

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

GIZELE REJANE BALDO

**INTERAÇÕES DE FOLHAS DE SOJA E ALGODÃO COM A
ATIVIDADE DO VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE
*Chrysodeixis includens***

Ponta Grossa – PR
2018

GIZELE REJANE BALDO

**INTERAÇÕES DE FOLHAS DE SOJA E ALGODÃO COM A
ATIVIDADE DO VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE
*Chrysodeixis includens***

Tese apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Doutora em Agronomia – Área de concentração: Agricultura. Linha de Pesquisa: Manejo Fitossanitário.

Orientador: Prof. Dr. Daniel R. Sosa-Gómez.

Ponta Grossa – PR
2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

B178 Baldo, Gizele Rejane
Interações de folhas de soja e algodão com a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Chrysodeixis includens*/ Gizele Rejane Baldo. Ponta Grossa, 2018. 97f.

Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel R. Sosa-Gómez.

1.Baculovírus. 2.ChinNPV. 3.Lepidoptera. 4.Noctuidae. 5.Superfície foliar. I.Sosa-Gómez, Daniel R.. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Doutorado em Agronomia. III. T.

CDD: 632.8



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Tese: “Interações de folhas de soja e algodão com a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Chrysodeixis includens*”.

Nome: Gizele Rejane Baldo

Orientador: Daniel Ricardo Sosa-Gomez

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente

Prof. Dr. Bráulio Santos

Prof. Dr. Adalci Leite Torres

Prof. Dr. Gabriel Moura Mascarim

Data da Realização: 28 de fevereiro de 2018.

DEDICO

À minha família por todo carinho e
incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar os caminhos da minha vida e por tudo aquilo que me concede a cada momento.

Ao meu orientador Dr. Daniel R. Sosa-Gómez pela confiança, pelo apoio e valiosa orientação durante esses quatro anos em que trabalhamos juntos.

Aos meus pais Orlando e Neiva, pelos valores ensinados e pela oportunidade concedida.

Ao Sérgio pelo incentivo, paciência, compreensão e espírito de sacrifício ao longo destes anos. Obrigada por estar sempre comigo, mesmo a distância, e ter me ajudado a “não deixar a peteca cair”.

Às minhas irmãs pelo carinho e compreensão.

Aos meus sobrinhos lindos e encantadores que, mesmo a distância, arrancaram sorrisos e fizeram meus dias muito mais felizes.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realização deste curso.

À Embrapa Soja pela oportunidade de conduzir os trabalhos da tese nas suas dependências.

À Dra. Maria Cristina Neves de Oliveira, pelas inúmeras horas dispendidas na realização das análises estatísticas, pelas dicas valiosas, pela amizade e companheirismo.

À Dra. Sueli Giolo, pelo auxílio valioso nas análises estatísticas.

Ao Prof. José Domingos Fontana, pelo auxílio na realização da análise cromatográfica, e pelo grande incentivo no pontapé inicial desde doutorado.

Aos colaboradores do Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa soja, em especial ao Fábio Paro, José Jairo Da Silva, Jovenil Da Silva, Miguel Pereira, Ivanilda Soldório, Sérgio Henrique, pelo carinho, amizade e importantes contribuições para o desenvolvimento da tese.

Aos responsáveis pela casa de vegetação, Alvino, Juliano, Marcos e Olivino, pela ajuda na manutenção constante das culturas utilizadas.

Aos colaboradores dos campos experimentais da entomologia, Oriverto, Wilson, Adriano, Elias e Pavão por todo auxílio com o experimento de campo e as pulverizações.

Às professoras Sheila Levy e Ângela Falleiros pelo auxílio e orientações na realização da análise histopatológica.

Aos professores Rui Furiatti (UEPG) e Maurício Ursi (UEL), pela oportunidade de estágio de docência.

À Fundação Mato Grosso, por ceder as sementes de algodão.

Aos amigos do laboratório, Alessandra Benatto, Patrícia Husch, Jhibran Ferral-Pinã e Maria Amélia Gholmie pela colaboração, amizade e companheirismo.

Aos estagiários do laboratório pelo companheirismo e auxílio, Cibeli, Juliana, Ana Carolina, Jéssika e André.

À Capes, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta tese.

“A aventura ainda não terminou.”

Bilbo Bolseiro – O Hobitt

RESUMO

BALDO, Gizele Rejane. **Interações de folhas de soja e algodão com a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Chrysodeixis includens***. 2018. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

Os vírus de poliedrose nuclear são importantes agentes de controle microbiano de larvas de lepidópteros. No entanto, sua atividade pode ser comprometida durante a interação com suas plantas hospedeiras. Entender como ocorre a interação do vírus da lagarta *Chrysodeixis includens*, ChinNPV, com dois de seus hospedeiros, soja e algodão, pode auxiliar a expandir o uso de pesticidas biológicos amenizando suas limitações. A interação planta/vírus foi estudada a fim de verificar a influência da planta sobre o processo de infecção, alterando a forma e o momento em que as larvas se alimentam desses substratos. Os tratamentos foram: disco de folha, incorporação de folha (liofilizada e seca em estufa) em dieta, alimentação com substrato foliar antes da inoculação viral, persistência e exposição do vírus sobre a planta. As avaliações foram realizadas até o 10º ou 12º dias após a inoculação, quando foram determinados o peso e o estágio de desenvolvimento de cada sobrevivente. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência com riscos competitivos e os demais dados à ANOVA. Alterações histopatológicas no intestino médio das lagartas alimentadas com folhas de soja e algodão e inoculadas com o ChinNPV foram analisadas por microscopia de luz. A fixação das partículas virais foi avaliada através da extração da cera epicuticular com cinco solventes, seguida de aplicação, lavagem e contagem do vírus remanescentes. Fixação, morfologia e persistência dos poliedros sobre folhas de soja e algodão, em ambiente controlado e campo, foram avaliadas por MEV em diferentes períodos. A mortalidade das lagartas foi comprometida pelo algodão em quase todos os bioensaios realizados. A inoculação do NPV sobre discos de folha de soja resultou em mortalidades semelhantes à dieta. No entanto, quando tecidos liofilizados foram incorporados à dieta, os folíolos de soja reduziram a mortalidade de *C. includens* por NPV, com mortalidade análoga à provocada pelo algodão e, quando secos em estufa, a mortalidade larval foi intermediária, entre o apresentado pela dieta artificial e as folhas de algodão. Quando o vírus foi exposto na superfície da soja e posteriormente recuperado, o tempo de contato com a folha (72h) reduziu a atividade do vírus, o mesmo não foi válido para o algodão. A análise histopatológica mostrou desestruturação das células epiteliais no tratamento de alimentação prévia com folha, entretanto este fenômeno não alterou a mortalidade das lagartas. Enquanto em campo, a distribuição dos poliedros foi uniforme no filoplano das duas culturas, no laboratório, os poliedros formaram agregados sobre a superfície da soja. Já quando a cera epicuticular foi removida, a interação da folha com o vírus foi afetada. A atividade do ChinNPV foi comprometida tanto por folhas de soja quanto algodão, sendo que a persistência do vírus começa a reduzir após o terceiro dia de contato com o filoplano. Foi possível observar que a inativação do vírus somente ocorre quando folha de algodão e vírus são fornecidos em conjunto, enquanto na soja, o tempo de contato do vírus com a folha parece influenciar reduzindo a mortalidade das lagartas. Assim, seria interessante estudar formulações e doses para compensar a perda de atividade viral provocada pelos tecidos foliares.

Palavras-chave: Baculovírus. ChinNPV. Lepidoptera. Noctuidae. Superfície foliar.

ABSTRACT

BALDO, Gizele Rejane. **Interações de folhas de soja e algodão com a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Chrysodeixis includens***. 2018. 97 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

Nucleopolyhedrovirus are important microbial control agents of lepidopteran larvae. However, their activity may be compromised during interaction with their host plants. Understanding the interaction process of the caterpillar virus *Chrysodeixis includens*, ChinNPV, with two of its hosts, soybean and cotton, may help to expand the use of biological pesticides by alleviating their limitations. The plant/virus interaction was studied in order to verify the influence of the plant on the infection process, changing the form and the moment in which the larvae feed on these substrates. The treatments were: leaf disc, incorporation of leaf (lyophilized and oven-dried) in diet, feeding with leaf substrate before viral inoculation, persistence, and virus exposure on the plant. Evaluations were carried out until the 10th or 12th days after inoculation, when the weight and stage of development of each survivor were determined. Mortality data were submitted to survival analysis with competitive risks and the other data to ANOVA. Histopathological changes in the midgut of caterpillars fed with soybean and cotton leaves and inoculated with ChinNPV were analyzed by light microscopy. Fixation of the virus particles was evaluated by extracting the epicuticular wax with five solvents followed by the application, washing and counting of the remaining virus. Fixation, morphology and persistence of the polyhedra on soybean and cotton leaves, under controlled environment and field, were evaluated by SEM on different periods. The mortality of caterpillars was compromised by cotton in almost all bioassays performed. NPV inoculation on soybean leaf discs resulted in diet-like mortalities. However, when lyophilized tissues were incorporated into the diet, soybean leaflets reduced the mortality of *C. includens* by NPV, with mortality similar to that caused by cotton, and when drying in oven, the larval mortality was intermediate between that presented by artificial diet and cotton leaves. When the virus was exposed on the soybean surface and later recovered, the time of contact with the leaf (72h) reduced the activity of the virus; the same was not true for cotton. The histopathological analysis showed disruption of epithelial cells in treatments of previous leaf feeding; however, this phenomenon did not change the mortality of caterpillars. While in the field, the polyhedra distribution was uniform on the phylloplane of the two cultures, in the laboratory, the polyhedra formed aggregates on the surface of the soybean. Already when the epicuticular wax was removed, the interaction of the leaf with the virus was affected. The activity of ChinNPV was compromised by both soybean and cotton leaves, and the persistence of the virus begins to decrease after the third day of contact with the phylloplane. It was possible to observe that the inactivation of the virus only occurs when cotton leaf and virus are supplied together, while in soybean, the time of contact of the virus with the leaf seems to influence, reducing the mortality of the caterpillars. Thus, it would be interesting to study formulations and doses to compensate for the loss of viral activity caused by foliar tissues.

Key words: Baculovirus. ChinNPV. Lepidoptera. Noctuidae. Leaf surface.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Funções de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio pelo método do disco de folha.....	35
Figura 1.2 - Funções de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio de incorporação de 3% de folha liofilizada em dieta (p/v)	38
Figura 1.3 - Funções de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio de folha seca em estufa incorporada em dieta	41
Figura 1.4 - Função de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para a mortalidade de causa 1 (morte por vírus) e causa 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio da alimentação prévia com substrato foliar, em cada um dos tempos analisados	44
Figura 1.5 - Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas de quarto ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i> , 24 h após a inoculação com ChinNPV.	46
Figura 2.1 - Curvas de proporção acumulada de morte $[F(t x)]$ pelo ChinNPV para os tratamentos T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV, fixando os dias após a aplicação do vírus em que os bioensaios foram montados.....	62
Figura 2.2 - Curvas de proporção acumulada de morte $[F(t x)]$ pelo ChinNPV nos dias 0, 1, 3 e 8 após a aplicação do vírus nas plantas/dieta, fixando os diferentes tratamentos	64
Figura 2.3 - Dia 1. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície adaxial de folhas de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F) ...	67
Figura 2.4 - Dia 3. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície adaxial de folhas de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F) ...	68

Figura 2.5 - Dia 8. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície adaxial de folhas de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F) ...	69
Figura 2.6 - Disposição da suspensão viral de ChinNPV aplicada com pulverizador com pressão de CO ₂ e bico tipo duplo leque (TJ60-11002VS) com gota muito fina sobre a superfície foliar de algodão e soja	71
Figura 2.7 - Dia 0. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície foliar de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F)	73
Figura 2.8 - Dia 2. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície foliar de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F)	74
Figura 2.9 - Dia 6. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície foliar de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F)	75
Figura 2.10 - Curvas de incidência acumulada em função do tempo [Fk(t)] para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) para no teste de exposição dos poliedros sobre a superfície foliar de soja e algodão.	77
Figura 2.11 - Cromatografia em camada delgada dos compostos extraídos da superfície foliar de soja e algodão com cinco diferentes solventes.....	79
Figura 2.12 - Fotomicrografia da superfície de (A) algodão e (B) soja, antes (esquerda) e após (direita) extração da cera com clorofórmio	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para o bioensaio pelo método do disco de folha, através do teste estatístico de análise de sobrevivência	34
Tabela 1.2 - Efeito do substrato foliar na mortalidade, no peso e no desenvolvimento de lagartas <i>Chrysodeixis includens</i> de 3° ínstar, 10 dias após a inoculação com ChinNPV.	36
Tabela 1.3 - Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para o bioensaio de incorporação de 3% de folha liofilizada incorporada em dieta (p/v) através do teste estatístico de análise de sobrevivência	37
Tabela 1.4 - Efeito do substrato foliar liofilizado e incorporado na dieta sobre a mortalidade, o peso e o desenvolvimento de lagartas <i>Chrysodeixis includens</i> de 3° ínstar, 12 dias após a inoculação com ChinNPV.	39
Tabela 1.5 - Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para as curvas de incidência acumulada no bioensaio de folha seca em estufa incorporada em dieta.....	40
Tabela 1.6 - Efeito do substrato foliar seco em estufa e incorporado na dieta sobre a mortalidade, o peso e o desenvolvimento de lagartas <i>Chrysodeixis includens</i> de 3° ínstar , 12 dias após a inoculação com ChinNPV.....	42
Tabela 1.7 - Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para o bioensaio da alimentação prévia com substrato foliar... ..	43
Tabela 1.8 - Efeito dos diferentes tipos de alimentação antes da inoculação com ChinNPV, na mortalidade e desenvolvimento das lagartas <i>Chrysodeixis includens</i> de 4° ínstar, após 10 dias de avaliação	45

Tabela 2.1 - Estimativas da incidência/probabilidade de mortalidade acumulada para cada tratamento no 12º dia, considerando os quatro dias após aplicação do vírus em que os bioensaios foram montados.....	61
Tabela 2.2 - Razão de risco de morte e intervalo de confiança para a comparação dos tratamentos dois a dois quando os dias são agrupados, no contexto do modelo de Fine-Gray	63
Tabela 2.3 - Razão de risco de morte e intervalo de confiança para a comparação dos dias dois a dois quando os tratamentos são agrupados, no contexto do modelo de Fine-Gray	65
Tabela 2.4 - Dados de temperatura e umidade relativa do ar durante o período de duração do experimento.....	70
Tabela 2.5 - Dados meteorológicos do período de duração do experimento em campo	72
Tabela 2.6 - Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray no bioensaio de exposição dos poliedros sobre a superfície foliar de soja e algodão	76
Tabela 2.7 - Efeito da exposição do ChinNPV sobre a superfície foliar de soja e algodão, na mortalidade e desenvolvimento das lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i> de 3º ínstar, 12 dias após a inoculação com ChinNPV	78
Tabela 2.8 - Área foliar utilizada na extração de compostos da superfície das folhas/folíolos de algodão e soja e volume empregado para ressuspender os extratos após secagem a vácuo	78
Tabela 2.9 - Fixação média dos corpos de oclusão do ChinNPV a partir de extratos da superfície foliar de soja e algodão provenientes de cinco diferentes solventes	80

