou não seus parâmetros biológicos. Segundo VAIL & HALL (1968), acreditava-se que os tecidos de insetos adultos não eram suscetíveis às infecções com vírus, devido a taxa baixa de multiplicação celular desses tecidos. Os autores realizaram trabalhos com adultos de *Trichoplusia ni* , abordando aspectos como longevidade de machos e fêmeas, espermatóforos de fêmeas acasaladas, oviposição, fertilidade e número de progênie contaminada. Com relação à longevidade, não foram observadas diferenças em relação ao grupo testemunha; também, observaram que a fertilidade dos ovos foi pouco alterada pela infecção. Quando o vírus foi injetado no hemocele das fêmeas adultas, também não teve influência na sua fecundidade, fertilidade e longevidade.

Nenhum sintoma da doença foi observado na progênie proveniente de ovos previamente desinfectados ou não.

FUXA & RICHTER (1988) induziram resistência em *Spodoptera frugiperda*, através de pressão de seleção com seu VPN. Depois de várias gerações, foram analisados alguns dos parâmetros biológicos dessa população comparados aos de uma colônia de *S. frugiperda* suscetível ao VPN. Com relação à fecundidade, as fêmeas da colônia suscetível produziram 550% mais ovos do que as da colônia resistente, com 85 e 50 % de fertilidade respectivamente. Com relação ao peso das pupas, não observaram diferenças significativas, sendo a longevidade dos adultos suscetíveis 2,6 % maior.

Pesquisas semelhantes foram desenvolvidas por ROTHMAN & MYERS (1994) com *M. californicum* (Lepidoptera:Lasiocampidae), para avaliar a possibilidade de mudanças no seu potencial reprodutivo, quando inoculadas com o seu VPN. As fêmeas adultas provenientes de larvas infectadas sofreram 17% de redução na fecundidade, totalizando 187 ovos para fêmeas contaminadas e 225 para as da testemunha. Também, o peso das pupas foi afetado quando as larvas foram inoculadas com o vírus, com médias de 0,44 e 0,49 g para as contaminadas e testemunha, respectivamente.

Quando uma população de insetos tratada com baculovírus sofre mudanças em alguns parâmetros biológicos, nem sempre essas alterações são devido exclusivamente à doença; também, a qualidade do alimento pode influir

sobre esses parâmetros. Esse aspecto foi estudado por MOSCARDI *et al.* (1981) com *Anticarsia gemmatalis*, quando alimentada com folhas de soja em diferentes estados de maturação. Assim, a média da fertilidade declinou quando as larvas foram alimentadas com folhas mais maduras, variando de 963 ovos/fêmea sobre folhas de plantas em estadio vegetativo até 515 ovos/fêmea quando alimentadas com folhas de plantas em fase mais avançada (floração, enchimento de vagens ou maturação fisiológica). Com relação à fertilidade, a menor qualidade do alimento consumido pelas larvas parece não ter afetado de forma significativa este parâmetro. As fêmeas acasaladas tiveram uma longevidade média de 14 e 17,6 dias quando as larvas foram alimentadas com folhas senescentes ou da fase de floração da cultura, respectivamente. A taxa de reprodução foi de 199,2 para as fêmeas provenientes de larvas alimentadas com folhas senescentes e de 364,8 quando alimentadas com folhas novas.

O efeito da temperatura sobre os diferentes parâmetros biológicos de *A. gemmatalis* foi estudado por MOSCARDI *et al.* (1981), nos EUA. A oviposição variou de 310 ovos/fêmea a 32,2 °C até 842 ovos/fêmea a 26,7 °C. As fêmeas obtidas de larvas criadas em dieta artificial, em laboratório, produziram mais ovos do que as provenientes de larvas de campo alimentadas com folhas de soja. Com relação à fertilidade, esta variou de 68,6 % a 21,1

<sup>0</sup>C, até 85,7% para insetos de campo em várias regiões. A longevidade das fêmeas decresceu conforme as temperaturas aumentaram. Assim, a 21,1 <sup>0</sup> C foi de 24,8 dias e a 32,2<sup>0</sup> C foi de 11,2 dias. A taxa de reprodução variou de 135 a 32,2<sup>0</sup> C para 369 a 26,7<sup>0</sup> C. Com relação ao período de oviposição, variou de 16 dias a 32,2<sup>0</sup> C para 33 dias a 21,1 <sup>0</sup> C. De um modo geral, as temperaturas extremas alteraram os principais parâmetros biológicos; no entanto, em temperaturas intermediárias não foram observadas diferenças significativas.

Com relação à possibilidade de resistência de *A. gemmatalis*, frente ao seu VPN, em condições de campo, existem alguns estudos realizados no Brasil e E.U.A. (ABOT 1993; ABOT et al. 1995). Os autores não encontraram diferenças significativas na resposta frente ao vírus, tanto para populações coletadas em diferentes regiões do Brasil quanto dos E.U.A.. Por sua vez, demonstrou-se a alta capacidade dessa praga em desenvolver resistência ao VPN, em condições de laboratório, em experimentos de pressão de seleção, quando a taxa de resistência da população selecionada foi maior que 1.000 vezes, em relação à população suscetível, após 13-15 gerações (ABOT et al. 1996).

Uma das questões importantes em populações que desenvolvem resistência a vírus entomopatogênicos, a exemplo do constatado por FUXA & RICHTER (1988) para *S. frugiperda*, é o quanto essas populações resistentes

podem ser afetadas em seus parâmetros biológicos, quando comparadas com populações suscetíveis. Assim, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de comparar uma população de *A. gemmatalis* resistente ao VPNAg com outra população suscetível quanto aos principais parâmetros biológicos do inseto, visando detectar alterações destes provocada pela seleção para resistência ao VPN.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Origem das Larvas Utilizadas nos Experimentos.

Os insetos utilizados foram provenientes de uma população de *A. gemmatalis* (Sertanópolis, PR) selecionados, em laboratório, através de 23 gerações , para alta resistência ao seu VPN. Essa população apresentava taxa de resistência ( $CL_{50}$  da população resistente/ $CL_{50}$  da população suscetível) superior a 3.000 vezes.

