**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Controle microbiano da traça-da-batata, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), com granulovírus

Gabriel Moura Mascarin

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2009**

Gabriel Moura Mascarin
Engenheiro Agrônomo

**Controle microbiano da traça-da-batata, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873)
(Lepidoptera: Gelechiidae), com granulovírus**

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Mascarin, Gabriel Moura

Controle microbiano da traça-da-batata, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873)
(Lepidoptera: Gelechiidae), com granulovírus / Gabriel Moura Mascarin. - - Piracicaba, 2009.
118 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Controle Biológico 2. Baculoviridae 3. Batata 4. Tomate 5. Traças 6. Vírus dos insetos
I. Título

CDD 632.78
M395c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A minha mãe, ANGELA, e meu irmão, BRUNO
Aos meus avós, AGAMENON e ANA
A minha querida companheira, NILCE
E ao meu amigo e célebre Prof. SÉRGIO (*in memoriam*)

OFEREÇO E DEDICO

**“Há homens que lutam um dia, e são bons;
Há outros que lutam um ano, e são melhores;
Há aqueles que lutam muitos anos, e são muito bons;
Porém há os que lutam toda a vida
Estes são os imprescindíveis”**
(Bertold Brecht)

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprendizagem e qualificação.

Ao meu ilustre mentor, Prof. Sérgio Batista Alves, pela honra do convívio, amizade inestimável, ensinamentos, orientação e incansável apoio moral e profissional (*in memoriam*).

Ao Prof. Dr. Ítalo Delalibera Júnior pela orientação, amizade e paciência.

Aos professores do Departamento de Entomologia (ESALQ/USP) pelos preciosos ensinamentos e empenho em suas disciplinas.

À bióloga Solange Aparecida Vieira-Barros pela amizade e suporte técnico no laboratório.

A todos os colegas que são ou foram do laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos e de outros laboratórios dos setores de Entomologia e Acarologia: Daian Guilherme Pinto de Oliveira, Giuliano Pauli, Juan Humberto Guarín Molina, Luciana Savoi Rossi-Zalaf, Rogério Biaggioni Lopes e Weliton Dias da Silva pela amizade e companheirismo ao longo desses anos de ESALQ.

Aos meus grandes amigos Rafael Bigoto e Thiago de Araújo Mastrangelo, pelo convívio e pelas alucinantes e inesquecíveis aventuras.

A todos de minha família, especialmente a minha mãe Ângela, que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial participando de cada etapa da minha vida.

A minha inseparável companheira, Nilce N. Koberi, meu esteio e motivação!

À bibliotecária Sílvia Zinsly pela atenção e correção da estrutura deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de estudo que possibilitou a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	13
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ABREVIACÕES.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Objetivos.....	21
1.2 Revisão bibliográfica.....	21
1.2.1 Aspectos econômicos da cultura da batata.....	21
1.2.2 Importância e danos de <i>Phthorimaea operculella</i>	22
1.2.3 Métodos de controle de <i>Phthorimaea operculella</i>	24
1.2.4 Baculovírus.....	28
1.2.5 Nomenclatura de baculoviroses.....	31
1.2.6 Uso de baculovírus para controle de pragas no Brasil.....	31
1.2.7 Modo e mecanismo de ação dos baculovírus.....	34
1.2.8 Efeitos subletais de baculovírus nos seus hospedeiros.....	36
1.2.9 Resistência de insetos a baculovírus.....	37
1.2.10 Produção de baculovírus.....	39
1.2.11 Formulação de vírus entomopatogênicos.....	41
1.2.12 Vírus de granulose de <i>Phthorimaea operculella</i>	42
Referências.....	46
2 POTENCIAL DE UM ISOLADO BRASILEIRO DE GRANULOVÍRUS (<i>PhopGV</i>) PARA CONTROLE DE <i>Phthorimaea operculella</i> (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE).....	54
Resumo.....	54
Abstract.....	55
2.1 Introdução.....	56
2.2 Desenvolvimento.....	57
2.2.1 Material e métodos.....	57
2.2.1.1 Criação de <i>Phthorimaea operculella</i> em condições de laboratório.....	57
2.2.1.2 Material de origem e preparo do inóculo de <i>PhopGV</i>	60
2.2.1.4 Virulência de <i>PhopGV</i> sob diferentes temperaturas em tubérculo de batata.....	62
2.2.1.5 Suscetibilidade de <i>Phthorimaea operculella</i> ao <i>PhopGV</i> aplicado na parte aérea de batata.....	64
2.2.1.6 Suscetibilidade de <i>Tuta absoluta</i> ao granulovírus (<i>PhopGV</i>) isolado de <i>Phthorimaea operculella</i>	65
2.2.1.7 Persistência de <i>PhopGV</i> aplicado em tubérculos de batata.....	66
2.2.1.8 Efeito da infecção viral na contagem total de hemócitos de <i>Phthorimaea</i> <i>operculella</i>	67
2.2.1.9 Determinação do equivalente larval (EL) a partir de lagartas infectadas de <i>Phthorimaea operculella</i> por <i>PhopGV</i>	68
2.2.1.10 Análises estatísticas.....	68

2.2.2 Resultados.....	71
2.2.2.1 Virulência de <i>PhopGV</i> sob diferentes temperaturas em tubérculo de batata.....	71
2.2.2.2 Suscetibilidade de <i>Phthorimaea operculella</i> ao <i>PhopGV</i> aplicado na parte aérea de batata.....	80
2.2.2.3 Suscetibilidade de <i>Tuta absoluta</i> ao granulovírus (<i>PhopGV</i>) isolado de <i>Phthorimaea operculella</i>	80
2.2.2.4 Persistência de <i>PhopGV</i> aplicado ao tubérculo de batata.....	83
2.2.2.5 Efeito da infecção viral na contagem total de hemócitos de <i>Phthorimaea operculella</i>	84
2.2.2.6 Determinação do equivalente larval (EL) a partir de lagartas infectadas de <i>Phthorimaea operculella</i> por <i>PhopGV</i>	85
2.2.3 Discussão.....	86
2.3 Considerações finais.....	92
Referências.....	92
3 EFICÁCIA DE GRANULOVÍRUS (<i>PhopGV</i>) NA FORMULAÇÃO EM TALCO E COM PRODUTOS À BASE DE NIM NA MORTALIDADE LARVAL DE <i>Phthorimaea operculella</i> (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE).....	97
Resumo.....	97
Abstract.....	98
3.1 Introdução.....	99
3.2 Desenvolvimento.....	101
3.2.1 Material e métodos.....	101
3.2.1.1 Insetos e vírus.....	101
3.2.1.2 Nim e formulação de <i>PhopGV</i>	102
3.2.1.3 Efeito de <i>PhopGV</i> , DalNeem [®] e NeemAzal [®] na mortalidade larval de <i>Phthorimaea operculella</i>	103
3.2.1.4 Efeito da formulação pó seco de <i>PhopGV</i> na mortalidade larval de <i>Phthorimaea operculella</i>	104
3.2.1.5 Análises estatísticas.....	105
3.2.2 Resultados.....	107
3.2.2.1 Efeito de <i>PhopGV</i> , DalNeem [®] e NeemAzal [®] na mortalidade larval de <i>Phthorimaea operculella</i>	107
3.2.2.2 Efeito da formulação em pó seco de <i>PhopGV</i> na mortalidade larval de <i>Phthorimaea operculella</i>	110
3.3 Discussão.....	111
3.4 Considerações finais.....	114
Referências.....	115

RESUMO

Controle microbiano da traça-da-batata, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), com granulovírus

A traça-da-batata, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), é praga-chave da batata (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae), causando sérios prejuízos em países produtores do mundo inteiro, com danos que podem atingir 100% em tubérculos armazenados. O uso de inseticidas químicos para controle de *P. operculella* geralmente aumenta os custos de produção, gera resíduos tóxicos e causa intoxicações nos produtores. O controle biológico é uma alternativa desejável para ser incorporado no Manejo Integrado de Pragas (MIP). O granulovírus, *PhopGV* (Baculoviridae), é um importante inimigo natural de *P. operculella*, causando epizootias frequentes nas populações dessa praga. O presente trabalho investigou o potencial de um isolado nativo de *PhopGV* sobre a fase larval de *P. operculella* a diferentes temperaturas de incubação em tubérculo (18, 24 e 30 °C) e na parte aérea de batata. Estudos relacionados à persistência do vírus aplicado em tubérculos e aos efeitos subletais da infecção viral sobre o peso pupal e o sistema imune de lagartas desse inseto foram executados. A suscetibilidade de um hospedeiro alternativo ao vírus, a traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepid.: Gelechiidae), foi avaliada em folhas de tomateiro (*Solanum lycopersium* L., Solanaceae). Em outros bioensaios, avaliou-se o efeito combinado de dois produtos à base de nim (DalNeem® e NeemAZAL®) com *PhopGV* sobre a mortalidade larval e rendimento de lagartas infectadas de *P. operculella*. Uma formulação em pó seco do vírus com talco foi desenvolvida para conferir proteção aos tubérculos. As temperaturas de incubação não afetaram a suscetibilidade de lagartas de *P. operculella* ao vírus, nem o rendimento de lagartas infectadas e a proporção de lagartas não recuperadas nos bioensaios em tubérculos. Porém, esses parâmetros foram altamente dependentes da concentração viral e 100% de mortalidade larval foi obtida a partir de 1×10^6 OB.mL⁻¹. Apesar de não ter ocorrido diferenças no rendimento de lagartas infectadas entre as temperaturas, o período de incubação até a coleta destas lagartas foi menor a 30 °C. Na parte aérea, lagartas de *P. operculella* foram menos suscetíveis ao patógeno do que em tubérculos, sugerindo aplicação de diferentes dosagens do vírus para lavoura de batata e tubérculo armazenado. O vírus demonstrou alta persistência durante o armazenamento, mantendo-se viável por até 60 dias com mortalidade > 80%. A transmissão do vírus da lagarta para pupa em baixas concentrações ($< 1 \times 10^6$ OB.mL⁻¹) foi confirmada. As pupas infectadas não apresentaram pesos diferentes daquelas sadias. A infecção viral provocou drástica redução no número total de hemócitos circulantes na hemolinfa de lagartas doentes. A melhor combinação de vírus com nim foi obtida pela mistura de 4 ppm DalNeem + 1×10^4 OB.mL⁻¹ *PhopGV*, que resultou em maior mortalidade larval do que os agentes aplicados sozinhos. NeemAzal teve efeito antagônico na mistura com *PhopGV* em razão da baixa mortalidade larval registrada. O vírus formulado com talco proporcionou altos níveis de mortalidade (> 70%) nas concentrações $< 5 \times 10^6$ OB.mL⁻¹ do que o vírus não formulado. *PhopGV* pode ser produzido *in vivo* em tubérculos de batata a 24-30 °C, e a sua combinação com talco ou DalNeem, ambos em baixas concentrações, foi muito eficiente contra *P. operculella*, devendo ser considerada em programas de manejo integrado.

Palavras-chave: Granulovírus; *Phthorimaea operculella*; *Solanum tuberosum* *Tuta absoluta*; *Solanum lycopersicum*; Persistência; Sistema imune; Nim; Formulação em talco

ABSTRACT

Microbial control of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), using a granulovirus

The Potato Tuber Moth (PTM), *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), is a major pest of potato causing up to 100% damage worldwide, especially under storage conditions. The use of chemical pesticides to control PTM usually increases production costs, generates toxic residues and farmer intoxications. Biological control is a desired alternative to be incorporated in Integrated Pest Management (IPM) programs. The granulovirus, *PhopGV* (Baculoviridae) is one of the most important natural enemies of PTM, frequently causing epizootics in host populations. The current research focused on basic studies to evaluate the potential of *PhopGV* to control PTM at different incubation temperatures (18, 24 e 30 °C) on potato tuber and on foliage. Investigations about virus persistence were done for treated tubers, and side-effects due to viral infection were assessed on pupal weight and immune system of PTM larvae. The susceptibility of a related host, the tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepid.: Gelechiidae), to the virus was also investigated on tomato leaves (*Solanum lycopersium* L., Solanaceae). In order to improve larval mortality by the pathogen, the virus was tested at different concentrations in combination with two neem products (DalNeem[®] and NeemAZAI[®]), and *PhopGV* was also tested in talc dust formulation. All tested temperatures did not affect the susceptibility of PTM larvae to *PhopGV*, neither the yield of infected larvae nor the rate of larvae not recovered on tuber bioassays. These parameters were highly dependent on the virus concentration and concentrations $> 1 \times 10^6$ OB.mL⁻¹ resulted in 100% larval mortality. Although the yield of infected larvae did not vary among the temperatures, the incubation period until the harvest of these larvae was shorter at 30 °C. On potato foliage, PTM larvae were less susceptible to the virus than on tubers, indicating that different virus dosages must be used for applications in field and storage conditions. The pathogen showed high persistence resulting in more than 80% larval mortality 60 days post-treatment. The transmission of the virus from larva to pupa at lower virus inoculum ($< 1 \times 10^6$ OB.mL⁻¹) was confirmed. However, the infected pupae had similar weights to those healthy ones. Infected larvae presented much lower densities of haemocytes compared to uninfected larvae. The best combination of *PhopGV* and neem products was achieved by the mixture of 4 ppm DalNeem with 1×10^4 OB.mL⁻¹ *PhopGV*, which resulted in higher PTM mortalities than both agents applied alone. NeemAzal had antagonistic effect when mixed with *PhopGV* resulting on reduced larval mortality. The talc dust formulation of virus promoted higher mortalities ($> 70\%$) at concentrations $< 5 \times 10^6$ OB.mL⁻¹ than to nonformulated virus. *PhopGV* can be produced *in vivo* on potato tubers at 24-30 °C, and the use of this virus in combination with talc or DalNeem, both at lower concentrations, was very efficient against PTM and must be considered in integrated management programs.

Keywords: Granulovirus; *Phthorimaea operculella*; *Solanum tuberosum*; *Tuta absoluta*; *Solanum lycopersicum*; Persistence; Immune system; Neem; Talc dust formulation

LISTA DE FIGURAS

1.1 Representação esquemática da morfologia dos corpos de oclusão de dois tipos de baculovírus, NPV, “single” NPV (SNPV) e “multiple” NPV (MNPV), e o tipo básico de GV contendo apenas um vírion.....	29
1.2 Ciclo da infecção sistêmica de um granulovírus no seu hospedeiro.....	36
2.1 Material utilizado na criação de <i>Phthorimaea operculella</i> em laboratório.....	59
2.2 Ciclo biológico de <i>Phthorimaea operculella</i> em condições de laboratório (25 ± 1 °C, UR $\geq 50\%$ e 12 h fotofase).....	60
2.3 Sintomatologia da granulovirose no hospedeiro e método de produção <i>in vivo</i> de <i>PhopGV</i> em condições de laboratório.....	62
2.4 Unidade experimental dos bioensaios utilizando tubérculo de batata como fonte de alimento para lagartas de <i>Phthorimaea operculella</i>	64
2.5 Material vegetal utilizado no experimento de <i>PhopGV</i> aplicado em parte aérea....	65
2.6 Material e unidades experimentais do bioensaio de virulência de <i>PhopGV</i> sobre <i>Tuta absoluta</i>	66
2.7 Relação concentração-mortalidade entre patógeno e hospedeiro descrita pelo modelo binomial complemento log-log.....	76
2.8 Curvas de concentração letal ajustadas com o modelo CLL para as relações entre concentração viral e mortalidade de lagartas de <i>Phthorimaea operculella</i> em tubérculos incubados a 18, 24 e 30 °C, em parte aérea e de lagartas de <i>Tuta absoluta</i> após aplicação de diferentes concentrações de <i>PhopGV</i>	77
2.9 Rendimento de lagartas de <i>Phthorimaea operculella</i> infectadas e recuperadas em tubérculos incubados a 18, 24 e 30 °C (A) e em parte aérea de batata a 22 °C (B) após aplicação de diferentes concentrações de <i>PhopGV</i>	78
2.10 Proporção de lagartas não recuperadas de <i>Phthorimaea operculella</i> em tubérculos incubados a 18, 24 e 30 °C (A) e em parte aérea de batata a 22 °C (B) após aplicação de diferentes concentrações de <i>PhopGV</i>	79
2.11 Porcentagem de lagartas infectadas ($\pm$ EP) de <i>Tuta absoluta</i> 15 dias após inoculação com diferentes concentrações de <i>PhopGV</i>	82
2.12 Frequência ($\pm$ EP) dos ínstaras larvais de <i>Tuta absoluta</i> 15 dias após exposição das lagartas neonatas a diferentes concentrações de <i>PhopGV</i>	82
2.13 Sintomas da infecção viral causada por <i>PhopGV</i> em lagartas e pupas de <i>Tuta absoluta</i>	83
2.14 Hemócitos provenientes da hemolinfa de lagartas sadias e doentes de último instar de <i>Phthorimaea operculella</i>	85
3.1 Etapas do preparo da formulação de <i>PhopGV</i> em pó seco de talco.....	105
3.2 Sintomas de lagartas de <i>Phthorimaea operculella</i> mortas por <i>PhopGV</i> e pela mistura do vírus com produtos à base de nim.....	110

LISTA DE TABELAS

2.1 Parâmetros usados no modelo CLL, estimativas das concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₀) e potências relativas e seus respectivos intervalos de confiança (ICs 95%) para a relação entre concentração viral e mortalidade.....	74
2.2 Persistência de <i>PhopGV</i> em tubérculos tratados e armazenados por diferentes períodos.....	84
2.3 Efeito de diferentes períodos de armazenamento de tubérculos tratados com <i>PhopGV</i> e não tratados (testemunha) no peso médio de pupa e na incidência da infecção viral em pupas de <i>Phthorimaea operculella</i>	84
2.4 Determinação do equivalente larval (EL) para lagartas de <i>Phthorimaea operculella</i> infectadas por <i>PhopGV</i>	86
3.1 Efeito de <i>PhopGV</i> e dois produtos à base de nim na mortalidade larval de <i>Phthorimaea operculella</i>	108
3.2 Interação de <i>PhopGV</i> com dois produtos à base de nim na mortalidade larval de <i>Phthorimaea operculella</i> , analisada pelo teste de Chi-quadrado (GL=1).....	109
3.3 Porcentagem de lagartas de <i>Phthorimaea operculella</i> infectadas e recuperadas de tubérculos tratados com <i>PhopGV</i> e dois produtos à base de nim.....	109
3.4 Mortalidade larval de <i>Phthorimaea operculella</i> após tratamento com vírus não formulado e vírus formulado em talco.....	111

LISTA DE ABREVIACÕES

AZA	Azadiractina (ingrediente ativo do nim)
cm	Centímetro
PVC	Cloreto de polivinil
CL ₅₀ ou CL ₉₀	Concentração letal para matar 50% ou 90% dos indivíduos de uma população
OB	Corpos de oclusão protéicos (<i>occlusion bodies</i>)
cv	Cultivar
Da	Dalton ($1,66 \times 10^{-27}$ kg)
EL	Equivalente larval
exp	Exponencial na base 10 (10^x)
g	Força gravitacional [$g = (1,118 \times 10^{-5}) * R * S^2$, onde R é o raio do rotor da centrífuga em centímetros, e S é a velocidade dada em rpm]
g	Grama
°C	Grau Celsius
GL	Grau de liberdade
h	Hora
i.a.	Ingrediente ativo
IC	Intervalo de confiança
SLS	Lauril sulfato de sódio
Lepid	Lepidoptera
L	Litro (1 dm^3)
Log	Logaritmo na base 10
μL	Micro litro (10^{-6} cm^3)
μm	Micrômetro (10^{-6} m)
mg	Miligrama (1 cm^3)
mL	Mililitro (10^{-3} cm^3)
mm	Milímetro (10^{-3} m)
min	Minuto
CLL	Modelo Complemento Log-Log
nm	Nanômetro (10^{-9} m)
ppm	Partes por milhão
PhopGV	<i>Phthorimaea operculella</i> granulovírus
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Potência relativa
C:E	Regime de claro e escuro
rpm	Rotações por minuto
TL ₅₀	Tempo letal para matar 50% dos indivíduos de uma população
UR	Umidade relativa do ar
UV	Ultravioleta
GV	Vírus de granulose (granulovírus)
NPV	Vírus de poliedrose nuclear (nucleopoliedrovírus)

1 INTRODUÇÃO

No cenário agrícola atual, a pressão da sociedade por alimentos isentos de agrotóxicos, a preocupação com a poluição ambiental, a exigência de boas práticas de manejo, a certificação de produtos agrícolas pelos países exportadores e, finalmente, a crescente valorização do mercado de orgânicos exercem, indubitavelmente, uma forte pressão na adoção de estratégias mais limpas e seguras no tocante ao manejo das pragas agrícolas. Tal efeito está aumentando em escala global e exercerá fundamental contribuição para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras, menos agressivas e que levem em consideração os aspectos sociais, econômicos e ambientais. Nesse sentido, abrem-se oportunidades para o emprego de vírus entomopatogênicos dentro do contexto de agricultura sustentável, como mais uma ferramenta na regulação de lepidópteros-praga.

Os vírus entomopatogênicos constituem uma importante arma biológica na regulação de populações de insetos-pragas com potencial para infectar mais de 1.000 espécies, principalmente representantes da ordem Lepidoptera. Nessa categoria, enquadram-se os vírus envoltos por uma capa protéica, denominados de baculovírus, cuja família é Baculoviridae. Esses vírus são os mais estudados por serem mais facilmente encontrados na natureza e devido à sua notável capacidade de causar epizootias no campo, contribuindo para manter o nível populacional abaixo do dano econômico. Logo, são considerados promissores para desenvolvimento de produtos microbianos. Por outro lado, esses patógenos são muito sensíveis às adversidades climáticas, especialmente à radiação ultravioleta (UV) que pode provocar sua inativação total dependendo do tempo de exposição. Não obstante, agentes bióticos e abióticos, como vento, chuva, pássaros, inimigos naturais e até mesmo o homem, podem atuar na disseminação dessas viroses no ambiente.

No tocante à família dos baculovírus, esta é composta por dois grupos congregados nos gêneros *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) denominados *vírus* da poliedrose nuclear e *Granulovirus* (GV) conhecidos como vírus de granulose. O primeiro é mundialmente conhecido pelo *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV = *Anticarsia gemmatalis* nucleopoliedrovírus) usado extensivamente para o controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* L., Ledip.: Noctuidae). Esse vírus chegou a ser aplicado em mais de 2 milhões de hectares de soja por ano no Brasil. Os GVs possuem partículas menores e singulares, com formato granular. Esses vírus possuem alta especificidade ao hospedeiro, sendo restritos à família da praga-alvo e, portanto, são

seletivos a insetos benéficos e inócuos ao homem. No entanto, poucas pesquisas têm se dedicado a estudar os GVs como bioinseticidas, seja pela falta de incentivo ou pela dificuldade em se trabalhar com esse grupo.

Na América Latina, o sucesso dos GVs tem sido relevante, onde são empregados em larga escala para controle de *Cydia pomonella* (L.) (Lepid.: Tortricidae) em pomares de maçã, pêra e nozes no Chile e Argentina, e visando ao controle das traças *Tecia solanivora* (Povolny) e *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepid.: Gelechiidae) em tubérculos de batata, sob condições de armazenamento na Colômbia, Bolívia, Peru e Venezuela. Outros países fora da América do Sul também estudam esses agentes virais para o biocontrole de lepidópteros em suas culturas.

No Brasil, o uso de GVs no controle biológico de pragas tem sido pouco explorado, mesmo havendo um mercado potencial em culturas frutíferas de clima temperado e tropical, grandes culturas, hortaliças e cultivos florestais. Atualmente, o único caso de uso prático de um GV é para o controle da lagarta-mandarová *Erinnyis ello* L. (Lepid.: Sphingidae), praga-chave da cultura da mandioca, porém é um programa de pequena escala.

A despeito do sistema agrícola convencional praticado fatidicamente para a cultura da batata no Brasil, a utilização de produtos microbianos à base de baculovírus assume papel preponderante em programas de manejo da traça *P. operculella*, a qual tem sido controlada, exclusivamente, por inseticidas químicos altamente tóxicos. Aplicações rotineiras e freqüentes têm resultado em desequilíbrios biológicos e ressurgência de pragas, devido à eliminação de inimigos naturais. As vantagens dos GVs são inúmeras, merecendo destaque a sua importância para o manejo da resistência da praga e a agregação de valor ao produto agrícola.

O uso de GV (*PhopGV* = *Phthorimaea operculella* granulovírus) para proteção da parte aérea e tubérculos de batata contra *P. operculella* constitui-se num componente interessante a ser incorporado em programas de manejo integrado, semelhante ao que tem sido feito com o NPV de *A. gemmatilis*, visando ao racionamento da aplicação de agrotóxicos. Dessa forma, esta pesquisa contemplou estudos básicos da relação patógeno-hospedeiro fornecendo subsídios à produção e aplicação prática de um isolado de granulovírus para o controle de *P. operculella*.

1.1 Objetivos

Determinar:

- A virulência do granulovírus por meio da concentração letal (CL₅₀) para fase larval de *P. operculella* sob diferentes temperaturas de incubação em tubérculo e na parte aérea de batata;
- A persistência do granulovírus aplicado em tubérculos de batata;
- O impacto da doença viral sobre o sistema imunológico do hospedeiro mediante contagem total de hemócitos;
- A equivalência larval por meio da quantificação do inóculo viral produzido em lagartas infectadas de último ínstar de *P. operculella*;
- A suscetibilidade do hospedeiro alternativo, *Tuta absoluta*, ao granulovírus isolado de *P. operculella*;
- A interação de nim (azadiractina) com granulovírus (*PhopGV*) sobre a mortalidade larval de *P. operculella*;
- Efeito da formulação de pó seco de *PhopGV* sobre a mortalidade larval de *P. operculella* visando ao tratamento de tubérculos para fins de armazenamento.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Aspectos econômicos da cultura da batata

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é originária da América do Sul e é uma das culturas que desempenha importante papel na alimentação humana, sendo uma das fontes de subsistência das populações, juntamente com o trigo, o arroz e o milho. A produção mundial de batata em 2007 foi de 321,7 milhões de toneladas. A China contribuiu com 22% dessa produção, seguida da Rússia. O Brasil posicionava-se em 21º lugar entre os maiores produtores em 2005. A área colhida de batata no Brasil foi estimada em 144.400 ha em 2008, sendo considerada muito aquém do seu real potencial de produção (FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2009).

Na América do Sul, a produção de batata se concentra em quatro países: Colômbia, Peru, Brasil e Argentina. O Brasil, apesar de não aparecer entre os dez principais países produtores

mundiais de batata, é um forte concorrente nesse continente, pois ocupa os 3º e 5º lugares em termos de área e produtividade, respectivamente. As regiões Sul e Sudeste são as principais produtoras, e o estado de Minas Gerais ocupa a liderança nacional (RESENDE et al., 1999).

O estado de São Paulo, segundo o Projeto Lupa (SÃO PAULO, 2009), é um importante centro produtor de batata inglesa, concentrando a maior parte de sua produção no sudoeste paulista, representado pelas regiões de Itapetininga e Avaré, e no leste, pela região de São João da Boa Vista.

1.2.2 Importância e danos de *Phthorimaea operculella*

Conhecida vulgarmente como traça-da-batata, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepid.: Gelechiidae) é um inseto oligófago que ataca preferencialmente solanáceas e destaca-se como uma das principais pragas da batata inglesa, ocorrendo em todas as regiões mundiais que cultivam essa planta (VON ARX et al., 1990; ZUCCHI et al., 1993). É originária da América do Sul, sendo favorecida por condições de clima quente e seco. Pode ser encontrada desde o sul da Europa até a Austrália e Nova Zelândia, e desde os Estados Unidos até o Japão (RAMAN; ALCÁZAR, 1992). Além disso, causa os maiores danos a essa cultura nos climas tropical e mediterrâneo da Índia, Filipinas, Tailândia, África do Norte, Peru e Oriente Médio (GELERNTER; TRUMBLE, 1999). MIRANDA FILHO et al. (2003) corroboram com outros autores no sentido de que, atualmente, *P. operculella* é uma das principais causas de descarte de tubérculos na colheita e beneficiamento no Brasil, e sua importância vem aumentando em condições de campo nos últimos anos.

Os adultos são mais ativos no período noturno, sendo que durante o dia permanecem refugiados nas folhas das plantas de batata, na vegetação próxima às lavouras ou sob torrões de solo e detritos. Os adultos possuem a característica de copularem poucas horas após a emergência e iniciam a oviposição antes de um dia (GAMBOA; NOTZ, 1990; BRISOLLA et al., 2002). Machos e fêmeas têm coloração acinzentada, com as asas anteriores exibindo pequenas manchas irregulares escuras e ornadas com pêlos nas bordas; as asas posteriores são branco-acinzentadas (BRISOLLA et al., 2002).