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS.....	17
REVISÃO DE LITERATURA	18
1 <i>Chrysodeixis includens</i>	18
2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BACULOVÍRUS.....	19
3 INFLUÊNCIA DA PLANTA HOSPEDEIRA NA INFECTIVIDADE DE NPV	22
CAPÍTULO 1 – INFLUÊNCIA DOS SUBSTRATOS FOLIARES NA MORTALIDADE E HISTOPATOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE <i>Chrysodeixis includens</i> (Walker, [1858]) (Lepidopera: Noctuidae) INOCULADAS COM ChinNPV	26
1.1 INTRODUÇÃO	26
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1.2.1 Criação massal de <i>C. includens</i>	27
1.2.2 Obtenção do vírus entomopatogênico	27
1.2.3 Obtenção das plantas hospedeiras.....	28
1.2.4 Efeito das plantas hospedeiras na mortalidade das lagartas inoculadas com ChinNPV	28
1.2.5 Análise histopatológica do intestino médio de lagartas de <i>C. includens</i> alimentadas com dieta artificial, folíolos de soja ou folhas de algodão e inoculadas com ChinNPV	31
1.2.6 Análise estatística.....	32
1.3 RESULTADOS.....	34
1.3.1 Efeito das plantas hospedeiras na mortalidade das lagartas inoculadas com ChinNPV	34
1.3.2 Análise Histopatológica do intestino médio de lagartas de <i>C. includens</i> alimentadas com dieta artificial, folíolos de soja ou folhas de algodão e inoculadas com ChinNPV	45
1.4 DISCUSSÃO	47
1.5 CONCLUSÕES	51
CAPÍTULO 2 – FIXAÇÃO, MORFOLOGIA E PERSISTÊNCIA DO BACULOVÍRUS DE <i>Chrysodeixis includens</i> (WALKER, [1858]) (LEPIDOPERA: NOCTUIDAE),	

ChinNPV, NA SUPERFÍCIE FOLIAR DE ALGODÃO (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) E SOJA (<i>Glycine max</i> L.)	53
2.1 INTRODUÇÃO	53
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.2.1 Criação massal de <i>C. includens</i>	54
2.2.2 Obtenção do vírus entomopatogênico	54
2.2.3 Obtenção das plantas hospedeiras	55
2.2.4 Persistência do NPV de <i>Chrysodeixis includens</i> nas folhas de soja e algodão em casa de vegetação	55
2.2.5 Fixação, persistência e morfologia das partículas virais (corpos de oclusão) sobre os substratos vegetais	56
2.2.6 Exposição dos corpos de oclusão sobre a superfície foliar	57
2.2.7 Efeito dos compostos da superfície foliar sobre a fixação dos corpos de oclusão	58
2.2.8 Análise estatística	59
2.3 RESULTADOS	61
2.3.1 Persistência do NPV de <i>Chrysodeixis includens</i> nas culturas da soja e algodão	61
2.3.2 Fixação, persistência e morfologia das partículas virais (corpos de oclusão) sobre os substratos vegetais	66
2.3.3 Exposição dos corpos de oclusão sobre a superfície foliar	76
2.3.4 Efeito dos compostos da superfície foliar sobre a fixação dos corpos de oclusão	78
2.4 DISCUSSÃO	81
2.5 CONCLUSÕES	86
CONCLUSÃO GERAL	87
REFERÊNCIAS	88

INTRODUÇÃO

Considerado um dos maiores produtores mundiais de soja (*Glycine max* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), o Brasil pode se tornar recordista na produção dessas *commodities* devido à expansão da área de produção e das novas tecnologias que proporcionam maior produtividade. Entretanto, esta expectativa crescente poderá ser influenciada pelo aumento da incidência de insetos-praga. Os membros da família Noctuidae, por exemplo, são insetos polívoros encontrados em uma grande variedade de culturas de importância econômica, capazes de causar grandes prejuízos (VAIL; HOSTETTER; HOFFMANN, 1999).

Entre os membros desta família, uma das espécies com importância considerável é a lagarta *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858), pertencente à subfamília Plusiinae e que tem sua distribuição restrita ao continente americano, desde o norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (ALFORD, HAMMOND, 1982, MOSCARDI et al., 2012). Esta espécie possui um grande número de hospedeiros, entre eles a soja e o algodão, dos quais se alimenta do parênquima das folhas, mantendo íntegras as nervuras e conferindo aspecto rendilhado (CRAVEIRO et al., 2008, BUENO et al., 2009). Esta lagarta tornou-se uma importante praga das lavouras de soja no Brasil, possivelmente, devido ao uso inadequado de fungicidas e inseticidas que levou à redução de inimigos naturais (SOSA-GÓMEZ et al., 2003, SOSA-GÓMEZ; LASTRA; HUMBER, 2010).

A principal forma de controle dos insetos-pragas tem sido há décadas baseada na utilização do controle químico. O uso de químicos, além de problemas ambientais e à saúde humana e animal, também está promovendo a resistência dos insetos a esses produtos. Usado como alternativa ao emprego de produtos químicos no controle de lagartas em diferentes culturas, os vírus de poliedrose nuclear são específicos para cada inseto, entretanto alguns destes vírus podem ter uma ampla gama de hospedeiros, aumentando seu interesse agrônomo (VAIL; HOSTETTER; HOFFMANN, 1999). Além disso, os vírus possuem alta virulência e seletividade, agindo especificamente sobre algumas ordens dos artrópodes, fato que confere relativa segurança para o meio ambiente, o homem e os animais (CASTRO et al., 1999, HERNIOU et al., 2012, MUDGAL et al., 2013).

A maior parte dos vírus produzidos e utilizados no controle de insetos refere-se ao grupo dos baculovírus (SOSA-GÓMEZ et al., 2008), pertencente à família

Baculoviridae e que se dividem em 4 gêneros: *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovírus (NPV) específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovírus (GV) específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (nucleopoliedrovírus (NPV) específicos de himenópteros), e *Deltabaculovirus* (nucleopoliedrovírus (NPV) específicos de dípteros) (JEHLE et al., 2006). Alfa e Beta baculovírus são os vírus que se apresentam em maior quantidade em relação aos outros gêneros, além de serem os mais estudados e utilizados comercialmente (GRZYWACZ, 2016).

Embora considerados de alta virulência e eficazes no controle principalmente de larvas de lepidópteros, os baculovírus podem ter sua eficiência comprometida por fatores ambientais e por algumas plantas hospedeiras que influenciam negativamente a suscetibilidade dos insetos à doença causada (ALI et al., 1998, CORY; HOOVER, 2006, STEVENSON; D'CUNHA; GRZYWACZ, 2010).

A luz ultravioleta é um dos principais fatores que podem contribuir para a rápida inativação de um baculovírus, assim como ocorre com outros entomopatógenos, e é considerada um grande obstáculo quanto à efetiva utilização de pesticidas virais (ALI et al., 2002). Além disso, o pH do ambiente onde o vírus se encontra, a temperatura e a precipitação também são importantes elementos que podem afetar a atividade viral do baculovírus quando este encontra-se no ambiente (YOUNG; YEARIAN, 1974, MCLEOD; YEARIAN; YOUNG, 1977, IGNOFFO, 1992). Ainda, estudos indicam que a planta hospedeira pode contribuir não apenas na redução da atividade do baculovírus, seja através da constituição química de suas folhas ou por alterações promovidas no intestino da lagarta, como também na redução da persistência dos baculovírus no ambiente e sua disseminação em uma população de insetos (KEATING; MCCARTHY; YEDOL, 1989, ALI et al., 1998, RAYMOND et al., 2002, STEVENSON; D'CUNHA; GRZYWACZ, 2010, SOSA-GÓMEZ, 2012).

Estudos da interação entre plantas hospedeiras, os vírus de poliedrose nuclear (NPV) e a suscetibilidade dos insetos à infecção são de fundamental importância para expandir o uso de pesticidas biológicos e sobrepujar suas limitações. Este estudo poderá proporcionar informações para auxiliar o manejo da *C. includens* através do seu vírus entomopatogênico nas culturas da soja e do algodão.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do substrato foliar de soja (*Glycine max* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sobre o vírus de poliedrose nuclear de *Chrysodeixis includens*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Verificar o efeito do substrato alimentar na mortalidade das lagartas expostas aos NPVs.
- 2) Averiguar o efeito do substrato de alimentação no intestino médio das lagartas.
- 3) Determinar a persistência do NPV de *Chrysodeixis includens* folhas de soja e algodão.
- 4) Estudar a fixação das partículas virais (Corpos de Oclusão) sobre os referidos substratos.
- 5) Avaliar o efeito dos exsudatos foliares sobre os corpos de oclusão.

REVISÃO DE LITERATURA

1 *Chrysodeixis includens*

A lagarta *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) pertence à família Noctuidae e subfamília Plusiinae. Sua ocorrência até meados de 2003/2004 era considerada baixa, sendo controlada naturalmente por parasitoides, predadores e entomopatógenos, raramente necessitando de medidas de controle para evitar prejuízos (SOSA-GÓMEZ et al., 2003). A importância desta praga aumentou ao longo dos últimos anos devido aos surtos populacionais da lagarta que se tornaram frequentes, motivados provavelmente pela alteração no manejo utilizado para aumentar a produtividade e consequente redução de seus inimigos naturais (SOSA-GÓMEZ et al., 2003, SOSA-GÓMEZ; LASTRA; HUMBER, 2010).

É uma praga polífaga com importância econômica em diferentes culturas, tendo sido registrada se alimentando de mais de 170 plantas hospedeiras (SPECHT; PAULA-MORAES; SOSA-GÓMEZ, 2015). Sua distribuição é restrita ao continente Americano e pode ser encontrada do norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (ALFORD, HAMMOND, 1982, MOSCARDI et al., 2012). O pico populacional desta praga está relacionado à maior disponibilidade de plantas hospedeiras, bem como a períodos quentes e úmidos (SANTOS et al., 2017), podendo manter-se em hospedeiros alternativos em períodos de entressafra. Além disso, alguns autores verificaram que o aumento populacional de *C. includens* é comum quando o cultivo de soja é feito próximo a áreas com algodão (BURLEIGH, 1972). Possivelmente este acréscimo populacional é explicado pelo consumo de néctar de flores de algodão pelos adultos, favorecendo a oviposição (BURLEIGH, 1972). Nos Estados Unidos é conhecida por ser uma espécie migratória, pois sobrevive durante o ano em regiões mais quentes e migram para outros locais quando a temperatura é favorável (HERZOG, 1980). Influenciadas pelas plantações de soja que no Brasil se iniciam em Mato Grosso e posteriormente avançam para outros estados, a migração dos adultos desta espécie também pode ser favorecida (PALMA et al., 2015).

A distribuição da *C. includens* ocorre principalmente no terço inferior e área central das plantas de soja e algodão (HERZOG, 1980), o que dificulta seu controle. Se alimentam do limbo foliar deixando intactas as nervuras, conferindo aspecto

rendilhado nas folhas o que caracteriza o ataque desta praga (CRAVEIRO et al., 2008, BUENO et al., 2009, MOSCARDI et al., 2012). Como consequência, a área foliar pode ser drasticamente reduzida, e com isso diminuir a produtividade das culturas. *C. includens* pode ocorrer na fase vegetativa e/ou reprodutiva tanto na cultura da soja, quanto na cultura do algodão.

2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BACULOVÍRUS

Ao longo dos últimos 70 anos, o manejo de pragas na agricultura foi baseado principalmente no controle químico. Contudo, os impactos negativos associados ao seu uso, principalmente na saúde e meio ambiente, exigiram um controle mais rigoroso na utilização, produção e regularização desses produtos. Em alguns casos, as mudanças foram forçadas pelo comportamento da própria praga, principalmente no que tange à seleção de populações resistentes (HAASE; SCIOCCO-CAP; ROMANOWSKI, 2015).

Baseado no conceito do manejo integrado de pragas (MIP), o uso harmônico de várias estratégias de controle passou então a ser adotado como forma de reduzir o uso de produtos químicos mantendo as populações de pragas em níveis abaixo do dano econômico. Dentre os diferentes métodos de controle usados de forma integrada, destacam-se os agentes de controle biológico, compostos por parasitoides, predadores e patógenos que são caracterizados pela sua eficiência, facilidade de utilização, preservação de inimigos naturais e reduzido impacto sobre o meio ambiente (MOSCARDI, 1999, LACEY, 2016). Neste sentido, os vírus entomopatogênicos se apresentam como uma alternativa viável para o controle de lepidópteros-praga em relação ao controle químico. Estes biopesticidas apresentam como principais características sua especificidade e seletividade a artrópodes, particularidade que o torna um agente biológico seguro, tanto para a saúde humana e animal quanto para o meio ambiente (CASTRO et al., 1999, HERNIOU et al., 2012, MUDGAL et al., 2013).

Os baculovírus são os vírus mais pesquisados no controle microbiano, representando a maior parte dos inseticidas virais comerciais em uso (SOSA-GÓMEZ et al., 2008) com aproximadamente 30 espécies desenvolvidas como biopesticidas (GRZYWACZ, 2016).

Os baculovírus são um grupo de vírus patogênicos a artrópodes, principalmente para larvas da ordem Lepidoptera, mas também para insetos das ordens Diptera e Hymenoptera (D'AMICO; SLACICEK, 2013, ROHRMANN, 2013, GRZYWACZ, 2016). Eles são caracterizados pela sua dupla cadeia de DNA circular que varia de 80 a 180 kbp de tamanho (SLACK; ARIF, 2007, HERNIOU et al., 2012). Seus genomas encontram-se em nucleocapsídeos em formato de bacilos delimitados por um envelope lipídico de dupla camada (SLACK; ARIF, 2007, ROHRMANN, 2013, GRZYWACZ, 2016). O nome "Baculovírus" é uma referência à morfologia em forma de bastão desses nucleocapsídeos (HERNIOU et al., 2012). Eles pertencem à família Baculoviridae que se divide em 4 gêneros: *Alphabaculovirus* (vírus de poliedrose nuclear específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovírus específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (vírus de poliedrose nuclear específicos de himenópteros), e *Deltabaculovirus* (vírus de poliedrose nuclear específicos de dípteros) (JEHLE et al., 2006). A maioria das espécies de baculovírus são encontradas nos baculovírus alfa e beta (GRZYWACZ, 2016).