### 2.2. Montagem dos Experimentos

Inicialmente, quando foi aplicada uma nova pressão de seleção, foram escolhidas as pupas resultantes de larvas que sobreviveram e empuparam em um mesmo dia, permitindo a padronização do experimento. As pupas foram

sexadas, com auxílio de lupa estereoscópica e o peso de 100 indivíduos de cada sexo foi registrado, para posterior análise estatística. Em seguida, foram colocadas em placas de Petri sem tampa e acondicionadas em gaiolas de acrílico, de 40x50x40 cm, com a base forrada com papel toalha umido, para emergência dos adultos. Como fonte de alimento dos adultos foi fornecida uma diluição de cerveja em água (10%), colocada sobre algodão, em placas de Petri de 5 cm de diâmetro. Paralelamente, uma colônia de indivíduos de *A. gemmatalis* suscetível ao VPN foi mantida separadamente e manipulada da mesma forma.

Por ocasião da emergência dos adultos, todos os que o fizeram no mesmo dia foram separados em outras gaiolas de acrílico, por três dias, para o acasalamento. Após esse período, 20 a 25 fêmeas foram transferidas individualmente para gaiolas de tela de arame, de 25 cm de altura e 12 cm de diâmetro, colocando-se uma placa de Petri na base e outra na abertura superior, fixadas com fita crepe. Em cada gaiola colocou-se uma cartela com o número da fêmea e a população correspondente ( resistente ou suscetível ). Revestindo seu interior, foi colocada uma folha de papel sulfite, como substrato de oviposição, que foi trocada diariamente até a morte do inseto.

Diariamente, os ovos foram quantificados e transferidos para uma gaiola de acrílico com sua base coberta com papel toalha umido, para avaliar a fertilidade. Também foram determinados o período de oviposição e a

longevidade das fêmeas. Os experimentos foram conduzidos por três gerações consecutivas de ambas as populações (resistente e suscetível). Os dados referentes a cada parâmetro avaliado foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de peso das pupas machos e fêmeas das populações resistentes e suscetíveis foram submetidos à análise de variância, considerando o efeito do sexo, população e a interação sexo x população. Detectaram-se diferenças estatísticas significativas entre os níveis sexo e população, mas não da interação entre eles.

Quando as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P=0,05$ ), observou-se que o conjunto das pupas machos e fêmeas da população suscetível foram significativamente mais pesadas do que as da população resistente (Tabela 6). Possivelmente, o menor peso das pupas da população resistente esteja relacionado com o gasto de energia para manter o mecanismo de resistência frente ao seu VPN. Com relação ao sexo, as pupas dos machos das duas populações apresentaram peso significativamente maior do que as das fêmeas. Segundo correlações realizadas por ROTHMAN & MYERS (1994), o peso das pupas fêmeas é um indicativo do seu potencial reprodutivo. O autor cita que, apesar dessa evidência, isso não é regra geral, pois menciona

que outros pesquisadores não têm conseguido, claramente, mostrar que um menor peso de pupas fêmeas determina um menor potencial reprodutivo.

Tabela 6 Peso de pupas, período de oviposição, longevidade, fecundidade e fertilidade para uma população resistente e uma população suscetível de *A. gemmatalis* ao seu VPN.

População	Teste I	Teste II	Teste III	Médias <sup>1</sup>
<b>Peso de pupas (mg)</b>				
Resistente	225	215	195	211 b
Suscetível	245	225	220	230 a
<b>Período de oviposição (dias)</b>				
Resistente	13,0	9,0	6,5	9,5 a
Suscetível	11,3	5,7	6,8	7,9 b
<b>Longevidade (dias)</b>				
Resistente	14,8	14,3	9,1	12,7 a
Suscetível	13,7	12,5	9,5	11,9 b
<b>Fecundidade</b>				
Resistente	581	451	334	455 a
Suscetível	609	325	387	440 a
<b>Fertilidade (%)</b>				
Resistente	84,5	88,2	85,0	85,9 a
Suscetível	85,1	88,0	86,1	86,4 a

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (P>0,05).

Quanto ao número de ovos produzidos por fêmea, não houve diferença significativa entre as populações resistente e suscetível. Isto significa que, apesar das altas taxas de resistência verificadas para a população de *A. gemmatalis* selecionada para resistência ao VPN, este fenômeno não afetou a fecundidade da espécie. Resultados semelhantes foram encontrados por VAIL & HALL (1969), com fêmeas de *T. ni* que sobreviveram à infecção viral, as quais não foram afetadas quanto ao acasalamento e fecundidade. No entanto, em outras espécies têm sido observados resultados diferentes. FUXA & RICHTER (1988) observaram que fêmeas de *S. frugiperda* de uma população resistente ao VPN tiveram a sua fecundidade afetada significativamente, em relação a outra população não exposta ao vírus. Resultados semelhantes foram obtidos por ROTHMAN & MYERS (1994), com fêmeas de *M. californicum fluviale* infectadas com o seu VPN.

Segundo FUXA et al. (1988), a redução da fecundidade em populações resistentes ao VPN pode ser devido aos genes selecionados para resistência, citando, ainda, que isso tem acontecido na seleção de mosquitos para resistência ao DDT. O mesmo fenômeno foi observado em raças de *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera:Aphidiidae) resistentes a inseticidas.

A fertilidade de *A. gemmatalis* foi outro parâmetro biológico não afetado pela ação viral, sendo de 85,9 % para a população resistente e de 86,4 % para a população suscetível. Resultados semelhantes foram obtidos por

VAIL & HALL (1969). Os autores não encontraram diferenças significativas na fertilidade de fêmeas de *T. ni* sobreviventes à infecção com o seu VPN quando larvas, nem quando o vírus foi injetado no hemocele das fêmeas adultas. Por outra parte, resultados contrários foram obtidos por FUXA & RICHTER (1988), que registraram diminuição de 35% na fertilidade dos ovos provenientes de fêmeas de *S. frugiperda* originárias de população resistentes ao seu VPN.