Durante a fase adulta, que dura entre 10 e 15 dias, as fêmeas ovipositam nas folhas, principalmente junto às nervuras da superfície inferior, nos pecíolos, nos brotos e gemas. Nos armazéns, a postura é realizada nas caixas, sobre os tubérculos ou nos estrados (BRISOLLA et al., 2002).

Os ovos são pequenos, medindo cerca de 0,5 mm, lisos, ovalados, de coloração branca ou amarelada, tornando-se escuros momentos antes da eclosão (BRISOLLA et al., 2002). As lagartas de *P. operculella* eclodem cerca de 5 dias após a oviposição. Inicialmente de coloração branca a amarelada, podem exibir tonalidade verde clara ou rosada e medir entre 10 e 12 mm de comprimento ao final do desenvolvimento larval. Possuem cabeça marrom e uma placa dorsal retangular escura no primeiro segmento torácico (BRISOLLA et al., 2002).

Duas semanas após a eclosão, as lagartas formam pupas em folhas secas, sob torrões de solo, em restos de cultura, nas caixas ou nas paredes e pisos dos armazéns. As pupas medem em torno de 6 mm e são marrom-avermelhadas, apresentando uma proteção, geralmente, por um casulo confeccionado de fios de seda e detritos, fora da galeria do tubérculo. O período pupal dura de 15 a 20 dias, emergindo, em seguida, os adultos (GALLO et al., 2002). O ciclo de ovo à fase adulta se completa em aproximadamente 25 a 30 dias.

Essa praga ocorre em todas as épocas de plantio da batata, provocando o secamento e a destruição dos tubérculos tanto no campo quanto no armazém (ZUCCHI et al., 1993). Suas lagartas produzem um dano característico nas folhas, caule e tubérculos. Alimentam-se preferencialmente do parênquima das folhas do terço médio, abrindo amplas galerias no limbo foliar (hábito minador), contribuindo para a redução da fotossíntese da planta. Podem assumir também hábito broqueador no caule, perfurando axilas foliares e o meristema apical (GAMBOA; NOTZ, 1990). Ao atacar tubérculos, abrem galerias e deixam pelo caminho detritos (fezes), onde pode ocorrer o desenvolvimento de fungos oportunistas e bactérias causadoras de podridão. Com isso, há depreciação comercial dos tubérculos atacados, e o período de armazenamento do produto fica comprometido seriamente. Outra característica marcante do ataque de lagartas de *P. operculella* é o acúmulo de detritos e fios de seda na superfície dos tubérculos de batata, indicando os pontos de entrada do inseto.

Por se tratar de uma praga de infestação cruzada, os danos podem continuar após o transporte dos tubérculos aos depósitos, onde a praga continua o seu desenvolvimento (GALLO

et al., 2002). Em armazéns rústicos, os danos oscilam entre 30 e 86% nos tubérculos, podendo chegar a 100% em alguns lugares (ÁLCÁZAR; RAMAN, 1992). VENTURA (1992) constatou a presença de *P. operculella* em culturas de tomate, principalmente na região norte do estado de São Paulo, onde tem acarretado dificuldades de controle.

1.2.3 Métodos de controle de *Phthorimaea operculella*

O controle da traça-da-batata é realizado quase exclusivamente com inseticidas químicos, os quais, além de tóxicos e caros, ocasionam desenvolvimento de resistência do inseto, supressão dos inimigos naturais e ressurgência de outras pragas. Portanto, é necessário procurar estratégias de manejo dessa praga baseadas em componentes alternativos de controle, uma vez que nenhuma técnica isolada confere proteção adequada. As principais medidas a serem incorporadas num programa de manejo integrado da traça-da-batata se resumem em: uso de variedades de batata resistentes, controle biológico, plantas repelentes, feromônios sexuais e práticas culturais, cujo objetivo principal é reduzir o número de aplicações ou evitar o uso de agrotóxicos, a fim de diminuir os custos de produção (RAMAN; ALCÁZAR, 1992; ORTEGA, 1995).

Da mesma forma que para outras pragas, o controle químico é importante ferramenta no manejo da traça-da-batata e inúmeros ingredientes ativos, de diferentes classes e modos de ação, estão à disposição do bataticultor. Sendo assim, é fundamental tomar conhecimento adequado desses produtos e utilizá-los em rotação, retardando o desenvolvimento de populações resistentes. Para tanto, deve-se buscar aqueles produtos mais seletivos e menos tóxicos aos organismos não-alvo, incluindo o homem.

No que concerne ao controle químico em campo, o nível de dano econômico (NDE) para a traça está entre 2 e 3 lagartas/planta. Na Costa Rica, o NDE é baseado no número de adultos e está compreendido entre 60 e 80 adultos/armadilha/semana (ORTEGA, 1995). Portanto, o NDE é variável de acordo com a metodologia e o país.

O controle cultural envolve um conjunto de práticas que visam, principalmente, a evitar o acesso da traça aos tubérculos, interrompendo o ciclo da praga. Segundo BRISOLLA et al. (2002), destacam-se:

- Plantar “sementes” isentas de ovos, lagartas ou pupas da traça, evitando-se a reinfestação das lavouras;
- Preparar adequadamente o solo, evitando a formação de torrões, e plantar na profundidade adequada à época, evitando tanto o prolongamento do ciclo da cultura quanto o fácil acesso de adultos e lagartas aos tubérculos;
- Realizar amontoa adequada, mantendo os tubérculos protegidos;
- A irrigação por aspersão diminui as rachaduras no solo, dificultando o acesso de adultos e lagartas aos tubérculos;
- Eliminar outros hospedeiros da traça, principalmente outras espécies de solanáceas, das proximidades das lavouras;
- Destruir restos de cultura;
- Realizar, quando possível, a rotação de culturas;
- Uso de plantas repelentes, como nim (*Azadirachta indica*) e eucalipto (*Eucalyptus globulus*);
- Não atrasar a colheita após a senescência ou dessecação das plantas;
- Durante o beneficiamento, destruir os tubérculos atacados e utilizar armazéns limpos, desinfestados e protegidos.

Além desses métodos de controle, o manejo da traça inclui, notadamente dentro de armazéns, o uso de feromônio e armadilhas luminosas.

O feromônio (atrativo sexual da fêmea) é acondicionado em uma cápsula e colocado em uma armadilha, com o objetivo de atrair os machos da espécie. Em campo, a quantidade de machos capturados pode servir como segura orientação ao produtor no sentido de adotar medidas racionais de controle químico. Nos armazéns, o uso de armadilhas com feromônio serve tanto para monitorar a atividade da traça como para efetivamente reduzir sua população e, conseqüentemente, os danos (BRISOLLA et al., 2002).

Recomenda-se de 8 a 42 armadilhas/ha em condições de campo e 1 a 2 armadilhas/10 m² em armazéns. Deve-se também atentar para a troca da pastilha de feromônio a cada 6 meses (ORTEGA, 1995).

As armadilhas luminosas são distribuídas dentro dos armazéns sobre bandejas contendo óleo queimado ou água com detergente. As mariposas atraídas pela luz se chocam com estruturas das armadilhas e são capturadas nas bandejas (BRISOLLA et al., 2002).

O uso da resistência varietal para controle da traça consiste numa alternativa promissora, mas que ainda precisa ser mais bem pesquisada (LOPES; VENDRAMIM, 2001). Sendo assim, a busca por fatores de resistência em espécies selvagens e cultivares comerciais de batata tem motivado pesquisadores de vários países a incorporar esses genes nos germoplasmas cultivados (LOPES et al., 2000).

Várias pesquisas vêm constatando níveis elevados de resistência a insetos e ácaros em espécies selvagens, entre as quais se destaca *Solanum berthaultii* L. (GIBSON, 1971). Um dos mecanismos de defesa dessas plantas é conferido pela presença de tricomas glandulares em folhas e ramos. Esse mecanismo de resistência pode exercer efeitos negativos diretos e indiretos ao inseto, como mortalidade larval e redução da fecundidade, respectivamente. Portanto, é importante que os programas de melhoramento genético de batata levem em consideração tais fatores, de forma a contribuir para uma regulação da população da praga a níveis inferiores ao de dano econômico.

Em testes com tubérculos, o clone NYL 235-4 (híbrido de *S. tuberosum* x *S. berthaultii*) apresentou resistência a *P. operculella*, provocando redução significativa na viabilidade larval e alongamento desta fase, porém não teve efeito na redução de oviposição. Em contrapartida, os genótipos de *S. berthaultii* (PI 473331 e PI 473334) apresentaram resistência do tipo não-preferência para oviposição da traça. Portanto, a não ocorrência desse tipo de resistência no híbrido NYL 235-4 se deveu ao fato de que esse material apresenta grande número de tricomas tipo B não funcionais (sem glândulas de exsudato), o que poderia ter constituído um estímulo à oviposição da traça (LOPES; VENDRAMIM, 2001; LOPES et al., 2000).

No tocante ao uso de outros insetos no controle biológico da traça, mais de 20 espécies de inimigos naturais foram relatadas para a traça-da-batata. Destacam-se algumas espécies de micro-himenópteros da família Braconidae, como *Apanteles subandinus*, bem como representantes da família Chalcididae, que parasitam as lagartas da traça-da-batata (GALLO et al., 2002).

O parasitoide de larvas, *Copidosoma koehleri* (Hymenoptera: Encyrtidae), proporciona um parasitismo entre 30 e 90% (ORTEGA, 1995). Tem-se pesquisado também espécies e

linhagens eficientes do gênero *Trichogramma* para controle dessa praga nas culturas de batata e tomate. Em estudo realizado em 2005, em Paranapanema (SP), observou-se que o controle biológico com *Trichogramma pretiosum* foi mais eficiente (93% de controle) em relação ao controle convencional (88%), comprovando o potencial desse parasitoide de ovos na regulação da população da praga (DOMINGUES; PARRA, 2006).

Em relação ao controle microbiano desta praga, destacam-se alguns fungos, bactérias e vírus como sendo os mais promissores. Entre os fungos, *Beauveria bassiana* é o mais relatado com potencial de uso. HAFEZ et al. (1997) testaram um produto comercial à base de *B. bassiana*, Boverol[®], sobre diferentes estádios de desenvolvimento de *P. operculella* e verificaram que as lagartas de 1º e 2º instares foram mais suscetíveis que as de 3º e 4º. Ainda mais, pré-pupa e pupa infectadas resultaram em marcante decréscimo na emergência e longevidade de adultos, bem como na viabilidade e deposição de seus ovos. Com relação às bactérias entomopatogênicas, tem-se utilizado bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis*, aplicados nos tubérculos antes de armazená-los.

Por último, o vírus de granulose, *Baculovirus phthorimae* ou PhopGV (*Phthorimaea operculella* granulovírus), vem sendo utilizado na base de 5 kg da formulação pó seco por tonelada de batata-semente nos países andinos. A formulação pode ser preparada usando-se 0,03% de vírus mais 99,97% de argila como inerte (GALLO et al., 2002; ORTEGA, 1995; HERRERA, 1998). Entretanto, não há estudos de laboratório e campo avaliando a eficácia de controle da praga pelo vírus e outros aspectos relacionados à sua produção *in vivo* e formulação em condições brasileiras.

O nim é uma planta com propriedades inseticidas que tem sido largamente utilizado no controle de inúmeros insetos e ácaros pragas. Seu principal composto ativo é a azadiractina (AZA), pertencente ao grupo químico dos triterpenoides, que possui diferentes mecanismos de ação sobre a praga-alvo afetando drasticamente o desenvolvimento normal do organismo, mediante desequilíbrio hormonal e inibição da formação de quitina (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993). Não obstante, exerce efeito de repelência, deterrência e antialimentação, além de afetar a reprodução e o custo adaptativo do inseto (MORDUE et al., 1998). De forma a suprir a lenta ação dos baculovírus, trabalhos recentes demonstram que existe grande potencial na associação de nim com esses patógenos, cuja interação é, na maioria das vezes, positiva, ou seja,

de natureza aditiva ou sinérgica, destacando o nim como um agente acelerador ou potencializador do processo de infecção viral (RAGURAMAN et al., 2004). A grande maioria dos trabalhos explorou apenas as associações entre nim-NPV-hospedeiro, uma vez que os NPVs são o grupo mais estudado como bioinseticidas para lepidópteros, enquanto por outro lado há escassez de pesquisas envolvendo GVs.

1.2.4 Baculovírus

Existem mais de 1.000 viroses de insetos distribuídas em quase todas as ordens. Muitas dessas enfermidades ocorrem, naturalmente, em insetos de importância agrícola. Os baculovírus têm sido estudados como agentes de controle biológico desde a década de 1960 (PAYNE, 1986). Devido à sua alta especificidade e ocorrência natural, os baculovírus são ótimos candidatos a serem usados em programas de manejo integrado de pragas (MOSCARDI, 1999; TANADA; KAYA, 1993).

As baculoviroses, ao infectarem o inseto-hospedeiro, multiplicam-se nos tecidos até, eventualmente, causar sua morte. São, portanto, parasitos obrigatórios e intracelulares. A morte do inseto pode ocorrer rapidamente, dentro de 48 horas, ou demorar de 10 a 25 dias em alguns casos, dependendo do tipo de baculovírus, da idade e dose ingerida pelo hospedeiro.

Os vírus infectam os insetos por via oral. Normalmente, as partículas virais são ingeridas com o substrato vegetal consumido pelo inseto, tais como folhas, órgãos de reserva, talos etc. A contaminação por meio dos ovos dos insetos é possível via interna e externa, por contaminação do córion, a qual é mais freqüente. A contaminação de larvas recém-nascidas é facilitada pelo hábito de comer o córion dos ovos.

Atualmente, a família Baculoviridae congrega dois gêneros: o *Nucleopolyhedrovirus* (vírus da poliedrose nuclear = NPV) e o *Granulovirus* (vírus de granulose = GV), sendo que as unidades infectivas virais encontram-se protegidas por cristais protéicos (corpos de oclusão, do inglês *occlusion bodies* = OB) na forma de poliedros ou grânulos, respectivamente (MURPHY et al., 1995) (Figura 1.1). Esses dois gêneros são distinguidos pela morfologia e composição dos corpos de oclusão e pela citopatologia que eles provocam no hospedeiro (BONNING, 2005; FEDERICI, 1997). Os NPVs produzem grandes poliedros (tipicamente com 1-5 µm de diâmetro)

podendo conter vários nucleocapsídeos envoltos por uma membrana comum (denominados de “multiple NPVs” = MNPV) ou podem ainda abrigar partículas contendo apenas um nucleocapsídeo por envelope e são denominados de “single NPVs” (SNPV). Os GVs produzem pequenos corpos de oclusão ou grânulos de aspecto baciliforme (150 nm de diâmetro por 200-600 nm de comprimento) com um único vírion (nucleocapsídeo + envelope).

Figura 1.1 - Representação esquemática da morfologia dos corpos de oclusão de dois tipos de baculovírus, NPV, “single” NPV (SNPV) e “multiple” NPV (MNPV), e o tipo básico de GV contendo apenas um vírion. Legendas: vírion (VIR), nucleocapsídeo (NC), matriz protéica (MP), envelope (ENV), capsídeo (CAP) e material genético formado por duas fitas duplas de DNA e proteínas (DP)

Os NPVs são divididos em dois grupos com base na relação filogenética (HERNIOU et al., 2001). Grupo I dos NPVs apresentam 17 genes que estão ausentes no grupo II. Os dois grupos têm distintas proteínas de fusão do envelope, com GP64 no grupo I, e F (fusão) no grupo II. Os GVs são classificados de acordo o tropismo histológico: GV do tipo 1, como *Trichoplusia ni* GV, inicia a infecção do hospedeiro via tecido epitelial do mesêntero, porém sua replicação fica restrita ao tecido adiposo. Uma vez que outros tecidos não são afetados, a infecção pode ser prolongada com letargia apenas um ou dois dias antes da morte. Para o tipo 2 de GV, o processo de infecção é semelhante ao dos NPVs, pois são capazes de infectar diversas células-alvo do

hospedeiro, característica da infecção poliorganotrópica, enquanto o GV do tipo 3 é restrito ao epitélio do mesêntero (monorganotrópica) (BONNING, 2005). *Harrisina brillians* GV é o único granulovírus do tipo 3 caracterizado até o presente momento e causa doença aguda (FEDERICI, 1997). A patogenicidade das doenças provocadas por NPV tem sido mais estudada em detalhe em comparação à de GV. Uma diferença fundamental entre a citopatologia das infecções de NPV e GV é que a membrana nuclear se rompe durante a replicação do GV, mas não para NPV, resultando na mistura de citoplasma e nucleoplasma. (WINSTANLEY; CROOK, 1993). Células infectadas por GV separam-se uma das outras e da membrana basal, resultando na proliferação de células regenerativas adjacentes à membrana basal, as quais se tornam infectadas quando se diferenciam.

A segurança dos vírus entomopatogênicos ao homem e a outros animais vertebrados está bem relatada na literatura. Mais de vinte espécies de vertebrados, incluindo o homem, já foram sistematicamente expostas à maioria desses vírus. Não foram detectados casos de toxicidade viral ou patogenicidade em animais vertebrados. Os inseticidas microbianos à base de vírus são considerados seguros para o homem e outros animais (IGNOFFO, 1973). No Brasil, desde 1979, o AgMNPV vem sendo utilizado pelos sojicultores em área superior a 1 milhão de hectares. Durante mais de 17 anos, o emprego do vírus envolveu o contato de trabalhadores com altas concentrações desse patógeno durante a produção e utilização, não se tendo notícias de qualquer problema de saúde.

O possível perigo da ingestão de partículas de vírus, sobretudo através dos alimentos consumidos pelos herbívoros e pelo homem, parece ser pequeno com NPV e GV (LECUONA, 1986). Entretanto, devem-se adotar medidas de precaução para pessoas que trabalham na produção e aplicação dos agentes virais para reduzir o risco de reações alérgicas pelo contato com os mesmos na pele e nos olhos.

Além de bioinseticidas, os baculovírus podem ser utilizados como vetores de expressão de genes heterólogos. Uma grande variedade de proteínas de importância na medicina e na agricultura está sendo produzida, em níveis elevados, em células de insetos usando baculovírus como vetores de expressão (CASTRO et al., 1999).

Em comparação aos NPVs, os GVs são, geralmente, mais específicos, parecendo ter sua infectividade restrita à família do seu inseto-hospedeiro original. Além disso, os GVs não são

tóxicos a mamíferos e a outros insetos benéficos, como abelhas, bicho-da-seda, parasitoides e predadores (GRÖNER, 1986). Para um estudo mais completo sobre evolução e outras características relacionadas aos baculovírus, pode-se consultar a revisão atualizada sobre este assunto em BONNING (2005).

1.2.5 Nomenclatura de baculoviroses

As baculoviroses são nomeadas de acordo com o gênero do vírus, com as características morfológicas, e no nome em latim do hospedeiro do qual foi isolada pela primeira vez. Esse sistema pode ser confuso porque muitas baculoviroses infectam mais de uma espécie de hospedeiro. *AcMNPV*, por exemplo, embora isolado primeiro de *Autographa californica*, pode infectar pelo menos 40 outras espécies dentro de Lepidoptera (GRÖNER, 1986). Dificuldades também surgem quanto à escolha do nome de referência a ser dado ao patógeno quando o mesmo vírus é isolado de espécies hospedeiras diferentes (por exemplo, *Rachiplusia* ou MNPV e *Anagrapha falcifera* MNPV são o mesmo agente viral infectando duas espécies diferentes de lepidóptero) (HARRISON; BONNING, 1999).

1.2.6 Uso de baculovírus para controle de pragas no Brasil

Os baculovirus têm sido isolados de uma ampla gama de invertebrados. O interesse em desenvolver esses patógenos em biopesticidas existe há mais de 40 anos. Os baculovírus possuem inúmeras vantagens sobre os inseticidas químicos convencionais que os tornam mais aceitos para o uso em programas de controle de pragas. Provavelmente a mais importante delas é sua alta especificidade em relação ao hospedeiro, já que não é nocivo aos insetos benéficos. Além disso, esses patógenos apresentam alta persistência no ambiente e são facilmente disseminados por fatores abióticos (chuva, vento, maquinários agrícolas etc.) e bióticos (pássaros, parasitoides, predadores etc.), sendo estas características desejáveis de um agente de biocontrole. Outro aspecto relevante é que podem ser produzidos localmente no próprio inseto-hospedeiro dispensando mão-de-obra intensiva e sem grandes custos, tornando sua exploração favorável em países emergentes (CORY; BISHOP, 1997).

Entretanto, o grande obstáculo na utilização prática desses patógenos tem sido a sua rápida inativação no campo, devido principalmente à ação da luz UV. Outros fatores abióticos também estão diretamente relacionados à efetividade do vírus, quando utilizado para o controle de pragas, merecendo destaque a temperatura do ambiente, pH da superfície foliar, tempo e temperatura de armazenamento do vírus (BATISTA-FILHO, 1990; SHAPIRO; ARGAUER, 1995; ALVES-JOSÉ, 1998). Nesse sentido, a formulação de baculovírus se torna crucial no seu processo de comercialização. Alguns vírus encontram-se comercialmente disponíveis sob a forma de macerado de lagartas ou como produto já formulado (RIBEIRO et al., 1998).

No Brasil, a eficiência de vírus no controle de insetos-pragas é uma realidade. Pode-se citar, como exemplos, alguns produtos aplicados na cultura da soja, milho e mandioca com *AgMNPV*, *Spodoptera frugiperda* nucleopoliedrovírus (*SfNPV*) e *EeGV*, respectivamente (RIBEIRO et al., 1998). O maior programa mundial de uso de vírus de insetos é o programa de controle da lagarta-da-soja pelo *AgMNPV*, desenvolvido pelo Dr. FLÁVIO MOSCARDI, do Centro Nacional de Pesquisas da Soja/Embrapa, em Londrina-PR, iniciado na década de 1980. Os resultados desse trabalho foram animadores, pois promoveu a redução de 70% dos custos de controle, quando comparado ao uso de agrotóxicos, além das vantagens ecológicas atribuídas à alta especificidade do produto e inocuidade ao ambiente. No final da década de 1990, estimou-se que, no Brasil, mais de 2 milhões de hectares de soja foram tratados com esse bioinseticida. Para cada 1 milhão de hectares tratados com o vírus, cerca de 1,6 milhão de litros de inseticidas não eram aplicados anualmente e, conseqüentemente, houve uma economia de milhões de dólares (RIBEIRO et al., 1998; MOSCARDI, 1999). Hoje este programa se encontra ameaçado pelo uso de inseticidas mais baratos, como os piretroides que possuem um amplo espectro de ação, combatendo também outras lagartas-praga da soja cujo vírus não tem efeito letal.

Estimulados por esse sucesso, outros programas menores têm sido testados, por exemplo: uso do vírus de granulose no controle de mandarová na cultura da mandioca e da seringueira; controle da lagarta-do-dendezeiro (*Sibine* sp.) com um vírus que provavelmente seja um densovírus; uso de um complexo poliedrose citoplasmática/densovírus no controle da lagarta *Eacles imperialis magnifica* Walker (Lepid.: Saturniidae) em cajueiro; e um vírus da poliedrose nuclear no controle da lagarta-do-cartucho do milho, *S. frugiperda* (J.E. Smith) (Lepid.: Noctuidae), e da lagarta-do-maracujazeiro (*Dione* spp.) (KITAJIMA, 1989). Outros vírus com

potencial de uso têm sido isolados de pragas importantes de culturas como a cana-de-açúcar, algodão, trigo, arroz, frutíferas, hortaliças, pastagens e florestais (RIBEIRO et al., 1998).

Um vírus de granulose, juntamente com espécies de fungos entomopatogênicos, tais como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, tem sido testado para o controle da broca-da-cana, principal praga da cana-de-açúcar no Brasil. Segundo LECUONA; ALVES (1988), em condições de laboratório, a aplicação conjunta de DsGV (*Diatraea saccharalis* granulovírus) + *B. bassiana* e DsGV + *Beauveria brongniartii* em *D. saccharalis* (Fabr.) (Lepid.: Pyralidae) melhorou a eficiência dos fungos, ficando inalterada a eficiência do vírus. Mediante um processo de seleção por passagem serial em lagartas, obteve-se aumento da eficiência de DsGV, notando-se uma redução significativa da dose letal (DL₅₀) de 40 OB/lagarta para 1 OB/lagarta ao segundo ínstar larval (PAVAN et al., 1983).

A ocorrência natural de NPV em lagartas desfolhadoras de maracujazeiro, como *Dione juno juno* (Cramer) e *Agraulis (Dione) vanillae* (L.) (Lepid.: Nymphalidae), tem provocado epizootias em vários lugares do país. A aplicação de 1×10^{11} OB/ha (= 80 EL) em campo, promoveu a manutenção de *D. juno juno* em densidades abaixo do nível de dano econômico (OLIVEIRA, 1998). As lagartas cessam a alimentação após 4 dias do tratamento, observando-se uma mortalidade de 96% após o sétimo dia (OLIVEIRA, 1998). Alguns inseticidas químicos, como carbaril, endosulfan e trichlorfon, conferem efeito sinérgico ao *Baculovirus dione* (OLIVEIRA, 1998).

No Brasil, um programa com vírus (GV) para controle da lagarta-mandarová, importante praga da mandioca e seringueira, teve início em 1980-81 pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI). No entanto, atualmente, EeGV também está sendo produzido no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e já foi usado em mais de 2.000 ha de mandioca, cuja produção do inóculo viral é ainda feita em colaboração com os produtores, por meio da coleta lagartas doentes pelo vírus no campo (OLIVEIRA, 1998).

Em 1992, a área tratada com NPV para controle de *S. frugiperda* foi de 20.000 ha (OLIVEIRA, 1998). A concentração aplicada sobre plantas de milho foi $2,5 \times 10^{11}$ OB/ha em 300 L/ha. Quando aplicado em $8,75 \times 10^{11}$ OB/ha, o controle foi praticamente igual ao químico em termos de rendimento da cultura (4.200 kg/ha). Na região sul, experimentos de campo com 30,

60, 90 e 120 g da formulação de *Sf*NPV mais 2,5 g i.a./ha de um inseticida piretroide (deltametrina) deram 34, 52, 61 e 91% de mortalidade, respectivamente (OLIVEIRA, 1998).

Em alguns países latinos, como Argentina e Chile, tem-se usado um vírus de granulose (*CpGV* = *C. pomonella* granulovírus) para o controle da mariposa *C. pomonella*, fazendo-se duas aplicações em pomares de pêra, maçã e nozes na concentração de 1×10^{11} OB/L, ou seja, calda de 0,5-0,8 L/árvore (OLIVEIRA, 1998). Atualmente, formulações do *CpGV* já se encontram disponíveis na França (Carpovirusine[®], Arysta Lifescience North America Corporation), na Suíça (Madex[®], Andermatt-Biocontrol AG), na Alemanha (Granupon[®], Hoechst AG) e na Moldávia (Virin-CP[®]) (MOSCARDI, 1998). Além desses, existem na natureza epizootias de doenças viróticas em vários outros insetos de menor importância econômica, que fazem parte dos fatores bióticos que regulam o seu nível populacional.

1.2.7 Modo e mecanismo de ação dos baculovírus

Corpos de oclusão protéicos (OB = *occlusion bodies*) de baculovírus ao serem consumidos pela fase larval do inseto juntamente com partes da planta hospedeira contaminadas iniciam o processo de infecção (Figura 1.2). No intestino médio (mesêntero), com pH altamente alcalino, os OB são dissolvidos, liberando os vírions (nucleocapsídeo + envelope), cujas membranas se fundem às membranas das microvilosidades das células epiteliais do ventrículo. Em seguida, os nucleocapsídeos migram através do citoplasma da célula e penetram através dos poros nucleares, atingindo o núcleo, onde liberam o DNA viral, dando início à transcrição dos genes do vírus e à replicação do seu genoma. Nessa fase primária de infecção, são sintetizados no núcleo apenas nucleocapsídeos, geralmente não havendo a formação de OB para a maioria dos hospedeiros, à exceção, por exemplo, de NPVs associados a larvas de himenópteros desfolhadores, nos quais a infecção se restringe às células epiteliais do ventrículo com a formação de OB, sejam eles grânulos ou poliedros dependendo do tipo de baculovírus. Os nucleocapsídeos formados no núcleo passam através da membrana nuclear e atravessam a membrana basal das células, adquirindo um novo envelope (RIBEIRO et al., 1998; MOSCARDI, 1999; GRANADOS; WILLIAMS, 1986).