Os vírus da poliedrose nuclear (NPV) e granulovírus (GV) diferem entre si devido à morfologia do corpo de oclusão. Os NPVs possuem corpos de oclusão (CO) poliédricos que variam de 0,4 a 5 µm e são formados por uma matriz cristalina composta principalmente pela proteína poliedrina. Eles contêm múltiplas partículas virais podendo apresentar um (*single* - SNPV) ou vários nucleocapsídeos por vírion (*multiple* - MNPV) (FEDERICI, 1997, GRZYWACZ, 2016). Já os GVs são menores, com tamanho variando de 0,3 a 0,5 µm, e constituídos geralmente por uma única partícula viral, com os corpos proteicos em formato ovoide, cujo componente principal é a granulina (CASTRO et al., 1999).

No ciclo de infecção do baculovírus são produzidos dois fenótipos virais: *budded virions* (BVs) e *occlusion derived virions* (ODV). Eles são geneticamente idênticos, mas diferem na composição proteica de seus envelopes e na sua funcionalidade. Os BVs são formados na primeira fase da infecção e são responsáveis pela infecção secundária, disseminando o vírus célula a célula por todo o corpo do inseto (MOSCARDI, 1998, ROHRMANN, 2013). Seu envelope é formado à medida que eles atravessam a membrana citoplasmática da célula. Já os ODVs são formados na fase final da infecção e são responsáveis pela transmissão horizontal do vírus, de inseto para inseto. Seu envelope é formado no núcleo, por

uma bicamada lipídica. Ao final da oclusão, os ODVs são embalados por uma matriz proteica cristalina denominada corpo de oclusão (FEDERICI, 1997, HARRISON; HOOVER, 2012).

A contaminação tem início com a ingestão dos corpos de oclusão pelo hospedeiro suscetível quando estes se encontram em sua fase larval (SLACK; ARIF, 2007). O pH básico do intestino médio dos insetos juntamente com a presença de enzimas proteases dissolvem rapidamente a matriz proteica do NPV disponibilizando as partículas virais em sua forma oclusa, os *occlusion derived virions* (ODV) (FEDERICI, 1997, CASTRO et al., 1999, CORY; HOOVER, 2006, HERNIOU et al., 2012). Após liberados, os ODVs atravessam a membrana peritrófica, possivelmente com o auxílio de enzimas metaloproteases denominadas “enhancins” presentes em sua superfície (FEDERICI, 1997, WANG; GRANADOS, 1997). Uma vez rompida essa barreira, os ODVs se ligam a receptores das células epiteliais do intestino médio, através de um conjunto de proteínas presentes nos vírions, denominados fatores de infectividade periférica (PIF), liberando os BVs. Estes, por sua vez, se fundem com a membrana celular via proteína de fusão (GP64 ou F) liberando os nucleocapsídeos no citoplasma celular dando início à infecção primária (HARRISON; HOOVER, 2012, ROHRMANN, 2013, GRZYWACZ, 2016). Os nucleocapsídeos migram então para o núcleo da célula onde seu DNA é descompactado e dá-se início a replicação do DNA viral e posterior disseminação do vírus por todo o corpo do inseto através dos BVs (FEDERICI, 1997, ROHRMANN, 2013). Ao final da infecção a produção de BV é reduzida e os nucleocapsídeos tornam-se ODVs à medida que adquirem o envelope e por fim são ocluídos pela poliedrina (HERNIOU et al., 2012, HAASE; SCIOCCO-CAP; ROMANOWSKI, 2015). Finalmente, a membrana dos núcleos repletos de corpos de oclusão se rompem liberando os COs na hemolinfa, causando a morte da lagarta e a liberação dos vírus no ambiente (FUXA, 2004).

Os sinais da doença aparecem alguns dias após a infecção. Alterações morfológicas como retardo do crescimento e descoloração da epiderme são seguidas de mudanças comportamentais com a redução da alimentação e da capacidade motora. Em alguns dias ocorre a morte das larvas, quando seus tecidos se liquefazem liberando os COs no ambiente (FEDERICI, 1997, MOSCARDI, 1999, FUXA, 2004)

3 INFLUÊNCIA DA PLANTA HOSPEDEIRA NA INFECTIVIDADE DE NPV

Diferente do que acontece a outros vírus que podem permanecer latentes em seus hospedeiros ou mesmo terem hospedeiros alternativos, com o baculovírus essa condição é limitada. Isso ocorre devido ao ciclo relativamente curto da maioria dos insetos, suas populações serem sazonais e cíclicas e principalmente devido à complexa alteração na fisiologia do inseto, desde a fase de ovo até o adulto, que fazem com que a latência e persistência do vírus no hospedeiro não sejam favoráveis (SLACK; ARIF, 2007). Por isso, os vírus de insetos desenvolveram mecanismos para permanecerem no ambiente por longos períodos à espera de surtos populacionais de seus hospedeiros (SLACK; ARIF, 2007).

Para garantir sua sobrevivência e persistir por muitos anos fora do hospedeiro, os baculovírus contam com uma rede de proteína cristalina constituída principalmente por poliedrina (NPV) ou granulina (GV), resistentes à solubilização, exceto em condições alcalinas, que conferem proteção aos vírions em seu interior (ROHRMANN, 1986). Segundo Coulibaly et al. (2007), partículas virais envoltas por poliedros, sejam elas das famílias Reoviridae ou Baculoviridae, podem sobreviver no meio extracelular a condições como desidratação, congelamento e degradação enzimática e ainda toleram tratamentos químicos como incubação com ácidos, ureia ou detergentes concentrados, mantendo ainda sua organização cristalina. Além disso, como uma estratégia dos NPVs, os poliedros podem conter um elevado número de vírions em seu interior, e estes podem conter um ou múltiplos nucleocapsídeos. Sendo assim, um único corpo de oclusão pode infectar uma célula com múltiplas cópias de seu genoma viral (SLACK; ARIF, 2007).

Apesar dos poliedros serem proteínas estáveis que conferem proteção às partículas virais, diversos fatores são indicados como responsáveis pela inativação de vírus da poliedrose nuclear.

A incidência de raios ultravioleta tem sido apontada como principal fator ambiental responsável pela inativação do vírus a campo e consequente redução da atividade dos baculovírus (BULLOCK, 1967, SMIRNOFF, 1972, GRZYWACZ, 2016). A exposição do vírus à luz solar no ambiente de campo causa a inativação de seu DNA prejudicando a atividade viral, que pode ser completamente comprometida em menos de 24 horas, levando à necessidade de reaplicações (YOUNG; YEARIAN, 1974, YOUNG; YEARIAN; KIM, 1977). A eficiência de baculovírus a campo ainda

pode ser afetada por diversos outros fatores como temperatura, precipitação e pH do ambiente onde ele se encontra (YOUNG; YEARIAN, 1974, MCLEOD; YEARIAN; YOUNG, 1977, IGNOFFO, 1992). Além disso, estudos indicam que a planta hospedeira também pode contribuir negativamente não apenas para a persistência dos baculovírus no ambiente, mas também na eficácia da infecção viral e sua disseminação em uma população de insetos (KEATING; MCCARTHY; YEDOL, 1989, ALI et al., 1998, ALI et al., 2002, RAYMOND et al., 2002, STEVENSON; D'CUNHA; GRZYWACZ, 2010, SOSA-GÓMEZ, 2012). Uma mesma planta afeta diferentes NPVs de maneira semelhante (FARRAR JR; RIDGWAY, 2000). Por sua vez, cada planta hospedeira atua de forma distinta na interação com o entomopatógeno, sendo que a mortalidade das lagartas pode variar até 50 vezes, quando ingeridas em diferentes plantas hospedeiras (CORY; HOOVER, 2006).

Muitos entomopatógenos persistem no meio ambiente e estes têm papel importante na infecção de novos hospedeiros (CORY; HOOVER, 2006). A manutenção da integridade dos corpos de oclusão do baculovírus é indispensável para sua persistência fora do hospedeiro e também para iniciar novas infecções (STEVENSON; D'CUNHA; GRZYWACZ, 2010).

Variações na arquitetura, na constituição química, na fenologia e no desenvolvimento das plantas são fatores decisivos na suscetibilidade dos insetos à doença causada pelos vírus (ALI et al., 2002). As plantas que proporcionam menor penetração de raios solares, seja pela disposição das folhas, pela inserção de pecíolos ou pela distribuição de ramos, asseguram maior persistência da atividade viral (ALI et al., 2002). Além disso, a fenologia (tecido vegetativo ou tecido reprodutivo) e o estresse das plantas hospedeiras provocados em alguns casos pela herbivoria prévia, também interferem na mortalidade das lagartas expostas aos NPVs (ALI et al., 1998).

Substâncias químicas presentes nas folhas foram apontadas como fatores responsáveis pela redução da suscetibilidade viral de baculovírus, sendo que a taxa de mortalidade das lagartas através do tempo varia substancialmente entre as diferentes plantas hospedeiras, devido principalmente às inúmeras diferenças químicas que ocorrem entre elas (KEATING; YENDOL; SCHULTZ, 1988, KEATING; MCCARTHY; YENDOL, 1989).

Alguns íons presentes nos exsudatos das folhas foram apontados como responsáveis pela inativação dos corpos de oclusão, contudo, a atividade inibidora

não foi atribuída diretamente ao íon, mas a um aumento global na força iônica (KEATING; MCCARTHY; YENDOL, 1989). Diferenças na força iônica podem comprometer a dissolução do corpo de oclusão e liberação dos vírions, ou podem ainda afetar a capacidade dos vírions de se ligar à célula hospedeira (KEATING; MCCARTHY; YENDOL, 1989).

O pH do substrato foliar também é apontado como inibidor da atividade do baculovírus (YOUNG; YEARIAN; KIM, 1977), podendo afetá-los de diferentes formas. Quando ácido, pode causar diferenças no pH do intestino médio do inseto dificultando a dissolução do poliedro e comprometendo a instalação da infecção viral. Folhas com pH básico podem aumentar as taxas de dissolução dos COs ainda em sua superfície, resultando numa inativação rápida por radiação UV, reduzindo a persistência do patógeno (CORY; HOOVER, 2006). No entanto, Elleman e Entwistle (1985) não identificaram o pH como responsável direto pela inativação dos NPVs, mas indicaram que ele contribui para a permanência de cátions em solução, e estes sim poderiam comprometer a atividade do vírus.

Os taninos, compostos resultantes do metabolismo secundário das plantas, têm mostrado ter atividade antimicrobiana contra uma grande quantidade de agentes patogênicos, incluindo bactérias, fungos e vírus (SWAIN, 1979, LÜTHY; HOFMANN; JAQUET, 1985). Eles possuem como característica principal a capacidade de se ligarem às proteínas (HAGERMAN; BUTLER, 1992). Os taninos podem agir ligando-se às proteínas dos vírus de modo que sejam formados agregados que impedem a liberação dos *occlusion derived virions* (ODV) (CADMAN, 1960, KEATING; MCCARTHY; YENDOL, 1989, KEATING; HUNTER; SCHULTZ, 1990), ou ainda através da ligação à membrana peritrófica que reduz o tamanho dos poros e dificulta a entrada do vírion nas células do intestino (FELTON; DUFFEY, 1990, KEATING; HUNTER; SCHULTZ, 1990).

A superfície da folha também pode apresentar metabólitos secundários denominados isoflavonoides. Assim como os taninos, eles são uma classe de compostos fenólicos e são abundantes em leguminosas. Sua atuação na redução da atividade viral de baculovírus também foi relatada, embora não se conheça mecanismo pelo qual isoflavonoides podem prejudicar a infectividade dos NPV (STEVENSON; D'CUNHA; GRZYWACZ, 2010).

A inibição da atividade viral dos NPVs também foi atribuída à presença de peroxidases. Estas geram radicais livres, que podem ocasionar um aumento da

descamação do intestino, dificultando a instalação da infecção primária pelo vírus (HOOVER, et al., 1998, HOOVER; WASHBURN; VOLKMAN, 2000).

Embora as condições ambientais e as características da planta hospedeira possam reduzir a atividade viral dos NPVs, alguns autores verificaram que a inativação de baculovírus na superfície das folhas não envolve a perda de corpos de oclusão poliédricos (YOUNG; YEARIAN; KIM, 1977, ELLEMAN; ENTWISTLE, 1985). Isso corrobora o fato de que a ingestão de alguns compostos que podem estar presentes nas folhas de diferentes espécies, em quantidades muito distintas, também dificultam o estabelecimento de infecções intestinais pelos baculovírus, possivelmente pela alteração da fisiologia intestinal ou por alguma incompatibilidade entre partículas virais e componentes das folhas (PLYMATE et al., 2008).

Segundo Ali e colaboradores (2002), além de reduzir significativamente a infecção viral pelo baculovírus, algumas plantas podem ainda aumentar o tempo de mortalidade dos insetos e reduzir a produção de COs, e com isso a infecção horizontal, de inseto para inseto, também fica comprometida.

Entender melhor como ocorre a interação da planta hospedeira com os vírus da poliedrose nuclear pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias que visam driblar a barreira imposta pelas plantas hospedeiras à efetividade de NPV e melhorar a eficácia dos pesticidas virais, que são uma alternativa viável ao uso de produtos químicos no controle de importantes pragas agrícolas.

Este estudo poderá trazer uma compreensão maior de como duas diferentes plantas hospedeiras (*Glycine max* L. e *Gossypium hirsutum* L.) influenciam a suscetibilidade de larvas de *C. includens* frente ao seu vírus entomopatogênico.

CAPÍTULO 1 – INFLUÊNCIA DOS SUBSTRATOS FOLIARES NA MORTALIDADE E HISTOPATOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE *Chrysodeixis includens* (WALKER, [1858]) (LEPIDOPERA: NOCTUIDAE) INOCULADAS COM CHINNPV

1.1 INTRODUÇÃO

A *Chrysodeixis includens* (Walker 1858), também denominada lagarta da soja, é uma praga polífaga, registrada se alimentando de mais de 170 plantas hospedeiras (SPECHT; PAULA-MORAES; SOSA-GÓMEZ, 2015) e distribuída em quase todo o continente americano (MOSCARDI et al., 2012). É considerada de grande importância econômica devido seu elevado potencial desfolhador, com destaque para as culturas de soja e algodão onde pode comprometer significativamente sua produtividade (BUSOLI et al., 2011).

Como alternativa aos produtos químicos usados no controle de larvas de lepidópteros, os vírus de poliedrose nuclear são caracterizados pela sua especificidade e alta virulência (CASTRO et al., 1999, HERNIOU et al., 2012, MUDGAL et al., 2013). Envoltos por um corpo proteico que lhes confere resistência, esses vírus têm a capacidade de preservarem sua atividade mesmo fora do hospedeiro (SLACK; ARIF, 2007), fato que favorece sua transmissão horizontal de inseto para inseto além de possibilitar a formulação de biopesticidas (ROHRMANN, 2013).

No entanto, a capacidade dos vírus de poliedrose nuclear de se manterem no ambiente não impede que alguns fatores, sejam ambientais ou relativos à interação inseto-vírus-planta, possam influenciar sua eficiência.