A longevidade e tempo de oviposição das fêmeas de *A. gemmatalis* pertencentes à população resistente ao VPN apresentaram valores significativamente superiores, em relação à população suscetível (Tabela 6). Possivelmente, essa reação possa ser uma estratégia de sobrevivência de *A. gemmatalis*, compensando o gasto de energia para resistir ao vírus, através da maior longevidade e maior tempo ovipositando. Por sua vez, FUXA & RICHTER (1988) encontraram que, embora significativas estatisticamente, as diferenças de longevidade entre fêmeas de *S. frugiperda* suscetíveis e resistentes não foram de grande magnitude. Os parâmetros reprodutivos de *A. gemmatalis* podem ser afetados também por outros fatores como densidade das populações e alimentação (MOSCARDI et al., 1981).

As fêmeas de *A. gemmatalis*, oriundas de população resistente ao seu VPN, não foram afetadas nos seus principais parâmetros reprodutivos; embora o peso de pupas tenha sido significativamente reduzido e a longevidade e o

tempo de oviposição das fêmeas tenham sido maior para a população resistente. Estes dois últimos aspectos indicam que, possivelmente, para reproduzir a níveis normais, indivíduos resistentes desenvolveram mecanismos para aumentar sua longevidade e tempo de oviposição, o que os torna mais predispostos a fatores naturais de mortalidade (predação, por exemplo). Isto, aparentemente, coloca os indivíduos resistentes em desvantagem em relação aos suscetíveis, para o atingimento do objetivo reprodutivo da espécie. Esses resultados, significam uma importante contribuição ao conhecimento do complexo *A. gemmatalis-Baculovirus anticarsia* e poderá servir como ponto de referência para futuras pesquisas sobre a possibilidade desse inseto ser selecionado para resistência ao VPN, em condições de campo.

## CAPITULO VI

Reversão da resistência de *Anticarsia gemmatalis* ao seu VPN, através da retirada da pressão de seleção em população selecionada para resistência ao vírus, em condições de laboratório.

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Existem poucos trabalhos relacionados à reversão da resistência de insetos frente a baculovírus. Uma população de *Spodoptera frugiperda*, selecionada para resistência ao seu VPN foi dividida em duas sub-populações, uma delas continuamente submetida à pressão de seleção e a outra mantida livre da ação do vírus (FUXA & RICHTER, 1989). Os resultados demonstraram que a retirada da pressão de seleção não resultou em modificações da resistência nas primeiras gerações, sendo que só a partir da oitava geração os valores de  $CL_{50}$  do VPN para a população selecionada diminuíram, até se tornarem semelhantes aos da testemunha. Várias são as causas atribuídas à reversão da resistência. FUXA & RICHTER (1992) citam que, entre outras, pode acontecer uma modificação genética, onde os genes para resistência sofrem uma reorganização, quando, depois de um período de

contato do hospedeiro com o vírus, cessa esse estímulo. Também, cita como outra possível causa, a migração de insetos suscetíveis de áreas não tratadas com o patógeno para áreas onde o vírus é aplicado, proporcionando cruzamentos entre populações suscetíveis e selecionadas, levando à perda da resistência ao vírus.

Estudos realizados por CURTIS et al. (1978) levaram-no a considerar que a reversão da resistência pode ser o resultado da seleção de gens em ausência de vírus, da imigração de insetos suscetíveis para áreas com populações resistentes ou a combinação dos dois fatores. Segundo Wood & Bishop (1981), citados por FUXA (1992), se a pressão de seleção é continuamente aplicada e relaxada, o grau de reversão pode se perder a cada ciclo. Estudos de reversão da resistência em *Epiphyas postvittana* (Walker) foram desenvolvidos por BRIESE et al. (1980), que trabalharam com três populações: resistente e suscetível de laboratório e uma de campo, realizando cruzamentos entre elas. Verificaram que as linhas de dose-resposta dos híbridos e retrocruzamentos manifestaram reversão de resistência, pois tiveram comportamento intermediário com relação aos pais. BRIESE (1982), trabalhando com um (VG) de *Phtorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera:Gelechiidae), praga do tomate e batata, esclareceram alguns aspectos genéticos da reversão da resistência; ao realizar o cruzamento da população resistente com a suscetível, observaram que a progênie teve

comportamento intermediário entre os pais. Segundo FUXA (1992), esses estudos são essenciais para o conhecimento da co-evolução hospedeiro-microrganismo.

Com relação a *Anticarsia gemmatalis*, diversas pesquisas básicas e aplicadas foram desenvolvidas na Embrapa Soja, Londrina, PR, com o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre os diversos fatores envolvidos na relação patógeno-hospedeiro (MOSCARDI 1986, MOSCARDI 1989, MOSCARDI & SOSA-GÓMEZ 1992, 1996, ABOT et al. 1995, ABOT et al. 1996). Os primeiros trabalhos de pesquisa sobre reversão da resistência ao VPN em *A. gemmatalis* foram realizados por ABOT (1993). Esse autor submeteu uma população dessa espécie à pressão de seleção por quatorze gerações e depois deixou-a livre de contato com o vírus. A resistência permaneceu quase inalterada através de quatro gerações. Segundo este autor, a prevalência da resistência da população livre de pressão de seleção possivelmente se mantenha somente por poucas gerações, diminuindo com o tempo, uma vez que, embora não significativa, foi observada uma discreta queda da resistência na segunda geração, a partir de retirada a pressão de seleção. O mesmo autor (ABOT 1993), realizou trabalhos com a mesma espécie, em condições de laboratório, onde uma população resistente ao VPN perdeu totalmente essa característica em quatro gerações, quando cruzada com uma população suscetível.

A nível mundial, existem poucos trabalhos, e esses apenas no Brasil, sobre a possibilidade de reversão da resistência de *A. gemmatalis* ao seu VPN e muitos aspectos ainda devem ser melhor estudados. Portanto, este experimento teve como objetivo exercer pressão de seleção sobre uma população dessa praga por 16 gerações, para que desenvolvesse alta resistência ao VPN e, a partir daí, suspender o contato com o vírus para avaliar em quantas gerações a resistência poderia ser revertida.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3. Origem do Inóculo

O inóculo do VPN utilizado foi obtido a partir da cepa LDB-79, isolada na Embrapa Soja, Londrina, de larvas de *A. gemmatalis* coletadas em culturas de soja da região, em 1979.

##### 3.1. Origem das Larvas

Como na maior parte dos experimentos, as larvas foram obtidas no Laboratório de Criação de Insetos da Embrapa-Soja, criadas segundo os procedimentos propostos por HOFFMAN-CAMPO et al. (1985).