Nessa fase, são chamados de “budded virions” (BV), os quais se distinguem dos vírions derivados dos OB por suas características morfológicas e a presença de proteínas específicas aos BV. Os BV, ao atingirem a hemolinfa e o sistema traqueal do inseto, espalham-se e provocam infecções secundárias a outros tecidos do hospedeiro. Nas células desses tecidos, ocorre a formação de BV que se disseminam de célula para célula. Em estágios avançados da infecção, há formação de OB, nos quais ocorre a oclusão dos vírions. Gradativamente, os núcleos das células infectadas tornam-se repletos de OB, havendo ruptura das membranas celulares e a liberação de grande quantidade de OB na hemolinfa do hospedeiro. No processo de infecção, o inseto é debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação, apresentando a característica de se deslocar para as partes superiores da planta hospedeira onde morre depois de um determinado tempo de infecção. Além disso, o inseto apresenta o corpo de aspecto opaco (branco-leitoso) em relação à lagarta sadia. Após alguns dias (varia com a espécie do hospedeiro e do vírus), o corpo do inseto se rompe, liberando grande quantidade de vírus sobre as partes adjacentes da planta (MOSCARDI, 1999).

Dessa forma, larvas infectadas ou mortas servem de inóculo para a transmissão horizontal do vírus, por meio da chuva, movimento de outros artrópodes nas plantas, bem como pela predação e parasitismo em insetos infectados (MOSCARDI, 1999). REED; SPRINGETT (1971) conduziram experimentos de campo na Austrália tratando áreas de batata com GV de *P. operculella* e verificaram que a disseminação do vírus para áreas não tratadas, a algumas milhas do local tratado, foi atribuída aos movimentos de pessoas, materiais agrícolas ou pássaros. A transmissão vertical de baculoviroses não é muito comum, porém desempenha importante papel na própria sobrevivência do patógeno e disseminação da doença a longas distâncias. Segundo REED (1971), não se constatou ainda essa forma de transmissão para o granulovírus de *P. operculella* (*PhopGV*), porém está provado que alguns baculovírus possuem essa capacidade, como é o caso do granulovírus de *C. pomonella* (*CpGV*), que tem transmissão transovariana dos parentais para os descendentes, sendo um problema sério em criações massais desse inseto (COSSENTINE et al., 2005). Segundo BONNING (2005), insetos-hospedeiros que abrigam viroses latentes não transmitem horizontalmente o vírus, mas podem transmiti-lo verticalmente.

Figura 1.2 - Ciclo da infecção sistêmica de um granulovírus no seu hospedeiro. A) Ingestão da partícula viral pela lagarta B) Infecção primária das células epiteliais do mesêntero C) Disseminação do vírus para células adjacentes e sua replicação no núcleo celular (N) com a formação do “estroma viral” (VS) D) Formação dos corpos de oclusão (OB) associada ao rompimento da membrana nuclear na fase final do processo de infecção. (Foto: GEORGE ROHRMANN, 2008, site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir&part=ch03>)

1.2.8 Efeitos subletais de baculovírus nos seus hospedeiros

Muitos estudos com patógenos em populações de Lepidoptera focam principalmente a mortalidade e suas causas diretas. Todavia, as doenças podem também reduzir a capacidade reprodutiva do hospedeiro e aumentar a sua suscetibilidade a outros agentes de mortalidade, afetando o valor adaptativo (*fitness*) da praga (ROTHMAN; MYERS, 1996). Os efeitos subletais ou secundários das infecções virais devem ser considerados como relevantes na dinâmica

populacional de lepidópteros, bem como os mecanismos fisiológicos onde interferem, quando se está avaliando o potencial da doença ao controle de um inseto-praga.

Os efeitos subletais causados por baculoviroses, principalmente pelos granulovírus, podem afetar qualquer fase ou etapa do ciclo biológico do inseto infectado, reduzindo sua capacidade adaptativa e, conseqüentemente, diminuindo suas chances de sobrevivência e multiplicação num determinado ambiente (ROTHMAN; MYERS, 1996; MOSCARDI, 1999). Esses efeitos podem ocorrer devido ao desvio das reservas energéticas do hospedeiro para suportar ou combater o patógeno, distúrbios no desenvolvimento de oócitos nas fêmeas ou mudanças hormonais induzidas pelo patógeno (O'REILLY; MILLER, 1989; BURAND; PARK, 1992). As causas desses efeitos foram estudadas em alguns trabalhos, onde os autores procuraram explicar a interação vírus-inseto infectado por meio de mecanismos fisiológicos e bioquímicos, envolvendo expressão gênica do vírus e interferência do patógeno na regulação hormonal do hospedeiro. Apesar da grande atenção atribuída ao controle de *P. operculella*, muitos estudos de patogenicidade, bioquímica e biologia molecular de baculovírus foram conduzidos usando o NPV de *Autographa californica* (AcMNPV) e pouco se conhece sobre os efeitos subletais do vírus de granulose (*PhopGV*) que infecta as lagartas da traça-da-batata.

Sendo essa doença uma baculovirose, cujo agente viral está restrito principalmente ao tecido adiposo do hospedeiro e é detentor do gene *egt* (GRANADOS; WILLIAMS, 1986), pode-se levantar a hipótese de que *PhopGV* também pode afetar a atividade de esterase do hormônio juvenil e as concentrações de ecdisteroide na hemolinfa do hospedeiro doente resultando em efeitos subletais ao mesmo.

1.2.9 Resistência de insetos a baculovírus

Resistência pode ser definida como uma alteração fisiológica em resposta à pressão de seleção oriunda da exposição ao baculovírus, resultando no decréscimo da suscetibilidade do inseto-hospedeiro ao patógeno (BONNING, 2005). O desenvolvimento da resistência às baculoviroses é um ponto-chave para o uso desses patógenos no manejo de pragas, porém tem recebido pouca atenção (FUXA, 1993). Insetos da mesma espécie coletados de diferentes locais frequentemente possuem resposta de suscetibilidade variável a um baculovírus específico,

provavelmente devido a uma exposição anterior em algumas regiões onde ocorreu seleção de populações resistentes. Resistência a um baculovírus pode variar geograficamente, conforme a frequência e níveis de exposição (FUXA, 1993). No Brasil, a resistência da lagarta-da-soja (*A. gemmatalis*) ao *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV) aumentou de acordo com o número de anos sob tratamento com esse patógeno em diferentes lugares sob condições de campo (ABOT et al., 1995). Inúmeros estudos têm demonstrado que isso é possível para selecionar hospedeiros resistentes sob pressão de seleção de diferentes baculoviroses, embora isto não seja regra geral para todas as combinações de vírus-hospedeiro (KAOMINI; ROUSH, 1988). A lagarta falsa-medideira, *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepid.: Noctuidae), apresentou aumento de 22 vezes de resistência ao seu vírus *TnSNPV* (MILKS; MYERS, 2000), não sendo observado nenhum custo adaptativo aparente associado a esta resistência que se mostrou estável na ausência da exposição viral (MILKS et al., 2002). Em contraste, a resistência a outros NPVs ou GVs está associada com a redução do peso pupal, tempo de desenvolvimento e fecundidade e fertilidade de ovos em *A. gemmatalis* (FUXA; RICHTER, 1998), *S. frugiperda* (FUXA et al., 1988) e *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lep.: Pyralidae) (BOOTS; BEGON, 1993). Devido ao custo adaptativo da resistência, notou-se que esta foi rapidamente regredida quando removeu-se a pressão de seleção pelo vírus em *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* (FUXA; RICHTER, 1998). Os mecanismos básicos envolvidos na resistência de insetos a baculoviroses foram listados por NARAYANAN (2004).

Um exemplo clássico de programa de manejo com granulovírus para controle de lepidóptero muito utilizado nos países de clima temperado se refere à aplicação de *CpGV*, em formulações comerciais, para regular a população de *C. pomonella* em pomares de maçã. Esse vírus tem sido usado há mais de 15 anos como bioinseticida para o controle dessa traça, porém já foi constatada baixa suscetibilidade de populações do inseto ao patógeno na França gerando preocupação e dúvidas na comunidade científica acerca da eficiência do vírus em condições de campo. Entretanto, na natureza existe um complexo viral de alta variabilidade genética, que confere ao patógeno a capacidade de superar a resistência daqueles indivíduos resistentes da população do inseto-hospedeiro (BERLING et al., 2009). Em virtude dessa plasticidade genética intrínseca às baculoviroses, pode-se inferir que a evolução da resistência do hospedeiro seja difícil de se estabelecer em condições naturais, porém o inverso pode ser verdadeiro quando se

lança mão da estratégia de aplicação inundativa com bioinseticidas à base de baculovírus que não costumam ter esse complexo viral.

Populações de campo de *P. operculella* na Austrália demonstraram suscetibilidade variável ao seu principal patógeno, *PhopGV* (BRIESE; MENDE, 1981). Esses mesmos autores verificaram que uma linhagem de laboratório de *P. operculella* mostrou-se a mais resistente de todas, apresentando uma DL_{50} 30 vezes maior do que algumas populações de campo. Essa população de laboratório já sofreu fortes impactos de *PhopGV* durante sua criação, o que aumentou a possibilidade de manifestar a resistência na maioria dos indivíduos. Os resultados obtidos por BRIESE (1982) sugeriram que a resistência de *P. operculella* criada em laboratório ao *PhopGV* foi determinada por um único e dominante gene autossômico, sendo essa resistência controlada por fatores mendelianos clássicos. A resistência de insetos a baculovirose em condições de campo leva um tempo consideravelmente maior para evoluir, uma vez que há fluxo gênico entre populações do hospedeiro, em virtude da presença de áreas de refúgio e devido à baixa frequência de aplicação de um bioinseticida viral (MOSCARDI, 1999).

1.2.10 Produção de baculovírus

Até o presente, vírus entomopatogênicos usados para controle de pragas são produzidos *in vivo*. O uso de um sistema *in vitro* para a produção viral é ainda economicamente inviável e com poucas chances de sucesso, em virtude do baixo rendimento de partícula viral por unidade de volume e porque o vírus normalmente perde sua capacidade infectiva para o inseto-hospedeiro após sua passagem em culturas de células (WEISS; VAUGHN, 1986). A produção desses agentes de biocontrole é simples e artesanal e é frequentemente realizada sobre o próprio inseto-hospedeiro. Em biofábricas, consegue-se obter grandes quantidades de lagartas doentes, especialmente para aqueles insetos criados em dieta artificial, permitindo assim a produção massal do vírus para ser utilizado em áreas extensas, como é o caso do *AgMNPV*. Em contrapartida, pode-se obter, em larga escala, a produção do vírus no campo pelos próprios agricultores, destacando-se o programa de produção de *PhopGV* em lagartas criadas sobre plantas e tubérculos de batata na Austrália, Bolívia, Colômbia, Peru e Venezuela.

Em sistema de produção massal de baculovírus, os fatores que mais afetam a otimização e o custo efetivo do processo da propagação *in vivo* são: escolha do hospedeiro, relação entre dose e idade (íntar) larval, condições de criação (temperatura, densidade do hospedeiro etc.) e processamento do agente viral. Esse assunto foi extensamente discutido por SHAPIRO (1986).

Alguns vírus entomopatogênicos de interesse para o controle de pragas na América do Sul são muito bem adaptados à produção em campo, onde se faz a coleta de lagartas doentes na lavoura tratada com vírus. Tanto *AgMNPV* como *EeGV* são exemplos típicos dessa abordagem. Entretanto, em virtude do hábito alimentar críptico de alguns insetos, a recuperação de lagartas infectadas na lavoura se torna difícil e onerosa. Desse modo, uma simples dieta semissintética seria muito mais viável e é o que vem sendo utilizado para a produção de NPV de *S. frugiperda*. A traça *P. operculella* é também um caso complicado, pois não há ainda uma dieta artificial adequada para sua fase larval, logo a produção é realizada nas próprias plantas ou tubérculos de batata.

No início do século 21, a crescente demanda pelo vírus *AgMNPV* levou à criação de uma biofábrica, na Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (Coodetec) em Cascavel, Paraná, para produção massal de lagartas doentes. Os insetos eram criados em caixas plásticas (30 x 35 x 12 cm), contendo 420 g de dieta artificial inoculada com vírus e recebendo cerca de 350 lagartas no início do 4º íntar larval. Após sete dias, as lagartas mortas eram coletadas e destinadas à formulação do bioinseticida COOPERVÍRUS PM®. Segundo MOSCARDI; SANTOS (2005), nessa condição, obtinha-se um rendimento médio de 35 g de lagartas mortas/caixa. A meta da empresa era produzir aproximadamente 600.000 lagartas/dia. Essa biofábrica foi, indubitavelmente, a maior do mundo envolvendo a produção de um vírus entomopatogênico, porém foi desativada em 2007, porque o custo de produção do bioproduto não era competitivo com o dos inseticidas piretroides e também devido a contaminações frequentes na criação de lagartas sadias pelo vírus via tubulações de ar (Dr. FLÁVIO MOSCARDI, Embrapa CNPSO, comunicação pessoal).

1.2.11 Formulação de vírus entomopatogênicos

A etapa de formulação representa um dos principais gargalos à comercialização de produtos microbianos à base de vírus e tem recebido pouca atenção. A formulação de agentes virais se divide em duas áreas: aquela relacionada à estabilidade durante o armazenamento (vida de prateleira) e àqueles fatores importantes à aplicação de campo. A estabilidade no armazenamento é muito mais dependente do método de processamento, mas tem sido pouco testado e existem poucas informações sobre esse assunto. O objetivo principal é produzir um preparo estável na qual a viabilidade do vírus é preservada ou mesmo aumentada. Muitos baculovírus são processados para serem usados como *sprays* (pulverizados), e as pesquisas com formulações no estado sólido são incipientes (CORY; BISHOP, 1997). Para ensaios em pequena escala, a estabilidade no armazenamento não é normalmente um problema, desde que os preparos de lagartas doentes maceradas em mistura com água ou parcialmente purificadas sejam frequentemente eficientes em campo e que se mantenham razoavelmente boas por curtos períodos quando refrigeradas ou, melhor ainda, congeladas. Isso não é prático para grandes quantidades de vírus, onde há necessidade de fugir das etapas que consomem muito tempo, como a centrifugação, e onde é importante manter níveis baixos de contaminação.

Uma vez que esses patógenos são afetados por condições ambientais adversas, como radiação UV e temperatura, sua persistência no campo pode ser diminuída, refletindo em insucesso de controle da praga-alvo. Os bioinseticidas virais são sensivelmente afetados pela radiação UV, sendo rapidamente desativados quando expostos principalmente ao espectro UV-B (280-310 nm), que é considerado o responsável também pela inativação de outros entomopatógenos (bactérias, fungos e protozoários) sob condições naturais (IGNOFFO et al., 1977). Dessa forma, o uso de inertes e outras substâncias protetoras contra a radiação UV se tornam fundamentais na aplicação desses agentes no campo, contribuindo para sua eficiência de controle ao longo do tempo (IGNOFFO; GARCIA, 1996). Com isso, pode-se manejar o binômio “concentração *versus* número de aplicações” do vírus, visto que o procedimento de aplicação tem forte participação nos custos das medidas de controle. Esse talvez seja o maior motivo da maioria das pesquisas com adjuvantes e inertes de diferentes naturezas química e física para propiciar uma proteção adequada ao vírus contra a radiação UV e lhe conferir maior estabilidade no

armazenamento. Hoje, a maioria dos produtos à base de baculovírus tem a formulação em pó molhável concentrado (WP).

O processo de formulação de vírus de insetos para fins de controle microbiano é caracterizado por ser simples e artesanal em todos os exemplos. Para *A. gemmatalis*, o NPV é aplicado pelos agricultores em forma de uma suspensão de macerado de lagartas doentes com caulim (argila) em água. O produto comercial Multigen[®] recomendado para o controle de *A. gemmatalis* era um preparo purificado feito para ser simplesmente suspenso em água para posterior aplicação (MOSCARDI, 1998; MOSCARDI, 1983).

Uma suspensão viral de GV é também obtida mediante um macerado de lagartas doentes de *E. ello* para tratar a parte aérea de mandioca. A aplicação pode ser feita com pulverizador costal ou tratorizado. As lagartas doentes e essas formulações de vírus podem ser mantidas a baixas temperaturas, geralmente entre 6 e 8 °C ou, se possível, em congelador (*freezer*) como forma de preservação do inóculo até o momento da aplicação (MOSCARDI, 1998).

Quando formulações secas de vírus são requeridas, como é o caso de NPV de *S. frugiperda* para inoculação diretamente no cartucho do milho e para tratar superfície de tubérculos com GV de *P. operculella*, mistura-se a suspensão viral, obtida de lagartas doentes maceradas, com caulim ou talco, realizando-se a pulverização após secagem do produto. Surfactantes também podem ser empregados para ajudar na melhor dispersão e adesão das partículas virais sobre substratos vegetais (OLIVEIRA, 1998).

1.2.12 Vírus de granulose de *Phthorimaea operculella*

Em diferentes partes do mundo, primeiro no Sri Lanka (STEINHAUS; MARSH, 1967) e, posteriormente, na África do Sul, Índia, Austrália, Tunísia, Peru, Quênia e Bolívia, identificaram-se lagartas de *P. operculella* mortas por um vírus do tipo granulose, pertencente à família Baculoviridae, denominando-o de *P. operculella* granulovírus (*PhopGV*). Esse granulovírus é um eficiente agente de biocontrole de lagartas de *P. operculella*, causando epizootias esporádicas em populações de campo (REED, 1971). Os corpos de oclusão caracterizam-se por uma forma oval alongada ou granular e possuem tamanho médio de 400–425 nm de comprimento por 225–250 nm de diâmetro. Cada grânulo viral contém um único nucleocapsídeo envolvido por um envelope

que, por sua vez, encontra-se embebido numa matriz protéica, composta por uma proteína em torno de 26.000 a 28.000 Da denominada de granulina (LAARIF et al., 2006). Em virtude do pequeno tamanho da partícula viral, sua observação é possível somente em microscópio eletrônico (RAMAN; ALCÁZAR, 1992). Segundo ZEDDAM et al. (1994), esse mesmo GV apresenta infecção cruzada a outra mariposa da família Gelechiidae, *Tuta absoluta* (Meyrick), a qual é a praga mais importante do tomateiro no Brasil e no Chile. Além disso, a variabilidade genética de diferentes isolados de *PhopGV* obtidos de várias regiões do mundo (Indonésia, Tunísia, Austrália, Peru, Índia) é muito pequena, o que sugere que os GVs encontrados em diferentes populações de *P. operculella* possuem a mesma origem (VICKERS et al., 1991; ZEDDAM et al., 1999). Dessa forma, presume-se que os próprios insetos envolvidos nas dispersões sucessivas (migrações) a partir do seu lugar nativo, Oeste da América do Sul, carregaram consigo seu próprio GV, o que demonstra a grande capacidade deste patógeno em sobreviver na população do seu hospedeiro sob diferentes condições ecológicas. Apesar disso, características do patógeno como virulência, produção *in vivo* e espectro de hospedeiros podem variar entre seus diferentes isolados geográficos, devendo ser estudados para cada situação. Semelhante a outros membros do gênero *Granulovirus* (MURPHY et al., 1995), presume-se que *PhopGV* não é capaz de infectar outros organismos não-alvo, sejam eles pássaros, gados ou humanos.

O sintoma típico de uma lagarta infectada por *PhopGV* é a coloração branco-leitosa, de aspecto leitoso; as lagartas adquirem movimentos lentos, incham-se ligeiramente e a morte ocorre entre os 12 e 21 dias, depois de haver ingerido o vírus. A grande maioria das lagartas tipicamente infectadas pelo vírus não consegue se transformar em pupa (LAARIF et al., 2006; RAMAN; ALCÁZAR, 1992).

Em microscópio de luz com contraste de fase, é possível observar partículas escuras com rápido e intenso movimento browniano, representando os OB de GV. Ao romper o tegumento da lagarta doente, nota-se o escorrimento de uma hemolinfa de aspecto branco-leitoso. O tecido adiposo e a hipoderme são, geralmente, os principais tecidos infectados. O tecido epitelial do intestino médio (mesêntero) é o primeiro a ser invadido pelas partículas virais, embora também ocorra colonização da matriz traqueal e dos tubos de Malpighi em estágios avançados da doença (GRANADOS; WILLIAMS, 1986). Estudos histopatológicos realizados por LAARIF et al.

(2006) provaram que *PhopGV* causa infecção poliorganotrópica em lagartas de *P. operculella*. O tecido adiposo, a epiderme e a matriz traqueal das lagartas são os principais tecidos infectados pelo vírus. Observações em microscópio eletrônico revelaram que as células de lagartas infectadas aumentam de tamanho e são acompanhadas pela ruptura da membrana nuclear em várias regiões (LAARIF et al., 2006). Consequentemente, os componentes nucleares e citoplasmáticos são misturados por toda a célula. Portanto, esse granulovírus pertence ao tipo 2, pois causa infecção sistêmica no hospedeiro, no qual a maioria dos órgãos, tais como tecido adiposo, epiderme, matriz traqueal, músculos, nervos, túbulos de Malpighi e tecidos reprodutivos e glandulares são infectados, de modo similar ao que ocorre com NPV em lepidópteros.

A produção de *PhopGV* é feita em lagartas sobre plantas de batata ou tubérculos, visto que não há ainda uma dieta artificial comercialmente disponível à criação da fase larval dessa praga. Para produção, primeiro, os tubérculos são mergulhados em uma suspensão viral de GV e, em seguida, são secados e infestados com lagartas jovens (recém-eclodidas), as quais depois são coletadas quando atingem o quarto ínstar. Por último, no Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Peru, mariposas são liberadas dentro de casas de vegetação onde há plantas de batata. Uma suspensão do vírus é aplicada sobre a folhagem das plantas e, posteriormente, infestam-nas com lagartas jovens. Lagartas doentes de, aproximadamente, quarto ínstar são coletadas e usadas como inóculo ou na formulação viral (RAMAN; ALCÁZAR, 1992; MATTHIESSEN et al., 1978).

No Peru, *PhopGV* pode ser empregado nas formas de suspensão aquosa e pó molhável para aplicá-lo via pulverização, ou em forma de pó seco para polvilhamento. Para isso, utilizam-se lagartas seja em estado fresco, congeladas ou também desidratadas (liofilizadas). Neste último caso, devem ser hidratadas antes de amolecerem (RAMAN; ALCÁZAR, 1992). Atualmente no Peru, o CIP cessou sua produção de *PhopGV*, em virtude do surgimento de outra traça de tubérculo armazenado mais importante, a espécie *Symmetrischema tangolias* (Geyen) (Lepid.: Gelechiidae), a qual não é suscetível ao vírus de *P. operculella* (JESUS ALCÁZAR (CIP, Peru), comunicação pessoal). Entretanto, o CIP já chegou a produzir cerca de 10 toneladas de *PhopGV* por ano entre 1995 e 2000.

A formulação líquida se prepara a partir do material que se obtém pela trituração de 20 lagartas infectadas, as quais se diluem em um litro de água e agregando um agente dispersante

(Triton[®] - 0,2%). Essa formulação vem sendo utilizada para controle da praga em campo. Para um hectare de batata, são recomendadas 2.000 lagartas doentes, que equivalem ao peso de 36,5 g. A aplicação do vírus proporciona de 70 a 100% de mortalidade larval. Há registro da persistência do vírus até os 60 dias depois da aplicação (RAMAN; ALCÁZAR, 1992). A aplicação pode ser realizada uma ou duas vezes durante o desenvolvimento do cultivo, dependendo do nível de infestação. Recomenda-se mais cuidado na etapa de tuberização da batata para proteger os tubérculos (RAMAN; ALCÁZAR, 1992).

No início dos anos de 1980, o CIP começou a pesquisar estratégias de manejo integrado para a traça-da-batata, resultando no desenvolvimento de um programa que foi implementado no Peru, Egito, Tunísia, Marrocos, Turquia e Iêmen (LAGNAOUI et al., 1996). GELERNTER; TRUMBLE (1999) ressaltam a importância de se adotar um programa integrado, com desenvolvimento de pesquisas e programas de educação, para se continuar obtendo sucesso no manejo integrado dessa praga.

Na Colômbia, a Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) coordena um programa semelhante junto aos produtores familiares, obtendo-se resultados animadores com o uso do vírus. Mais recentemente, o *PhopGV* está sendo utilizado naquele país para controle de outra traça na cultura da batata, denominada de *Tecia solanivora* (traça-guatemalteca-da-batata ou traça-gigante-da-batata), associado a outras medidas que integram o manejo integrado dessa praga (HERRERA, 1998).

Na Austrália, experimentos com aplicação do vírus em campos de batata foram conduzidos com sucesso (REED; SPRINGETT, 1971). Os mesmos autores verificaram efeito similar do vírus com os tratamentos químicos na prevenção de danos em batata. GUALDRÓN; NOTZ (2000) estudaram a patogenecidade de um vírus da granulose à traça-guatemalteca-da-batata e verificaram que a sua formulação em pó (50 lagartas doentes/L), com talco ou caulim (caulinita) na concentração de 5 g/kg de tubérculo, ocasionou a mortalidade larval de 97 a 100%.

Com relação à suscetibilidade de outros lepidópteros ao *PhopGV*, ALCÁZAR et al. (1992) testaram diferentes concentrações desse vírus em quatro espécies: *S. tangolias* (Gelechiidae), *T. absoluta* (Gelechiidae), *Spodoptera eridania* (Cramer) (Noctuidae) e *Bombyx mori* L. (Bombycidae). Entretanto, somente a espécie *T. absoluta* foi suscetível ao *PhopGV*, apresentando somente 4% das lagartas infectadas. Isso reforça a tese de que o isolado peruano de

PhopGV é espécie-específico para *P. operculella*, apesar de sua patogenicidade estar restrita a algumas espécies da mesma família.

Analogamente, corroborando com a informação acima, FALCON et al. (1968) demonstraram que o *CpGV*, isolado de *C. pomonella*, só foi infectivo às lagartas de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepid.: Tortricidae), que é uma praga taxonomicamente muito próxima à primeira, sendo ambas da mesma família.

PhopGV merece especial atenção por ser um importante inimigo natural *P. operculella*. Em virtude da inexistência de informações sobre as interações deste patógeno com seu hospedeiro nas condições brasileiras, tornam-se necessários estudos básicos para avaliar suas características de patogenicidade, virulência, produção *in vivo* e persistência a fim de fornecer subsídios sobre seu uso em programas de manejo integrado dessa praga. Além disso, a mistura do vírus com determinados agentes estressores (adjuvantes) pode ser viável economicamente para reduzir da sua concentração e promover a melhoria da sua ação.

Referências

- ABOT, A.R.; MOSCARDI, F.; FUXA, J.R.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; RICHTER, A.R. Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis vírus. **Journal of Entomological Science**, Tifton v. 30, p. 62-69, 1995.
- ALCÁZAR, J.; RAMAN, K.V. Control de *Phthorimaea operculella* en almacenes rústicos, empleando virus granulosis en polvo. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 35, p. 117-120, 1992.
- ALCÁZAR, J.; CERVANTES, M.; RAMAN, K.V. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 35, p. 107-111, 1992.
- ALVES-JOSÉ, L.A. **Atividade do baculovírus de *Autographa californica* (Speyer) – vEGTDEL sobre *Heliothis virescens* (F.).** 1998. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- BATISTA FILHO, A. **Estudo sobre formulações do *Baculovirus anticarsia*.** 1990. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1990.

BERLING, M.; BLACHERE-LOPEZ, C.; SOUBABERE, O.; LERY, X.; BONHOMME, A.; SAUPHANOR, B.; LOPEZ-FERBER, M. *Cydia pomonella granulovirus* genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 925-930, 2009.

BONNING, B.C. Baculoviruses: Biology, Biochemistry and Molecular Biology. In: GILBERT, L.I.; IATROU K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**, New York: Elsevier Pergamon Press, 2005. v. 6 p. 233-270.

BOOTS, M.; BEGON, M. Trade-offs with resistance to a granulosis virus in the Indian meal moth, examined by a laboratory evolution experiment. **Functional Ecology**, Oxford, v. 7, p. 528-534, 1993.

BRIESE, D.T.; MENDE, H.A. Differences in susceptibility to a granulosis virus between populations of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 71, p. 11-18, 1981.

BRIESE, D.T. Genetic basis for resistance to a granulosis virus in the potato moth *Phthorimaea operculella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 39, p. 215-218, 1982.