Enquanto a radiação UV foi apontada como responsável pela inativação do DNA viral (BULLOCK, 1967, SMIRNOFF, 1972), o pH do ambiente onde o vírus se encontra pode favorecer a ruptura da capa proteica, liberando o genoma, os quais são rapidamente degradados (YOUNG; YEARIAN; KIM, 1977, CORY; HOOVER, 2006). Além disso, fatores inerentes à planta podem influenciar a atividade do baculovírus. Os taninos, por exemplo, tem a capacidade de se ligar às proteínas dos vírus podendo dificultar a liberação dos *occlusion derived virions* (ODV) (KEATING; MCCARTHY; YENDOL, 1989, KEATING; HUNTER; SCHULTZ, 1990), enquanto a

presença de peroxidases pode favorecer o aumento de protusões no intestino médio das lagartas, dificultando a instalação da infecção primária pelo vírus (HOOVER, et al., 1998, HOOVER; WASHBURN; VOLKMAN, 2000).

A inibição da infecção viral parece depender das concentrações dos compostos químicos que chegam ao intestino médio das lagartas (KEATING; HUNTER; SCHULTZ, 1990), e dependendo da sua composição, cada planta hospedeira atua de forma diferente na suscetibilidade dos insetos à doença causada pelos vírus (CORY; HOOVER, 2006).

Dessa forma, buscou-se identificar e avaliar as interações envolvendo a lagarta *C. includens*, duas de suas importantes plantas hospedeiras, a soja e o algodão, e o ChinNPV utilizado no seu controle.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Criação massal de *C. includens*

As lagartas de *Chrysodeixis includens* foram oriundas do laboratório de Entomologia da Embrapa Soja e foram criadas em dieta artificial de Greene, Lepla e Dickerson (1976), à base de feijão, levedura, caseína, proteína de soja e germe de trigo, com as modificações e metodologia definidas por Hoffmann-Campo, Oliveira e Moscardi (1985).

1.2.2 Obtenção do vírus entomopatogênico

O isolado do vírus utilizado, ChinNPV (Isolado CNPSo-VPN168), se encontra armazenado na coleção de entomopatógenos da Embrapa Soja e foi obtido a partir de lagartas infectadas e coletadas em plantações de soja em Iguaraçu, PR, na safra 2005/2006.

O NPV foi multiplicado em sua lagarta hospedeira, mantida em dieta artificial livre de anticontaminante (formol), e posteriormente os indivíduos mortos foram armazenados em tubos de centrifugação tipo Falcon a -20 °C. Lagartas contendo o

vírus foram maceradas, e a suspensão resultante foi diluída em água destilada estéril e filtrada através de um algodão hidrófilo para a remoção de detritos. O vírus foi então parcialmente purificado, com o homogenato centrifugado quatro vezes a 7.000 g por 15 min a temperatura de 10°C (Eppendorf 5810 R, Alemanha), sendo o sobrenadante rejeitado e o precipitado ressuspenso em água destilada, em cada centrifugação. O sedimento resultante contendo os poliedros foi ressuspenso em água destilada, colocado em tubos criogênicos e armazenados a - 20 °C até serem usados. A concentração de corpos de oclusão foi estimada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer espelhada (Boeco, Alemanha) e microscópio ótico com contraste de fase e magnificação de 400 x (Carl Zeiss 47 30 28, Alemanha).

1.2.3 Obtenção das plantas hospedeiras

As plantas hospedeiras da lagarta *C. includens* (Soja – BRS 360 RR e algodão - FMT 701), foram cultivadas em casa de vegetação. A semeadura foi realizada em vasos plásticos de 3 L contendo uma mistura de terra, areia e esterco curtido na proporção 3:2:2 e um total de quatro plantas/vaso. Em todos os experimentos, as plantas foram utilizadas de 30 a 40 dias após a semeadura.

1.2.4 Efeito das plantas hospedeiras na mortalidade das lagartas inoculadas com ChinNPV

Folhas de soja e algodão foram fornecidas a lagartas *C. includes* de maneiras diversas a fim de verificar se a possível influência na doença causada varia de acordo com a planta e com a forma e o momento em que as larvas se alimentam desses substratos.

- **Bioensaios pelo método do disco de folha**

Os bioensaios foram realizados com base na metodologia utilizada por Ali e colaboradores (1998). As folhas de algodão e soja foram coletadas, cortadas em

discos de 6 mm de diâmetro e colocadas em bandejas com 32 células, com o fundo contendo ágar 2% solidificado. Em seguida 2 μL de uma suspensão de vírus contendo $2,5 \times 10^3$ CO e 0,01% de Tween 80 foi distribuída sobre os discos. A concentração foi determinada através de teste piloto. Larvas de terceiro ínstar foram então colocadas individualmente em cada uma das células e mantidas por até 48h, ou até consumirem pelo menos 80% do tecido vegetal. Aquelas larvas que consumiram o disco foram transferidas para novas bandejas, sem o ágar, contendo folha da respectiva cultura hospedeira, sem vírus, que foram substituídas em dias alternados. Os controles consistiram em um grupo de lagartas tratadas da mesma maneira, mas não inoculadas. Além destes, discos de dieta de aproximadamente 4 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram utilizados como controle positivo e negativo e tratados de forma semelhante, resultando num total de seis tratamentos (T1 = dieta artificial; T2 = folha de algodão; T3 = folha de soja; T4 = dieta + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV). Os bioensaios foram conduzidos em câmaras B.O.D. a 26 ± 2 °C, com fotoperíodo de 14:10 (L:E) e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. O experimento foi repetido cinco vezes e os insetos foram observados diariamente durante 10 dias. No décimo dia após o início do experimento foram anotados o estágio de desenvolvimento e o peso de cada indivíduo sobrevivente.

- **Bioensaios pelo método de incorporação de tecidos da folha em dieta**

As folhas das culturas foram cortadas, secas em estufa com circulação de ar (Tecnal TE 394/3) a 50°C por 72h ou então liofilizadas (Liofilizador LS3000 - Terroni) e em seguida trituradas em moinho de facas (Manesco e Ranieri Ltda, Willey, Brasil) com peneira de abertura de 1 mm. As folhas trituradas foram incorporadas à dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) na proporção de 3% (p/v), juntamente com o ChinNPV na concentração final de 5×10^3 CO.mL⁻¹. Esta concentração corresponde a CL₅₀ determinada por Alexandre e colaboradores (2010) para a mesma estirpe do vírus. A incorporação foi realizada quando a temperatura da dieta, sem formaldeído, atingiu aproximadamente 50°C. Posteriormente a dieta foi vertida em bandejas com 32 células com capacidade de 30 mL cada. Após sua solidificação, lagartas de *C. includens* de terceiro ínstar foram

transferidas individualmente para cada célula. Os tratamentos utilizados foram T1 – Dieta, T2 – Dieta + 3% de folha de algodão triturado e T3 – Dieta + 3% de folha de soja triturada como testemunhas e T4 – Dieta + ChinNPV como controle positivo, T5 – Dieta + 3% de folha de algodão triturado + ChinNPV e T6 – Dieta + 3% de folha de soja triturada + ChinNPV. Os bioensaios foram mantidos em câmaras B.O.D. a $26 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14:10 (Luz: Escuro) e umidade relativa de $60\% \pm 10\%$. Os experimentos foram avaliados diariamente até o 12º dia após o início do bioensaio e foram repetidos nove e onze vezes com folhas liofilizadas e secas em estufa, respectivamente. As informações de peso e estágio de desenvolvimento dos indivíduos sobreviventes foram coletadas ao final de 12 dias de avaliação.

- **Influência da alimentação prévia com substrato foliar na mortalidade de *C. includens* inoculadas com ChinNPV**

Lagartas neonatas de *C. includens* foram alimentadas com folhas de algodão, soja ou dieta artificial até o final de terceiro ínstar. Posteriormente, as larvas foram inoculadas com $150 \text{ CO.lagarta}^{-1}$ utilizando o método “droplet feeding” com lagartas em jejum (HUGHES e WOOD, 1981). A concentração utilizada foi aproximadamente duas vezes o valor da Cl_{50} para lagartas de terceiro ínstar (Item 2.3.3). O volume fornecido foi de $300 \text{ nL.lagarta}^{-1}$ (KUNIMI; FUXA, 1996). Foram realizados quatro tratamentos, sendo o controle negativo (T1) que consistiu das lagartas alimentadas com dieta e inoculadas apenas com uma solução de água destilada, corante alimentício (água, etanol, corante azul brilhante FCF, eritrozina e tartrazina, Mix coralin azul jeans) (10%) e sacarose (5%); o controle positivo, com lagartas alimentadas com dieta, às quais foram inoculadas com a solução corante + sacarose juntamente com o vírus (T2); as lagartas alimentadas até o final de terceiro ínstar com folhas de algodão e inoculadas com a suspensão contendo o vírus (T3), e também as lagartas que consumiram folhas de soja e foram inoculadas com a solução juntamente com o ChinNPV (T4). A suspensão viral foi fornecida em bandejas tipo “Bio-assay tray Bio-BA-128-USA”, compostas por oito divisórias com 16 células cada. Após 24h, foram transferidas para bandejas de 32 células (células de 30 cm^3) contendo dieta artificial, as lagartas que visualmente apresentaram alteração na cor do sistema digestório devido à presença do corante. Sessenta

lagartas foram usadas para cada tratamento, divididas em três repetições. As bandejas foram mantidas em câmara B.O.D. a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14:10 (Luz: Escuro) e umidade relativa de $60\% \pm 10\%$. A avaliação ocorreu diariamente até o décimo dia após o início do bioensaio. Os indivíduos sobreviventes ao final do experimento tiveram seu estágio de desenvolvimento determinado.

1.2.5 Análise histopatológica do intestino médio de lagartas de *C. includens* alimentadas com dieta artificial, folíolos de soja ou folhas de algodão e inoculadas com ChinNPV

Variações histopatológicas do intestino médio das lagartas, promovidas pelos diferentes substratos de alimentação juntamente com o vírus também foram avaliadas. Para isso, lagartas de *C. includens* foram alimentadas até o final de terceiro ínstar com folhas de soja, algodão ou dieta. Posteriormente elas foram inoculadas com $150\text{ CO.lagarta}^{-1}$ de quarto ínstar utilizando o método “droplet feeding” (HUGHES e WOOD, 1981), conforme protocolo e tratamentos descritos anteriormente.

O estudo histológico foi realizado no Laboratório de Insetos, do Departamento de Histologia, da Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

Após 24h da inoculação com vírus, foram coletados oito tubos digestivos por tratamento. Para a coleta, as lagartas de *C. includens* de quarto ínstar foram anestesiadas por resfriamento a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 minutos) e dissecadas sob microscópio estereoscópio, com solução salina (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO_3 e água destilada-q.s.p 100 mL).

O intestino médio foi removido e então fixado em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por seis horas. Após a fixação, o material foi lavado em solução de álcool etílico 70%, por três vezes (cinco minutos cada); desidratado álcool etílico 70 e 95% (por cinco e 20 minutos, respectivamente); pré-infiltrado em solução de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + álcool etílico 95% (1:1) por quatro horas em temperatura ambiente; infiltrado em resina básica + ativador (kit de embebição Historesin® Leica) em temperatura ambiente por 24 horas; incluído em moldes apropriados de polietileno contendo solução de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + ativador

(dibenzoilperóxido) + endurecedor (dimetilsulfóxido) e mantido em temperatura ambiente até a polimerização da resina. O material incluso na resina foi cortado com 5 µm de espessura, com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo (Leica, RM125, USA) e colocado em lâminas de vidro previamente limpas.

Para a coloração, os cortes foram hidratados (cinco minutos) em água destilada, corados com Hematoxilina de Harris (7 minutos); lavados em água corrente (10 minutos); corados com Eosina aquosa (25 min); lavados em água destilada (cinco mergulhos); desidratados em álcool etílico 95% (5 min) e 100% (10 min); diafanizados em três banhos de xilol (10 min cada um) e montados em bálsamo do Canadá. Após secagem, as lâminas foram analisadas e as imagens capturadas em fotomicroscópio (Zeiss: Axiophot, Alemanha) no Departamento de Histologia/CCB/UEL.

1.2.6 Análise estatística

As variáveis respostas média de peso (mg) e porcentagem de lagartas, pré-pupas e pupas dos indivíduos sobreviventes ao final da avaliação e tempo médio de mortalidade (dias), foram analisadas através de delineamento experimental inteiramente casualizado variando no número de tratamentos e repetições para cada um dos bioensaios realizados conforme mostrado no item 1.2.4. Os dados das variáveis respostas dos diferentes bioensaios foram submetidos aos testes para verificar as pressuposições de normalidade e independência dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965; PARENTE, 1984), a homogeneidade de variância dos tratamentos (BURR; FOSTER, 1972) e não-aditividade do modelo (TUKEY, 1949). Após as análises exploratórias e atendidos os pressupostos, foram realizadas as Análises de Variâncias (ANOVA) e a comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (STEEL, TORRIE, 1960) pelo software estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute, 2009). Quando os dados não atenderam à normalidade e homogeneidade de variâncias, eles foram transformados aplicando-se a transformação da família potência (BOX; COX, 1964) e então submetidos à ANOVA. Não atendendo os pressupostos da ANOVA, os dados foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (CAMPOS, 1979).

O tempo médio de mortalidade em cada um dos bioensaios foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$TMM = \frac{\sum (D1 \times N + D2 \times N2 \dots + Dn \times Nn)}{NT}$$

Onde:

D = dia da avaliação;

N = número de lagartas mortas pelo ChinNPV naquele dia;

NT = Número total de lagartas mortas pelo ChinNPV.

Para os dados de mortalidade, o modelo utilizado foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial entre os tratamentos, as subamostras e as repetições para cada um dos bioensaios realizados conforme mostrado no item 1.2.4. Nos casos em que os efeitos das subamostras e a interação entre tratamentos vs subamostras não apresentaram significância estatística o modelo utilizado foi o completamente casualizado. Os dados de mortalidade foram avaliados sob a abordagem não paramétrica na Análise de Sobrevida por Riscos Competitivos (PINTILIE, 2006, CARMES, 2015). Na presença de riscos competitivos tem-se então, que os indivíduos estão sob risco de falha por k causas diferentes e que a ocorrência de uma das k causas impede que se observe a ocorrência de qualquer outra. Seja $k= 1, 2$ denota as causas (1 = morte por vírus e 2 = morte por causas desconhecidas). A análise de sobrevivência permite a avaliação dos dados relacionados ao tempo até a ocorrência de um evento de interesse, o qual é chamado tempo de falha (COLOSIMO; GIOLO, 2006). Além disso, permite a observação parcial da variável resposta quando o evento não é observado (censura). As curvas de incidência/proporção acumulada do risco de morte foram comparadas pelo teste de Gray (1988) calculando-se as estimativas pontuais para o total de dias de duração do bioensaio. A função $F_k(t)$ fornece a probabilidade de morte pela causa k em cada t (dia). Estudos indicaram que, na presença de riscos competitivos, há situações em que o risco da causa específica num grupo é maior do que no outro (GRAY, 1988). O *software* R, versão 3.4.1 (R CORE TEAM, 2014) foi utilizado para a análise de sobrevivência e comparação das curvas pelo teste de Gray por meio dos pacotes *cmprsk* e *survival* (GRAY, 2014).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Efeito das plantas hospedeiras na mortalidade das lagartas inoculadas com ChinNPV

- **Bioensaio pelo método do disco de folha**

Ao avaliar os efeitos dos tratamentos na mortalidade por vírus, observou-se que as curvas de incidência acumulada foram semelhantes entre dieta artificial + ChinNPV (T4) e folha de soja + ChinNPV (T6) e que ambas favoreceram infecções significativamente superiores ao tratamento com folha de algodão + ChinNPV (T5) (Tabela 1.1 e Figura 1.1). A mortalidade por causa desconhecida, por sua vez, foi semelhante entre todos os tratamentos quando as funções de incidência acumulada foram comparadas pelo teste de Gray, apresentando média de 19,6% ao final de dez dias de avaliação.