### 3.2. Experimentos (Bioensaios) de Laboratório

Para o início da colônia, foram coletadas larvas de *A. gemmatalis* no município de Sertanópolis-PR. A primeira geração foi mantida sobre folhas de soja, uma vez que as larvas não aceitaram imediatamente a dieta artificial específica.

Quando a colônia atingiu um desenvolvimento adequado, essa foi dividida em duas subpopulações. Uma delas foi deixada como testemunha e a outra foi submetida à pressão de seleção pelo VPN, com uma dosagem suficiente para matar 80% das larvas submetidas a estudo ( $CL_{80}$ ). A cada geração, foram montados bioensaios com larvas de final de segundo instar, utilizando 60 larvas para cada dosagem; as concentrações de VPN foram: 60, 180, 540, 1600 e 4860 corpos de inclusão poliédricos (CIP) por ml de dieta, além da testemunha, submetida à dieta sem vírus.

Conforme a resistência mostrou acréscimos ao longo das gerações, as dosagens foram ajustadas, segundo a resposta da população frente a cada novo estímulo. Ao final de cada experimento, os dados obtidos foram submetidos à

análise de probites, pelo programa Microprobits 3.0, de SPARKS & SPARKS (1987), Lily Research Labs., Greenfield, Indiana, EUA. Os ensaios foram realizados tanto para a população submetida à pressão de seleção quanto para a população suscetível. Os resultados da análise de probites na população selecionada, obtidos em cada geração, permitiram estimar a  $CL_{80}$  a ser aplicada na geração seguinte e, também, estabelecer a taxa de resistência ( $TR=CL_{50}$  da população selecionada/ $CL_{50}$  da população suscetível).

A pressão de seleção, em cada geração, envolveu a infecção de 4.000 larvas de segundo ínstar com a  $CL_{80}$  do VPN. A partir do quarto dia após a inoculação, as larvas mortas foram retiradas diariamente. As sobreviventes foram transferidas, como pré-pupas, para recipientes de plástico com vermiculita, como substrato para empuparem. As pupas permaneceram nesses recipientes por aproximadamente três dias, para completarem sua quitinização, evitando-se, dessa forma, serem danificadas pelo manuseio. Após esse período, todas as pupas obtidas foram sexadas, com auxílio de lupa binocular e colocadas em gaiolas de acrílico de 50 x 40 x 40 cm, até a emergência dos adultos. No fundo das gaiolas colocou-se papel toalha umido e três placas de Petri contendo algodão embebido em uma diluição de cerveja em água destilada (10 %), como fonte de alimento, e três placas com água destilada.

Por ocasião da emergência dos adultos, nas paredes das gaiolas foram fixadas folhas de sulfite, como substrato para oviposição. Diariamente, as

folhas foram retiradas e substituídas por outras. As folhas com os ovos foram introduzidas em bandejas com água e estes descolados manualmente. Em seguida, foram coados em gaze e, com auxílio de espátula, foram distribuídos, em grupos de aproximadamente 100 unidades, sobre cartelas de papel sulfite. Estas foram fixadas na parte interna de tampas de copos de plástico de 150 cc de capacidade, contendo aproximadamente 20 ml de dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO et al. 1985). Após eclodirem, as larvas permaneceram nos copos até o segundo ínstar, sendo, então, enviadas para o Laboratório de Patologia de Insetos, para serem submetidas aos bioensaios. Esta operação foi repetida, em cada geração.

Após 16 gerações, a população resistente que apresentava uma taxa de resistência de 2.494 vezes foi dividida em duas subpopulações; uma delas continuou a ser submetida a pressão de seleção e a outra foi deixada livre de contato com o VPN e utilizada nos ensaios para avaliar a prevalência da resistência. Essas duas populações foram ainda comparadas à população suscetível, nunca inoculadas com o VPN. Os ensaios realizados com a população suscetível consistiram, desde o início, no preparo das concentrações de 60, 180, 540, 1600 e 4860 CIP/ml de dieta, mais uma testemunha (20 ml de água destilada). Foram utilizados vinte copos de plástico de 50 cc, contendo 10 ml de dieta. Cada copo foi considerado uma repetição. Quando a dieta atingiu a temperatura ambiente, três larvas de terceiro ínstar foram colocadas

por copo, e este fechado com tampa de cartolina. Após quatro dias da inoculação, os copos foram observados diariamente, registrando-se o número de larvas mortas. Os dados foram submetidos à análise de probites, segundo programa descrito anteriormente. O procedimento foi repetido por 13 gerações.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando a população de *A. gemmatalis*, coletada em Sertanópolis, Pr, foi submetida à pressão de seleção em laboratório, demonstrou uma rápida resposta frente a esse estímulo, manifestando resistência verdadeira já na F<sub>5</sub> (TR=15,53 vezes), apresentando valores crescentes de resistência a cada geração, atingindo uma TR de 146,7 vezes na F<sub>10</sub> e superior a 3.000 vezes após a F<sub>15</sub>.(Tabela 7)

Tabela 7 Concentrações letais médias (CL<sub>50</sub>) e respectivos intervalos de confiança (IC) (95%) para uma população de *A. gemmatalis* submetida a pressão de seleção por seu VPn, comparada a uma população suscetível ao patógeno, em laboratório.