BRISOLLA, A.D.; NAZARENO, N.R.X.; TRATCH, R.; FURIATTI, R.S.; JACCOUD FILHO, D.S. In: _____ **Manejo integrado das principais doenças e pragas da cultura da batata: uma visão holística de controle para o estado do Paraná**. 2002. p. 35-38. (**Circular IAPAR**, 124,)

BURAND, J.P.; PARK, E.J. Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and pupation of gypsy moth larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 60, p. 171-175, 1992.

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

CORY, J.S.; BISHOP, D.H.L. Use of baculoviruses as biological insecticides. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 7, p. 303-313, 1997.

COSENTINE, J.E.; JENSEN, L.B.M.; AND EASTWELL, K.C. Incidence and transmission of a granulovirus in a large codling moth [*Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae)] rearing facility. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 90, p. 187-192, 2005.

DOMINGUES, G.R.; PARRA, J.R.P. Controle biológico por meio de liberações de *Trichogramma*: mais um aliado ao produtor no combate à traça-da-batata. **Revista Batata Show**, Itapetininga, n. 14, p. 43-45, 2006.

FALCON, L.A.; KANE, W.R.; BETHELL, R.S. Preliminary evaluation of a granulosis virus for control of the codling moth. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 61, p. 1208-1213, 1968.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: Miller, L.K. (Ed.). **The Baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p. 33-60.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Batata. In _____. **Agrianual 2009: anuário da agricultura brasileira**. São Paulo, 2009. p. 201-207.

FUXA, J.R. Insect resistance to viruses. In: BECKAGE, N.E.; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.), **Parasites and Pathogens of Insects**. New York: Academic Press, 1993. v. 2, p. 197-209.

FUXA, J.R.; MITCHELL, F.L.; RICHTER, A.R. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. **Entomophaga**, Paris, v. 33, p. 55-63, 1988.

FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Repeated reversion of resistance to nucleopolyhedrovirus by *Anticarsia gemmatilis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 71, p. 159-164, 1998.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v.10 920 p.

GAMBOA, M.; NOTZ, A. Biología de *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa (*Solanum tuberosum*). **Revista Facultad Agronomía Maracay**, Maracay, v. 16, p. 219-230, 1990.

GELERNTER, W.D.; TRUMBLE, J.T. Factors in the success and failure of microbial insecticides in vegetable crops. **Integrated Pest Management Reviews**, CIDADE, v. 4, p. 301-306, 1999.

GIBSON, R.W. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 68, p. 113-119, 1971.

GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Ed.) **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. chap.4 p.89-108.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R., FEDERICI, B.A. (Ed.). **The Biology of Baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. p. 177-202.

GUALDRÓN, L.N.; NOTZ, A. Patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Mérida, Venezuela. **Boletín de Entomología Venezolana**, Maracay, v. 15, n. 1, p. 39-48, 2000.

HAFEZ M, ZAKI FN, MOURS Y A, SABBOUR M. Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller). **Journal of Pest Science**, Berlin, v. 70, p.158-159, 1997.

HARRISON, R.L.; BONNING, B.C. The nucleopolyhedroviruses of *Rachiplusia ou* and *Anagrapha falcifera* are isolates of the same virus. **Journal of General Virology**, London, v. 80, p. 2793-2798, 1999.

HERNIOU, E.A.; LUQUE, T.; CHEN, X.; VLAK, J.M.; WINSTANLEY, D. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. **Journal of Virology**, Washington, v. 75, p. 8117-8126, 2001.

HERRERA, F. La polilla guatemalteca de la papa: biología, comportamiento y practicas de manejo integrado. **Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA)**. 2 ed. Bogotá: Corpoica., 1998. 14 p.

IGNOFFO, C.M. Effects of entomopathogens on vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 217, p. 141-164, 1973.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Simulated sunligh-UV sensitivity of experimental dust formulations of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa /Heliothis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 192-194, 1996.

IGNOFFO, C.M.; HOSTETTER, D.L.; SIKOROWSKI, P.P.; SUTTER, G.; BROOKS, W.M. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology**, College Park, v. 6, p. 411-415, 1977.

KAOMINI, M.; ROUSH, R.T. Absence of response to selection for resistance to nucleopolyhedrosis virus in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 23, p. 379-382, 1988.

KITAJIMA, E.W. Classification, identification and characterization of insect viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, p. 9-15, 1989.

LAARIF, A.; AMMAR, B.; TRABELSI, M.; BEN HAMOUDA, M.H. Histopathology and morphogenesis of the *Granulovirus* of potato tuber moth *Phthorimaea operculella*. **Tunisian Journal of Plant Protection**, Le Kef , v. 1, n. 2, p.115-124, 2006.

LAGNAOUI, A.; BEN SALAH, H.; EL-BEDEWY, R. Integrated management to control potato tuber moth in North Africa and the Middle East. **CIP Circular**, Lima, v. 22, p. 10-15, 1996.

LECUONA, R.; ALVES, S.B. Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch. and granulosis virus on *Diatraea saccharalis* (F., 1794) at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 15, p. 223-228, 1988.

LECUONA, R. **Controle microbiano de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch. e vírus da granulose, e simulação dos efeitos de sua aplicação.** 1986. 170p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

LOPES, M.T.R.; VENDRAMIM, J.D. Resistência de genótipos de batata a *Phthorimaea operculella* (Zeller). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 235-239, 2001.

LOPES, M.T.R.; VENDRAMIM, J.D.; THOMAZINI, A.P.B.W. Biologia e preferência para oviposição de *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) em folhas de genótipos de *Solanum tuberosum* (L.) e *Solanum berthaultii* (Hawkes). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, p. 319-326, 2000.

MATTHIESSEN, J.N.; CHRISTIAN, R.L.; GRACE, T.D.C.; FILSHIE, B.K. Large-scale field propagation and the purification of the granulosis virus of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 68, p. 385-391, 1978.

MILKS, M.L.; MYERS, J.H. The development of larval resistance to a nucleopolyhedrovirus in not accompanied by an increased virulence in the virus. **Evolutionary Ecology**, London, v. 14, p. 645-664, 2000.

MILKS, M.L.; MYERS, J.H.; LEPTICH, M.K. Costs and stability of cabbage looper resistance to a nucleopolyhedrovirus. **Evolutionary Ecology**, London, v. 16, p. 369-385, 2002.

MIRANDA FILHO, H.S.; GRANJA, N.P.; MELO, P.C.T. **Cultura da batata**: sobre a cultura da batata realizada em Vargem Grande do Sul, SP, maio de 2003. 68 p. (Apostila)

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 39, p. 903-924, 1993.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; SIMMONDS M.S.J.; LEY, S.V.; BLANEY, W.M.; MORDUE M.; NASIRUDDIN M.; NISBET, A.J. Actions of azadirachtin, a plant allelochemicals, against insects. **Pesticide Science**, London, v. 54, p. 277-284, 1998.

MOSCARDI, F. **Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis*.** EMBRAPA, 1983. 21 p. (Comunicado Técnico, 23)

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 15 p. 509-539.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F.; SANTOS, B. Produção comercial do nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae) em laboratório comercial In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005. Recife. **Anais simpósio de controle biológico**, Recife, 2005. p.42.

MURPHY, F.A.C.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, A.W.; JARVIS, A.W.; MARTELLY, G.; MAYO, M.E.; SUMMERS, D. (Ed.). **Virus taxonomy**: Classification and nomenclature of viruses. In: INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 6., **Archives of Virology**, supl. 10, p. 1-586, 1995.

NARAYANAN, K. Insect defence: its impact on microbial of insect pests. **Current Science**, Bangalore, v. 86, p. 800-81, 2004.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. **Science**, New York, v. 245, p. 1110-1112, 1989.

OLIVEIRA, M.R.V. South America. In: HUNTER-FUJITA, F.R.; ENTWISTLE, P.F.; EVANS, H.F.; CROOK, N.E. (Ed.) **Insect viruses and pest management**. New York: Wiley, 1998. chap.22 p.339-355.

ORTEGA, E. Tecnología para el control integrado de la palomilla de la papa. **Fonaiap Divulga**, cidade, n.48, 1995. (www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd48/texto/tecnologia.htm)

PAVAN, O.H.O.; BOUCIAS, D.G.; ALMEIDA, L.C.; GASPAR, J.O.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N. Granulosis virus of *Diatraea saccharalis* (DsGV): Pathogenicity, replication and ultrastructure. In: **INTERNATIONAL CONGRESS**, 18., Havana, 1983. Proceedings...Havana: ISSCT, 1983. p. 644-659.

PAYNE, C.C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie**, Berlin, v.32, p. 183-200, 1986.

RAGURAMAN, S.; GANAPATHY, N.; VENKATESAN, T. Neem versus entomopathogens and natural enemies of crop pests: the potential and strategies. In: KOUL, O., WAHAB, S. (Ed.). **Neem**: Today and in the New Millennium. New York: Kluwer Academic Publishers, 2004. p.125-182.

RAMAN, K.V.; ALCÁZAR, J. Control biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus phthorimaeae*. Lima, Peru: Centro Internacional de la Papa (CIP), 1992.. 19 p. (**Boletín de Capacitación CIP-2**)

REED, E.M. Factors affecting the status of a virus as a control agent for the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae)). London **Research**, London, v. 61, p. 207-222, 1971.

REED, E.M.; SPRINGETT, B.P. Large-scale field testing of a granulosus virus for the control of the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae)). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 61, p. 223-233, 1971.

RESENDE, L.M.A.; MASCARENHAS, M.H.T.; PAIVA, B.M. Aspectos econômicos da produção e comercialização de batata. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 197, p. 9-19, 1999.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M.L.; KITAJIMA, E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 14, p. 481-508.

ROTHMAN, L.D.; MYERS, J.H. Debilitating effects of viral diseases on host Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 1-10, 1996.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Instituto de Economia Agrícola. **Levantamento censitário de unidades de produção agrícola do Estado de São Paulo - LUPA 2007/2008**. São Paulo: SAA/CATI/IEA, 2008. Disponível em: <<http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

SHAPIRO, M. In vivo production of baculoviruses. In: GANADOS, R. R.; FEDERICI, B. (Ed.), **The Biology of Baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 2 p. 31-61.

SHAPIRO, M.; ARGAUER, R. Effect of pH, temperatura, and ultraviolet radiation on the activity of an optical brightener as a viral enhancer for the gipsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 88, n. 6, p. 1602-1606, 1995.

STEINHAUS, E.A.; MARSH, G.A. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 9, p. 436-438, 1967.

TANADA, Y.; KAYA, H.K. **Insect pathology**. New York: Academic, 1993. 666 p.

VENTURA, M.U. **Efeito de genótipos de *Lycopersicon* spp. sobre *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) e toxicidade dos aleloquímicos 2-tridecanona e 2-undecanona**. 1992. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

VICKERS, J.M.; CORY, J.S.; ENTWISTLE, P.F. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosus virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 57, p. 334-342, 1991.

VON ARX, R., ROUX, O., BAUMGARTNER, J. Tuber infestation by potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), at potato harvest in relation to farmers' practices. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Zurich, v. 31, p. 277-292, 1990.

WEISS, S.A.; VAUGHN, J.L. Cell culture methods for large-scale propagation of baculoviruses. In.: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Ed.) **The biology of baculoviruses**. Florida: CRC Press, 1986. v. 2, cap. 3, p. 63-88.

WINSTANLEY, D.; CROOK, N. Replication of *Cydia pomonella* granulosus virus in cell cultures. **Journal of General Virology**, London, v. 74, p. 1599-1609, 1993.

ZUCCHI, R.A.; SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O. **Guia de identificação de pragas agrícolas**. Piracicaba: FEALQ, 1993. 139 p.

ZEDDAM, J.L.; LÉRY, X.; GIANNOTTI, J.; NINO, L.; ANGELES, I.; ALCÁZAR, J. Susceptibility of different potato moth species to a same granulosus virus. In: **Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, 28, Montpellier, 1994. Proceedings...Montpellier: 1994. p. 239-240.

ZEDDAM, J.L.; POLLET, A.; MANGOENDIHARJO, S.; RAMADHAN, T.H.; FERBER, M.L. Occurrence and virulence of a granulosus virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 48-54, 1999.

2 POTENCIAL DE UM ISOLADO DE GRANULOVÍRUS PARA CONTROLE DE *PHTHORIMAEA OPERCULELLA* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) NO BRASIL

Resumo

O presente estudo demonstra o potencial de um isolado brasileiro de *PhopGV* para controlar a fase larval da traça-da-batata *Phthorimaea operculella*. A relação entre mortalidade larval e concentração viral para *P. operculella* foi investigada a diferentes temperaturas de incubação em parte aérea e tubérculos de batata. A virulência de *PhopGV* a *P. operculella* não foi afetada pelas temperaturas entre 18 e 30 °C. Lagartas tratadas em parte aérea (folhas + hastes) se mostraram menos suscetíveis ao patógeno do que lagartas tratadas em tubérculos. Os rendimentos máximos de lagartas infectadas foram semelhantes a 18, 24 e 30 °C (32, 31,4 e 34,8%, respectivamente), e estes rendimentos foram obtidos pelas concentrações virais ótimas de 41, 6,3 e 62 x 10⁵ OB.mL⁻¹. Consequentemente, a quantidade de inóculo viral para gerar os mesmos rendimentos de lagartas infectadas foi muito inferior a 24 °C do que a 18 e 30 °C. Entretanto, o tempo decorrido até a coleta das lagartas infectadas foi maior a 18 °C e menor a 30 °C do que a 24 °C. A contagem total de hemócitos em lagartas sadias de último ínstar foi 2,5 vezes maior do que nas lagartas doentes. O vírus permaneceu viável em tubérculos sob condições de armazenamento por até 60 dias, após o tratamento, com nível de mortalidade acima de 80%. O patógeno foi muito virulento também à traça-do-tomateiro *Tuta absoluta*, causando altas taxas de mortalidade, atraso no desenvolvimento larval e inibição da pupação nas lagartas infectadas. Esse isolado nativo de *PhopGV* tem potencial para controlar a fase larval de *P. operculella* em tubérculos de batata a uma ampla faixa de temperatura.

Palavras-chave: Granulovírus; Controle microbiano; *Phthorimaea operculella*; *Tuta absoluta*; *Solanum tuberosum*; *Solanum lycopersicum*; Persistência; Sistema imune

POTENTIAL OF A GRANULOVIRUS ISOLATE FOR CONTROL OF *PHTHORIMAEA OPERCULELLA* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) IN BRAZIL

Abstract

Different aspects of a Brazilian granulovirus strain, *PhopGV*, isolated from the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* were investigated with the purpose to reveal the biological control potential of this pathogen and perspectives for *in vivo* production. The relationship of larval mortality-virus concentration for *P. operculella* was determined at different temperatures on potato leaves and tubers. Virulence of *PhopGV* to *P. operculella* was not affected by temperatures from 18 to 30°C. Larvae treated on foliage proved to be less susceptible to *PhopGV* than larvae treated on tubers. The maximum yields of infected larvae were similar at 18, 24 and 30 °C (32.0, 31.4 and 34.8%, respectively) and these yields were achieved by the optimal virus concentrations of 41, 6.3 and 62 x 10⁵ OB.mL⁻¹. Consequently, the amount of virus inoculum to generate similar yields of infected larvae was much lower at 24 °C than at 18 and 30 °C. However, the time until harvest the infected larvae was longer at 18 °C and shorter at 30 °C than at 24 °C. The total haemocytes count for last instar healthy larvae were 2.5-fold higher than the infected larvae. The virus persisted viable on tubers under storage conditions for at least to 60 days post-treatment resulting in mortality above 80%. The pathogen was also highly virulence to the tomato pinworm *Tuta absoluta*, causing high mortality, delayed larval growth and inhibited pupation of infected larvae. This Brazilian *PhopGV* strain has potential to control PTM larvae on potato tubers at a broad range of temperature.

Keywords: Granulovirus; Microbial control; *Phthorimaea operculella*; *Tuta absoluta*; *Solanum tuberosum*; *Solanum lycopersicum*; Persistence; Immune system

2.1 Introdução

A praga mais prejudicial para a bataticultura mundial é a traça-da-batata *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepid.: Gelechiidae), que ocorre nas regiões subtropical e tropical e cujas lagartas perfuram folhas, ápices e caules das plantas, bem como as raízes tuberosas (RADCLIFFE, 1982; VON ARX et al., 1990). Os problemas com *P. operculella* no Brasil tem se agravado, particularmente em batata (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae) e tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Outras plantas solanáceas podem servir de hospedeiras secundárias para essa praga. Na maioria das áreas produtoras do Brasil, a batata é cultivada durante o ano todo favorecendo a ocorrência da praga com muitas gerações ao ano, as quais atingem constantemente o nível de dano econômico. Outra preocupação é que *P. operculella* permanece até o final da época de cultivo, quando os tubérculos ficam mais expostos no campo e são infestados antes ou durante a colheita. A infestação cruzada de *P. operculella* do campo para o armazém e vice-versa contribui para a sua severidade. Devido ao seu potencial biológico e poder destrutivo elevados, perdas de produção em armazéns sem refrigeração podem alcançar 100%, se o controle dessa praga for negligenciado (VON ARX et al., 1987; ALCÁZAR; RAMAN, 1992).

O manejo de *P. operculella* em batata e tabaco se baseia quase inteiramente no uso de inseticidas químicos de amplo espectro, principalmente piretroides, os quais podem causar aumento na população de moscas-brancas, tripses, afídeos e ácaros fitófagos no campo exigindo aplicações mais frequentes de pesticidas. Métodos de controle alternativo para pragas agrícolas estão em crescente demanda devido à preocupação com o ambiente e saúde alimentar. Um granulovírus altamente patogênico e específico para lagartas de *P. operculella* (denominado de *PhopGV*) foi primeiramente isolado e descrito no Sri Lanka (STEINHAUS; MARSH, 1967) e depois em diferentes países do mundo (ZEDDAM et al., 1999), demonstrando grande potencial para ser usado como bioinseticida por ser produzido localmente de forma fácil e formulado a um baixo custo. Os vários isolados geográficos de *PhopGV* encontrados nas populações de *P. operculella* pelo mundo possuem poucas diferenças em seu genoma de DNA viral, o que sugere que eles têm a mesma origem (Oeste da América do Sul), porém isso não exclui as prováveis diferenças de virulência, produção *in vivo* e espectro de hospedeiros entre eles (VICKERS et al. 1991; ZEDDAM et al. 1999). O patógeno mostrou-se tão efetivo quanto os pesticidas na prevenção de dano ao tubérculo no campo e, em condições favoráveis, pode persistir de uma

safr a outra (REED, 1971). O granulovírus é um agente de controle microbiano de sucesso que pode ser usado em programas de manejo integrado de *P. operculella*, visto que é compatível com a maioria dos métodos de controle. Além disso, o uso de um bioinseticida ajudaria a reduzir resíduos químicos, manejar a resistência de *P. operculella* a inseticidas químicos, preservar outros inimigos naturais, além de ser inócuo aos mamíferos.

Diversos países como Peru, Bolívia, Colômbia, Tunísia, Egito e Yêmen iniciaram produção local de *PhopGV* em colaboração com o Centro Internacional da Batata (CIP – Centro Internacional de la Papa) (INTERNATIONAL POTATO CENTER, 1996). Desde 2006, no laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ-USP, Piracicaba, SP, Brasil, estudos têm sido realizados para investigar diferentes aspectos de um isolado brasileiro de granulovírus. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi demonstrar o potencial de controle biológico desse patógeno e suas perspectivas de produção *in vivo* para ser aplicado em condições de campo e de armazenamento.

Bioensaios de concentração-mortalidade foram conduzidos para verificar a influência da temperatura na virulência de *PhopGV* em lagartas de *P. operculella* alimentadas com tubérculos de batata. A suscetibilidade de *P. operculella* a *PhopGV* foi comparada em tubérculo e na parte aérea de batata. A persistência de *PhopGV* aplicada em tubérculo foi estudada e mudanças no sistema imunológico de lagartas doentes também foram caracterizadas. A suscetibilidade de *T. absoluta* a *PhopGV* também foi demonstrada.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e métodos

2.2.1.1 Criação de *Phthorimaea operculella* em condições de laboratório

A criação de *P. operculella* em condições de laboratório iniciou-se a partir de lagartas coletadas de tubérculos infestados de batata (cv. Ágata) em área de batata no município de Itapetininga, São Paulo, Brasil no verão de 2006. A colônia de laboratório foi mantida em uma sala de criação a 25 ± 1 °C, UR $\geq 50\%$ e 12:12 C:E (Claro : Escuro) h fotoperíodo no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ-USP). O método de criação foi adaptado do protocolo de BRIESE (1980). Em resumo,

lagartas recém-eclodidas (neonatas) foram transferidas para tubérculos de batata (cv. Ágata) perfurados, mediante uso de um conjunto de pregos fixados a um pedaço de madeira (Figura 2.1 E). Tal perfuração teve a finalidade de facilitar a penetração dos insetos no substrato alimentar. Inicialmente, os tubérculos foram pesados para se conhecer o número exato de lagartas a serem inoculadas, utilizando-se a relação de 2 g de batata para cada lagarta (SINGH; CHARLES, 1977; PRATISSOLI et al., 2003). Os tubérculos foram colocados em caixas plásticas (32 x 19,5 x 5,5 cm), cujo fundo foi coberto com areia esterilizada, a qual serviu de abrigo para formação das pupas (Figura 2.1 B). As lagartas permaneceram alimentando-se dos tubérculos por um período médio de 2 a 3 semanas até se transformarem em pupas. As pupas foram retiradas periodicamente por meio do peneiramento da areia (Figura 2.1 C) e transferidas para uma gaiola, composta de uma armação metálica e coberta com tela de nylon, até a emergência dos adultos (Figura 2.1 D). Esses foram coletados e transferidos para gaiolas de acasalamento, confeccionadas de tubo PVC (cloreto de polivinil) com 10 cm de diâmetro por 15 a 22 cm de altura (Figura 2.1 A). A extremidade superior do tubo foi fechada com uma fina malha de nylon, afixado com elástico. Sobre o tecido, colocou-se um disco de papel-filtro com um pedaço de batata para estimular a postura das fêmeas neste mesmo lugar. A extremidade inferior foi vedada com um pedaço de papelão furado no centro, por onde foi introduzido um tubo plástico contendo solução de mel a 10%. Para que os insetos pudessem se alimentar, introduziu-se um pedaço de algodão no tubo, ficando embebido na solução para permitir o deslocamento do líquido por capilaridade. Procurou-se colocar o máximo de mariposas por gaiola (≥ 8 casais/tubo), de forma a maximizar a postura no papel-filtro. Os discos de papel-filtro contendo ovos foram retirados e mantidos em placas de Petri (15 x 2 cm), colocando-se tampa sobre tampa, vedando-as com filme plástico de PVC Magipack[®] até a eclosão das lagartas. As posturas de ovos foram coletadas duas vezes por semana e serviram tanto para manutenção da colônia como para os experimentos usando o vírus. As cartelas de ovos que sobravam por excesso eram conservadas em geladeira (5-8 °C) por no máximo três semanas. O ciclo completo do inseto é ilustrado na Figura 2.2.

Figura 2.1 - Material utilizado na criação de *Phthorimaea operculella* em laboratório. A) Gaiola de PVC para acasalamento B) Caixa plástica contendo batatas para desenvolvimento das lagartas C) Peneira para separar pupas da areia D) Gaiola para coleta de adultos E) Perfurador de batata (pregos + suporte de madeira)

Figura 2.2 - Ciclo biológico de *Phthorimaea operculella* em condições de laboratório (25 ± 1 °C, UR $\geq 50\%$ e 12 h fotofase). A) Adulto da traça-da-batata B) Postura de ovos C) Lagarta de IV instar D) Pupa do tipo obtecta E) Casulo confeccionado por fio de seda + areia + detritos

2.2.1.2 Material de origem e preparo do inóculo de *PhopGV*

O granulovírus de *P. operculella* (*PhopGV*) foi isolado de lagartas doentes encontradas na colônia de laboratório do inseto em 2006. Provavelmente, o vírus estava incubado em algumas das lagartas coletadas a partir de tubérculos infestadas do campo nessa mesma época. A propagação do agente viral foi conduzida por meio dos métodos de imersão de ovos e tubérculos descritos por SPORLEDER et al. (2005) e REED; SPRINGETT (1971). Tubérculos superficialmente perfurados e cartelas contendo ovos de *P. operculella* foram imersos numa suspensão viral durante 2 e 1 min, respectivamente, para promover a contaminação. A suspensão do vírus consistiu de 10 lagartas de último instar (IV estágio) doentes por litro de água com 0,1% de espalhante-adesivo Tween 20[®] de acordo com o protocolo do CIP (INTERNATIONAL

POTATO CENTER, 1992). Em seguida, lagartas neonatas foram contaminadas com corpos de oclusão (*occlusion bodies* = OB) ou grânulos de GV (Figura 2.3 B) após alimentarem-se do córion do ovo e dos tubérculos tratados. As lagartas infectadas foram mantidas em caixas plásticas separadas da colônia sadia no mesmo ambiente de 25 ± 1 °C, UR $\geq 50\%$ e 12:12 (C:E) h fotoperíodo (Figura 2.3 D). Lagartas infectadas que apresentavam sintomas típicos da virose, isto é, de aparência branco-leitosa e de corpo inchado (Figura 2.3 A), foram purificadas e usadas nos bioensaios.

Uma cultura-estoque de *PhopGV* foi mantida a -40 °C na forma de cadáveres liofilizados de lagartas infectadas de *P. operculella* (Figura 2.3 C). O vírus foi submetido a um processo de semipurificação descrito a seguir. Somente lagartas infectadas de último ínstar com aproximadamente $8,7 \pm 1$ mg.lagarta⁻¹ e 11 ± 1 mm de comprimento foram usadas para purificação do patógeno. As lagartas foram maceradas em cadinho com auxílio de um pistilo e homogeneizadas em solução-tampão Tris (pH 7,4) + 0.1% SLS (lauril sulfato de sódio). A suspensão foi filtrada através de tecido “voile” para remoção dos resíduos orgânicos do inseto (fragmentos orgânicos em geral). A suspensão filtrada foi transferida para tubos de centrífuga de 50 mL e completou-se o volume adicionando mais solução tampão de Tris + 0.1% SLS. A suspensão foi centrifugada a 299 g (= 1.000 rpm) durante 3 min a 4 °C. O material precipitado (*pellet*) foi descartado e a suspensão viral foi preservada em *freezer* (-40 °C) constituindo fonte de inóculo para a realização dos subseqüentes experimentos. Essa suspensão viral foi quantificada em câmara de Petroff-Hausser (Hausser Scientific, Pensilvânia, EUA) sob microscópio de luz com contraste de fase em aumento de 1000x.

Figura 2.3 - Sintomatologia da granulovirose no hospedeiro e método de produção *in vivo* de *PhopGV* em condições de laboratório. A) característica de uma lagarta de *Phthorimaea operculella* de último ínstar infectada por granulovírus B) Corpos de oclusão (OB) ou grânulos de *PhopGV* vistos em microscopia eletrônica de varredura (B) (Barra = 2 μm) C) Lagartas infectadas por *PhopGV* e liofilizadas constituindo material estoque D) Caixa plástica contendo tubérculos e ovos tratados com vírus para multiplicação do inóculo

2.2.1.4 Virulência de *PhopGV* sob diferentes temperaturas em tubérculo de batata

O efeito da temperatura de incubação na virulência de *PhopGV* foi avaliado por meio da imersão de tubérculos de batata (peso > 60 g, cv. Ágata) durante 5 min em dez suspensões virais (5×10^2 , 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 OB.mL⁻¹) acondicionadas em frascos de bquer de 2 L. O volume de cada suspensão viral foi de 400 mL.