Tabela 1.1: Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para o bioensaio pelo método do disco de folha, através do teste estatístico de análise de sobrevivência.

Comparação dos tratamentos	Estatística do teste de Gray		Valor <i>p</i>	
	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida
T1 versus T2	--	1,030	≈ 1,000*	0,310
T1 versus T3	--	1,323	≈ 1,000*	0,250
T1 versus T4	159,436	1,223	≈ 0,000**	0,269
T1 versus T5	97,501	0,000	≈ 0,000**	0,993
T1 versus T6	177,962	0,797	≈ 0,000**	0,372
T2 versus T3	--	0,015	≈ 1,000*	0,902
T2 versus T4	172,015	0,979	≈ 0,000**	0,322
T2 versus T5	108,180	1,747	≈ 0,000**	0,186
T2 versus T6	193,667	0,169	≈ 0,000**	0,681
T3 versus T4	193,239	0,491	≈ 0,000**	0,483
T3 versus T5	122,128	2,027	≈ 0,000**	0,154
T3 versus T6	217,504	0,227	≈ 0,000**	0,634
T4 versus T5	22,461	0,475	0,000**	0,491
T4 versus T6	0,469	0,129	0,493	0,719
T5 versus T6	20,046	0,714	0,000**	0,398

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = folha de algodão; T3 = folha de soja; T4 = dieta + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV. * Curvas não diferem; ** As funções de incidência acumulada diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Gray.

A morte das lagartas causada por ChinNPV teve seu máximo no 5º e 6º dia, enquanto a mortalidade por causas desconhecidas teve aumento gradativo a partir do terceiro dia após a inoculação.

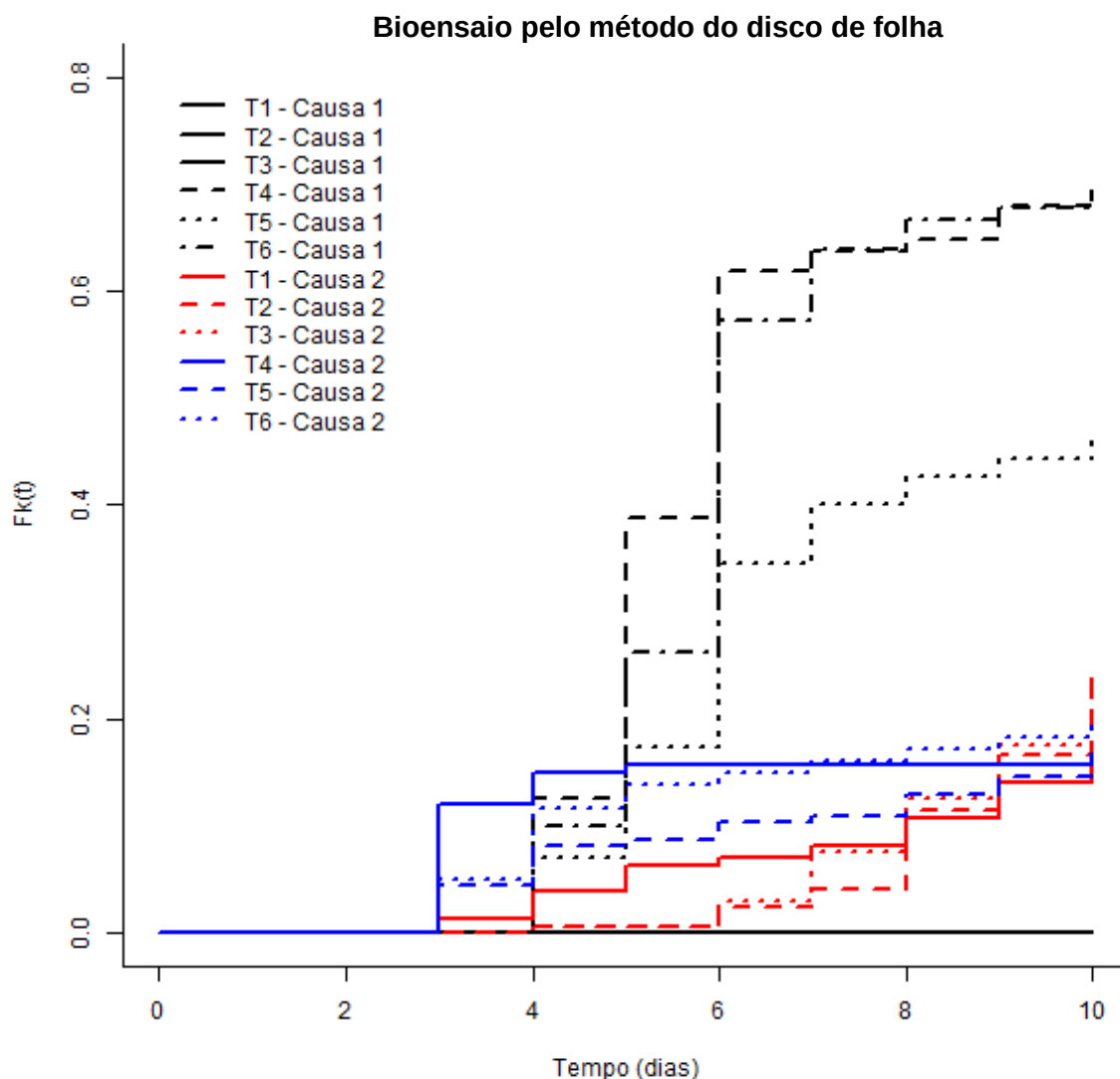


Figura 1.1: Funções de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio pelo método do disco de folha. T1 = Dieta artificial; T2 = folha de algodão; T3 = folha de soja; T4 = dieta + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = Folha de soja + ChinNPV.

Lagartas alimentadas com dieta artificial e inoculadas com vírus apresentaram 68,0% de mortalidade após 10 dias, enquanto as que foram mantidas em folhas de soja e algodão tiveram mortalidade de 69,4% e 47,1%, respectivamente. A redução média na morte de larvas quando o vírus foi inoculado junto com a folha de algodão foi de 31,4% em comparação à dieta artificial e ao disco do folíolo de soja com o vírus. No entanto, o tempo médio até que a morte ocorresse não diferiu entre as

lagartas alimentadas com algodão ou soja, mas com folhas de algodão as lagartas demoraram mais para morrer quando comparadas àquelas que consumiram dieta artificial e ChinNPV (Tabela 1.2). Além disso, quando as lagartas foram alimentadas com folhas de algodão ou soja, tanto nos tratamentos controle (T2 e T3), quanto nos tratamentos com vírus (T5 e T6), o tempo de desenvolvimento das larvas aumentou em comparação àquelas alimentadas com dieta, visto que em média 98,3% dos indivíduos sobreviventes ao final do décimo dia se encontravam no estágio larval. A mesma interferência pode ser vista no peso de lagartas, pré-pupas e pupas, que apresentaram valores inferiores sempre que as lagartas foram alimentadas com substrato foliar, com exceção do peso adquirido pelas lagartas quando se alimentaram apenas de dieta artificial (T1), o qual não diferiu das lagartas alimentadas com folhas.

Tabela 1.2: Efeito do substrato foliar na mortalidade, no peso e no desenvolvimento de lagartas *Chrysodeixis includens* de 3º ínstar, 10 dias após a inoculação com ChinNPV.

Trat.	Mort. 10º dia (%) ± EP		TMM (dias)	Peso (g)			Estágio Desenvolvimento (%)		
	Vírus	CD		lagarta	pré-pupa	pupa	lagarta	pré-pupa*	pupa**
T1	0,0 ± 0,0	17,6 ± 3,3	-	0,1586 ab	0,2520 a	0,2402 a	78,4 b	23,4 a	10,0 b
T2	0,0 ± 0,0	23,6 ± 3,2	-	0,0721 b	0,1487 b	--	98,6 a	1,4 b	0,0 b
T3	0,0 ± 0,0	23,8 ± 3,0	-	0,1191 b	0,1234 b	0,1451 b	94,9 a	3,0 b	2,2 b
T4	68,0 ± 4,8	15,6 ± 2,9	5,3 a	0,2493 a	0,2513 a	0,2532 a	9,4 c	18,8 a	71,8 a
T5	47,1 ± 3,7	16,8 ± 2,7	6,1 b	0,1293 b	--	--	100,0 a	0,0 b	0,0 b
T6	69,4 ± 3,4	20,0 ± 3,0	5,8 ab	0,1427 b	--	--	100,0 a	0,0 b	0,0 b

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = folha de algodão; T3 = folha de soja; T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV. CD = causa desconhecida; TMM = Tempo médio de mortalidade; Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). * Para atender aos requisitos da análise de variância, aos dados de porcentagem de pré-pupa aplicou-se a transformação da família potência ($p=1-0,41948 = 0,5805$). ** Não atendendo os pressupostos da ANOVA, os dados de porcentagem de pupa foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis.

• Tecidos foliares liofilizados e incorporados na dieta artificial

O teste de Gray usado para a comparação entre as curvas das funções de incidência acumulada dos tratamentos indicou que não houve diferença significativa na mortalidade causada por vírus quando as lagartas alimentaram-se de dieta artificial com tecidos de folha de algodão ou de dieta artificial com tecidos de folha

de soja (T5 e T6, respectivamente) e que ambos provocaram infecções inferiores a testemunha (dieta artificial). Já a mortalidade por causas desconhecidas variou entre os tratamentos, mas não seguiu nenhuma tendência específica, seja entre tratamentos com ou sem folha incorporada ou com a presença ou não de vírus (Tabela 1.3 e Figura 1.2).

Tabela 1.3: Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para o bioensaio de incorporação de 3% de folha liofilizada incorporada em dieta (p/V) através do teste estatístico de análise de sobrevivência.

Comparação dos tratamentos	Estatística do teste de Gray		Valor <i>p</i>	
	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida
T1 versus T2	--	0,572	≈ 1,000*	0,449
T1 versus T3	--	2,648	≈ 1,000*	0,104
T1 versus T4	179,681	8,889	≈ 0,000**	0,003**
T1 versus T5	82,099	0,362	≈ 0,000**	0,548
T1 versus T6	77,370	4,860	≈ 0,000**	0,028**
T2 versus T3	--	0,815	≈ 1,000*	0,367
T2 versus T4	179,136	6,057	≈ 0,000**	0,014**
T2 versus T5	81,152	1,713	≈ 0,000**	0,191
T2 versus T6	76,966	2,448	≈ 0,000**	0,118
T3 versus T4	195,208	2,210	≈ 0,000**	0,137
T3 versus T5	90,965	4,739	≈ 0,000**	0,030**
T3 versus T6	86,934	0,372	≈ 0,000**	0,542
T4 versus T5	32,990	12,355	0,000**	0,000**
T4 versus T6	37,901	0,884	0,000**	0,347
T5 versus T6	0,138	7,487	0,711	0,006**

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + 3% de folha de algodão; T3 = dieta artificial + 3% de folha de soja; T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV; T6 = dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV. * Curvas não diferem; ** As funções de incidência acumulada diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Gray.

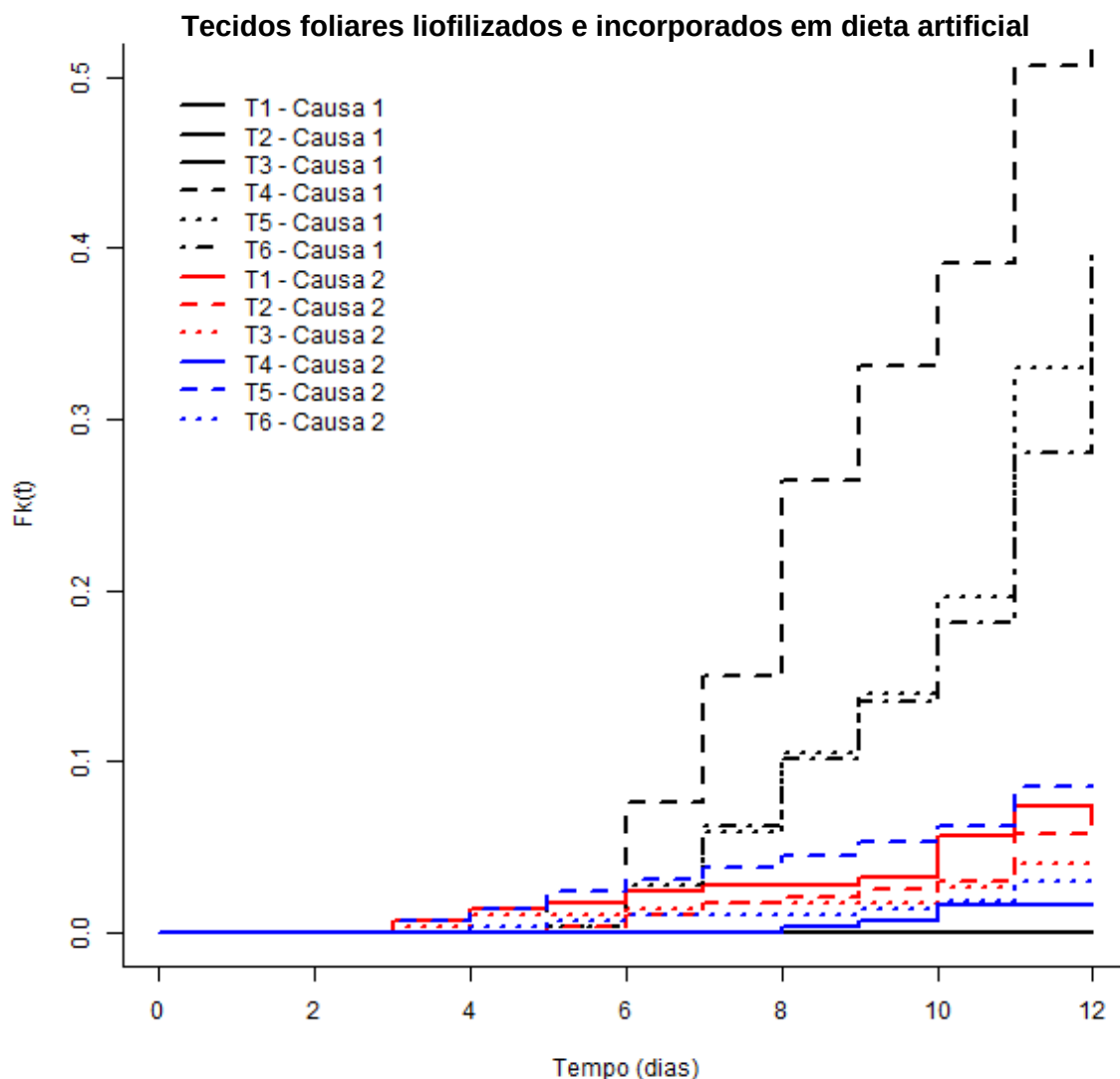


Figura 1.2: Funções de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio de incorporação de 3% de folha liofilizada em dieta (p/v). T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + 3% de folha de algodão; T3 = dieta artificial + 3% de folha de soja; T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV; T6 = dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV.