Geração	População Seleccionada		População Suscetível		Taxa de Resistência <sup>2</sup>
	CL <sub>50</sub> <sup>1</sup>	IC (95%)	CL <sub>50</sub> <sup>1</sup>	IC(95%)	
F1	1.194	879-1.661	1.123	951 - 1.578	- 1,00
F2	1.186	896 - 1.638	927	669 - 1.339	1,28
F3	855	659 - 1.126	816	619 - 1.102	1,05
F4	511	386 - 663	141	49 - 287	3,62
F5	6.368	4.497 - 9.485	410	313 - 522	15,53
F6	2.685	1.946 - 3.639	147	118 - 186	18,26
F7	4.223	3.077 - 5.693	97	66 - 140	43,54
F8	18.695	13.976 - 25.628	227	170 - 300	82,36
F9	10.529	7.538 - 14.293	90	33 - 131	117,00
F10	41.082	30.554 - 56.398	280	100 - 541	146,72
F11	61.257	19.591 - 125.986	318	141 - 612	192,63
F12	167.825	69.956 - 426.868	376	187 - 688	446,34
F13	376.489	261.993 - 592.904	644	478 - 901	584,61
F14	341.016	115.331 - 876.596	406	298 - 556	839,94
F15	1,3 x 10 <sup>6</sup>	616.453 - 5,4 x 10 <sup>6</sup>	364	272 - 470	3.719,94
F16	1,0 x 10 <sup>6</sup>	500.539 - 2,9 x 10 <sup>6</sup>	410	293 - 580	2.493,85
F17	913.748	557.622 - 1,9 x 10 <sup>6</sup>	686	395 - 1.239	1.322,00
F18	1,9 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup> - 4,0 x 10 <sup>6</sup>	246	188 - 320	7.811,05
F19	2,7 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup> - 17,6 x 10 <sup>6</sup>	665	401 - 990	4.137,18
F20	1,3 x 10 <sup>6</sup>	990.710 - 1,8 x 10 <sup>6</sup>	931	424 - 2.433	1.461,22
F21	975.255	3,3 x10 <sup>6</sup> - 5,9 x 10 <sup>6</sup>	468	362 - 620	2.084,00
F22	1,7 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup> - 2,4 x 10 <sup>6</sup>	394	283 - 532	4.327,74
F23	1,2 x 10 <sup>6</sup>	0,2 x 10 <sup>6</sup> - 3,9 x 10 <sup>6</sup>	392	304 - 496	3.191,77

<sup>1</sup> CL<sub>50</sub> em corpos poliédricos de inclusão/ml de dieta.

<sup>2</sup> Taxa calculada através: CL<sub>50</sub> pop. resistente/CL<sub>50</sub> pop. suscetível.

O desenvolvimento de resistência de insetos a vírus entomopatogênicos em experimentos de pressão de seleção, em laboratório, tem sido documentado para várias espécies, com TR a baculovírus variando de 3 a 140 vezes, em 6,8 gerações (FUXA 1993). Portanto, as TR de *A. gemmatalis* ao seu VPN, verificadas neste trabalho, são as mais altas obtidas até hoje com baculovírus, o que mostra o elevado potencial dessa espécie em desenvolver resistência ao VPNAg. FUXA et al. (1993) cita que, a nível de campo, Martignoni (1957) detectou um aumento na taxa de resistência de 38 vezes, para uma população de *Eucosoma griseana* Hübner após uma epizootia natural de um VG. Por outro lado, resultados contrários têm sido obtidos com algumas espécies do gênero *Heliothis* que demonstraram incapacidade de desenvolver resistência quando submetidas a pressão de seleção por 23 gerações (WHITLOCK 1977) ou ainda por 25 gerações (IGNOFFO & ALLEN 1972).

Quando a população resistente encontrava-se na  $F_{16}$  ( $CL_{50} = 1,02 \times 10^6$ ; TR = 2.494 vezes) e foi liberada da pressão de seleção, pode-se observar que, de uma forma geral, não existiram marcadas diferenças nos valores de  $CL_{50}$  entre as primeiras dez gerações estudadas (Tabela 8). Esses resultados poderiam indicar, por uma parte, prevalência da resistência; mas, também, a sua progressiva perda tenha sido mascarada pela amplitude dos intervalos de

confiança obtidos das análises de próbites, uma vez que as  $CL_{50}$  diminuíram no decorrer das gerações após a liberação da pressão de seleção pelo VPNAg.

A inalteração inicial dos valores de  $CL_{50}$  com uma população de *A. gemmatalis* de Dourados, MS, quando deixada livre de pressão de seleção, foi observada por ABOT (1993). O autor observou que os intervalos de

Tabela.8. Concentrações letais médias ( $CL_{50}$ ), intervalos de confiança (95%) e taxas de resistência de uma população de *A. gemmatalis* resistente ao seu VPN, após liberada da pressão de seleção, comparada com uma população suscetível.

Geração <sup>1</sup>	$CL_{50}$ - Pop. Resistente	$CL_{50}$ - Pop. Suscetível	Taxa Resist.
F <sub>2</sub>	1.085.343 (797.152-1.563.350)	686 (395 - 1.239)	1.582
F <sub>4</sub>	1.477.945 (956.202-2.630.837)	1.234 (936 - 1.571)	1.198
F <sub>6</sub>	708.732 (506.966-1.042.521)	468 (362 - 620)	1.514
F <sub>8</sub>	583.882 (443.139- 779.918)	392 (304 - 496)	1.489
F <sub>10</sub>	633.170 (310.307-880.285)	304 (88 - 813)	2.082
F <sub>11</sub>	4.519 (106-17.154)	344 (222 - 508)	13
F <sub>13</sub>	2.529 (1.885-3.512)	490 (227 - 981)	05

<sup>1</sup> F<sub>1</sub> corresponde a F<sub>16</sub> da população resistente, quando foi retirada a pressão de seleção pelo VPN.

confiança (95%) apresentaram sobreposição, indicando que as diferenças não foram significativas, através de quatro gerações. Dados semelhantes foram obtidos por FUXA (1992), com uma população resistente ao VPN, deixada livre de contato com o vírus. As  $CL_{50}$  mantiveram-se sem diferenças estatísticas significativas por oito gerações, até atingir valores próximos aos da população suscetível.

A partir da  $F_{11}$  a população resistente e livre de pressão de seleção apresentou um expressivo decréscimo de suscetibilidade ao VPN ( $CL_{50}=4.519$  CIP/ml); no entanto, a  $CL_{50}$  da população suscetível foi de 344 CIP/ml e TR de 13 vezes (perda de 99,3 % com relação à  $F_{10}$ ). Nesta geração não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as  $CL_{50}$  das populações resistente e suscetível, baseado na sobreposição dos intervalos de confiança (95%); essa sobreposição foi devido a um aumento na amplitude dos intervalos de confiança da população resistente (106-17.154), provocada por heterogeneidade dos dados de mortalidade das larvas infectadas pelo VPN. Essa hipótese pode ser confirmada pelo fato que, na  $F_{13}$  quando a  $CL_{50}$  da população resistente sofreu um novo e expressivo decréscimo (2.530 CIP/ml), mas, ainda as respostas das duas subpopulações frente ao VPN foram significativamente diferentes, baseado, também, na não sobreposição dos intervalos de confiança (95%). Nessa geração a TR foi de apenas 5 vezes,

sofrendo, portanto, uma perda de resistência de 99,7 % com relação à F<sub>2</sub> (imediatamente após a liberação da pressão de seleção).