Os tubérculos da testemunha foram imersos apenas em água destilada. Após secagem à temperatura ambiente, os tubérculos foram transferidos para copos plásticos (475 mL), considerados como as unidades experimentais (Figura 2.4 A). Uma camada circular de papelão corrugado foi colocada no fundo dos copos para promover abrigo às pupas. Lagartas neonatas (< 5 h pós-eclosão) foram transferidas aos tubérculos seguindo a proporção desejada de uma lagarta para cada 2 g de batata, segundo a recomendação de SINGH; CHARLES (1977) e PRATISSOLI et al. (2003). Após a infestação, os copos foram fechados com tampas plásticas (100 mm diâmetro) contendo uma abertura central (35 mm diâmetro), a qual foi coberta com tecido “voile” para promover ventilação (Figura 2.4 B). Os copos foram acondicionados a 30, 24 ou 18 ± 0.5 °C, UR ≥ 50% e 12:12 (C:E) h fotoperíodo em câmaras com ambiente controlado do tipo B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*). Temperaturas superiores a 30 °C não foram incluídas nesse estudo em razão de afetarem negativamente o desenvolvimento das lagartas de *P. operculella* e também a qualidade do tubérculo de batata. Grupos de 30 lagartas foram usados em cada copo (repetição). O primeiro bioensaio foi conduzido com as seguintes concentrações virais: 1 x 10⁴, 1 x 10⁵, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷, 1 x 10⁸ OB.mL⁻¹ e mais a testemunha. O segundo bioensaio consistiu de suspensões virais da ordem de 5 x 10², 1 x 10³, 5 x 10³, 5 x 10⁴, 5 x 10⁵ OB.mL⁻¹ e mais a testemunha. Cada tratamento foi repetido cinco e quatro vezes no primeiro e segundo bioensaio, respectivamente. As avaliações foram realizadas quando as primeiras pupas se formaram no grupo das testemunhas para cada temperatura testada. Durante a avaliação, os insetos foram removidos dos tubérculos e classificados como “vivos” (pupas ou lagartas sadias), “lagartas mortas pelo vírus” (lagartas infectadas incapazes de se transformar em pupa), “morte desconhecida” (lagartas ou pupas mortas por causa desconhecida), ou “lagartas não recuperadas” (lagartas que não puderam ser recuperadas porque desapareceram ou provavelmente morreram prematuramente antes do período de avaliação). As avaliações tiveram início após 15, 21 e 30 dias de incubação a 30, 24 e 18 °C, respectivamente. A proporção de mortalidade nos tratamentos foi expressa pela seguinte equação: $\frac{total - vivo}{total}$. Para medir a produção *in vivo* de *PhopGV*, determinou-se a taxa de lagartas infectadas pelo vírus, também denominada de “rendimento”, calculando-se a proporção entre o número de lagartas infectadas recuperadas e o número total de lagartas colocadas em cada repetição (= 30).

Figura 2.4 - Unidade experimental dos bioensaios utilizando tubérculo de batata como fonte de alimento para lagartas de *Phthorimaea operculella*. A) Corte transversal do copo plástico de 475 mL (tubérculo sobre camada de papelão corrugado ou areia estéril) B) Tampa plástica com furo central, coberto com tecido “voile”

2.2.1.5 Suscetibilidade de *Phthorimaea operculella* ao *PhopGV* aplicado na parte aérea de batata

Para avaliar a suscetibilidade de *P. operculella* ao *PhopGV* usando como dieta larval a parte aérea (folhagem) de batata (cv. Ágata), removeram-se de três a quatro folhas compostas, cada uma contendo de cinco a sete folíolos, a partir de plantas com 45 dias de idade, previamente cultivadas em ambiente protegido (casa de vegetação) (Figura 2.5 A). Em seguida, essas folhas de batata foram imediatamente colocadas em recipientes plásticos (575 mL) contendo água para evitar sua desidratação e manter a turgescência. Um recipiente plástico contendo de três a quatro folhas compostas (folhagem) foi considerado como a unidade experimental (Figura 2.5 B). A folhagem foi pulverizada com 5 mL das seguintes suspensões virais: 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 OB.mL⁻¹ contendo 0.1% Tween 20[®] usando um equipamento de pulverização do tipo *airbrush* (30 mL.min⁻¹) (Primar Ltda., modelo 141, 2 CV). Água destilada com 0.1% Tween 20[®] foi usada para pulverizar as parcelas da testemunha. Grupos de 25 lagartas neonatas (< 5 h pós-eclosão) foram aleatoriamente transferidos com auxílio de pincel às folhagens. Cada tratamento consistiu de quatro repetições. Os tratamentos foram mantidos durante 14 dias em sala climatizada a 22 ± 1 °C, UR $\geq 50\%$ e 12:12 (C:E) h fotoperíodo.

Decorrido esse período, quando as folhas começaram a senescer, as lagartas de todos os tratamentos foram transferidas para tubérculos acondicionados em copos plásticos a fim de permitir o completo desenvolvimento larval (vide metodologia do item 2.2.1.4). O período de avaliação ocorreu após nove dias de incubação, quando teve início a formação das pupas na testemunha. Insetos mortos e vivos foram contados durante a avaliação de acordo com a explicação do item anterior (2.2.1.4).

Figura 2.5 - Material vegetal utilizado no experimento de *PhopGV* aplicado em parte aérea. A) Cultivo de batata cv. Ágata em casa de vegetação B) Parte aérea de batata mantida em pote plástico contendo água para utilização em bioensaio

2.2.1.6 Suscetibilidade de *Tuta absoluta* ao granulovírus (*PhopGV*) isolado de *Phthorimaea operculella*

A suscetibilidade de lagartas de *T. absoluta* ao *PhopGV* foi avaliada com base na proporção de insetos mortos e lagartas infectadas. O bioensaio foi conduzido com folhas compostas (3-5 folíolos) de tomateiro (cv. Santa Clara) pulverizadas com 5 mL de seis suspensões virais + 0.1% Tween 20[®] ($1,1 \times 10^3$, $1,1 \times 10^4$, $1,1 \times 10^5$, $1,1 \times 10^6$, $1,1 \times 10^7$ e $5,54 \times 10^7$ OB.mL⁻¹) usando um equipamento de pulverização tipo *airbrush* (30 mL.min⁻¹). Plantas da testemunha foram pulverizadas com água destilada + 0.1% Tween 20[®]. Após secagem à temperatura ambiente, folhas destacadas de plantas de tomateiro foram mantidas em placas de Petri (13,5 cm diâmetro) com um pedaço de algodão úmido colocado no pecíolo para evitar desidratação (Figura 2.6). O algodão foi umedecido conforme a necessidade. Grupos de 15

lagartas neonatas (< 5 h pós-eclosão) foram transferidos para cada folha, com auxílio de um pincel. A unidade experimental foi representada por uma folha composta de tomateiro acondicionada em uma placa de Petri contendo 15 lagartas. Cada tratamento foi composto por seis repetições. Após 13 dias de incubação em uma sala climatizada (25 ± 1 °C, UR $\geq$ 50% e 12:12 (C:E) h fotoperíodo), o número total de pupas e lagartas sadias (vivos) e o número total de lagartas infectadas (mortos) foram contados conforme descrito no item 2.2.1.4.

Figura 2.6 - Material e unidades experimentais do bioensaio de virulência de *PhopGV* sobre *Tuta absoluta*. A) Distribuição ao acaso das placas (parcelas) com folhas de tomateiro em sala com ambiente controlado B) Parcela experimental representada por uma folha composta de tomateiro contendo algodão úmido no pecíolo dentro de uma placa de Petri

2.2.1.7 Persistência de *PhopGV* aplicado em tubérculos de batata

Tubérculos (peso > 60 g, cv. Ágata) tratados com o vírus foram armazenados em diferentes períodos antes da infestação com *P. operculella*, servindo de indicador da persistência de *PhopGV*. No primeiro bioensaio, a taxa de mortalidade larval foi avaliada em tubérculos tratados com duas concentrações virais (1×10^5 e 1×10^7 OB.mL⁻¹) pelo método da imersão de tubérculos em suspensão viral por 5 min. Os tubérculos da testemunha foram imersos em água destilada. Esses tubérculos foram mantidos numa sala climatizada a 23 ± 1 °C, UR $\geq$ 50% e 12:12 (C:E) h fotoperíodo. Zero, 15 e 60 dias após o tratamento, grupos de 30 lagartas neonatas (< 5 h pós-eclosão) foram transferidos para cada repetição. A mortalidade larval foi determinada aos 20 dias após a infestação dos tubérculos. Cada tratamento consistiu de quatro repetições. Num segundo bioensaio, o mesmo método foi empregado, com exceção de que a infestação larval

ocorreu após 6, 15 e 30 dias de armazenamento dos tubérculos, e grupos de 15 lagartas neonatas foram transferidos para cada repetição. Nesse experimento, pupas oriundas das parcelas da testemunha e das parcelas tratadas com vírus foram coletadas para determinar seu peso pupal (apenas fêmeas) e a taxa de infecção pupal após 20 dias da infestação. Pupas foram pesadas dentro de 48 h da pupação.

2.2.1.8 Efeito da infecção viral na contagem total de hemócitos de *Phthorimaea operculella*

O efeito de *PhopGV* sobre o sistema imunológico de *P. operculella* foi avaliado de forma indireta pela contagem de hemócitos totais (CHT) da hemolinfa de lagartas infectadas. Um grupo de lagartas foi contaminado com 5×10^6 OB.mL⁻¹ de *PhopGV* pelo método de imersão de tubérculo e um outro grupo não contaminado foi usado como testemunha. Dois grupos de 15 lagartas cada foram separados, sendo um utilizado como tratamento e outro como controle (testemunha). As lagartas com 24-48 h após atingir o último ínstar (11 ± 1 mm comprimento e $8,53 \pm 0,2$ g por lagarta) foram esterilizadas superficialmente com álcool 70%. As lagartas infectadas foram coletadas de tubérculos tratados com uma concentração viral de 5×10^6 OB.mL⁻¹ (~ 1 Equivalente Larval/L de água destilada). Todas as lagartas se encontravam vivas, até mesmo aquelas infectadas, e foram coletadas separadamente de duas colônias distintas, uma sadia e outra contaminada pelo vírus, após 15-20 dias da infestação dos tubérculos (25 ± 1 °C, UR $\geq$ 50% e 12:12 (C:E) h fotoperíodo). Cada lagarta foi delicadamente perfurada com uma agulha na região abdominal ventral para extravasar a hemolinfa. Gotas de hemolinfa foram coletadas com uma micropipeta e diluídas 1:9 (v/v) em tubo de microcentrífuga do tipo eppendorf® contendo solução tampão com anticoagulante para inseto (98 mM NaOH, 0,15 M NaCl, 1,7 mM EDTA, pH 4,5). O tubo de microcentrífuga foi agitado em vórtex e todos os hemócitos presentes na alíquota de hemolinfa foram contados em câmara de Neubauer (Optik Labor, Suíça) sob microscópio de luz com contraste de fase no aumento de 400x.

2.2.1.9 Determinação do equivalente larval (EL) a partir de lagartas infectadas de *Phthorimaea operculella* por *PhopGV*

Lagartas infectadas de último ínstar de *P. operculella* pelo *PhopGV* foram medidas quanto ao seu comprimento e pesadas. A metodologia para produção do vírus, inoculação e desenvolvimento foram similares ao item 2.2.1.2 (25 ± 1 °C, UR $\geq$ 50% e 12:12 (C:E) h fotoperíodo). Três amostras compostas contendo 14, 49 e 60 lagartas infectadas por *PhopGV* foram esterilizadas superficialmente com álcool 70% e maceradas usando o conjunto cadinho + pistilo em suspensão com 35, 30 e 40 mL de solução tampão Tris + 0,1% SLS, respectivamente. As suspensões foram filtradas através de tecido “voile” para remoção dos resíduos orgânicos das lagartas (fragmentos orgânicos grosseiros). Os corpos de oclusão foram quantificados em câmara de Petroff-Hausser com auxílio de microscópio de luz com contraste de fase no aumento de 1000x.

2.2.1.10 Análises estatísticas

Um modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo CLL), também conhecido como modelo de gompit, foi usado para descrever a relação entre concentração viral e a probabilidade de mortalidade acumulada, levando em consideração os dados de mortalidade natural oriundos da testemunha (C) (ROBERTSON; PREISLER, 1992). Todos os dados de mortalidade dos bioensaios de virulência envolvendo a aplicação de diferentes concentrações de *PhopGV* foram analisados pelo modelo CLL. A variável resposta apresentou distribuição binomial com probabilidade de resposta (isto é, mortalidade) sendo explicada pela equação $p'_i = C + (1 - C) * p_i$, onde p'_i é a probabilidade da mortalidade total para a concentração c_i , C é a taxa de mortalidade natural (limiar natural), e p_i é a probabilidade de mortalidade causada pelo patógeno viral na concentração c_i , a qual representa a função de distribuição acumulada. Esse modelo proporcionou um ajuste satisfatório para a variável binomial de acordo com o teste da “razão do log-verossimilhança” e exibiu a menor escala de *deviance*, indicada pelo valor de Chi-quadrado (χ^2) de Pearson, em relação aos outros modelos testados, tais como as

regressões logística e probit. No modelo CLL $p_i = 1 - \exp(-\exp(\beta_0 + \beta_1 * \log(x_i)))$, onde x_i , β_0 e β_1 são concentração do patógeno, intercepto e *slope* (coeficiente angular), respectivamente. A estimativa da concentração letal média ou qualquer outra obtida (por exemplo, CL₅₀ e CL₉₀) foi independente da mortalidade natural da testemunha, que consiste no parâmetro $\hat{C}$. Dessa forma, a curva das concentrações letais foi ajustada com base na proporção de mortalidade remanescente ($1 - \hat{C}$), que correspondeu ao efeito somente do patógeno (vírus) e, por isso, não considerou o efeito da mortalidade natural. O modelo CLL foi ajustado para todos os conjuntos de dados cuja variável resposta foi caracterizada como proporção de mortalidade, e os valores de CL₅₀ e CL₉₀ foram estimados usando o procedimento PROBIT do programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE INC., 2004). Para estimar os valores de CL₅₀ e CL₉₀ e seus respectivos intervalos de confiança (ICs 95%), o fator de heterogeneidade (FH = valor do χ^2 de Pearson dividido pelo número de graus de liberdade do resíduo) foi usado para multiplicar todas as variâncias e covariâncias a fim de acomodar a superdispersão apresentada pela distribuição dos dados de mortalidade (COLLETT, 1991). Portanto, o princípio dessa técnica foi inflacionar os erros padrões (EPs) dos coeficientes do modelo CLL o que, conseqüentemente, corrigiu as probabilidades ou os valores de CL₅₀ e CL₉₀ e seus respectivos ICs 95% com base nessa variação extra-binomial encontrada nos dados de mortalidade. Os valores de CL₅₀ ou CL₉₀ foram comparados usando dois métodos. O primeiro método considera que os valores de CL₅₀ ou CL₉₀ não são significativamente diferentes entre si quando seus respectivos ICs 95% se sobrepõem (os intervalos de confiança apresentam sobreposição). Enquanto o segundo método, muito mais rigoroso e preciso do que o primeiro, compara as CL₅₀s e CL₉₀s usando o “teste da razão da concentração letal”, também chamado de “potência relativa (PR)”, descrito primeiro por ROBERTSON; PREISLER (1992) e, depois, oportunamente confrontado com o método anterior por WHEELER et al. (2007). As potências relativas dos valores da CL₅₀ e CL₉₀ foram calculadas com seus respectivos ICs 95% e foram usadas exclusivamente para correlacionar a efetividade do vírus *PhopGV* entre as temperaturas testadas nos bioensaios com tubérculos de batata. Este teste da “razão” é indicado como o mais apropriado para comparar concentrações, doses e tempos letais. Com base neste teste, não existe diferença entre as CL₅₀s ou CL₉₀s se o IC 95% da razão das CL₅₀s ou CL₉₀s incluir o número 1 ou o IC 95% para o log(razão das CL₅₀s ou CL₉₀s) incluir o 0 (zero) ao nível de significância de $\alpha = 0,05$. As CL₅₀s e CL₉₀s obtidas do bioensaio com tubérculos na temperatura de 24 °C foram

usadas como “padrão de referência” para a realização dos cálculos das potências relativas entre as temperaturas (24 com 18 °C e 24 com 30 °C).

Análises de regressão linear e não-linear foram usadas para determinar a relação de concentração-resposta das variáveis “rendimento de lagartas infectadas” e “proporção de lagartas não recuperadas” (lagartas *not found*), respectivamente, para cada temperatura e dieta larval (tubérculo ou folhagem). Valores máximos de rendimento de lagartas infectadas e as correspondentes concentrações ótimas do patógeno foram obtidos pela derivação das equações de regressão para cada combinação entre temperatura e dieta larval. Essa análise teve por objetivo estimar as melhores concentração viral, dieta larval e temperatura para a produção *in vivo* de *PhopGV*. Os dados foram processados pelo programa estatístico R, versão 2.8.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008).

Dados de mortalidade natural obtidos nos grupos testemunha nas diferentes temperaturas de incubação para os bioensaios com tubérculos foram submetidos à análise de variância com um único fator (*one-way* ANOVA) e, em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (*Tukey's Honestly Significant Difference* = Tukey's HSD, $p \leq 0,05$) a fim de verificar se a temperatura influenciou a sobrevivência larval de *P. operculella* nas testemunhas. Para verificar se houve influência da temperatura ou da concentração viral sobre a variável resposta “mortalidade larval”, “rendimento de lagartas infectadas” e “lagartas não encontradas” obtidas dos experimentos com tubérculos, os dados foram submetidos à ANOVA com dois fatores (*two-way* ANOVA), “temperatura” e “concentração viral”. Antes da análise estatística, os dados de “mortalidade larval” e “rendimento de lagartas infectadas” foram transformados em $(x)^{1,7}$ e $\arcseno\sqrt{\frac{x+0,5}{100}}$, respectivamente, para atender às exigências de homocedasticidade (distribuição normal e homogeneidades de variâncias). No bioensaio de suscetibilidade de *T. absoluta* ao *PhopGV*, os dados referentes à variável resposta “taxa de lagartas infectadas” receberam transformação $\sqrt{x+0,5}$ para serem submetidos à ANOVA e, em seguida, compararam-se as médias pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). Os dados referentes à contagem total de hemócitos (CTH) foram analisados por meio da ANOVA seguida pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,05$) para comparação de médias entre duas amostras independentes. Os bioensaios de persistência do vírus seguiram delineamento inteiramente aleatorizado em esquema fatorial 3 x 3

(período de armazenamento x concentração viral). Nesses experimentos, a proporção de mortalidade larval e o peso pupal foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$), enquanto que a incidência de pupas infectadas por *PhopGV* foi apenas descrita. Todas essas análises também foram processadas usando o programa SAS 9.1.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Virulência de *PhopGV* sob diferentes temperaturas em tubérculo de batata

A mortalidade natural nas testemunhas variou de $27,4 \pm 4,9\%$ (média $\pm$ EP) ($24\text{ }^{\circ}\text{C}$) a $36,3 \pm 4,4\%$ ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) com média geral de $32,7 \pm 1,8\%$. As médias da proporção de lagartas mortas nas testemunhas registradas nas diferentes temperaturas não foram significativamente diferentes ($F_{(2, 24)} = 2,48$, $p = 0,11$), indicando que essa amplitude térmica não foi suficiente para afetar a sobrevivência larval de *P. operculella*. Logo, pode-se inferir que essa mortalidade natural relativamente alta de lagartas nas parcelas das testemunhas é uma característica intrínseca do próprio inseto, mas também pode ter sido provocada pela manipulação das lagartas no momento da transferência para os tubérculos, ou por outros motivos não identificados.

A heterogeneidade do desvio residual (*deviance*), isto é, das discrepâncias entre os dados observados e esperados de cada bioensaio, foi significativo dentro de cada temperatura testada, pois os valores de HF excederam 1,5 ($p < 0,05$), indicando a presença de variação extra-binomial (superdispersão) em todos os dados ajustados com o modelo CLL (Tabela 2.1). Os valores de CL_{50} e CL_{90} variaram de 4,11 a $7,05 \times 10^4$ OB.mL⁻¹ e de 9,22 a $14,1 \times 10^5$ OB.mL⁻¹, respectivamente, e seus respectivos ICs 95% tiveram sobreposição, pois as amplitudes dos ICs 95% foram grandes devido à correção feita pelos fatores de heterogeneidade. Além disso, baseado no teste de razão entre as concentrações letais, os valores de CL_{50} e CL_{90} a 18 e 30 °C não foram significativamente diferentes de 24 °C (valor padrão de comparação) em virtude de os valores dos ICs 95% das PRs terem incluído o número 1 ($p > 0,05$). Portanto, a análise baseada no método da sobreposição dos ICs 95% das concentrações letais corroborou os resultados revelados pelo método da razão de potência, e ambos concordaram também com os resultados da ANOVA ($F_{(\text{temperatura: } 2, 126)} = 0,28$, $p = 0,7569$). Com base nessas análises, verificou-se que não houve efeito significativo da temperatura sobre a mortalidade larval, porém a concentração viral

foi significativa e o principal fator que explicou a variação na proporção de mortalidade larval de *P. operculella* ($F_{(\text{concentração: } 10, 126)} = 247,5, p < 0,0001$). As concentrações virais requeridas para matar 90% de lagartas de *P. operculella* foram 22,3, 25,1 e 13,1 vezes maiores do aquelas necessárias para matar 50% das lagartas nas temperaturas de 18, 24 e 30 °C, respectivamente. Isto indica que lagartas de *P. operculella* foram mais suscetíveis a 30 °C do que nas outras temperaturas, porque o aumento de inóculo viral para matar de 50 a 90% nesta temperatura foi menor do que a 18 e 24 °C. A taxa de mortalidade larval atingiu 100% em concentrações $\geq 1 \times 10^7$ OB.mL⁻¹, independentemente da temperatura testada (Figuras 2.7 e 2.8).

O parâmetro β_1 se refere ao valor do *slope* do modelo CLL e indica a taxa de mortalidade larval de *P. operculella* em função do log(concentração viral) e, geralmente, quanto maior é este valor, mais virulento é o patógeno. A intensidade da relação entre a mortalidade larval e a concentração viral foi expressa pelos altos valores do *slope* ($\beta_1 > 0,8$). A mortalidade em todas as temperaturas foi diretamente proporcional ao aumento da concentração viral, e esta relação foi descrita pelas curvas sigmóides com *slopes* superiores a 0,85 (Figura 2.7). O maior valor de *slope* ($1,07 \pm 0,19$) foi adquirido a 30 °C, o que reflete maiores incrementos de mortalidade com o aumento da concentração viral em relação às outras temperaturas (Tabela 2.1 e Figure 2.7). As curvas de mortalidade-resposta apresentaram tendências similares entre as temperaturas (Figura 2.8). A superdispersão apresentada pelos dados de mortalidade foi mais evidente nas concentrações $\leq 1 \times 10^6$ OB.mL⁻¹ para todas as temperaturas. O maior incremento de mortalidade foi observado para as concentração de 1×10^4 a 1×10^6 OB.mL⁻¹, destacando-se por ser um intervalo da curva de mortalidade com crescimento praticamente linear e abrupto.

Todas as lagartas infectadas se tornaram moribundas com movimentos lentos e morreram antes de atingirem o estágio de pupa. Corpos de oclusão de *PhopGV* foram observados em toas as lagartas infectadas provenientes dos tubérculos tratados com vírus, enquanto que as lagartas mortas nas testemunhas não apresentaram os sinais e sintomas da doença granulose. Linhas de regressão oriundas de polinômios de 2ª ordem explicaram significativamente de 47 a 55% ($p < 0,0001$) da variação na relação entre a concentração viral e a taxa de lagartas infectadas e recuperadas em todas as temperaturas (Figura 2.9). Os máximos rendimentos de lagartas infectadas foram 32, 31,4 e 34,8%, que corresponderam às concentrações virais ótimas de 41, 6,3 e 62×10^5 OB.mL⁻¹ a 18, 24 e 30 °C, respectivamente. Consequentemente, a quantidade de

inóculo viral necessária para gerar rendimentos similares de lagartas infectadas foi bem menor a 24 °C do que a 18 e 30 °C. Entretanto, o tempo de incubação desde a inoculação até a colheita das lagartas doentes foi maior a 18 °C e menor a 30 °C em relação a 24 °C. Efeitos significativos da concentração viral foram observados sobre o rendimento de lagartas infectadas ($F_{(9, 104)} = 25,4$, $p < 0,0001$) e sobre a proporção daquelas lagartas não encontradas ou recuperadas dos tubérculos ($F_{(10, 127)} = 30,5$, $p < 0,0001$), enquanto que as temperaturas não causaram impactos significativos nessas variáveis ($p = 0,83$ e $p = 0,74$, respectivamente). A taxa de lagartas não recuperadas (*not found*) foi positivamente afetada pela concentração viral em todas as temperaturas ($R^2 = 41-61\%$, $p < 0,0001$), cujos maiores valores ($> 40\%$) foram obtidos a partir de concentrações virais superiores a 5×10^5 OB.mL⁻¹ (Figura 2.10).

Tabela 2.1 - Parâmetros usados no modelo CLL, estimativas das concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) e potências relativas e seus respectivos intervalos de confiança (ICs 95%) para a relação entre concentração viral e mortalidade

Hospedeiro	Substrato alimentar	T (°C)	^a n	GL	^b χ ²	^c FH (p valor)	^d β ₁ ± EP (p valor)	^e CL ₅₀ (IC95%) [x 10 ⁴ OB.mL ⁻¹]	^e CL ₉₀ (IC95%) [x 10 ⁶ OB.mL ⁻¹]	^f PR - CL ₅₀ (IC95%)	^f PR - CL ₉₀ (IC95%)
<i>Phthorimaea operculella</i>	Tubérculo de batata	18 ± 0,5	1320	42	84,0	2,00 (<0,0001)	0,89 ± 0,12 (<0,0001)	6,31 (2,31; 12,4)	1,41 (0,78; 3,06)	0,65 ^{ns} (0,35; 1,21)	0,73 ^{ns} (0,37; 1,44)
		24 ± 0,5	1357	43	115,8	2,96 (<0,0001)	0,86 ± 0,12 (<0,0001)	4,11 (1,36; 8,57)	1,03 (0,54; 2,42)	1 (0,55; 1,81)	1 (0,60; 1,66)
		30 ± 0,5	1366	43	86,8	2,02 (<0,0001)	1,07 ± 0,19 (<0,0001)	7,05 (2,28; 13,4)	0,92 (0,54; 1,99)	0,58 ^{ns} (0,25; 1,34)	1,12 ^{ns} (0,57; 2,19)
	Folhas de batata	22 ± 1	700	22	36,5	1,66 (0,0266)	0,89 ± 0,17 (<0,0001)	10,5 (2,04; 25,6)	2,31 (1,06; 7,24)	–	–
<i>Tuta absoluta</i>	Folhas de tomateiro	25 ± 1	630	34	63,3	1,86 (0,0017)	0,50 ± 0,09 (<0,0001)	1,05 (0,05; 5,37)	2,66 (0,78; 12,8)	–	–

^a n = número total de lagartas neonatas testadas. ^b Valores de χ² de Pearson para o teste do modelo CLL. ^c FH = fator de heterogeneidade (p valor para o teste de H₀: FH ≤ 1,5) usado para multiplicar todas as variâncias e covariâncias. ^d Slope ± EP com p valor para o teste de slope (H₀: β₁ = 0). ^e CL₅₀ ou CL₉₀ = concentração letal para matar 50% ou 90% dos indivíduos. ^f PR = potência relativa; quando o IC 95% incluir o número 1 para PR de CL₅₀ ou CL₉₀, então os valores de CL₅₀ ou CL₉₀ não são significativamente diferentes (ns = não significativo, p > 0,05). IC = intervalo de confiança

Figura 2.7 - Relação concentração-mortalidade entre patógeno e hospedeiro descrita pelo modelo binomial complemento log-log. (A) Virulência de *PhopGV* a lagartas de *Phthorimaea operculella* incubadas a diferentes temperaturas em tubérculos de batata (B) Virulência de *PhopGV* a lagartas de *Phthorimaea operculella* em parte aérea de batata (C) Virulência de *PhopGV* a lagartas de *Tuta absoluta* em folhas de tomateiro

Figura 2.8 - Curvas de concentração letal ajustadas com o modelo CLL para as relações entre concentração viral e mortalidade de lagartas de *Phthorimaea operculella* em tubérculos incubados a 18, 24 e 30 °C, em parte aérea e de lagartas de *Tuta absoluta* após aplicação de diferentes concentrações de *PhopGV*

Figura 2.9 - Rendimento de lagartas de *Phthorimaea operculella* infectadas e recuperadas em tubérculos incubados a 18, 24 e 30 °C (A) e em parte aérea de batata a 22 °C (B) após aplicação de diferentes concentrações de *PhopGV*. Círculos cheios: valores observados; linhas sólidas: curvas de regressão; linhas tracejadas: intervalo de confiança a 95%

Figura 2.10 - Proporção de lagartas não recuperadas de *Phthorimaea operculella* em tubérculos incubados a 18, 24 e 30 °C (A) e em parte aérea de batata a 22 °C (B) após aplicação de diferentes concentrações de *PhopGV*. Círculos cheios: valores observados; linhas sólidas: curvas de regressão; linhas tracejadas: intervalo de confiança a 95%

2.2.2.2 Suscetibilidade de *Phthorimaea operculella* ao *PhopGV* aplicado na parte aérea de batata

A mortalidade natural de lagartas em folhagem de batata obtida na testemunha foi de $20,2 \pm 10,1\%$, sendo praticamente a mesma taxa encontrada nos bioensaios com tubérculos. A inclinação da reta (*slope*) da relação mortalidade-concentração viral foi também significativa ($\beta_1 = 0,89$) (Tabela 2.1). As CL_{50} s e CL_{90} s para lagartas tratadas em parte aérea (folhagem) de batata a 22 ± 1 °C foram 2,55 e 2,24 vezes maiores em relação às lagartas alimentadas com tubérculos a $24 \pm 0,5$ °C, o que indica uma provável menor suscetibilidade de lagartas de *P. operculella* quando alimentadas com parte aérea de batata (Figuras 2.7 e 2.8). A concentração necessária para atingir 90% de mortalidade foi 22 vezes maior do que a concentração para matar 50% das lagartas. Concentrações $\geq 5 \times 10^5$ OB.mL⁻¹ proporcionaram mais de 70% de mortalidade, e na máxima concentração (1×10^7 OB.mL⁻¹) 97% das lagartas morreram. A grande variabilidade na resposta de mortalidade foi observada a concentrações $\leq 5 \times 10^5$ OB.mL⁻¹ indicando superdispersão dos dados biológicos. A relação entre a taxa de lagartas infectadas e a concentração viral foi explicada em 70% ($p < 0,0001$) pela equação de regressão de 2º grau (Figura 2.9). O máximo rendimento de lagartas infectadas e recuperadas da parte aérea de batata foi de aproximadamente 70%, correspondendo a uma concentração ótima de $1,72 \times 10^6$ OB.mL⁻¹. Esse rendimento foi praticamente duas vezes maior do que os rendimentos obtidos em todas as temperaturas testadas no bioensaio com tubérculo. Analogamente às tendências encontradas nos bioensaios com tubérculos, a taxa de lagartas não recuperadas (*not found*) esteve positivamente correlacionada com a concentração do patógeno, mas apresentou um súbito crescimento a partir de 1×10^6 OB.mL⁻¹ (Figure 2.10).