A estimativa da mortalidade causada pelo ChinNPV foi de 66,0% no tratamento contendo apenas dieta, 39,4% no tratamento com folha de algodão e 39,5% no tratamento com folha de soja. A redução média da mortalidade de lagartas foi de aproximadamente 40,2% quando elas se alimentaram da mistura dieta/substrato em comparação à dieta contendo apenas o vírus. No entanto, o tempo médio para que a morte decorrente da infecção pelo vírus ocorresse foi semelhante entre todos os tratamentos (Tabela 1.4). Além disso, as lagartas apresentaram desenvolvimento semelhante entre os tratamentos, com a maior porcentagem de indivíduos sobreviventes em estágio de pupa ao final de 12 dias após a inoculação com vírus.

O peso das lagartas sobreviventes ao final do 12º dia apresentou grande variação entre os tratamentos, ao contrário das pré-pupas remanescentes que apresentaram pesos análogos entre eles. O peso das pupas foi maior apenas quando as lagartas se alimentaram da dieta contendo tecido foliar do algodão em relação às que se alimentaram na dieta contendo soja e vírus (Tabela 1.4). O peso das pupas provenientes dos outros tratamentos não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 1.4: Efeito do substrato foliar liofilizado e incorporado na dieta sobre a mortalidade, o peso e o desenvolvimento de lagartas *Chrysodeixis includens* de 3º ínstar, 12 dias após a inoculação com ChinNPV.

Trat.	Mort. 12º dia (%) ± EP		TMM (dias)	Peso (g)			Estágio Desenvolvimento (%)		
	Vírus	CD		Lagarta	pré-pupa	pupa	lagarta	pré-pupa	pupa
T1	0,0 ± 0,0	7,4 ± 1,9	-	0,1989 abc	0,2657 a	0,2500 ab	7,8 a	11,2 a	76,5 a
T2	0,0 ± 0,0	7,4 ± 2,5	-	0,1508 c	0,2556 a	0,2556 a	11,8 a	11,1 a	77,1 a
T3	0,0 ± 0,0	4,0 ± 1,4	-	0,1750 bc	0,2350 a	0,2468 ab	14,8 a	17,0 a	68,2 a
T4	66,0 ± 3,5	1,6 ± 0,8	9,0 a	0,2639 ab	0,2719 a	0,2399 ab	18,9 a	8,6 a	68,3 a
T5	39,4 ± 4,1	8,5 ± 1,9	9,0 a	0,2910 a	0,2586 a	0,2498 ab	7,9 a	18,0 a	74,0 a
T6	39,5 ± 3,8	3,0 ± 1,2	9,8 a	0,2059 abc	0,2414 a	0,2363 b	17,3 a	13,5 a	63,7 a

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + 3% de folha de algodão; T3 = dieta artificial + 3% de folha de soja; T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV; T6 = dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV. CD = causa desconhecida; TMM = Tempo médio de mortalidade. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

- **Tecidos foliares secos em estufa e incorporados em dieta artificial**

Ao analisar a influência dos tratamentos na variável mortalidade através do teste não paramétrico de Gray, foi possível identificar evidências de que as curvas das funções de incidência acumulada referentes à mortalidade por vírus (causa 1) foram diferentes entre os tratamentos dieta artificial + ChinNPV, dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV e dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV (T4, T5 e T6, respectivamente) (Tabela 1.5 e Figura 1.3). Para a causa 2 (mortalidade por causa desconhecida), os tratamentos sem incorporação de folha apresentaram maior tendência na mortalidade sendo que o controle composto apenas por dieta artificial (T1) apresentou mortalidade superior às testemunhas com

folha incorporada (T2, T3) e também à dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV (T5). Este último também foi inferior ao tratamento contendo apenas dieta e vírus (T4).

Tabela 1.5: Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para as curvas de incidência acumulada, no bioensaio de folha seca em estufa incorporada em dieta.

Comparação dos tratamentos	Estatística do teste de Gray		Valor <i>p</i>	
	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida
T1 versus T2	--	5,376	≈ 1,000*	0,020**
T1 versus T3	--	4,822	≈ 1,000*	0,028**
T1 versus T4	194,727	0,3484	≈ 0,000**	0,555
T1 versus T5	103,039	9,156	≈ 0,000**	0,002**
T1 versus T6	132,172	2,876	≈ 0,000**	0,090
T2 versus T3	--	0,001	≈ 1,000*	0,976
T2 versus T4	219,395	2,753	≈ 0,000**	0,097
T2 versus T5	114,087	0,484	≈ 0,000**	0,487
T2 versus T6	147,866	0,246	≈ 0,000**	0,620
T3 versus T4	207,691	0,109	≈ 0,000**	0,109
T3 versus T5	107,850	0,493	≈ 0,000**	0,482
T3 versus T6	139,950	0,232	≈ 0,000**	0,630
T4 versus T5	28,225	5,443	0,000**	0,020**
T4 versus T6	9,896	1,267	0,002**	0,260
T5 versus T6	3,981	1,372	0,046**	0,242

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + 3% de folha de algodão; T3 = dieta artificial + 3% de folha de soja; T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV; T6 = dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV. *Curvas não diferem; ** As funções de incidência acumulada diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Gray.

Tecidos foliares secos em estufa e incorporados em dieta artificial

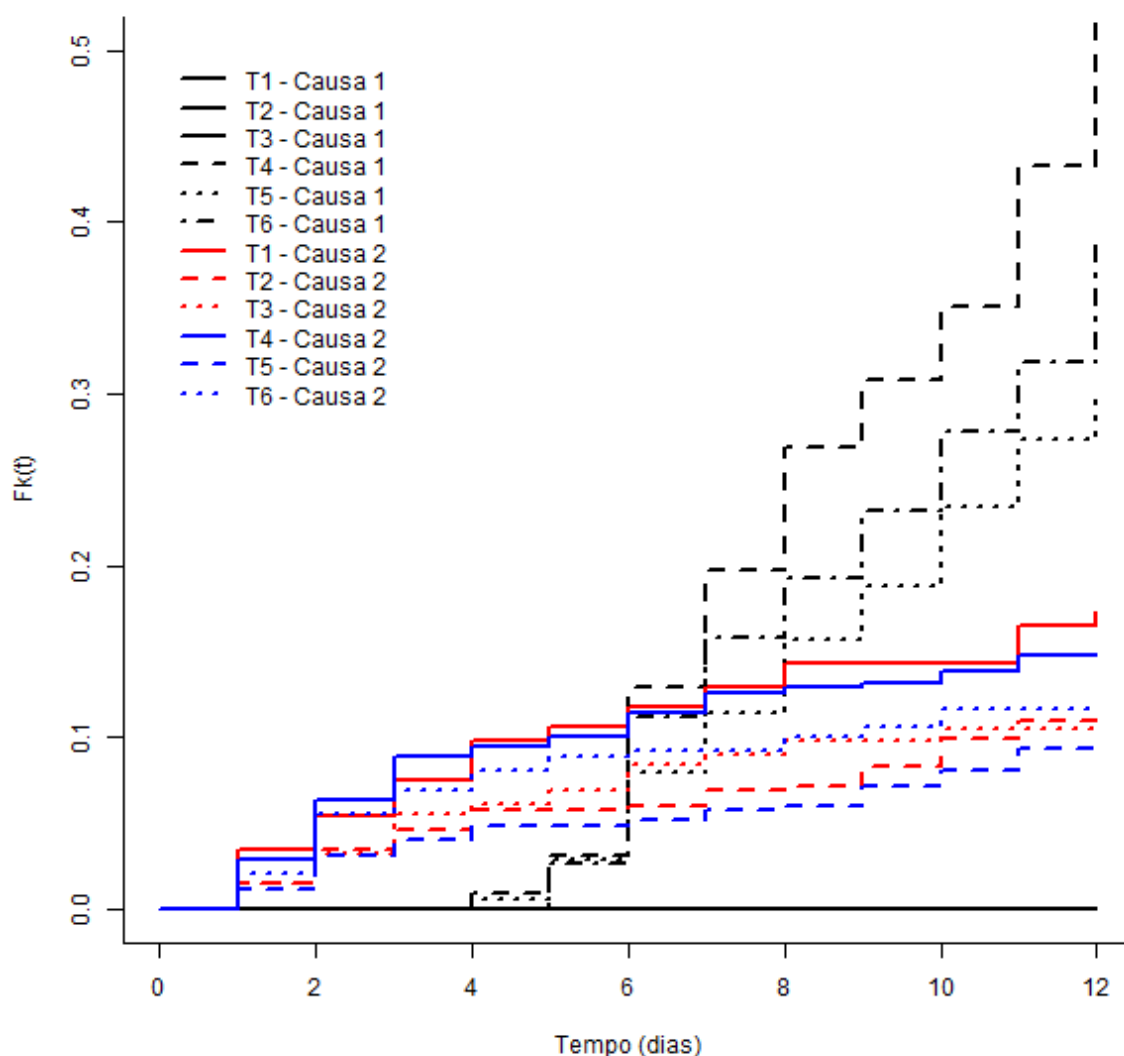


Figura 1.3: Funções de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio de folha seca em estufa incorporada em dieta. T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + 3% de folha de algodão; T3 = dieta artificial + 3% de folha de soja; T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV; T6 = dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV.

A estimativa da mortalidade causada pelo ChinNPV foi de 54,4% no tratamento contendo apenas dieta artificial, 39,3% no tratamento com folha de soja incorporada e 30,0% no tratamento com folha de algodão (Tabela 1.6). Embora apresente diferenças na mortalidade por vírus, o tempo médio para que ela ocorresse foi semelhante entre os tratamentos.

O peso de lagartas, pré-pupas e pupas variou significativamente entre os tratamentos, no entanto, aqueles contendo folha incorporada, com exceção do tratamento dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV (T6), apresentaram a maior porcentagem de indivíduos em estágio larval ao final de 12 dias após a inoculação com vírus.

Tabela 1.6: Efeito do substrato foliar seco em estufa e incorporado na dieta sobre a mortalidade, o peso e o desenvolvimento de lagartas *Chrysodeixis includens* de 3º ínstar, 12 dias após a inoculação com ChinNPV.

Trat.	Mort. 12º dia (%) ± EP		TMM (dias)	Peso (g)			Estágio Desenvolvimento (%)		
	Vírus	CD		lagarta	pré-pupa	pupa	lagarta	pré-pupa	pupa
T1	0,0 ± 0,0	17,3 ± 2,3	-	0,1457 cd	0,2532 bc	0,2353 b	27,3 b	12,3 a	60,4 ab
T2	0,0 ± 0,0	10,9 ± 1,7	-	0,1373 cd	0,2423 b	0,2329 abc	59,3 a	8,3 a	32,4 c
T3	0,0 ± 0,0	10,5 ± 1,7	-	0,1105 d	0,2232 c	0,2131 d	49,9 a	8,3 a	41,7 bc
T4	54,4 ± 3,2	14,7 ± 1,9	8,2 a	0,2385 a	0,2359 abc	0,2414 a	26,7 b	11,3 a	62,0 a
T5	30,0 ± 2,5	9,4 ± 1,6	8,5 a	0,1813 bc	0,2553 a	0,2329 b	57,9a	10,5 a	31,5 c
T6	39,3 ± 3,1	11,6 ± 1,7	8,6 a	0,2273 ab	0,2293 c	0,2254 cd	27,5b	10,5 a	62,0 a

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + 3% de folha de algodão; T3 = dieta artificial + 3% de folha de soja; T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = dieta artificial + 3% de folha de algodão + ChinNPV; T6 = dieta artificial + 3% de folha de soja + ChinNPV. CD = causa desconhecida; TMM = Tempo médio de mortalidade. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

- **Influência da alimentação prévia com substrato foliar na mortalidade de *C. includens* inoculadas com ChinNPV**

Através da análise de sobrevivência e teste não paramétrico de Gray, observou-se que não há evidências de diferenças significativas entre as curvas de incidência acumulada para a mortalidade causada por ChinNPV, quando as lagartas foram alimentadas com diferentes substratos antes da inoculação com o vírus e mantidas em dieta artificial após ingestão do mesmo (Tabela 1.7 e Figura 1.4). Já a mortalidade por causas desconhecidas, foi proporcionalmente maior nas lagartas que se alimentaram de substrato foliar, sendo que a folha de algodão + ChinNPV (T3) diferiu de ambos os tratamentos com dieta (T1 e T2), enquanto o tratamento com folha de soja + ChinNPV (T4) diferiu apenas do controle positivo, composto de dieta + ChinNPV (T2).

Tabela 1.7: Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray para o bioensaio da alimentação prévia com substrato foliar.

Comparação dos tratamentos	Estatística do teste de Gray		Valor <i>p</i>	
	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida
T1 versus T2	30,085	0,401	0,000*	0,527
T1 versus T3	29,938	5,626	0,000*	0,018*
T1 versus T4	26,569	3,626	0,000*	0,057
T2 versus T3	0,036	7,567	0,850	0,006*
T2 versus T4	0,265	5,394	0,607	0,020*
T3 versus T4	0,159	0,338	0,690	0,561

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + ChinNPV; T3 = folha de algodão + ChinNPV; T4 = folha de soja + ChinNPV. * As curvas das funções de incidência acumulada em função do tempo diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Gray.

A mortalidade causada pelo vírus iniciou seis dias após a inoculação com o ChinNPV e teve seu pico entre o 6º e 7º dias. Já quando a mortalidade por causa desconhecida é considerada, o aumento foi gradativo para os tratamentos com substrato foliar, enquanto o tratamento controle (T1) apresentou mortalidade apenas no último dia de avaliação (Figura 1.4).