Pela tendência da resposta da população resistente, quando deixada livre da pressão de seleção, pode-se afirmar que houve expressiva queda da resistência a partir da F<sub>4</sub> e que, possivelmente, essa resistência seja totalmente perdida nas gerações subsequentes à F<sub>13</sub>, com valores de CL<sub>50</sub> semelhantes às da população suscetível, com Tr próxima de zero.

As altas taxas de resistência ao VPN por *A. gemmatalis*, têm sido obtidas em laboratório, mas isso não foi observado a campo (ABOT et al. 1995), esse fato pode indicar que há mecanismos naturais importantes que estão impedindo a manifestação desse fenômeno em condições de campo; um desses mecanismos pode ser o cruzamento de populações suscetíveis com populações expostas ao VPN. Esse fato foi confirmado por ABOT (1993) que cruzou uma população de *A. gemmatalis* altamente resistente ao seu VPN, com uma população suscetível ao patógeno resultando em perda total da resistência em quatro gerações. Segundo MOSCARDI (1997), os produtores de soja são favoráveis a um aumento da área tratada com VPNAg dos 8 % atuais (1.000.000 ha) para 35 % (4.000.000 ha) mas, o autor cita que não seria interessante essa expansão desde que a resistência de *A. gemmatalis* pode ser potencialmente alta se o cruzamento entre populações de insetos suscetíveis e selecionadas são reduzidas em cada região.

Os resultados obtidos nesta pesquisa significam um valioso aporte científico sobre o assunto, uma vez que, por falta de antecedentes com relação a *A. gemmatalis* servirão de referência para futuras pesquisas, visando aprofundar o conhecimento da complexa relação hospedeiro-microrganismo e os mecanismos de resistência envolvidos; para desenvolver estratégias de manejo da resistência ao VPN, caso essa venha a se manifestar em condições de campo.

## CONCLUSÕES GERAIS

- Os três isolados temporais do VPNAg (43, 102, e 106) não resultaram alterados na sua virulência quando submetidos a seis passagens seriadas no seu hospedeiro natural, *A. gemmatalis*.
- A redução nas proporções de ágar e caseína (50/50%; 30/50% e 0/50%) na dieta de *A. gemmatalis* não prejudicaram a produção do VPN.
- A melhor combinação para se obter alta produção de VPN foi obtida quando larvas de quinto ínstar foram inoculadas com 14.580 e 43.700 CIP/ml de dieta e mantidas na faixa de 29 a 32° C.
- - Fêmeas de *A. gemmatalis* sobreviventes ao VPN, não foram afetadas em relação a sua fecundidade e fertilidade; no entanto, o peso das pupas foi significativamente reduzido e a longevidade e tempo de oviposição foram maiores para as fêmeas da população resistente.
- A reversão da resistência de *A. gemmatalis* através da retirada da pressão de seleção, alcançou valores de 99,7 em 13 gerações.

## BIBLIOGRAFIA

ABOT, A.R. Avaliação da Resistência de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera:Noctuidae) ao seu Vírus de Poliedrose Nuclear Nuclear *Baculovirus anticarsia*. UFPR, Curitiba-PR; 71 pp., Tese de Mestrado.

ABOT, A.R.; F. MOSCARDI; J.R. FUXA; D.R. SOSA-GÓMEZ & A.R. RICHTER. Susceptibility of Populations of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae) from Brazil and the United States to a Nuclear Polyhedrosis Virus. **J. Entomol. Sci.**, v. 30, n. 1, p.62-69, 1995

ABOT, A.R.; F. MOSCARDI; J.R. FUXA; D.R. SOSA-GÓMEZ & A.R. RICHTER. Development of Resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and United States to a Nuclear Polyhedrosis Virus Under Laboratory Selection Pressure. **Biological Control**, n. 7, p.126-130, 1996.

ALLEN, G.E.; C.M. IGNOFFO. The Nucleopolyhedrosis Virus of *Heliothis*:

Quantitative In Vivo Estimates of Virulence. **J. Invert. Pathol.** n.13,

p. 378-381, 1969.

ALLEN, G.E.; J.D. KNELL. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia*

*gemmatalis*: ultrastructure, replication, and pathogenicity. **Florida Ent.**

v. 90, p.233-240, 1977.

BATISTA, T.F.C. Fatores que limitam a eficiência de *Baculovirus anticarsia*

sobre *anticarsia gemmatalis* Huebner, 1818 (Lepidoptera:Noctuidae).

Univ. Fed. De Pelotas, Brasil, Tese de Mestrado, 1997.

BERINO, E.C.S. Determinação da atividade biológica de isolados geográficos

e temporais de VPN de *anticarsia gemmatalis* Huebner, 1818

(Lepidoptera:Noctuidae). Univ. Fed. RS, Porto Alegre, Brasil, Tese de

Mestrado, 1995.

BIEVER, K.D.; D.L. HOSETTER. Activity of the Nuclear-Polyhedrosis

Virus of the Cabbage Looper Evaluated at Programmed Temperature

Regimes. **J. Invert. Pathol.**, n. 18, p. 81-84, 1971.

BOUCIAS, D.G.; G.L. NORDIN. Interinstar Susceptibility of the Fall

Webworm, *Hyphantria cunea*, to its Nucleopolyhedrosis and Granu

losis Viruses. **J. of Invert. Pathol.**, n. 30, p. 68-75, 1977.

BOUCIAS, D.G.; D.W. JOHNSON; G.E. ALLEN. Effects of Host Age,

Virus dosage, and Temperature on the Infectivity of Nucleopolyhedrosis

Virus Against Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, Larvae.

**Environ. Entomol.**, n.9, p. 59-61, 1980.

BRIESE, D.T.; H.A. MENDE; T.D.C. GRACE; P.W. GEIER. Resistance to

Nuclear Polyhedrosis Virus in the Light-Brown Apple Moth *Epiphyas*

*postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). **J. of Invert. Pathol.**, n.36, p.211-

215, 1980.