2.2.2.3 Suscetibilidade de *Tuta absoluta* ao granulovírus (*PhopGV*) isolado de *Phthorimaea operculella*

T. absoluta foi mais suscetível ao *PhopGV* do que *P. operculella*, o hospedeiro do qual esse granulovírus foi isolado inicialmente. A resposta de mortalidade de lagartas de *T. absoluta* ao *PhopGV* foi diretamente proporcional à concentração do patógeno (Figuras 2.7 e 2.8). A

mortalidade natural da testemunha foi de $27,8 \pm 10,1\%$, também considerada elevada, bem como para *P. operculella*. As CL_{50} s e CL_{90} s para lagartas neonatas de *T. absoluta* a 25 ± 1 °C foram 1,05 e 266×10^4 OB.mL⁻¹, respectivamente, o que indica que esse inseto foi 3,9 e 2,6 vezes mais suscetível ao *PhopGV* do que as lagartas de *P. operculella* alimentadas com tubérculos a $24 \pm 0,5$ °C (Tabela 2.1). Com base na CL_{50} , as lagartas de *T. absoluta* foram 10 vezes mais suscetíveis do que as lagartas de *P. operculella* quando alimentadas com folhas de batata, porém os valores da CL_{90} foram similares. A concentração viral necessária para matar 90% de *T. absoluta* foi 253 vezes maior do que aquela necessária para atingir 50% de mortalidade dos insetos. Em outras palavras, isso é um indicativo de que a população de *T. absoluta* usada nesse bioensaio apresenta grande espectro de suscetibilidade ao vírus. A taxa de lagartas infectadas e recuperadas das folhas de tomateiro aumentou consideravelmente com as concentrações virais ($F_{(5, 30)} = 22,55$, $p < 0,0001$) atingindo um patamar de 94,4% na densidade de $1,1 \times 10^7$ OB.mL⁻¹ (Figura 2.11). A $1,1 \times 10^3$ OB.mL⁻¹, poucas lagartas infectadas foram recuperadas (3,3%). Não foram detectadas diferenças significativas quanto ao nível de infecção larval entre as concentrações de $1,1 \times 10^4$ e $1,1 \times 10^6$ OB.mL⁻¹ (41-68%). A proporção de lagartas infectadas foi superior a 85% nas concentrações virais $\geq 1,1 \times 10^6$ OB.mL⁻¹, sem apresentar diferenças significativas entre essas concentrações.

Concentrações de *PhopGV* entre $1,1 \times 10^4$ e $5,5 \times 10^7$ OB.mL⁻¹ atrasaram o desenvolvimento do estágio larval de *T. absoluta*. Mais de 60% das lagartas não conseguiram atingir o último instar e a maioria delas permaneceu no terceiro e quarto instares nas três maiores concentrações virais aplicadas nas folhas de tomateiro (Figura 2.12). E mais de 60% das lagartas atingiram o quinto instar na menor concentração viral e na testemunha. Os sintomas da infecção viral nas lagartas de *T. absoluta* foram semelhantes aos encontrados nas lagartas doentes de *P. operculella*, e se caracterizaram pela opacidade e esbranquiçamento de aspecto leitoso do tegumento da lagarta, mais evidente na parte ventral do inseto, e nítido inchaço e flacidez do corpo, com o tegumento apresentando certa elasticidade e resistência ao rompimento (Figura 2.13 A). Algumas das pupas de *T. absoluta* coletadas dos tratamentos virais apresentaram deformações morfológicas, provavelmente devido ao efeito subletal da infecção viral em lagartas que não morreram, mas que estavam contaminadas (Figura 2.13 B).

Figura 2.11 - Porcentagem de lagartas infectadas ($\pm$ EP) de *Tuta absoluta* 15 dias após inoculação com diferentes concentrações de *PhopGV*. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si significativamente (Tukey's HSD, $p > 0,05$)

Figura 2.12 - Frequência ($\pm$ EP) dos ínstar larvais de *Tuta absoluta* 15 dias após exposição das lagartas neonatas a diferentes concentrações de *PhopGV* (N = 90 lagartas/tratamento)

Figura 2.13 - Sintomas da infecção viral causada por *PhopGV* em lagartas e pupas de *Tuta absoluta*. A) Lagarta sadia (coloração verde-rosada) e lagarta doente (coloração branco-leitosa) B) Pupa normal (superior) e pupa deformada (inferior)

2.2.2.4 Persistência de *PhopGV* aplicado ao tubérculo de batata

A mortalidade causada por *PhopGV* não foi afetada pelo armazenamento ($F_{(2, 25)} = 0,91$, $p = 0,41$), mas sim pela concentração viral usada no tratamento dos tubérculos ($F_{(2, 25)} = 74,4$, $p < 0,0001$) (Tabela 2.2). Uma interação significativa foi encontrada para a concentração viral e o período de armazenamento ($F_{(4, 25)} = 5,07$, $p = 0,004$), sugerindo que a resposta do inseto às concentrações virais sofreu de alguma forma influência do período de armazenamento dos tubérculos. A mortalidade larval a 1×10^7 OB.mL⁻¹ permaneceu acima de 84% e foi consideravelmente maior do que a 1×10^5 OB.mL⁻¹. Embora não ocorreu diferença estatística entre as médias de tratamentos, houve uma tendência no aumento da mortalidade natural na testemunha de zero a 60 dias de armazenamento, provavelmente devido ao efeito da idade (envelhecimento) do tubérculo na sobrevivência larval de *P. operculella*.

Todas as lagartas ficaram doentes e nenhuma se transformou em pupa na concentração de 1×10^7 OB.mL⁻¹, enquanto que a 1×10^5 OB.mL⁻¹ mais de 34% das lagartas passaram para o estágio pupal (Tabela 2.3). Essas pupas que se desenvolveram a partir de lagartas expostas ao *PhopGV* tiveram praticamente o mesmo peso (10-12,5 mg/pupa) daquelas coletadas na testemunha ao longo de todos os períodos de armazenamento. ($F_{(5, 14)} = 2,12$, $p = 0,12$), mesmo

com a maioria dessas pupas estando infectadas (55,2-83,3%). Isso indica que este nível de concentração viral não causou alto índice de mortalidade larval nem efeito subletal nas pupas, porém o vírus persistiu até o estágio pupal via transmissão transestadial naquelas lagartas previamente expostas ao inóculo. Além disso, não foi possível detectar o vírus nos adultos emergidos a partir de pupas infectadas por meio das técnicas utilizadas nesse trabalho.

Tabela 2.2 - Persistência de *PhopGV* em tubérculos tratados e armazenados por diferentes períodos

Período de armazenamento (dias após tratamento)	¹ Mortalidade larval (%)		
	Concentração de <i>PhopGV</i> (OB.mL ⁻¹)		
	0 (Testemunha)	1 x 10 ⁵	1 x 10 ⁷
0	25,8 ± 4,6 Ac	67,5 ± 5,0 Ab	99,2 ± 0,8 Aa
15	40,0 ± 6,2 Ab	50,0 ± 5,6 Ab	96,7 ± 1,4 Aa
60	46,67 ± 3,33 Ab	50,0 ± 6,2 Ab	84,2 ± 8,0 Aa

¹ Médias (± EP) seguidas pelas mesmas letras maiúsculas (dentro de colunas) e letras minúsculas (dentro de linhas) não diferem significativamente (Tukey's HSD, $p > 0,05$).

Tabela 2.3 - Efeito de diferentes períodos de armazenamento de tubérculos tratados com *PhopGV* e não tratados (testemunha) no peso médio de pupa e na incidência da infecção viral em pupas de *Phthorimaea operculella*

Período de armazenamento (dias após tratamento)	¹ Peso pupal (mg.pupa ⁻¹)		Infecção pupal (%)	
	Testemunha	1 x 10 ⁵	Testemunha	1 x 10 ⁵
6	10,1 ± 0,6	11,4 ± 0,6	0	75,8 ± 12,7
15	11,1 ± 0,4	10,5 ± 0,7	0	55,2 ± 27,7
30	12,4 ± 0,5	12,2 ± 0,3	0	83,3 ± 13,6

¹ Não houve diferença estatística significativa entre as médias (± EP), logo as letras não foram apresentadas (Tukey's HSD, $p > 0,05$).

2.2.2.5 Efeito da infecção viral na contagem total de hemócitos de *Phthorimaea operculella*

A doença viral reduziu drasticamente a densidade total de hemócitos nas lagartas de último ínstar de *P. operculella*. Lagartas sadias apresentaram 4.168 ± 682 hemócitos.μL⁻¹ em

contraste aos 1.651 ± 366 hemócitos. μL^{-1} (média $\pm$ EP) de hemolinfa encontrados em lagartas infectadas por *PhopGV* ($t_{(1, 28)} = 10,57$, $p = 0,003$). Vários dos hemócitos em circulação na hemolinfa de lagartas infectadas encontravam-se infectados, contendo partículas virais no seu interior (Figura 2.14).

Figura 2.14 - Hemócitos provenientes da hemolinfa de lagartas saudáveis e doentes de último instar de *Phthorimaea operculella*. A-B) Diferentes tipos de hemócitos (células normais) coletados de lagartas saudáveis (aumento de 400x) B-C) Hemócitos infectados por partículas virais (OB) de *PhopGV* (indicados pela seta amarela) (aumento de 1000x)

2.2.2.6 Determinação do equivalente larval (EL) a partir de lagartas infectadas de *Phthorimaea operculella* por *PhopGV*

O número de equivalente larval (EL) variou de $3,5$ a $8,0 \times 10^9$ OB.lagarta $^{-1}$ (Tabela 2.4). A quantidade de vírus por peso larval esteve associada com o peso médio larval. Isso indica que

lagartas mais pesadas produzem mais OB por grama de lagarta. A densidade de inóculo viral produzida a partir de uma lagarta infectada de último ínstar foi de $6,6 \times 10^9$ OB.lagarta⁻¹ e $7,7 \times 10^8$ OB.mg⁻¹ de lagarta.

Tabela 2.4 - Determinação do equivalente larval (EL) para lagartas de *Phthorimaea operculella* infectadas por *PhopGV*

Grupo de ensaio	Número de lagartas examinadas	Peso total (mg)	Peso médio (mg.lagarta ⁻¹)	EL (10 ⁹ OB.lagarta ⁻¹)	OB por peso larval (10 ⁸ OB.mg ⁻¹)
A	14	120	8,57	8,0	9,3
B	60	532	8,86	8,4	9,5
C	49	400	8,16	3,5	4,3
Média (±EP)	-	-	-	$6,6 \pm 1,6$	$7,7 \pm 1,7$

2.2.3 Discussão

O modelo CLL se adequou muito bem aos dados e foi útil para descrever a mortalidade do inseto em função da concentração do patógeno, pois é considerado um modelo mais flexível para análises de bioensaios com pesticidas em relação a outros modelos como logístico e probit. (ROBERTSON; PREISLER 1992). Além disso, a variação extra-binomial provavelmente é caracterizada como sendo uma variabilidade inerente do sistema biológico em estudo. Essa variação extra-binomial dos experimentos de concentração-mortalidade contribuiu significativamente no aumento do fator de heterogeneidade (FH) computado na análise dos dados.

As temperaturas testadas (18-30 °C) não afetaram a mortalidade larval de *P. operculella* causada por *PhopGV*, o rendimento de lagartas infectadas e o nível de lagartas não recuperadas dos bioensaios conduzidos em tubérculos de batata. Entretanto, a concentração viral foi o principal fator de impacto na resposta dessas variáveis. Os valores do *slope* foram significativos e muito semelhantes em todos os ensaios com *P. operculella* e corresponderam a altas taxas de mortalidade causada pelo vírus.

O aumento da concentração viral resultou diretamente no incremento da taxa de mortalidade larval em todas as temperaturas. A virulência de *PhopGV* expressa pelas CL_{50} e CL_{90} foi similar a 18 e 30 °C, e estas temperaturas não se enquadram na amplitude térmica ótima para a sobrevivência das lagartas de *P. operculella* determinada por SPORLEDER et al. (2004) e BRIESE (1980), cuja faixa é de 24 a 28 °C. Esses resultados corroboram com outros estudos demonstrando que a replicação de *PhopGV* em lagartas de *P. operculella* está sincronizada com o desenvolvimento larval e este, por sua vez, com a temperatura de incubação (SPORLEDER et al. 2008). A similaridade entre a faixa ótima de temperatura do hospedeiro e do patógeno poderia ser esperada dessa relação de parasitismo obrigatório e intracelular que requer diversos sistemas celulares enzimáticos para sua replicação (JOHNSON et al. 1982). Inúmeros estudos demonstraram que a progressão da doença por baculovírus é fortemente afetada pela temperatura (RIBEIRO; PAVAN 1994; VAN BEEK et al., 2000; SPORLEDER et al., 2008), porque esta pode regular a cinética da replicação do patógeno e determinar a atividade de alimentação do estágio larval e, portanto, a dosagem ingerida de inóculo viral (IGNOFFO, 1966; SPORLEDER et al., 2008). SPORLEDER et al. (2008) encontraram diferenças significativas na mortalidade larval de *P. operculella* por *PhopGV* usando uma faixa de temperatura de 16 a 28 °C. Altas temperaturas parecem ser mais prejudiciais à multiplicação viral do que as baixas, mas os limites dependem do sistema inseto-vírus. Muitas espécies de insetos continuam a se desenvolver normalmente em temperaturas menores de incubação (18 °C), todavia a progressão da doença viral se torna muito lenta resultando em longos ínstares larvais (VAN BEEK et al., 2000; STAIRS, 1978).

A virulência de um isolado brasileiro de *PhopGV* contra lagartas neonatas de *P. operculella* foi determinada com base nos valores de CL_{50} e foi significativamente diferente daqueles determinados em outros trabalhos (ALCÁZAR et al., 1992; KROSCHEL et al., 1996; ZEDDAM et al., 1999; SPORLEDER et al., 2005; 2007; 2008). No entanto, devido aos diferentes procedimentos (idade larval, dieta larval, suscetibilidade da população de *P. operculella*, método de inoculação do vírus, origem do isolado de *PhopGV*) e à análise de dados usados nesses estudos, as comparações não podem ser aplicadas diretamente.

A taxa de mortalidade de lagartas de *P. operculella* alimentadas com folhas esteve diretamente correlacionada com a concentração do granulovírus. Concentrações letais para matar

50 e 90% das lagartas de *P. operculella* em folhas de batata foram superiores ao dobro dos valores estimados em tubérculos, a despeito das temperaturas de incubação. Entretanto, não se pode afirmar que lagartas de *P. operculella* foram menos suscetíveis ao *PhopGV* quando alimentadas com folhas do que com tubérculos, porque o *slope* da curva de mortalidade do ensaio em folhagem de batata não foi significativamente diferente daqueles estimados para os ensaios de tubérculo a 24 e 18 °C. Avaliando diferenças na suscetibilidade a baculoviroses em função do substrato alimentar, pesquisas apontam que as folhas podem aumentar a frequência de descarte (reciclagem) das células epiteliais do mesêntero, afetando assim a resistência do hospedeiro (ENGELHARD; VOLKMAN, 1995; HOOVER et al. 2000; GOULSON, 2003; PLYMALE et al., 2008). Esses autores também chamaram a atenção para os compostos químicos derivados de plantas que interagem com os corpos de oclusão do vírus reduzindo a liberação dos vírions infectivos por meio da mudança do pH intestinal do mesêntero ou mesmo bloqueando-os.

Para o sistema de produção massal *in vivo* de *PhopGV*, é essencial determinar a temperatura ótima e a concentração viral para recuperar a maior número possível de lagartas infectadas antes da desintegração larval (JOHNSON et al. 1982; SPORLEDER et al. 2008). A seleção de uma dieta larval adequada é também recomendada para aperfeiçoar a produção do vírus. Os presentes dados revelaram que temperaturas de incubação e dietas larvais contribuíram marginalmente para a variação no rendimento de lagartas infectadas. O inóculo viral foi novamente o principal fator responsável por afetar o rendimento de lagartas infectadas. Concentrações intermediárias variando de 6,3 a 62×10^5 OB.mL⁻¹ proporcionaram o máximo rendimento de lagartas infectadas (30-35%) em tubérculos. A melhor temperatura para a multiplicação do vírus em lagartas de *P. operculella* em tubérculos foi de 24 °C, a qual proporcionou rendimento semelhante ao das outras temperaturas, porém usando uma concentração viral menor. Além disso, a 24 °C, o tempo decorrido entre a inoculação do vírus e a coleta das lagartas infectas é menor do que a 18 °C. O máximo rendimento de lagartas infectadas coletadas da parte aérea da batata foi o dobro do rendimento geral obtido em tubérculo com uma concentração ótima quase três vezes maior do que o segundo método. Contudo, seria mais oneroso e laborioso, devido à necessidade de maior espaço físico (infra-estrutura) e intensa mão-de-obra, e também mais difícil de criar lagartas de *P. operculella* sobre plantas de batata ao invés de tubérculos. Portanto, é preferível usar tubérculos para multiplicação *in vivo* do vírus em torno

de 24 °C. Em concentrações $\geq 1 \times 10^7$ OB.mL⁻¹, a grande maioria das lagartas mortas ocorreu em ínstaes larvais iniciais, e isto esteve associado com septicemia devido à superdose de vírus adquirida pelo inseto. Essa morte prematura de lagartas ocorreu principalmente dentro dos tubérculos, dificultando a procura e coleta desses indivíduos, porque essas lagartas se desintegravam facilmente em poucos dias. De acordo com REED (1971), após ingerir altas doses de vírus, lagartas recém-eclodidas morrem dentro de 48 h de uma toxicemia devido ao efeito de superdose, muito diferente da progressão normal da doença a qual não mataria o hospedeiro antes de 2-3 semanas. Em baixas concentrações, a produção do vírus decresce em razão do aumento do número de lagartas que escapam à infecção. Isso está de acordo com SPORLEDER et al. (2008), que recomendaram uma temperatura ao redor de 24 °C para propagar *PhopGV* a fim de assegurar rápido desenvolvimento larval e minimizar a mortalidade natural de *P. operculella*. Populações de *P. operculella* aumentam dentro da faixa de temperatura de 10-35°C, com um ótimo a 28-30°C (SPORLEDER et al., 2004). Essa faixa de temperatura também beneficia a infecção por *PhopGV* e sua replicação nas lagartas de *P. operculella*, como foi demonstrado aqui e por SPORLEDER et al. (2008). Embora a temperatura não tenha afetado o rendimento de lagartas infectadas, ela exerceu a maior influência no tempo de incubação desde a inoculação larval nos tubérculos até a colheita de lagartas infectadas. De um modo geral, a temperatura ótima para a produção do vírus coincide com a temperatura ideal ao desenvolvimento larval do hospedeiro (RIBEIRO; PAVAN, 1994), mas isso não é regra geral, como mostram outros autores (WITT; STAIRS, 1976).

Os altos índices de mortalidade natural e de lagartas não recuperadas de *P. operculella* não são incomuns (BRIESE, 1980; SPORLEDER et al., 2005) e contribuíram decisivamente para tornar os fatores de heterogeneidade significativos em todos os bioensaios. A taxa de lagartas não recuperadas em tubérculos foi quase duas vezes maior do que na parte aérea, em virtude da maior facilidade de se observar e coletar as lagartas que morriam pelo vírus na parte aérea de batata.

As lagartas de *T. absoluta* foram mais suscetíveis ao *PhopGV* do que *P. operculella*, o hospedeiro do qual o patógeno foi isolado inicialmente. ANGELES; ALCÁZAR (1995) demonstraram que uma estirpe de *PhopGV* do Peru isolado de *P. operculella* foi patogênico a lagartas de *T. absoluta*. A CL₅₀ dessa estirpe viral foi de $3,5 \times 10^6$ OB.mL⁻¹ contra lagartas de *T. absoluta* alimentadas com folhas de batata tratadas previamente com diferentes suspensões virais.

Aparentemente, essa CL_{50} é muito maior do que a CL_{50} observada para o isolado brasileiro de *PhopGV*, mas as diferenças quanto ao substrato alimentar, isolado viral, população do inseto e outros detalhes metodológicos não permitem fazer comparações diretas. *T. absoluta* e *P. operculella* são espécies bem próximas, pertencentes à mesma família (Gelechiidae), e elas podem ainda ocorrer simultaneamente atacando a parte aérea de batata (RADCLIFFE, 1982; CISNEROS, 1986). A infecção cruzada de *PhopGV* em lagartas de *T. absoluta* também foi constatada por ZEDDAM et al. (1994), os quais verificaram por meio de enzimas de restrição que o GV extraído de lagartas de *T. absoluta* era o mesmo de *P. operculella*. Portanto, a chance de ocorrer infecção cruzada entre lagartas de *T. absoluta* e *P. operculella* pode ser comum sob condições naturais.

A boa estabilidade de *PhopGV* até 60 dias de armazenamento é uma vantagem para o controle biológico e isso foi também demonstrado por ALCÁZAR et al. (1992). É esperado que, no campo, o vírus possa permanecer por um longo tempo viável no solo e também dentro dos estômatos das plantas de batata (REED, 1971; REED; SPRINGETT, 1971).

Foi possível detectar corpos de oclusão virais de *PhopGV* em pupas usando simplesmente um microscópio de luz com contraste de fase, possibilitando a confirmação da persistência transestadial da fase larval para as pupas. A transmissão da infecção de NPV das larvas para as pupas foi também demonstrada por BOUCIAS et al. (1980) para a lagarta-da-soja *A. gemmatilis* Hübner (Lepid.: Noctuidae). Não foi possível visualizar *PhopGV* no estágio adulto, logo futuras investigações usando técnicas mais sofisticadas, como PCR, são necessárias para demonstrar a passagem do vírus da pupa para o adulto e a transmissão transovariana. O peso de pupas de *P. operculella* infectadas por *PhopGV* foi similar ao das pupas sadias da testemunha. Efeitos subletais de GVs em insetos representantes da ordem Lepidoptera são muito frequentes e têm importantes implicações na dinâmica populacional do hospedeiro (ROTHMAN; MYERS 1996). MATTHEWS et al. (2002) também não encontraram diferenças no peso de pupas de *Lacanobia oleracea* (L.) (Lepid.: Noctuidae) desenvolvidas a partir do I, II, III e V instares larvais expostos a *L. oleracea* GV (LoGV) em comparação aos respectivos pesos de pupas sadias das testemunhas.

Pouco se conhece ainda sobre as defesas dos insetos contra infecções virais. As imunidades humoral e celular têm sido demonstradas como mecanismos de defesa contra

infecções virais em insetos (NARAYANAN, 2004). Drástica redução no número de hemócitos durante infecções microbianas foi relatada por várias pesquisas (RATCLIFFE; WALTERS, 1983; BALAVENKATASUBBAIAH et al., 2001; NARAYANAN, 2004), embora o oposto também foi observado por KALIA et al. (2001). No presente trabalho, foi demonstrado que lagartas de *P. operculella* infectadas por *PhopGV* sofreram considerável redução do número total de hemócitos circulantes na hemolinfa induzida pela infecção viral. Além disso, hemócitos infectadas sofreram hipertrofia com muitos vacúolos no citoplasma, como também observado por LAARIF et al. (2006). Essa redução do número de hemócitos é provavelmente uma importante alteração fisiológica induzida pela infecção viral para o patógeno superar uma das mais importantes barreiras da imunidade do inseto (NARAYANAN, 2004). Duas hipóteses podem explicar essa redução de hemócitos pelo *PhopGV*. Os granulovírus podem infectar e se multiplicar nos hemócitos do hospedeiro, levando-os à morte após colonização celular e liberação da progênie viral. Outra suposição seria que muitos hemócitos são mobilizados para os tecidos infectados, diminuindo assim o seu número em circulação na hemolinfa (WITTIG, 1968). Hemócitos circulantes desempenham papel-chave na prevenção da disseminação da infecção em lagartas (WASHBURN et al., 1996; CHAPMAN, 1998), e uma redução em seu número pode resultar em aumento da suscetibilidade do hospedeiro à progressão da infecção viral.

A densidade de vírus produzida por lagarta de *P. operculella* foi medida como equivalente larval (EL) (OB por lagarta) para estimar a eficácia da produção *in vivo*. Foi observado que a produção *in vivo* de OB do vírus é substancialmente afetada pelo peso larval. Lagartas mais pesadas são capazes de produzir mais OB, provavelmente porque elas têm maior massa de tecido adiposo disponível para a multiplicação viral. Os rendimentos de OB por lagarta e por peso larval foram de $6,6 \times 10^9$ OB.lagarta⁻¹ e $7,7 \times 10^8$ OB.mg⁻¹ a 25 ± 1 °C, respectivamente, os quais foram semelhantes aos rendimentos obtidos em outros estudos (MATHIESSEN et al., 1978; ALCÁZAR et al., 1992; ZEDDAM et al., 1999; SPORLEDER et al., 2008), a despeito dos métodos de inoculação e temperaturas de incubação usadas. SPORLEDER et al. (2008) demonstraram que o número de vírus por lagarta pode ser melhor descrito com base na idade e peso larval do hospedeiro, enquanto que o inóculo viral e a temperatura exercem relativamente pouca influência nesse parâmetro.

2.3 Considerações finais

Em resumo, o isolado brasileiro de *PhopGV* demonstra potencial para o controle de lagartas de *P. operculella* em uma ampla faixa de temperatura (18-30 °C) e também para o controle da fase larval de *T. absoluta*. A suscetibilidade de lagartas de *P. operculella* na parte aérea de batata requer dosagens maiores de vírus do que aquelas necessárias para o controle da praga em tubérculos. Por último, uma temperatura de incubação entre 24 e 30 °C é recomendada para a produção *in vivo* de *PhopGV* usando tubérculo como substrato alimentar do hospedeiro.