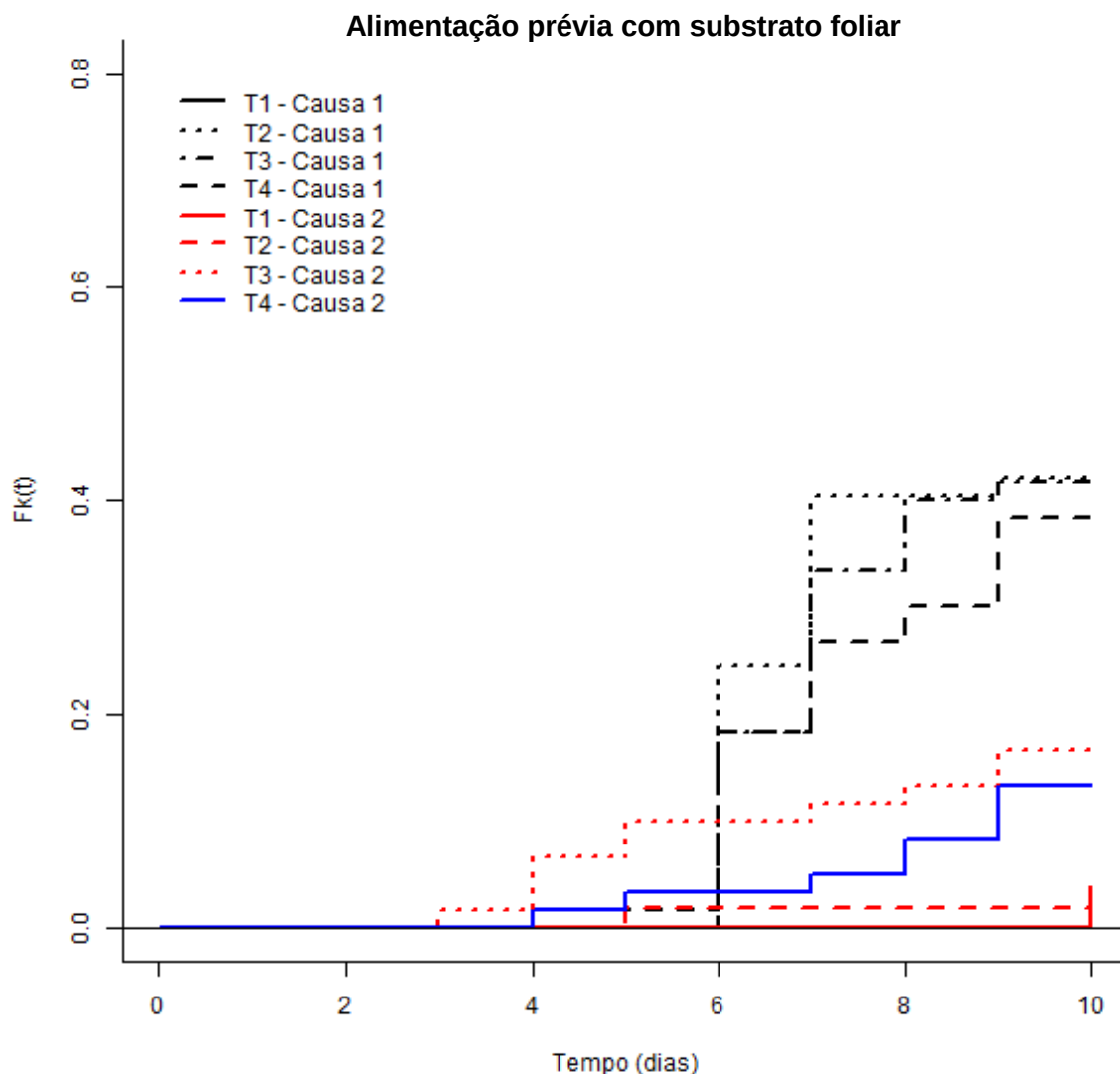


Figura 1.4: Função de incidência acumulada $[F_k(t)]$ para a mortalidade de causa 1 (morte por vírus) e causa 2 (morte por causa desconhecida) no bioensaio da alimentação prévia com substrato foliar, em cada um dos tempos analisados. T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + ChinNPV; T3 = folha de algodão + ChinNPV; T4 = folha de soja + ChinNPV.

O tempo médio entre a inoculação com o vírus e a morte de larvas causada pelo ChinNPV foi maior quando as lagartas se alimentaram de soja (7 dias) comparado àquelas alimentadas com dieta (6,6 dias), enquanto larvas que consumiram folhas de algodão antes da inoculação com o vírus apresentaram tempo médio de mortalidade (6,8 dias) semelhante aos demais tratamentos (Tabela 1.8). Além disso, os tratamentos contendo o vírus interferiram negativamente no desenvolvimento dos indivíduos analisados, visto que ao final do décimo dia, a maior parte dos indivíduos sobreviventes ainda se encontrava em estágio larval.

Tabela 1.8: Efeito dos diferentes tipos de alimentação antes da inoculação com ChinNPV, na mortalidade e desenvolvimento das lagartas *Chrysodeixis includens* de 4º ínstar, após 10 dias de avaliação.

Tratamentos	Mort. 10º dia (%) ± EP		TMM (dias)	Estágio Desenvolvimento (%)		
	Vírus	CD		Lagarta	pré-pupa	pupa
T1	0,0 ± 0,0	3,9 ± 2,7	--	27,8 b	5,6 a	27,7 a
T2	42,1 ± 6,6	1,8 ± 1,8	6,6 a	85,3 a	0,0 a	14,7 a
T3	41,7 ± 6,4	16,7 ± 4,9	6,8 ab	72,7 ab	12,3 a	15,0 a
T4	38,3 ± 6,3	13,3 ± 4,4	7,0 b	82,8 a	7,4 a	9,8 a

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + ChinNPV; T3 = folha de algodão + ChinNPV; T4 = folha de soja + ChinNPV. CD = causa desconhecida; TMM = Tempo médio de mortalidade. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

1.3.2 Análise Histopatológica do intestino médio de lagartas de *C. includens* alimentadas com dieta artificial, folíolos de soja ou folhas de algodão e inoculadas com ChinNPV

O intestino médio (IM) das lagartas de *C. includens* no tratamento controle é formado, do lúmen intestinal para a periferia, pela membrana peritrófica (Mp) que delimita os espaços endoperitrófico e ectoperitrófico, por um epitélio de revestimento pseudoestratificado prismático com bordadura em escova (Be) e pela camada muscular (CM), composta de músculos longitudinais e circulares que sustentam o epitélio. O epitélio apresenta pelo menos três tipos celulares denominados de células colunares (Co), células caliciformes (Ca) e células regenerativas (Cr) (Figura 1.5).

No tratamento em que a lagarta se alimentou de dieta artificial e posteriormente foi inoculada com ChinNPV (Figura 1.5) foram observadas pequenas alterações. O epitélio apresentou-se ligeiramente mais espesso que o controle, com o núcleo das células colunares mais próximas à região apical e um aumento na proliferação dessas células. A membrana peritrófica e a camada muscular apresentaram-se rompidas pontualmente em diferentes locais, enquanto a bordadura estriada apresentou uma ligeira expansão.

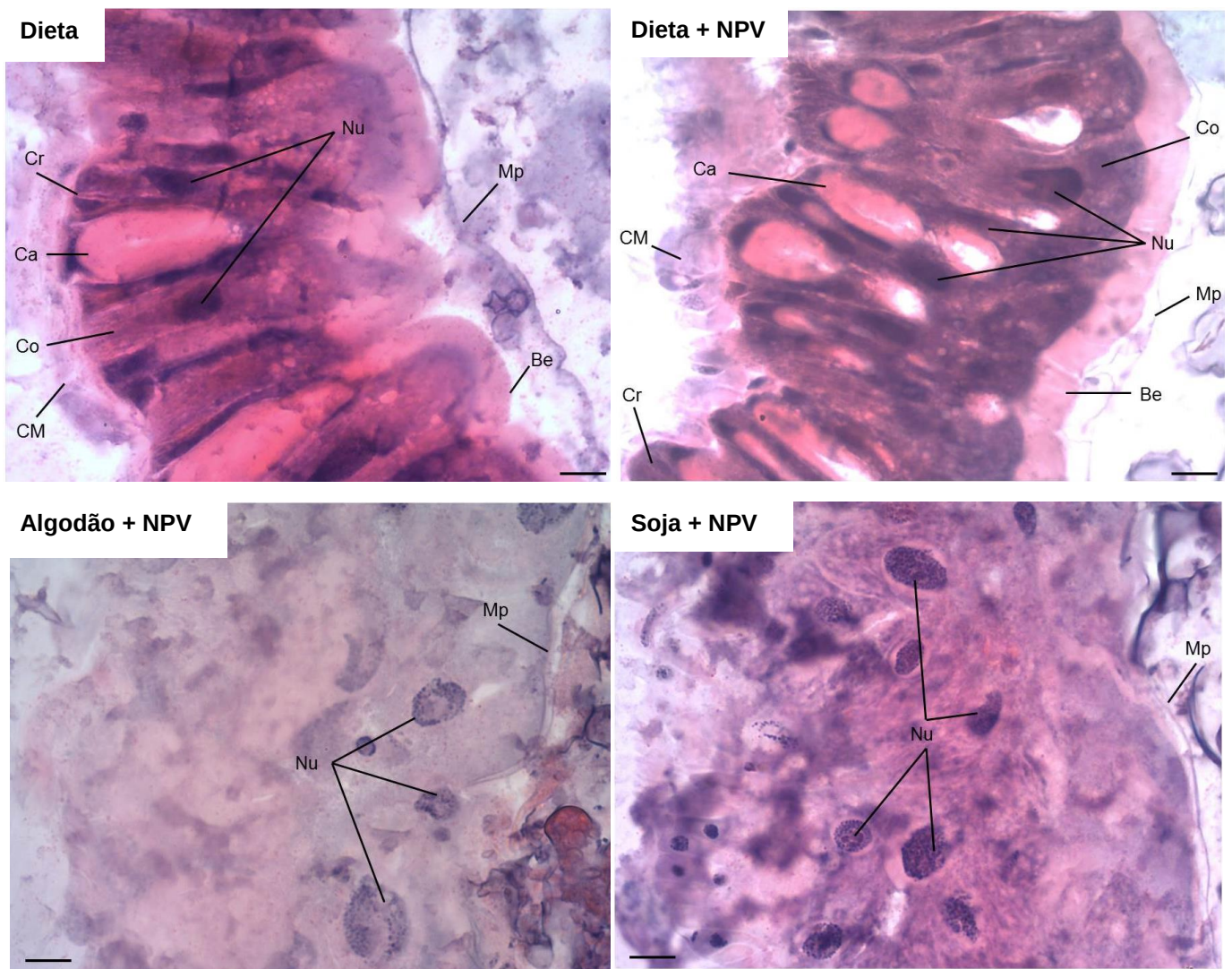


Figura 1.5: Fotomicrografia do intestino médio (IM) de lagartas de quarto ínstar de *Chrysodeixis includens*, 24 h após a inoculação com ChinNPV. Coloração Hematoxilina de Harris e Eosina. Barra = 10 μ m. Células colunares (Co), caliciformes (Ca) e regenerativas (Cr), membrana peritrófica (Mp), bordadura estriada (Be), camada muscular (CM), núcleo (Nu).

As lagartas alimentadas com folhas de algodão e soja antes da inoculação com o vírus (Figura 1.5) sofreram completa desestruturação da camada epitelial, assim como da camada muscular, impossibilitando a identificação clara dos tipos celulares. A alteração nuclear se deve principalmente à sua dilatação e presença de cromatina descondensada com grumos. Os insetos que se alimentaram inicialmente com folhas de algodão, aparentemente, apresentaram espessamento da membrana peritrófica.

1.4 DISCUSSÃO

A planta hospedeira desempenha importante papel na eficiência do ChinNPV sobre a lagarta *C. includens*. No entanto, cada espécie vegetal produz um resultado diferente na suscetibilidade à doença (YOUNG; YEARIAN, 1974, YOUNG; YEARIAN; KIM, 1977, ELLEMAN; ENTWISTLE, 1985, ALI et al., 1998, FARRAR JR; RIDGWAY, 2000, PENG et al., 1999, ALI et al., 2002; RAYMOND et al., 2005, PLYMATE, 2006, STEVENSON; D'CUNHA; GRZYWACZ, 2010).

Neste estudo, tanto tecidos foliares de algodão quanto de soja promoveram redução da infecção/mortalidade de *C. includens* pelo ChinNPV na maioria dos bioensaios realizados, sendo que os folíolos de soja proporcionaram diferenças nas respostas de mortalidade dependendo da forma como o tecido vegetal foi disponibilizado para a lagarta.

A forma de desidratação dos folíolos de soja (liofilizado e seco em estufa) antes de incorporar à dieta das lagartas alterou os padrões de mortalidade pelo ChinNPV, indicando que o processo de secagem interferiu diretamente nos compostos e/ou processos que comprometem a atividade do vírus utilizado. A liofilização é apontada como um método eficaz na manutenção da qualidade química do material submetido ao processo de secagem, sendo uma prática comum na desidratação de plantas medicinais, produtos farmacêuticos e alimentos (CIURZYŃSKA; LENART, 2011, NIREESHA et al., 2013). Secagens feitas com temperaturas entre 50 °C e 60 °C também são consideradas adequadas para que uma grande variedade de plantas não sofram alterações de seus compostos bioativos (MELO; RADÜNZ; MELO, 2004). Entretanto, diferentes grupos de plantas se comportam de maneira distinta durante o processo de secagem. Katsube e colaboradores (2009) verificaram a redução de compostos polifenólicos em folhas de amoreira secas a 70 °C, enquanto Roshanak, Rahimmalek e Goli (2016) observaram um aumento no teor de compostos fenólicos totais, em relação ao tecido fresco, quando folhas de *Camellia sinensis* ou *C. assamica*, usadas como chá verde, foram secas com temperatura de 60 °C, por exemplo. Dessa forma, a temperatura utilizada (50 °C) para reduzir a umidade das folhas de soja pode ter inativado composto(s) que interferem na atividade do vírus, seja por interação direta, ou no próprio metabolismo da lagarta, visto que quando liofilizada, soja e algodão apresentaram mortalidade semelhante (39,5% e 39,4%, respectivamente), e quando seca em

estufa, mesmo apresentando valores de mortalidade próximos (39,3% no tratamento com folha de soja e 30,0% no tratamento com folha de algodão), houve diferença estatística entre elas. Nos dois casos, tanto soja quanto algodão diferiram da testemunha contendo apenas dieta artificial e ChinNPV.

Quando o tecido foliar de algodão foi fornecido *in natura* no momento da inoculação com o vírus (bioensaio com disco de folha), a mortalidade das lagartas foi menor que naquelas alimentadas com dieta artificial ou com tecido foliar de soja, indicando que os tecidos de algodão reduzem o processo de infecção pelo vírus. No caso da soja, a mortalidade de lagartas foi elevada e próxima daquela ocasionada pela dieta (69,4% e 68,0%, respectivamente). Isso pode ser devido ao tempo limitado (insuficiente para causar a inativação dos corpos de oclusão) em que o vírus ficou em contato com o tecido foliar (por no máximo 48 h), ou ainda, devido ao método de exposição, em que o vírus não permaneceu exposto aos conteúdos celulares resultantes no processo de maceração das folhas. Nos métodos de tecido incorporado na dieta, o vírus permaneceu durante todo o processo em contato com o substrato foliar, além de estar exposto aos compostos liberados no processo de trituração.