BRIESE, D.T. Genetic Basis for Resistance to a Granulosis Virus in the

Potato Moth *Phthorimaea operculella*. **J. of Invert. Pathol.**, n.39, p. 215-218,

1982.

BUCHER, G.E.; W.J. TURNOCK. Dosage Responses of the Larval Instars  
of the Bertha Armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera:Noctuidae)  
to a Native Nuclear Polyhedrosis. **Can. Entomol. n.115**, p. 341-349, 1983

BURGES, H.D.;N.W. HUSSEY. Introduction. In: Burges H.D.; Hussey, N.W.  
(Eds.). **Microbial Control of Insects and mites.**, N.Y.Academic Press, 1971,  
p.1-11.

CARNER, G.R.; S.G. TURNIPSEED. Potential of a nuclear polyhedrosis  
virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. **J. Econ.**  
**Entomol.**,v.70 p.608-610, 1977.

CHAUTANI, A.R.; D. CLAUSSEN. Rearing Douglas-Fir Tussock Moth  
Larvae on Synthetic Media for the Production of Nuclear-Polyhedrosis  
Virus. **J. of Econ. Entomol.**, v.61, n.(1-3), 1968.

CURTIS, C.F.; L.M. COOK; R. WOOD. Selection for and against insecticide  
resistance and posible methods of inhibiting the evolution of resistance in  
mosquitoes. **Ecol. Entomol. V.3**, p. 273, 1978

DAVID, W.A.L.; S. ELLABY; G. TAYLOR. The effect of Reducing the Content of Certain Ingredients in a Semisynthetic Diet on the Incidence of Granulosis Virus Disease in *Pieris brassicae*. **J. of Invert. Pathol.**, n. 20, 332-340, 1972.

DOANE, CH. C. Bioassay of Nuclear-Polyhedrosis Virus Against Larval Instars of the Gypsy Moth. **J. of Invert. Pathol.**, n.9, p.376-386, 1967.

FUXA, J. *Spodoptera frugiperda* Susceptibility to Nuclear Polyhedrosis Virus Isolates with Reference to Insect Migration. **Environ. Entomol.** n.16, p.218-223, 1987.

FUXA, J.R.; F.L. MITCHELL; A.R. RICHTER. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep.:Noctuidae) to a Nuclear Polyhedrosis Virus in the Field and Laboratory. **Entomophaga**, v.33, n.1, p. 55-63, 1988.

FUXA, J.R.; A.R. RICHTER. Reversion of Resistance by *Spodoptera frugiperda* to Nuclear Polyhedrosis Virus. **J. Invert. Pathol.**, v. 53, p. 52-56, 1988.

FUXA, J.R. Insect Control With Baculoviruses. **Biotech. Adv.**, v.9, p. 425-

442, 1991

FUXA, J.R.; A.R. RICHTER. Virulence and Multigeneration Passage of

Nuclear Polyhedrosis Virus Selected for a Increase Rate of Vertical

Transmission. **Biological Control**, v.2, p. 171-175, 1992.

FUXA, J.R.; AR. RICHTER; M.S.STROTHER. Detection of *anticarsia*

*gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in predatory arthropods and parasitoids

after viral release in Louisiana soybean. **J. Econ. Entomol.** N.22, p. 51-60,

1993.

GETZIN, L. Mass rearing of viruses-free cabbage loopers on artificial diets. **J.**

**Insect Pathol.** V.4, P. 486, 1962

GOMES, S.A.Reações de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) ao seu virus

de Poliedrose Nuclear: espostas a isolados geográficos, suscetibilidade de

instares larvais, consumo e controle em *Triticum aestivum* L. Tese de

Mestrado, UFPR, Curitiba, 1995.

HEDLUND, R.C.; W.G. YENDOL. Gypsy Moth Nuclear-Polyhedrosis Virus

Production as Related to Inoculating Time, Dosage and Larval Weight.

**J. of Econ. Entomol.**, v. 67, n.1, p. 61-63, 1974.

HOFFMAN-CAMPO, C.B.; E.B. de OLIVEIRA; F. MOSCARDI. Criação

Massal da Lagarta da Soja, *Anticarsia gemmatalis*. Embrapa, Doc. 10.,

pp. 23, 1985.

HUNTER, D.K.; P.L. HARTSELL. Influence of Temperature on Indian-

Meal Moth Larvae Infected with a Granulosis Virus. **J. of Invert. Pathol**

v. 17, p. 347-349, 1971.

IGNOFFO, C.M. Production and Virulence of a Nuclear-Polyhedrosis Virus

from Larvae of *Trichoplusia ni* (Hubner) Reared on a Semisynthetic Diet.

**J. of Insect Pathol.** , v.6, p. 318-326, 1964.

IGNOFFO, C.M. Standardization of Products Containing Insect Viruses. **J. of**

**Invert. Pathol.**, v.8, p.547-548, 1966

IGNOFFO, C.M. Effects of Age on Mortality of *Heliothis zea* and *Heliothis*

*virescens* Larvae Exposed to a Nuclear-Polyhedrosis Virus. **J. of Invert.**

**Pathol.**, v.8, n.2, p. 282, 1966.

IGNOFFO, C.M. Effects of Temperature on Mortality of *Heliothis zea*

Larvae Exposed to sublethal Doses of a Nuclear-Polyhedrosis Virus.

**J. of Insect Pathol.**, v.8, n.2, p. 290-292, 1966

IGNOFFO, C.M.; M. SHAPIRO; W.F. HINK. Replication and Serial

Passage of Infectious *Heliothis* Nucleopolyhedrosis Virus in a

Established Line of *Heliothis zea* Cells. **J. of Invert. Pathol.**, v.18,

p. 131-134, 1971

IGNOFFO, C.M.; G.E. ALLEN. Selection for Resistance to a Nucleo-

Polyhedrosis Virus in Laboratory Populations of the Cotton Bollworm

*Heliothis zea*. **J. of Invert. Pathol.**, v. 20, p.187-192, 1972.

IGNOFFO, C.M. Development of a Viral Insecticide: Concept to

commercialization. **Exp. Parasitol.** N.33, p. 380, 1973.