Referências

- ALCÁZAR, J.; CERVANTES, M.; RAMAN, K.V. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 35, p. 107-111, 1992.
- ALCÁZAR, J.; RAMAN, K.V. Control de *Phthorimaea operculella* en almacenes rústicos, empleando virus granulosis en polvo. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 35, p. 117-120, 1992.
- ANGELES, I.; ALCÁZAR, J. Susceptibilidad de la polilla *Scropialpulpuloides absoluta* al virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* (PoVG). **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 38, p. 65-70, 1995.
- BALAVENKATASUBBAIAH, M.; NATRAJU, B.; THIAGRAJAN, V.; DATTA, R.K. Haemocyte counts in different breeds of silkworm, *Bombyx mori* L. and their changes during the progressive infection of BmNPV. **Indian Journal of Sericulture**, Ludhiana, v. 40, p. 158-162, 2001.
- BOUCIAS, D.G.; JOHNSON, D.W.; ALLEN, G.E. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, larvae. **Environmental Entomology**, College Park, v. 9, p. 59-61, 1980.
- BRIESE, D.T. Characterisation of a laboratory strain of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 70, p. 203-212, 1980.
- CHAPMAN, R.F. Circulatory system, blood and immune system. In: **The insects: structure and function**. 4th ed. London: Cambridge University Press, 1998. p. 94-131.

CISNEROS, F. Control biológico de las plagas con especial referencia al cultivo de papa. In: VALENCIA, L. (Ed). **Control integrado de plagas de papa**. Colômbia: CIP-ICA, 1986. p. 101-108.

COLLETT, D. **Modeling Binary Data**. New York: Chapman & Hall, 1991. 369 p.

ENGELHARD, E.K.; VOLKMAN, L.E. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, New York, v. 209, p. 384-389, 1995.

GOULSON, D. Can host susceptibility to baculovirus infection be predicted from host taxonomy or life history? **Environmental Entomology**, College Park, v. 32, n. 1, p. 61-70, 2003.

HOOVER K.; WASHBURN, J.O.; VOLKMAN, L.E. Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 46, p. 999-1007, 2000.

IGNOFFO, C.M. Effects of temperature on mortality of *Heliothis zea* larvae exposed to sublethal doses of a nuclear-polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 8, p. 290-292, 1966.

INTERNATIONAL POTATO CENTER. **CIP Training Bulletin 2: The International Potato Center**. Lima, 1992. 27 p.

INTERNATIONAL POTATO CENTER. **CIP in 1995: The International Potato Center Annual Report**. Lima, 1996. 56 p.

JOHNSON, D.W.; BOUCIAS, D.B.; BARFIELD, C.S.; ALLEN, G.E. A temperature-dependent developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 40, p. 292-298, 1982.

KALIA, D.; CHAUDHARI, S.; GUJAR, G.T. Changes in haemolymph constituents of American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), infected with nucleopolyhedrovirus. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 39, p. 1123-1129, 2001.

KROSCHER, J.; FRITSCH, E.; HUBER, J. Biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller) in the Republic of Yemen using granulosis virus: biochemical characterization, pathogenicity and stability of the virus. **Biocontrol Science and Technology**, New York, v. 6, p. 207-216, 1996.

LAARIF, A.; AMMAR, B.; TRABELSI, M.; BEN HAMOUDA, M.H. Histopathology and morphogenesis of the *Granulovirus* of potato tuber moth *Phthorimaea operculella*. **Tunisian Journal of Plant Protection**, Le Kef, v. 1, n. 2, p.115-124, 2006.

MATHIESSEN, J.N.; CHRISTIAN, R.L.; GRACE, T.D.C.; FILSHIE, B.K. Large-scale field propagation and the purification of the granulosis virus of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 68, p. 385-391, 1978.

MATTHEWS, H.J.; SMITH, I.; EDWARDS, J.P. Lethal and sublethal effects of a granulovirus on the tomato moth *Lacanobia oleracea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 80, p. 73-80, 2002.

NARAYANAN, K. Insect defence: its impact on microbial of insect pests. **Current Science**, Bangalore, v. 86, p. 800-813, 2004.

PLYMALE, R.; GROVE, M.J.; COX-FOSTER, D.; OSTIGUY, N.; HOOVER, K. Plant-mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in lepidopteran larvae. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, p. 737-749, 2008.

PRATISSOLI, D.; PARRA, J.R.P.; OLIVEIRA, H.N.; PEREIRA, F.F. Aspectos biológicos da traça-da-batatinha *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p.1153-1155, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN: 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

RADCLIFFE, E.B. Insect pests of potato. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 27, p. 173-204, 1982.

RATCLIFFE, N.A.; WALTERS, J.B. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insect clearance of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 29, p. 407-415, 1983.

REED, E.M. Factors affecting the status of a virus as a control agent for the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae)). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 61, p. 207-222, 1971.

REED, E.M.; SPRINGETT, B.P. Large-scale field testing of a granulosis virus for the control of the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae)). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 61, p. 223-233, 1971.

RIBEIRO, H.C.T.; PAVAN, O.H.O. Effect of temperature on the development of baculoviruses. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 118, p. 316-320, 1994.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 1992. 127 p.

- ROTHMAN LD, MYERS JH Debilitating effects of viral diseases on host Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 1-10, 1996.
- SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT® User's Guide**, version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 2004.
- SINGH, P.; CHARLES, J.G. An artificial diet for larvae of the potato tuber moth. **New Zealand Journal of Zoology**, Wellington, v. 4, p. 449-451, 1977.
- SPORLEDER, M.; CAUTI, E.M.R.; HUBER, J.; KROSCHEL, J. Susceptibility of *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae) to its granulovirus *PoGV* with larval age. **Agricultural and Forest Entomology**, Oxford, v. 9, p. 271-278, 2007.
- SPORLEDER, M.; KROSCHEL, J.; HUBER, J.; LAGNAOUI, A. An improved method to determine the biological activity (LC_{50}) of the granulovirus *PoGV* in its host *Phthorimaea operculella*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 116, p. 191-197, 2005.
- SPORLEDER, M.; KROSCHEL, J.; QUISPE, M.R.G.; LAGNAOUI, A. A temperature-based simulation model for the potato tuberworm, *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera; Gelechiidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 33, p. 477-486, 2004.
- SPORLEDER, M.; ZEGARRA, O.; CAUTI, E.M.R.; KROSCHEL, J. Effects of temperature on the activity and kinetics of the granulovirus infecting the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). **Biological Control**, Orlando, v. 44, p. 286-295, 2008.
- STAIRS, G.R. Effects of a wide range of temperatures on the development of *Galleria mellonella* and its specific *Baculovirus*. **Environmental Entomology**, College Park, v. 7, n. 2, p. 297-299, 1978.
- STEINHAUS, E.A.; MARSH, G.A. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 9, p. 436-438, 1967.
- VAN BEEK, N.; HUGHES, P.R.; WOOD, H.A. Effects of incubation temperature on the dose-survival time relationship of *Trichoplusia ni* larvae infected with *Autographa Californica* Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 76, p. 185-190, 2000.
- VICKERS, J.M.; CORY, J.S.; ENTWISTLE, P.F. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosus virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.57, p.334-342, 1991.
- VON ARX, R.; GOUEDER, J.; CHEIKH, M.; BEN TEMIME, A. Integrated control of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) in Tunisia. **Insect Science and Its Applications**, Nairobi, v. 8, p. 989-994, 1987.

VON ARX, R., ROUX, O., BAUMGARTNER, J. Tuber infestation by potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), at potato harvest in relation to farmers' practices. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Zurich, v. 31, p. 277-292, 1990.

WASHBURN, J.O.; KIRKPATRICK, B.A.; VOLKMAN, L.E. Insect protection against viruses. **Nature**, London, v. 383, p. 767, 1996.

WHEELER, M. W., FADEL, J., ROBERTSON, J. K., AND BAILER, J. Confidence interval construction for relative toxicity endpoints such as LD₅₀ or LD₉₀ ratios. **Journal of Economic Entomology**. College Park, v. 100, n. 6, 1945-1949, 2007.

WITT, D.J.; STAIRS, G.R. Effects of different temperatures on *Tipula* iridescent virus infection in *Galleria mellonella* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 28, p. 151-152, 1976.

WITTIG, G. Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars III Some observations concerning virus inclusion bodies. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 10, p. 211-229, 1968.

ZEDDAM, J.L.; LÉRY, X.; GIANNOTTI, J.; NINO, L.; ANGELES, I.; ALCÁZAR, J. Susceptibility of different potato moth species to a same granulosus virus. In: **Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**, 28, Montpellier, 1994. Proceedings...Montpellier: 1994. p. 239-240.

ZEDDAM, J.L.; POLLET, A.; MANGOENDIHARJO, S.; RAMADHAN, T.H.; FERBER, M.L. Occurrence and virulence of a granulosus virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 48-54, 1999.

3 EFICÁCIA DE GRANULOVÍRUS (*PHOPGV*) NA FORMULAÇÃO EM TALCO E COM PRODUTOS À BASE DE NIM NA MORTALIDADE LARVAL DE *PHTHORIMAEA OPERCULELLA* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)

Resumo

Granulovírus de insetos (GV) possuem um importante papel na regulação natural de populações de pragas agrícolas e florestais. Embora os GVs apresentem bons atributos como agentes de controle biológico, a lenta capacidade de causar morte, a suscetibilidade à luz ultravioleta e outras condições ambientais aliadas às dificuldades para produção massal têm limitado o desenvolvimento desses patógenos como biopesticidas. Duas estratégias para melhorar o desempenho do vírus consistem na combinação de concentrações baixas do vírus com inseticidas botânicos e na formulação do vírus com agentes estressores para reduzir o tempo letal, assim como aumentar a mortalidade final. Foram avaliados em laboratório o efeito de duas concentrações de *Phthorimaea operculella* granulovírus (*PhopGV*) usados em combinação com dois produtos comerciais à base de nim em duas concentrações, e o efeito de *PhopGV* formulado com talco na mortalidade de larvas de *P. operculella* (Zeller, 1873) e no rendimento de larvas infectadas recuperadas. DalNeem combinado com *PhopGV* resultou em efeito aditivo por aumentar a mortalidade de larvas, enquanto uma interação antagonista foi observada em NeemAzal misturado com *PhopGV*. Não houve alterações significativas nos rendimentos de lagartas infectadas para todas as combinações dos produtos de nim com *PhopGV*, embora houvesse uma tendência de redução pelo efeito do nim. A aplicação somente de talco resultou em aumento significativo da mortalidade de lagartas mais novas. Formulação do vírus em concentrações abaixo de 5×10^6 OB.g⁻¹ com talco aumentou a taxa de mortalidade. Dessa forma, DalNeem e talco têm potencial para serem usados em formulações virais para controlar *P. operculella* em campo ou em armazéns.

Palavras-chave: Granulovírus; Azadiractina; Formulações de nim, Formulação com pó de talco; *Phthorimaea operculella*; *Solanum tuberosum*

EFFICACY OF GRANULOVIRUS (*PHOPGV*) IN TALC DUST FORMULATION AND WITH NEEM PRODUCTS ON LARVAL MORTALITY OF *PHTHORIMAEA OPERCULELLA* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE)

Abstract

Insect granuloviruses (GV) play an important role in regulation of populations of agricultural and forest pests. Although GVs present good attributes as biological control agents, the slow killing capacity, the susceptibility to UV light and other environmental conditions and difficulties for mass production have limited the development of these pathogens as biopesticides. Two approaches to improve virus performance are the combination of low concentrations of viruses with botanical insecticides and formulation of the virus with stressor agents to increase the speed to kill, as well as to increase mortality. The effect of two concentrations of *Phthorimaea operculella* granulovirus (*PhopGV*) used in combination with two commercial Neem products at two concentrations and the effect of *PhopGV* formulated with talc on larval mortality of *P. operculella* (Zeller, 1873) and yield of infected larvae recovered was evaluated in the laboratory. DalNeem combined with *PhopGV* resulted in an additive effect by enhancing larval mortality whereas an antagonistic interaction was observed for NeemAzal mixed with *PhopGV*. The neem products with virus did not cause significant effects on the yield of infected larvae, although there were some evidences that the rate of infected larvae decreased especially for the association of the virus with DalNeem. Application of talc alone resulted in significant mortality on young larvae. Formulation of virus at concentrations lower than 5×10^6 OB.g⁻¹ with talc increased mortality rate. Therefore, DalNeem and talc may have potential for use in virus formulations to control *P. operculella* in the field or storage facilities.

Keywords: Granulovirus; Azadirachtin; Neem formulations; Talc dust formulation; *Phthorimaea operculella*; *Solanum tuberosum*

3.1 Introdução

A traça-da-batata *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae) é um inseto cosmopolita e se destaca por ser a principal praga da cultura da batata responsável por grandes perdas em regiões de clima quente (RADCLIFFE, 1982; HANAFI, 1999). *P. operculella* é um lepidóptero originário da América do Sul e se disseminou para a maioria dos campos de batata do resto do mundo (VON ARX et al., 1990; INTERNATIONAL POTATO CENTER, 1996). O dano econômico ocorre principalmente próximo ao final do ciclo de cultivo, quando os tubérculos ficam expostos, e pode continuar depois da colheita quando batatas infestadas são levadas para os armazéns. Se houver negligência de medidas de controle, os danos aos tubérculos armazenados podem ser severos (HANAFI, 1999). Bataticultores brasileiros geralmente aplicam frequentemente inseticidas químicos de amplo espectro de ação durante o ciclo da cultura. Até o presente momento, não existe produto biológico disponível no mercado contra *P. operculella*, e uma alternativa promissora que pode ser integrada ao manejo sustentável dessa praga é o granulovírus (*PhopGV*), um membro da família Baculoviridae, que é normalmente encontrado provocando epizootias naturais em populações do hospedeiro (REED; SPRINGETT, 1971; ZEDDAM et al., 1999). Este patógeno tem sido usado com sucesso como um biorregulador de *P. operculella* em condições de campo e de armazenamento em outros países (REED; SPRINGETT, 1971; BRIESE, 1980; RAMAN; ALCAZAR, 1992; ZEDDAM et al., 1999) e poderia servir de ferramenta para minimizar a evolução da resistência a inseticidas convencionais e a ressurgência de pragas secundárias.

Os granulovírus (GVs) são agentes seguros de controle biológico, pois apresentam uma gama de hospedeiros das mais restritas entre os vírus de insetos e, conseqüentemente, esses patógenos apresentam baixo impacto negativo a organismos não-alvo e ao meio ambiente (BURGES et al., 1980; GRÖNER, 1986). No entanto, essa alta especificidade ao hospedeiro e a baixa velocidade de ação contra os insetos-alvo representam sérias desvantagens dos GVs, pois são fatores limitantes ao desenvolvimento desses patógenos como bioinseticidas.

Extratos de semente da espécie de árvore originária da Índia, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), contêm vários compostos químicos que agem como inibidores de alimentação, inseticidas e reguladores de crescimento de inseto (RCI) e que são usados contra inúmeros insetos, incluindo lepidópteros-praga (MORDUE et al., 1998). Embora existam muitos

compostos potencialmente inseticidas no extrato da semente de nim (SINGH; SASTRY, 1988; CUBILLO et al., 1999), o principal ingrediente ativo na maioria das formulações é o tetranortriterpeno de azadiractina (AZA), o qual possui efeito intenso sob baixas concentrações na alimentação, crescimento, ecdise e reprodução de mais de 400 espécies de insetos (SIEBER; REMBOLD, 1983; LEE et al., 1991; MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993). A azadiractina tem a vantagem de ser biodegradável e apresenta baixo risco para o ambiente devido à sua origem vegetal (GRUBER, 1992). IANNAcone; LAMAS (2003) demonstraram a atividade inseticida e de inibição do crescimento em lagartas de *P. operculella* quando expostas ao extrato de nim.

A eficácia de baculovírus pode ser melhorada em combinação com outros agentes, tais como branqueadores óticos (brancóforos), quitinase, ácido bórico e extratos botânicos (SHAPIRO; BELL, 1982; SHAPIRO et al., 1987; SHAPIRO; ROBERTSON, 1992; MURUGAN et al., 1998). Combinando baixas concentrações de vírus entomopatogênicos com inseticidas de plantas é de considerável interesse dentro do contexto de proteção de plantas contra insetos-praga a fim de diminuir o tempo letal e aumentar a mortalidade pelo agente biológico. Efeitos sinérgico ou aditivo com baixas doses de inseticidas botânicos associados a vírus têm sido estudados. Por exemplo, estudos demonstram efeito positivo do uso combinado de nucleopoliedrovírus (NPV) e AZA no crescimento e mortalidade larval de lepidópteros (NATHAN et al., 2005; NATHAN; KALAIIVANI, 2006; KUMAR et al., 2008). Quando AZA foi usada em combinação com o NPV da lagarta-cigana (*Lymantria dispar* L., Lepid.: Lymantriidae), a mistura foi significativamente mais efetiva contra as lagartas comparado ao NPV ou AZA sozinhos (COOK et al., 1996). No entanto, os autores ressaltam que a adição de AZA na formulação viral pode resultar em baixa quantidade de inóculo viral sendo produzido no cadáver e, portanto, baixa liberação da progênie viral no ambiente, uma vez que as lagartas tratadas ficam menores. Tanto AZA quanto baculovírus afetam a fisiologia do inseto por alterar os níveis de ecdisteroide e hormônio juvenil, causando atraso na ecdise e aumento na duração da fase larval (O'REILLY; MILLER, 1989; DHADIALLA et al., 1998). Interações antagonistas de AZA e NPVs até o momento não foram relatadas. À luz dos conhecimentos atuais, são escassas as informações sobre os efeitos de AZA e GVs aplicados simultaneamente sobre lepidópteros.

Os baculovírus são geralmente muito sensíveis à radiação UV, pH alcalino e altas temperaturas. Adjuvantes ou inertes podem proporcionar proteção efetiva contra fatores adversos do ambiente e, conseqüentemente, aumentar a persistência viral. Pó de talco é um inerte com potencial para ser usado em formulação de vírus em pó seco ou pó molhável por ser barato, proporcionar proteção contra o UV, além de produzir efeitos deletérios aos insetos, como desidratação, abrasão seguida de injúrias das partes bucais, redução do consumo de alimento e dificuldade na mobilidade, contribuindo para o aumento da mortalidade (EBELING, 1971; QUARLES, 1992; ALVES et al., 2008).

Esta pesquisa teve como objetivos determinar a compatibilidade e eficácia de dois produtos comerciais à base de nim em combinação com os corpos de oclusão (OB) de *PhopGV* na mortalidade larval e no rendimento de lagartas infectadas de *P. operculella*. Em outro experimento, avaliou-se a eficácia do pó de talco misturado com os grânulos de *PhopGV* em tubérculos de batata comparado ao vírus não formulado sobre a mortalidade larval de *P. operculella*.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Insetos e vírus

Lagartas neonatas de *P. operculella* usadas ao longo desse estudo foram coletadas de uma colônia que vinha sendo mantida por três anos no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, Departamento de Acarologia e Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), em Piracicaba, São Paulo, Brasil. O procedimento de criação foi adaptado do protocolo elaborado por BRIESE (1980). Em resumo, os ovos foram colocados em recipientes plásticos (32 x 19.5 x 5.5 cm) contendo tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L, cv. Ágata). A densidade larval foi de 2 g de tubérculo por lagarta, de acordo com recomendações de SINGH; CHARLES (1977) e PRATISSOLI et al. (2003). Os recipientes foram cobertos no fundo por uma camada de areia esterilizada para prover locais de pupação, e a sua tampa conteve um furo central preenchido com um pedaço de tecido “voile” para permitir ventilação adequada, evitando-se que os tubérculos se

estragassem mais rapidamente. A areia foi peneirada duas vezes por semana e as pupas, coletadas e transferidas para gaiolas de acasalamento. Cada gaiola dessas conteve no mínimo cinco casais de adultos. Essas gaiolas foram feitas com tubos de PVC (cloreto de polivinil; 10 cm diâmetro x 22 cm altura) contendo na sua extremidade superior um pedaço de malha de nylon, sobre a qual se colocou um disco de papel de filtro para a postura dos ovos. Para estimular a postura no papel de filtro, colocou-se um pedaço de batata em cima como atrativo. Os ovos foram coletados duas vezes por semana e serviram de material tanto para a manutenção da criação como para a elaboração dos bioensaios. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10%. A criação do inseto foi conduzida em uma sala asséptica climatizada (25 ± 1 °C, UR $\geq 50\%$ e 12:12 (L:E) h fotoperíodo). Os cadáveres de lagartas infectadas, maioria de último ínstar, foram vigorosamente macerados em uma solução tampão de Tris (pH = 7,4) com 0,1% de SLS (lauril sulfato de sódio). A suspensão viral foi filtrada através de um tecido “voile” para remoção de fragmentos grosseiros de tecidos orgânicos. O filtrado foi transferido para tubos plásticos tipo FalconTM, centrifugados a 299 g (= 1.000 rpm) por 3 min e, em seguida, o precipitado (*pellet*) foi descartado. A concentração da suspensão viral foi determinada em câmara de Petroff-Hausser. Essa suspensão semipurificada do vírus apresentou concentração de 9×10^9 OB.mL⁻¹ (OB = *occlusion bodies*/corpos de oclusão) e foi usada ao longo de todos os experimentos, permanecendo armazenada a - 40 °C quando não esteve em uso. Suspensões virais contendo entre 10^4 e 5×10^8 OB.mL⁻¹ foram preparadas diluindo-se sucessivamente a suspensão original em água destilada.

3.2.1.2 Nim e formulação de *PhopGV*

Foram utilizadas duas formulações oleosas (CE) à base de azadiractina (AZA) comercializados como NeemAzal[®]-T/S (Sustain-Ability Ltd., Nova Zelândia) e DalNeem[®] (Resitec Indústria Química Ltda., Brasil) contendo 10.000 e 859 ppm (partes por milhão) de azadiractina A como ingrediente ativo (i.a.), respectivamente. DalNeem também continha 736 ppm de azadiractina B. Cada formulação de nim foi diluída em água destilada para adquirir as concentrações desejadas de 4 e 8 ppm do i.a. azadiractina A (AZA-A).

Em outro experimento, foi utilizado como inerte/carreador para a formulação do vírus (*PhopGV*) o talco (DTS PM, Mineração São Judas, Brasil), constituído de partículas com

diâmetros entre 1,9 e 2,3 μm e composto basicamente de silicato de alumínio ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5$). O talco foi previamente autoclavado por 20 min a 120 °C e, em seguida, resfriado à temperatura ambiente antes de ser misturado às suspensões virais.

3.2.1.3 Efeito de *PhopGV*, DalNeem[®] e NeemAzal[®] na mortalidade larval de *Phthorimaea operculella*

O experimento foi conduzido em tubérculos de batata com sua superfície contaminada pelo agente viral (*PhopGV*), por meio do método da imersão (ALCÁZAR et al., 1992a), onde os tubérculos foram imersos em tratamentos aquosos por 5 min. Na primeira fase de experimentos, as formulações de *PhopGV* com NeemAzal foram testadas: (1) água destilada (testemunha), (2) *PhopGV* em uma concentração de 1×10^4 OB.mL⁻¹, (3) *PhopGV* em uma concentração de 1×10^5 OB.mL⁻¹, (4) AZA de NeemAzal a 0.04% (4 ppm), (5) AZA de NeemAzal a 0.08% (8 ppm), (6) *PhopGV* a 1×10^4 OB.mL⁻¹ + NeemAzal a 4 ppm, (7) *PhopGV* a 1×10^4 OB.mL⁻¹ + NeemAzal a 8 ppm, (8) *PhopGV* a 1×10^5 OB.mL⁻¹ + NeemAzal a 4 ppm, (9) *PhopGV* a 1×10^5 OB.mL⁻¹ + NeemAzal a 8 ppm. Em paralelo, o segundo grupo de experimentos consistiu de DalNeem associado ao vírus nas mesmas concentrações e combinações de tratamentos do bioensaio anterior.

O volume usado para tratar os tubérculos foi de 300 mL para todos os tratamentos. Vírus e os produtos de nim foram misturados e os tubérculos imediatamente tratados. Em seguida, depois de secados superficialmente, os tubérculos foram colocados sobre um pedaço de papelão corrugado dentro de potes plásticos de 475 mL, fechados com tampas (100 mm diâmetro) com um furo central (35 mm diâmetro) preenchido por um pedaço de tecido “voile”, de modo a promover ventilação no interior do recipiente. Lotes de 30 lagartas neonatas de *P. operculella* (< 5 horas pós-eclosão) criados em tubérculos de batata foram transferidos, com auxílio de um pincel fino, para cada copo contendo 70 ± 5 g de tubérculo e, depois, levados para incubar em uma sala climatizada a 24 ± 0.5 °C, $55 \pm 5\%$ UR e 12:12 (L:E) h fotoperíodo. Cada tratamento conteve quatro repetições. A mortalidade larval foi verificada após 21 dias de incubação, quando as lagartas da testemunha iniciaram a pupação, e a porcentagem desse parâmetro foi calculada pela contagem do número de lagartas mortas pelo número total de lagartas colocadas por parcela

(= 30). As lagartas coletadas com sintomas típicos da doença granulose, isto é, cadáveres infectados exibindo aparência branco-leitosa, insensibilidade a estímulos (morbidez) e flacidez do corpo, foram registradas como “lagartas infectadas recuperadas”, variável essa também denominada de “rendimento de lagartas infectadas”.

3.2.1.4 Efeito da formulação pó seco de *PhopGV* na mortalidade larval de *Phthorimaea operculella*

O experimento foi realizado com vírus semipurificado (não formulado) e com a formulação viral de pó seco em dois bioensaios conduzidos paralelamente. Para formular o vírus, os grânulos virais (OB) da suspensão-estoque de *PhopGV* foram adicionados ao talco na proporção de 1:1 (120 mL de suspensão viral para 120 g de talco) em um frasco de béquer de 500 mL (Figura 3.1 A). As misturas foram secadas com aeração forçada em uma câmara de fluxo laminar vertical por 12 h a 26 °C. Após secagem, as misturas foram moídas a um fino pó com auxílio de um conjunto de cadinho e pistilo (Figura 3.1 B e C). Quatro concentrações virais foram formuladas em talco: 5×10^2 , 5×10^4 , 5×10^6 e 5×10^8 OB.g⁻¹. Talco sozinho e água destilada formaram dois tipos de testemunha, um controle positivo e outro negativo. Os tubérculos foram transferidos para sacos plásticos (polipropileno) contendo 120 g de cada formulação viral de pó seco. O conjunto foi agitado manualmente por alguns segundos até os tubérculos adquirirem uma fina camada branca do produto formulado (Figura 3.1 D). Para a testemunha não tratada, os tubérculos foram imersos em água destilada por 5 min. Outro bioensaio foi conduzido com as mesmas concentrações virais descritas anteriormente, sem a adição de talco, tendo-se por objetivo avaliar o efeito do vírus não formulado, incluindo uma testemunha não tratada composta somente por água destilada. Nesse ensaio, o método da imersão foi usado para promover a contaminação superficial dos tubérculos imergindo-os em diferentes suspensões virais. Para ambos os bioensaios, lotes de 20 lagartas neonatas (< 5 h pós-eclosão) foram transferidas para copos contendo 50 ± 5 g de tubérculos e incubados em uma sala climatizada a 24 ± 0.5 °C, $55 \pm 5\%$ UR e 12:12 (C:E) h fotoperíodo. Cada tratamento consistiu de seis repetições de 20 lagartas. Três semanas depois, quando os insetos começaram a se transformar em pupas na testemunha, a

porcentagem de mortalidade larval foi calculada com base no número de lagartas mortas pelo número total de lagartas introduzidas nos copos (= 20).

Figura 3.1 - Etapas do preparo da formulação de *PhopGV* em pó seco de talco. A) Mistura de talco com suspensão de vírus em béquer B) Secagem da formulação em bandeja metálica C) Tratamento de tubérculos na formulação de pó seco D) Comparação entre testemunha não tratada (esquerda) e tubérculo tratado com a formulação viral (direita)

3.2.1.5 Análises estatísticas

Os experimentos foram arranjados segundo o delineamento estatístico inteiramente aleatorizado. Dados de todos os experimentos representados pelas variáveis-resposta mortalidade larval e rendimento de lagartas infectadas foram submetidos à análise de variância (*one-way*

ANOVA) e as médias separadas pelo teste de Tukey (HSD, $p \leq 0,05$). Antes das análises, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para “rendimento de lagartas infectadas” do bioensaio de nim com *PhopGV* e em $(x + 0,5)^{1,5}$ para “mortalidade larval” referente ao bioensaio de formulação do vírus com talco, de forma a homogeneizar as variâncias. A eficiência devido à formulação (comparação entre o vírus formulado e não formulado) foi determinada pela fórmula $[100 - (Cv/Fv)*100]$, onde Cv é a mortalidade corrigida (%) do vírus não formulado (cru) e Fv , a mortalidade corrigida (%) do vírus formulado com talco. Todos os dados foram analisados no programa estatístico SAS versão 9.1 (SAS INSTITUTE INC., 2004).

Interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas dos agentes misturados foram determinadas usando o teste de Chi-quadrado (χ^2). A análise das interações do vírus com os dois produtos de nim foi conduzida independentemente. Para os cálculos, a mortalidade observada foi previamente corrigida pela equação $CM_i (\%) = [(T_i - C)/(100 - C)]*100$, onde CM é a mortalidade corrigida do tratamento i , C é a mortalidade observada na testemunha, e T_i é a mortalidade observada no tratamento i (SCHNEIDER-ORELLI, 1947). A fórmula seguinte sugerida por FINNEY (1971) e MCVAY et al. (1977) foi usada para determinar a mortalidade esperada, quando os dois agentes agem independentemente um do outro: $Me = M_{estressor} + M_{gv} * [(100 - M_{estressor})/100]$, onde Me é a % mortalidade esperada, M_{gv} é a % mortalidade causada por *PhopGV* sozinho, e $M_{estressor}$ é a % mortalidade observada causada somente pelo agente estressor (talco ou nim). Os resultados obtidos pelo teste de Chi-quadrado, $\chi^2 = (M_{gv+estressor} - Me)^2/Me$, onde $M_{gv+estressor}$ é a mortalidade observada para a combinação dos dois agentes e Me é o valor esperado, foram comparados ao valor tabelado de Chi-quadrado ($\chi^2_{tab} = 3,84$) para 1 grau de liberdade ($p = 0,05$). Se o valor tabelado exceder o calculado, conclui-se que a mortalidade observada para combinação dos agentes está dentro da amplitude esperada dos efeitos aditivos. Se o valor calculado exceder o tabelado, então haverá razão para suspeitar de uma reação antagônica ou sinérgica entre os dois agentes.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Efeito de *PhopGV*, DalNeem® e NeemAzal® na mortalidade larval de *Phthorimaea operculella*

A mortalidade larval na testemunha foi de $17,6 \pm 4,8\%$ (Tabela 3.1). As mortalidades causadas por *PhopGV* não foram estatisticamente diferentes entre as duas concentrações virais ($p > 0,05$), variando de $51,3 \pm 3,9\%$ a $72,6 \pm 3,1\%$ para 1×10^4 e 1×10^5 OB.mL⁻¹, respectivamente. Médias das mortalidades larvais após exposição à AZA sozinha variaram de $57,5 \pm 6,0\%$ a $80,8 \pm 2,9\%$ para DalNeem e de $42,2 \pm 5,9\%$ a $59,2 \pm 3,7\%$ para NeemAzal. DalNeem causou taxas de mortalidade significativas a 4 e 8 ppm, porém a mortalidade pelo NeemAzal foi superior à testemunha apenas na concentração de 8 ppm ($p < 0,05$). Em geral, as mortalidades proporcionadas pelos tratamentos com DalNeem foram 36,3% e 36,5% maiores do que o NeemAzal nas concentrações de 4 e 8 ppm, respectivamente. A combinação de 1×10^4 OB.mL⁻¹ de *PhopGV* com 4 ppm de DalNeem proporcionou aumentos significativamente maiores de mortalidade de *P. operculella* em relação à aplicação de cada produto individualmente ($F_{(14, 52)} = 22,2$, $p < 0,0001$). Quando o vírus foi aplicado a 1×10^4 OB.mL⁻¹ com 8 ppm AZA de DalNeem, a mortalidade observada foi substancialmente maior (~ 2 vezes) do que o vírus aplicado individualmente, mas não diferiu estatisticamente do produto de nim ($p > 0,05$). Quando *PhopGV* foi aplicado com NeemAzal, as taxas de mortalidade foram similares às dos tratamentos onde esses produtos foram aplicados separadamente nas mesmas concentrações. Com base no teste de Chi-quadrado (χ^2), o efeito aditivo de *PhopGV* e DalNeem foi observado para todas as concentrações testadas ($\chi^2 \text{ calc} \leq 3,84$), e a interação de *PhopGV* com NeemAzal foi caracterizado como efeito antagônico ($\chi^2 \text{ calc} > 3,84$), exceto para a sua combinação usando baixas concentrações de cada agente (efeito aditivo) (Tabela 3.2).

Um efeito indireto do uso de AZA com o vírus foi medido pela porcentagem de lagartas infectadas recuperadas dos tubérculos. O rendimento de lagartas infectadas de *P. operculella* dos tubérculos foi consideravelmente baixo (< 10%) quando o vírus foi aplicado a 1×10^4 OB.mL⁻¹ com os dois produtos à base de nim, e nenhuma diferença estatística foi detectada entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 3.3). Quando os produtos de nim foram aplicados com *PhopGV* a 1×10^5 OB.mL⁻¹, a taxa de lagartas infectadas foi reduzida em até duas vezes comparada à

aplicação do vírus sozinho, mas diferenças estatísticas também não foram detectadas ($p > 0,05$). Diferenças de quatro a seis vezes no rendimento de lagartas infectadas foram encontradas entre os tratamentos de 1×10^5 e 1×10^4 OB.mL⁻¹ de *PhopGV* e entre as suas combinações com 8 ppm de DalNeem, respectivamente ($F_{(9, 35)} = 6,3$, $p < 0,0001$). Em todas as combinações de nim + *PhopGV*, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas, notou-se uma tendência de queda na recuperação de lagartas infectadas.

Lagartas com sintomas típicos da doença viral exibiram aparência branco-leitosa, segmentos corporais inchados (hipertrofia), insensibilidade a estímulos (morbidez) e flacidez do corpo. Os tratamentos à base de AZA causaram escurecimento, contração e deformidades no corpo da lagarta. Os tratamentos que levaram a combinação de AZA e *PhopGV* causaram simultaneamente escurecimento do tegumento e extravasamento de conteúdos corporais das lagartas, praticamente desintegrando-se quando tocadas. Geralmente, lagartas mortas por AZA + *PhopGV* tiveram septicemia (Figura 3.2).

Tabela 3.1 - Efeito de *PhopGV* e dois produtos à base de nim na mortalidade larval de *Phthorimaea operculella*

Produtos à base de nim	¹ Mortalidade larval (%)		
	Concentração de <i>PhopGV</i> (OB.mL ⁻¹)		
	0	1×10^4	1×10^5
0	17,6 ± 4,8 f	51,3 ± 3,9 de	72,6 ± 3,1 abcd
DalNeem 4 ppm	57,5 ± 6,0 bcde	86,7 ± 3,6 a	74,4 ± 6,2 abcd
DalNeem 8 ppm	80,8 ± 2,9 ab	92,5 ± 2,9 a	80,0 ± 5,1 abc
NeemAzal 4 ppm	42,2 ± 5,9 ef	54,4 ± 5,9 bcde	53,3 ± 8,5 cde
NeemAzal 8 ppm	59,2 ± 3,7 bcde	40,8 ± 5,2 ef	57,5 ± 8,7 bcde
¹ C.V. (%)	19,1		

¹ Médias (± EP) dentro das colunas e das linhas seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (Tukey HSD, $p > 0,05$). ² Coeficiente de variação

Tabela 3.2 - Interação de *PhopGV* com dois produtos à base de nim na mortalidade larval de *Phthorimaea operculella*, analisada pelo teste de Chi-quadrado (GL = 1)

Concentração de <i>PhopGV</i> (OB.mL ⁻¹)	¹ Mortalidade larval (%)				
	DalNeem				
	0 ppm	4 ppm	χ^2_{calc}	8 ppm	χ^2_{calc}
0	-	48,4	-	76,7	-
1 x 10 ⁴	40,8	86,7 (83,8)	2,97 ^{Adit}	90,9 (86,2)	0,26 ^{Adit}
1 x 10 ⁵	66,7	69,0 (82,8)	3,02 ^{Adit}	75,7 (92,2)	3,22 ^{Adit}
	NeemAzal				
	0 ppm	4 ppm	χ^2_{calc}	8 ppm	χ^2_{calc}
0	-	29,9	-	50,4	-
1 x 10 ⁴	40,8	44,7 (51,7)	2,38 ^{Adit}	28,2 (70,6)	25,50 ^{Ant}
1 x 10 ⁵	66,7	43,4 (75,4)	17,47 ^{Ant}	48,4 (83,5)	14,74 ^{Ant}

¹ Mortalidades corrigidas para os tratamentos de GV + Nim estão apresentados como valores Observados (M_{gv+aza}) e em parêntesis os valores Esperados (Me). Adit.: efeito aditivo ($\chi^2_{calc} \leq 3,84$); Ant.: efeito antagônico ($\chi^2_{calc} > 3,84$ e $(M_{gv+aza} - Me) < 0$)

Tabela 3.3 - Porcentagem de lagartas de *Phthorimaea operculella* infectadas e recuperadas de tubérculos tratados com *PhopGV* e dois produtos à base de nim

Produtos à base de nim	¹ Rendimento de lagartas infectadas (%)	
	Concentração de <i>PhopGV</i> (OB.mL ⁻¹)	
	1 x 10 ⁴	1 x 10 ⁵
0	9,6 ± 2,9 bc	39,6 ± 7,4 a
DalNeem 4 ppm	7,5 ± 2,1 bc	17,5 ± 5,0 abc
DalNeem 8 ppm	3,3 ± 2,4 c	18,9 ± 2,2 ab
NeemAzal 4 ppm	5,0 ± 2,2 bc	15,8 ± 3,7 abc
NeemAzal 8 ppm	9,2 ± 2,9 bc	15,0 ± 2,9 abc
C.V. (%)	32,4	

¹ Médias (± EP) dentro das colunas e das linhas seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (Tukey HSD, $p > 0.05$). ² Coeficiente de variação

Figura 3.2 - Sintomas de lagartas de *Phthorimaea operculella* mortas por *PhopGV* e pela mistura do vírus com produtos à base de nim. A) Lagarta infectada somente por *PhopGV* e morta no interior de uma galeria no tubérculo B) Exemplos de lagartas de diferentes idades mortas pela combinação de nim + *PhopGV* (lagartas pequenas geralmente morreram por septicemia)

3.2.2.2 Efeito da formulação em pó seco de *PhopGV* na mortalidade larval de *Phthorimaea operculella*

A mortalidade larval de *P. operculella* após tratamento com *PhopGV* não formulado foi diretamente dependente da concentração viral, exceto para a concentração de 5×10^2 OB.mL⁻¹ a qual não diferiu estatisticamente da testemunha. Mais de 80% de mortalidade larval foi observada nas concentrações $\geq 5 \times 10^6$ OB.mL⁻¹ (Tabela 3.4). O tratamento apenas com talco resultou em $69,2 \pm 7,1\%$, e na maioria dos casos as lagartas morreram no primeiro ínstar devido à rápida desidratação do tegumento. Mortalidades associadas ao vírus formulado a níveis de 5×10^2 e 5×10^4 OB.g⁻¹ não foram significativamente diferentes da testemunha tratada com talco. Vírus formulado ou não formulado a 5×10^6 e 5×10^8 OB.g⁻¹ (mL⁻¹) foram mais eficientes do que o tratamento apenas com talco ($F_{(9, 49)} = 58,66$, $p < 0,0001$). A mortalidade de *P. operculella* após tratamentos com *PhopGV* formulado aumentou de $77,0 \pm 3,7\%$ a 5×10^2 OB.g⁻¹ para 100% a 5×10^8 OB.g⁻¹. A formulação de talco melhorou a eficácia do vírus a 5×10^2 e 5×10^4 OB.g⁻¹ aumentando a mortalidade larval em 77,8 e 47,7% em relação ao vírus cru nas mesmas concentrações (Tabela 3.4). Efeito aditivo ($\chi^2_{\text{calc}} < 3,84$) foi verificado quando se adicionou talco

ao vírus a 5×10^2 , 5×10^4 e 5×10^6 OB.g⁻¹, porém não houve ganho de mortalidade a 5×10^8 OB.g⁻¹. Nessa elevada concentração, tanto o vírus formulado como o cru proporcionaram 100% de mortalidade, devido à alta dose viral adquirida pelas lagartas pequenas que leva a uma rápida mortalidade (efeito de superdose).

Tabela 3.4 - Mortalidade larval de *Phthorimaea operculella* após tratamento com vírus não formulado e vírus formulado em talco

Tratamento	¹ Mortalidade larval (%)		² Eficiência (%)	³ Mortalidade esperada (%) [χ^2_{calc}]
	Vírus formulado	Vírus não formulado		
⁴ Testemunha	69,2 ± 7,1 cd	21,4 ± 3,8 f	-	--
5×10^2 OB.g ⁻¹ (mL ⁻¹)	77,0 ± 3,7 bc	33,7 ± 10,7 ef	77,8	67,0 [0,22 ^{Adit}]
5×10^4 OB.g ⁻¹ (mL ⁻¹)	82,5 ± 6,7 bc	53,3 ± 3,3 de	47,7	76,8 [0,01 ^{Adit}]
5×10^6 OB.g ⁻¹ (mL ⁻¹)	90,8 ± 3,5 ab	87,5 ± 1,71 ab	4,8	95,4 [0,53 ^{Adit}]
5×10^8 OB.g ⁻¹ (mL ⁻¹)	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	0,0	-
⁵ C.V. (%)	17,1		-	-

¹ Médias (± EP) dentro das colunas e linhas seguidas pelas mesmas letras não são significativamente diferentes (Tukey's HSD, $p > 0,05$). ² Eficiência da formulação foi calculada por $[100 - (\text{vírus não formulado}/\text{vírus formulado}) \times 100]$. ³ Valores esperados para GV + Nim (*Me*) e valores calculados de χ^2 entre colchetes; Adit.: efeito aditivo ($\chi^2_{calc} \leq 3,84$). ⁴ A testemunha do tratamento vírus formulado e não formulado consistiu da aplicação de talco e água destilada, respectivamente. ⁵ Coeficiente de variação

3.3 Discussão

Este trabalho teve por objetivo usar AZA ou talco como um fator de estresse para aumentar a taxa de mortalidade de *P. operculella* a baixas concentrações do vírus e, consequentemente, reduzir o dano ao tubérculo. A mistura à baixa concentração de DalNeem (4 ppm) e *PhopGV* (1×10^4 OB.mL⁻¹) resultou no melhor efeito aditivo com aumento significativo da mortalidade larval comparado a cada um dos tratamentos (Nim ou GV) aplicados individualmente. Nenhuma das outras combinações de *PhopGV* com DalNeem ou NeemAzal resultou no aumento significativo de mortalidade comparado aos produtos sozinhos. Analisando as interações dos produtos à base de nim com o patógeno pelo teste de Chi-quadrado (χ^2),

encontrou-se um efeito antagônico de NeemAzal com *PhopGV* e aditivo para DalNeem. Nenhuma interação de sinergismo foi registrada para as combinações dos tratamentos provavelmente devido à alta mortalidade causada pelas concentrações testadas de ambos agentes. Diferenças entre os métodos de comparação pelo teste de Tukey e análise de Chi-quadrado (χ^2) ocorreram em razão do alto nível de mortalidade natural de *P. operculella* e à superdispersão dos dados biológicos (variação extra-binomial). Existem algumas evidências de que o nim também apresenta propriedades antivirais (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993). Compostos com tal atividade viricida podem estar presentes no NeemAzal, mas não no DalNeem, e podem ter contribuído para reduzir a infecção viral quando o NeemAzal foi misturado ao vírus e exposto às lagartas de *P. operculella*.

O tratamento com DalNeem proporcionou um sutil incremento da mortalidade de lagartas de *P. operculella* em relação ao NeemAzal. Considerando que os dois produtos foram aplicados nas mesmas concentrações de AZA, as diferenças nos valores de mortalidade larval provavelmente se devem às formulações ou composição de substâncias inseticidas. O produto DalNeem apresenta o composto AZA B, o qual pode atuar em sinergismo com a AZA A e, dessa forma, pode ter melhorado seu efeito sobre a mortalidade do inseto.

Nim pode induzir mudanças no intestino do inseto, inclusive no agrupamento das microvilosidades, desorganização das camadas de membrana extracelular e alterações na porção basal das células epiteliais, as quais podem induzir paralisia da alimentação e, consequentemente, menor ingestão de partículas virais com o alimento. O consumo de alimento pode também ser inibido por meio do efeito repelente proporcionado pelo nim a níveis de < 0.001 a 50 ppm de AZA (MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000), o que implica na menor ingestão de vírus. Em virtude do rompimento ou desorganização da parede intestinal do inseto pela AZA, o patógeno viral não consegue atingir as células epiteliais do mesêntero, que representam o principal sítio de penetração dos granulovírus.

Quando os produtos de nim foram aplicados com *PhopGV*, houve uma tendência de redução na taxa de recuperação de lagartas infectadas em comparação ao tratamento do vírus sozinho. Esse efeito ocorreu provavelmente porque as lagartas expostas à mistura dos agentes morreram precocemente (primeiros ínstar), frequentemente dentro do tubérculo e, como consequência disso, o inóculo viral (corpos de oclusão) produzido por essas lagartas não tem

condições de ser transmitido a outros indivíduos e infectar novas gerações do inseto. A adição de AZA à suspensão viral pode ter implicações epizootiológicas, resultando em menor quantidade de inóculo viral sendo produzido no cadáver larval e menor liberação no ambiente, porque lagartas doentes ficam menores ou morrem precocemente dentro do tubérculo, como sugerido por COOK et al. (1996). A maioria dos estudos acerca da interação de nim e NPVs em mistura a baixas doses contra lepidópteros-praga indica efeitos sinérgicos ou aditivos, traduzidos pela redução do tempo letal e aumento da mortalidade larval, ambos aspectos relacionados ao incremento da virulência do patógeno (COOK et al., 1996; NATHAN et al., 2005; NATHAN; KALAIVANI, 2006; KUMAR et al., 2008). O trabalho realizado recentemente por KUMAR et al. (2008) confirma os benefícios da combinação de NPV e AZA visando ao controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepid.: Noctuidae), obtendo-se redução da sobrevivência e afetando também a alimentação e biologia do inseto-alvo. Além disso, é preciso considerar que o uso de nim associado com o granulovírus em batata pode controlar outras pragas tais como afídeos, moscas-brancas e crisomelídeos, porque os compostos à base de AZA possuem amplo espectro de ação sobre diferentes grupos de insetos (ASCHER, 1993).

O talco foi testado com a finalidade de carrear os grânulos virais (OB) na formulação de pó seco ou pó molhável, no entanto foi verificado que esse agente físico a 5×10^2 OB.g⁻¹ foi suficiente para promover mais de 76% de mortalidade larval de *P. operculella*. É de conhecimento comum que formulações em pó seco, à base de compostos minerais (silicatos de alumínio, carbonatos de cálcio etc.) de diferentes fontes naturais (rochas, algas, conchas etc.), também causam injúrias ao aparato bucal de insetos mastigadores e desidratação corporal, visto que esses compostos absorvem a camada de cera epicuticular do inseto resultando em perda de água (EBELING, 1971; QUARLES, 1992). O talco usado na formulação de *PhopGV* resultou em aumento expressivo da mortalidade larval a 5×10^4 OB.mL⁻¹. Lagartas pequenas (mais jovens) foram mais sensíveis à dessecação e observaram-se que essas lagartas tiveram mais dificuldade para movimentar-se sobre a superfície do tubérculo tratada com talco. A camada de talco formada sobre o tubérculo serviu como uma barreira física contra a penetração das lagartas de *P. operculella* prevenindo danos.

Devido ao hábito críptico das lagartas de *P. operculella*, é necessária uma quantidade significativa de partículas virais (OB) sobre a superfície do tubérculo ou da folhagem (parte

aérea) de batata para causar grandes taxas de mortalidade, porque o único momento em que a lagarta pode se contaminar pelo GV é logo após a sua eclosão quando caminham sobre a superfície da batata, em busca de um lugar para penetrar. Portanto, a densidade de vírus requerida para conferir um controle satisfatório é, consequentemente, maior do que aquela normalmente requerida para o controle de insetos que se alimentam de partes expostas das plantas, isto é, que não possuem hábito críptico (REED; SPRINGETT, 1971). Um programa de manejo integrado de *C. pomonella* em pomares de maçã utiliza da aplicação inundativa com alta dosagem de um granulovírus (*CpGV*), já que é uma praga de hábito críptico e curta exposição ao patógeno (ARTHURS; LACEY, 2004). No Peru e na Colômbia, a formulação pó molhável de *PhopGV* é vendida numa mistura com talco para tratar tubérculos-semente, que são armazenados em condições rústicas sem refrigeração, a fim de protegê-los contra infestações externas de *P. operculella*. ALCÁZAR et al. (1992b) verificaram uma redução de 32 vezes na infestação de *P. operculella* quando o vírus foi formulado em talco, o qual sozinho causou 50% de redução na infestação dos tubérculos comparado à testemunha, após 120 dias da aplicação. Os mesmos autores apontaram um sutil ganho de eficiência para a mistura de talco + vírus em relação à suspensão viral aquosa para suprimir a população de *P. operculella* e que resultou em apenas 13% de dano após 120 dias, ao invés de 100% nos armazéns não tratados com o vírus. Algumas vantagens adicionais desta formulação em pó de talco para o vírus estão relacionadas à sua proteção à radiação UV e maior estabilidade na prateleira do que as formulações aquosas (CORY; BISHOP, 1997; IGNOFFO; GARCIA, 1996), tornando esse tipo de formulação desejável num programa de manejo integrado de praga (MIP). Portanto, mais estudos devem ser conduzidos para avaliar a formulação em pó de *PhopGV* em relação à sua eficácia e persistência nas condições de campo.

3.3 Considerações finais

O uso de misturas de *PhopGV* com o produto à base de nim DalNeem em baixas concentrações permite maior eficiência no controle de lagartas *P. operculella* sem afetar a produção de lagartas infectadas. Entretanto, a formulação de nim NeemAzal pode afetar a eficiência de controle pelo vírus e indica que testes de laboratório são necessários para avaliar a

compatibilidade de outras formulações de nim com vírus antes de aplicá-los juntos em campo. A formulação do vírus em pó de talco aumenta a mortalidade de lagartas de *P. operculella*, comparado ao vírus não formulado.

Referências

ALCÁZAR J., CERVANTES M., RAMAN K.V. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 35, p. 107-111, 1992a.

ALCÁZAR, J.; CERVANTES, M.; RAMAN, K.V. Efectividad de un virus granulosis formulado en polvo para controlar *Phthorimaea operculella* en papa almacenada. **Revista Peruana de Entomologia**, Lima, v. 35, p. 113-116, 1992b.

ALVES, L.F.A.; OLIVEIRA, D.G.P.; NEVES, P.M.O.J. Fatores que afetam a eficiência da terra de diatomácea no controle de adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 6, p. 716-722, 2008.

ARTHURS, S.P.; LACEY, L.A. Field evaluation of commercial formulations of the codling moth granulovirus: persistence of activity and success of seasonal applications against natural infestations of codling moth in pacific northwest apple orchards. **Biological Control**, Orlando, v. 31, p. 388-397, 2004.

ASCHER, K.R.S. Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 22, p. 433-449, 1993.

BRIESE, D.T. Characterisation of a laboratory strain of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 70, p. 203-212, 1980.

BURGES, H.D., CROIZIER, G., HUBER, J. A review of safety tests on baculoviruses. **BioControl**, Dordrecht, v. 25, n. 4, p. 329-339, 1980

COOK, S.P.; WEBB, R.E.; THORPE, K.E. Potential enhancement of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus with the triterpene azadirachtin. **Environmental Entomology**, College Park, v. 25, p. 1209-1214, 1996.

CORY, J.S.; BISHOP, D.H.L. Use of baculoviruses as biological insecticides. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 7, p. 303-313, 1997.

CUBILLO, D.; SANABRIA, G.; HILJE, L.. Evaluación de la repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre *Bemisia tabaci*. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 53, p. 65-71, 1999.

DHADIALLA, T.S.; CARLSON, G.R.; LE, D.P. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 545-569, 1998.

EBELING, W. Sorptive dust for pest control. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 16, p. 123-158, 1971.

FINNEY, J.R. **Probit Analysis**, 3rd ed. London: Cambridge University Press, 1964. 38 p.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R., FEDERICI, B.A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. v.1: Biological Properties and Molecular Biology. p. 177-202.

GRUBER, A.K. Biología y ecología del árbol del neem (*Azadirachta indica* A. Juss): extracción, medición, toxicidad y potencial de crear resistencia. **CEIBA**, Tegucigalpa v. 33, p.249-256, 1992.

HANAFI, A. Integrated pest management of potato tuber moth in field and storage. **Potato Research**, Wageningen, v. 42, p. 373-380, 1999.

IANNACONE, J.; LAMAS, G. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. **Entomotropica**, Maracay, v. 18, n. 2, p. 95-105, 2003.

IGNOFFO, C.M.; GARCIA, C. Simulated sunlight-UV sensitivity of experimental dust formulations of the nuclear polyhedrosis virus of *Helicoverpa* /*Heliothis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 67, p. 192-194, 1996.

INTERNATIONAL POTATO CENTER. **CIP in 1995: The International Potato Center Annual Report**. Lima, 1996. 56 p.

KUMAR, N.S.; MURUGAN, K.; AND ZHANG, W. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and azadirachtin. **BioControl**, Dordrecht, v. 53, p. 869-880, 2008.

LEE, S.M.; KLOCKE, J.A.; BARNBY, M.B.; YAMASAKI, R.B.; BALANDRIN, M.F. Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azadirach*. In: HEDIN PA (Ed.). **Naturally occurring pest bioregulators**. American chemical Society, Washington, DC, 1991. p. 293-304. (ACS symposium series 449)

MCVAY, J.R.; GUDAUSKAS, R.T.; HARPER, J.D. Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 29, p. 367-372, 1977.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 39, p. 903-924, 1993.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; SIMMONDS M.S.J.; LEY, S.V.; BLANEY, W.M.; MORDUE M.; NASIRUDDIN M.; NISBET, A.J. Actions of azadirachtin, a plant allelochemicals, against insects. **Pesticide Science**, London, v. 54, p. 277-284, 1998.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.

MURUGAN, K.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; KUMAR, N.S.; JEYABALAN, D.; SENTHILNATHAN, S. Synergistic of botanicals and biocides (nuclear polyhedrosis virus) on pest control. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi, v. 57, p. 732-739, 1998.

NATHAN, S.S.; KALAIVANI, K.; CHUNG, P.G. The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 83, p. 46-57, 2005.

NATHAN, S.S.; KALAIVANI, K. Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 96-104, 2006.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. **Science**, New York, v. 245, p. 1110-1112, 1989.

PRATISSOLI, D.; PARRA, J.R.P.; OLIVEIRA, H.N.; PEREIRA, F.F. Aspectos biológicos da traça-da-batatinha *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p.1153-1155, 2003.

QUARLES, W. Diatomaceous earth for pest control. **The IPM Practitioner**, Berkeley, v. 14, n. 5/6, p. 1-11, 1992.

RADCLIFFE, E.B. Insect pests of potato. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 27, p. 173-204, 1982.

RAMAN, K.V.; ALCÁZAR, J. Control biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus phthorimaea*. Lima: Centro Internacional de la Papa (CIP), 1992. 19 p. (**Boletín de Capacitación CIP-2**)

REED, E.M.; SPRINGETT, B.P. Large-scale field testing of a granulosis virus for the control of the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae)). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 61, p. 223-233, 1971.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/STAT[®] User's Guide**, version 9.1. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 2004.

SCHNEIDER-ORELLI, O. **Entomologisches Praktikum**, H.R. Sauerlander, Aarau, Switzerland, 1947.

SHAPIRO, M.; BELL, R.A. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 75, p. 346-349, 1982.

SHAPIRO, M.; PREISLER, H.K.; ROBERTSON, J.L. Enhancement of nucleopolyhedrosis virus activity on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by chitinase, **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 80, p. 1113-1116, 1987.

SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J.L. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 85, p. 1120-1124, 1992.

SIEBER, K.P.; REMBOLD, H., The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 29, p. 523-527, 1983.

SINGH, P.; CHARLES, J.G. An artificial diet for larvae of the potato tuber moth. **New Zealand Journal of Zoology**, Wellington, v. 4, p. 449-451, 1977.

SINGH, N.K.; SASTRY, M.S. Anti-microbial activity of neem oil. **Indian Journal of Pharmacology**, New Delhi, v. 13, p. 102, 1988.

VON ARX, R.; ROUX, O.; BAUMGARTNER, J. Tuber infestation by potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), at potato harvest in relation to farmers' practices. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 31, p. 277-292, 1990.

ZEDDAM, J.L.; POLLET, A.; MANGOENDIHARJO, S.; RAMADHAN, T.H.; FERBER, M.L. Occurrence and virulence of a granulosis virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 74, p. 48-54, 1999.