JOHNSON, D.W.; D.B. BOUCIAS; C.S. BARFIELD; G.E. ALLEN. A

Temperature-Dependent Developmental Model for a Nucleopolyhedrosis

Virus of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:

Noctuidae). **J. of Invert. Pathol.**, v. 40, n.2, p.292-298, 1982.

MAGNOLER, A. Bioassay of Nucleopolyhedrosis Virus Against Larval

Instars of *Malacosoma neustria*. **J. of Invert. Pathol.**, v. 25, p.343-

348, 1975.

MORALES, L.; F. MOSCARDI; S. GRAVENA. Potencial do baculovirus de

*Autographa californica* (Speyer) no controle de *Chrysodexis includens*  
(Walker) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lep.:Noctuidae). **Pesq.**

**Agrop. Bras.**, Brasília, v.28, n.2, p. 237-243, 1993

MORALES L.; F. MOSCARDI. Comparação entre duas Metodologias de

Bioensaios para Vírus Entomopatogênicos. **An. Soc. Entomol. Brasil**,  
v.22, n.3, p.535-540, 1993.

MOSCARDI, F.; C.S. BARFIELD; G.E. ALLEN. Effects of Temperature

on adult Velvetbean Caterpillar Oviposition, Egg Hatch and Longevity.

**Ann. of Entomol. Soc. of Am.**, v.74, p.167-171, 1981.

MOSCARDI, F.; J.E. MARUNIAK; I.L. SOLDORIO; F. PARO. Estabilidade de *Baculovirus anticarsia* após passagens sucessivas em populações naturais de *Anticarsia gemmatalis*. **Embrapa, Resultados de Pesquisa**, 1988.

MOSCARDI, F.; D.R. SOSA-GÓMES. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: **Pest Management in Soybean**, Ed. LG Copping, MB Green, RT Rees, pp. 98-109. London/New York:Elsevier, 1992.

MOSCARDI, F.; D.R. SOSA-GÓMES. Utilización de vírus a campo. In: **Microorganismos Patógenos Empleados em el Control microbiano de Insectos Plaga**, Ed. R.E. Lecuona, pp. 261-76. Buenos aires: Taller Mariano Mass, 1996

MOSCARDI, F.; L.G. LEITE; C.E. ZAMATARO. Production of Nuclear Polyhedrosis Virus of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae) Effect of Virus Dosage, and Host Density and Age. **An. Soc. Ent. Bras.** n.26, p.121-132, 1997.

MOSCARDI, F. Biological Control in soybeans: Use of a Baculovirus Against the Soybean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. 6<sup>th</sup>. General Conference of the Third World Academy of Sciences, Rio de Janeiro, sept. 7-11, 1997.

POTTER, K.N.; P. FAULKNER; E.A. MACKINON. Strain selection during Serial Passage of *Trichoplusia ni* nuclear Polyhedrosis Virus. **J. Virology**, v.18, n.3, p. 1040-1050, 1976.

POTTER, K.N.; R.P. JAQUES; P. FAULKNER. Modification of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus Passaged in vivo. **Intervirolgy**, n.9, p. 76-85, 1978.

ROTHMAN, L.D.; J.H. MYERS. Nuclear Polyhedrosis Virus Treatment Effect on Reproductive Potential of Western Tent Caterpillar (Lepid.: Lasiocampidae). **Environ. Entomol.**, v.23, n.4, p. 864-869, 1994.

ROLLINSON, W.D.; H.B. HUBBARD; F.B. LEWIS. Mass Rearing of the European Pine Sawfly for Production of the Nuclear Polyhedrosis Virus. **J. of Econ. Entomol.** , v.63, n.1, p. 343-344, 1970.

SHAPIRO, M. In Vivo Production at Otis Air Base, Mass. **USDA For Serv.**

**Tech. Bull.**, v. 1584, p. 464-467, 1981.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; F. MOSCARDI. Producción de Virus Patógenos de

Ácaros e Insectos. **IN: Lecuona, R.E. Microorganismos Patógenos**

**Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plagas.**, Cap. 19,

p. 223, 236, 1996.

SPARKS, TH.; A. SPARKS. Microprobit 3.0, Lilly Research Labs.,

Greenfield, Indiana, EUA, 1987.

SPENCER, N.R.; N.C. LEPLA; G.A. PRESSER. Sodium Alginate as a

Gelling Agent in Diets for the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*. **Ent. Exp.**

**& Appl.**, v.20, p. 39-42, 1976.

STAIRS. G.R.; T. FRASER; M. FRASER. Changes in Growth and Virulence

of a Nuclear Polyhedrosis Virus from *Choristoneura fumiferana* after

Passage in *Trichoplusia ni* and *Galleria melonella*. **J. Invert. Pathol.**,

v.38, p. 230-235, 1981.

THOMPSON, C.G. Thermal Inhibition of Certain Polyhedrosis Virus

Diseases. **J. of Insect Pathol.**, v.1, p. 189-192, 1959.

TVERMYR, S. Effect of Nuclear Polyhedrosis Virus in *Neodiprion sertifer*

(Geoffr.)(Hymenoptera:Diprionidae) at Different Temperatures.

**Entomophaga**, v. 14, n. 3, p. 245-250, 1969.

VAIL, P.V.; I.M. HALL. The Influence of Infections of Nuclear-Polyhedrosis

Virus on Adult Cabbage Loopers and Their Progeny. **J. of Invert. Pathol.**

v. 13, p. 358-370, 1969.

VAIL, P.V.; S.J. ANDERSON; D.L. JAY. New Procedures for Rearing

Cabbage Loopers and Other Lepidopteous Larvae for Propagation of

Nuclear Polyhedrosis Virus. **Environ. Entomol.**, v. 2, n. 3, p.339-344.

VANDERZANT, E.; M.C. POOL; CH. RICHARDSON. The Role of

Ascorbic Acid in the Nutrition of Three Cotton Insects. **J. Ins. Physiol.**

v.8, p.287-297, 1962.

WHITLOCK, V.H. Failure of a strain of *Heliothis armigera* (Hubn.)

(Noctuidae:Lepidoptera) to Develop Resistance to a Nuclear Polyhedrosis

Virus and a Granulosis Virus. **J. Ent. Ssoc. Sth. Afr.**, v.40, n.2, p.251-

253, 1977.