No caso do algodão, outros estudos já apontaram possíveis razões para a redução da susceptibilidade larval ao NPV. Compostos como tanino, foram indicados como possíveis responsáveis pela redução da suscetibilidade viral de baculovírus de *Helicoverpa zea* em algodão (YOUNG; YANG; FELTON, 1995). Uma possibilidade é que os taninos se liguem às proteínas dos vírus formando agregados que impedem a liberação dos *occlusion derived virions* (ODV) (FELTON et al., 1987). Já Hoover e colaboradores (1998) verificaram que a inibição da doença promovida pelo baculovírus devido à aplicação de tanino condensado pode ser o resultado não da precipitação do vírus, mas da geração de radicais livres promovida por atividade pró-oxidante. A produção de radicais livres é devida principalmente à ação de enzimas peroxidase e polifenol oxidase e foi testada por Hoover e colaboradores (1998) através da aplicação de diferentes antioxidantes e pró-oxidantes sobre a folha de algodão, tomate e alface, sendo que os insetos que se alimentaram de algodão foram menos suscetíveis à doença viral. Durante o processo de digestão do substrato foliar, os radicais livres podem estimular o aumento de protusões citoplasmáticas das células infectadas no intestino médio das lagartas, reduzindo a

infecção, ou ainda, podem danificar diretamente os corpos de oclusão (HOOVER; WASHBURN; VOLKMAN, 2000, CORY; HOOVER, 2006).

A mortalidade por vírus das lagartas alimentadas com algodão foi menor sempre que o ChinNPV entrou em contato direto com o substrato foliar, mas não teve influência quando as lagartas se alimentaram com folhas de algodão apenas antes da inoculação com o vírus, indicando que os componentes que poderiam alterar sua eficiência, somente atuam quando o vírus é fornecido juntamente com o substrato foliar. Este fato corrobora, parcialmente, com os dados verificados por Young, Yang e Felton (1995) que avaliaram a influência de taninos na mortalidade das larvas de *Helicoverpa zea* pelo HzNPV. Quando três diferentes concentrações de tanino condensado (Quebracho) (0,025, 0,05 e 0,1%) foram adicionadas à dieta juntamente com o vírus, a mortalidade foi reduzida, em média, em 4,3 vezes. Já quando o HzNPV foi fornecido pelo teste “droplet feeding” e após as lagartas foram transferidas para dieta contendo tanino, a mortalidade não foi afetada. Entretanto, quando o tanino foi fornecido juntamente com o vírus pelo teste “droplet feeding” a mortalidade larval também não foi influenciada. Isto seria um indicativo de que outros compostos presentes na folha do algodão também podem influenciar a atividade do vírus.

O intestino médio de *C. includens* no tratamento controle apresentou arquitetura semelhante à descrita por LEVY (2005) e CRUZ (2014) com *A. gemmatilis*, e com outros lepidópteros (SPENCE; KAWATA, 1993, RIBEIRO; FERREIRA; TERRA, 1997, BROOKS et al., 2002, SOUSA et al., 2009). Em larvas de lepidópteros, ele é pseudoestratificado colunar, formado por quatro tipos celulares distintos: as células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (CHIANG; YEN; PENG, 1986, BINDER; BOWERS, 1994, LEVY et al., 2004), as quais estão envolvidas ativamente na produção e secreção de enzimas e absorção de nutrientes (CHAPMAN, 1998).

Os insetos que se alimentaram com substrato foliar antes da inoculação com o vírus apresentaram o epitélio altamente desestruturado. As folhas *in natura* alteraram a arquitetura típica deste órgão, impossibilitando a correta identificação das suas células. Era esperado a não visualização da membrana peritrófica, uma vez que as células colunares são as responsáveis pela sua formação (HARPER; GRANADOS, 1999), no entanto, a membrana se manteve íntegra em sua maior extensão, o que já descartaria a hipótese de que as fibras mais enrijecidas das

folhas pudessem ter agredido a parede intestinal. A principal função desta membrana seria proteger o epitélio de abrasão promovida pelo conteúdo intestinal, atuando ainda como barreira contra a penetração de microrganismos na cavidade do corpo e na hemocele (EISEMANN; BINNINGTON, 1994).

As lagartas que foram alimentadas com folhas de algodão ainda apresentaram um aparente espessamento da membrana peritrófica. Este fato também foi verificado por Plymate e colaboradores (2008) em lagartas de *Chloridea virescens* alimentadas com algodão e alface, cuja membrana peritrófica foi mais espessa que quando alimentadas apenas com dieta artificial. Esse espessamento não foi percebido em larvas alimentadas com folhas de tomate. Neste estudo, *C. includens* alimentadas com folíolos de soja também não mostraram aumento na espessura desta membrana. Futuras análises morfométricas poderão auxiliar nestas dúvidas quanto às dimensões desta estrutura em insetos alimentados com diferentes substratos foliares.

O intestino médio das lagartas alimentadas com dieta e inoculadas com o ChinNPV apresentaram alteração no epitélio que condiz com o início da infecção viral. Segundo Moscardi (2014), após 24 h de infecção de lagartas de *Spodoptera cosmioides* pelo vírus AfNPV, foi possível observar a fragmentação da membrana peritrófica, células colunares mais alongadas e em diferentes estágios de maturação. Isso nos leva a inferir que a intensa modificação morfológica foi devido ao substrato foliar, e não somente à infecção viral pelo ChinNPV.

O desenvolvimento e o peso das lagartas alimentadas com substrato foliar também sofreram alterações em relação àquelas alimentadas com dieta artificial. O peso dos indivíduos sobreviventes do bioensaio com disco de folha foi menor quando as lagartas foram alimentadas com substrato foliar a partir da inoculação com o vírus, mas não houve diferença entre elas e suas respectivas testemunhas que não foram inoculadas. O mesmo ocorreu com o estágio de desenvolvimento, sendo que grande parte das lagartas que se alimentaram com folhas/folíolos de algodão ou soja, inoculados ou não com vírus, se encontravam em estágio larval ao final do experimento. Esse fato diverge do observado por Rothman e Myers, (1996), que indicaram que quando não ocorre a mortalidade pelo NPV, os vírus tendem a reduzir o peso dos insetos infectados e retardar o desenvolvimento.

O atraso no desenvolvimento e no peso quando as lagartas foram alimentadas com substrato foliar após a inoculação com o vírus também pode estar

relacionado com o maior desprendimento das células intestinais provocados pela atividade dos radicais livres, no caso do algodão. Hoover e colaboradores (2000) observaram um retardo no desenvolvimento de *C. virescens* alimentadas com algodão devido ao aumento da regeneração das células do epitélio. Esses mesmos autores presumiram que se o desprendimento das células não fosse acelerado quando os insetos foram alimentados com folhas de algodão, então seu maior tempo de desenvolvimento deveria favorecer a infecção provocada pelo vírus. Da mesma forma, Andrade e colaboradores (2016) observaram que as lagartas mantidas em folhas de algodão apresentaram maior duração do tempo de desenvolvimento em relação à dieta artificial, enquanto na soja, mesmo com um menor consumo foliar, o período larval foi semelhante às lagartas alimentadas com dieta. O resultado contrastante observado na soja pode ser relativo ao tempo em que as larvas foram alimentadas com folhas, sendo desde neonatas no trabalho de Andrade e a partir do terceiro ínstar neste trabalho. Além disso, Cruz (2014) observou que lagartas de *A. gemmatilis* alimentadas com soja transgênica BRS 359 RR, sem pulverização, apresentaram redução do crescimento, do consumo e do ganho de peso e sugeriu que este fato pode estar ligado aos mesmos compostos e/ou enzimas que confere a este genótipo a resistência ao herbicida glifosato.

1.5 CONCLUSÕES

Nas condições da presente pesquisa, pode-se concluir que a capacidade das plantas hospedeiras em influenciar a atividade dos vírus de poliedrose nuclear é complexa, sendo que cada planta atua de forma diferente na suscetibilidade do inseto à doença.

A mortalidade de lagartas *C. includens* causada pelo ChinNPV foi diretamente afetada tanto pelo algodão (FMT 701) quanto pela soja (BRS 360 RR). No entanto, os folíolos de soja comprometeram a atividade viral em menor intensidade que o algodão, sendo a influência dependente da forma como o vírus foi disponibilizado às lagartas.

O efeito na mortalidade de lagartas alimentadas com o algodão somente é observado quando este é fornecido juntamente com o vírus.

Peso e desenvolvimento foram afetados quando as larvas se alimentaram de substrato foliar após a inoculação com o vírus, mas, neste caso o vírus não foi responsável por esta alteração.

A ingestão de folhas de soja e algodão antes da inoculação com o vírus não comprometeu a infecção viral, mas foi capaz de desestruturar a camada epitelial.

CAPÍTULO 2 – FIXAÇÃO, MORFOLOGIA E PERSISTÊNCIA DO BACULOVÍRUS DE *Chrysodeixis includens* (WALKER, [1858]) (LEPIDOPERA: NOCTUIDAE), ChinNPV, NA SUPERFÍCIE FOLIAR DE ALGODÃO (*Gossypium hirsutum* L.) E SOJA (*Glycine max* L.)

2.1 INTRODUÇÃO

As altas infestações com insetos-praga são responsáveis pela redução significativa de produtividade de diversas culturas quando o controle não é realizado. Entre os insetos passíveis de causar danos a diferentes plantas cultivadas está a lagarta *Chrysodeixis includens*, pertencente à família Noctuidae e subfamília Plusiinae. Esta lagarta é conhecida por ser uma praga polífaga, com elevado potencial desfolhador e que teve sua importância aumentada nos últimos anos, devido às mudanças adotadas no sistema do manejo utilizado, principalmente para a cultura da soja (SOSA-GÓMEZ et al., 2003, SOSA-GÓMEZ; LASTRA; HUMBER, 2010; BALDIN; LOURENÇÃO; SCHLICK-SOUZA, 2014).

Entre as possíveis formas de controlar *C. includens*, o controle biológico com vírus entomopatogênicos é considerado uma alternativa viável ao emprego de produtos químicos, devido à alta virulência de algumas estirpes e sua seletividade (CASTRO et al., 1999, HERNIOU et al., 2012, MUDGAL et al., 2013). Contudo, fatores ambientais, como a luz ultravioleta e a temperatura, e inerentes à própria planta onde o vírus é aplicado, podem comprometer sua eficiência reduzindo a atividade viral, fazendo-se necessárias novas aplicações (YOUNG; YEARIAN, 1974, YOUNG; YEARIAN; KIM, 1977). Segundo Stevenson, D’cunha e Grzywacz (2010), a atividade do baculovírus de *Helicoverpa armigera* (HearNPV) foi comprometida em menos de uma hora de exposição do vírus sobre a superfície foliar de grão de bico (*Cicer arietinum*), indicando que a eficiência do baculovírus pode ser rapidamente comprometida pela superfície de algumas plantas.

Da mesma forma, o pH, a microtopografia da superfície foliar, a forma e a constituição da cera epicuticular e a distribuição dos tricomas e dos estômatos podem influenciar a maneira como os corpos de oclusão (CO) se depositam e se fixam sobre a superfície foliar (SMALL; MOORE; ENTWISTLE, 1986) favorecendo ou não sua permanência na planta.

Dessa forma, buscou-se entender como o vírus de poliedrose nuclear de *C. includens* se distribui e fixa na superfície foliar de duas importantes culturas, a soja e o algodão.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Criação massal de *C. includens*

As lagartas da espécie *C. includens* foram criadas em dieta artificial, conforme o protocolo de Hoffmann-Campo, Oliveira e Moscardi (1985), no laboratório de Entomologia da Embrapa Soja. A dieta artificial utilizada é a descrita por Greene, Lepla e Dickerson (1976).

2.2.2 Obtenção do vírus entomopatogênico

O vírus utilizado, ChinNPV (Isolado CNPSo-VPN168), se encontra armazenado na coleção de entomopatógenos da Embrapa Soja e foi obtido a partir de lagartas infectadas e coletadas em plantações de soja em Iguaraçu, PR, na safra 2005/2006.

A multiplicação do vírus foi realizada mediante inoculação de lagartas *C. includens* mantidas em dieta artificial (GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976) sem formol. Após sua morte, as lagartas infectadas foram recolhidas, maceradas e diluídas em água destilada autoclavada. O homogenato foi então filtrado e centrifugado quatro vezes (7.000 g por 15 min a temperatura de 10° C) para purificação parcial (Eppendorf 5810 R, Alemanha). O sedimento resultante contendo os poliedros foi ressuspenso em água destilada, colocado em tubos criogênicos e armazenados a - 20 °C até serem usados. A concentração de corpos de oclusão foi estimada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer espelhada (Boeco, Alemanha) e microscópio ótico com contraste de fase e magnificação de 400 x (Carl Zeiss 47 30 28, Brasil).

2.2.3 Obtenção das plantas hospedeiras

As plantas hospedeiras de *C. includens* (Soja – BRS 360 RR e algodão - FMT 701) foram cultivadas em casa de vegetação, com exceção daquelas utilizadas para o ensaio de microscopia eletrônica em campo. A semeadura ocorreu em vasos plásticos de 3 L contendo uma mistura de terra, areia e esterco curtido na proporção 3:2:2 e um total de quatro plantas/vaso. Em todos os experimentos, as plantas foram utilizadas de 30 a 40 dias após a semeadura.

2.2.4 Persistência do NPV de *Chrysodeixis includens* nas folhas de soja e algodão em casa de vegetação

Uma suspensão viral foi aplicada sobre plantas de soja e algodão com pulverizador de pressão constante, pressurizado com CO₂ (Herbicat), equipado com bico do tipo leque (DG110-VS, Teejet) com vazão de 150 L.ha⁻¹. A concentração utilizada foi de 1,5 x10¹¹ CO.ha⁻¹, em água deionizada com 0,01% de Tween 80. Às plantas controle, foi pulverizada apenas a solução contendo 0,01% de Tween 80. Como controles positivo e negativo, foi utilizada a dieta de Greene, Lepla e Dickerson (1976), disposta em bandejas de 32 células, pulverizadas no mesmo momento que as plantas, com suspensão viral, ou água, respectivamente.

Logo após a pulverização (dia 0) e 1, 3 e 8 dias após a aplicação do vírus sobre as plantas, folhas/folíolos de cada tratamento foram coletadas e fornecidas para larvas de 3º ínstar, seguindo a metodologia semelhante à utilizada por Young e Yearian (1974). Cada tratamento consistiu de 32 larvas, que foram transferidas individualmente para bandejas de bioensaio com 32 células. Após 72 h, as lagartas foram transferidas para dieta de Greene, sem formol. O experimento foi composto por três repetições e os insetos foram observados diariamente durante 12 dias. Os bioensaios foram mantidos em condições controladas de temperatura (26°C ± 2 °C), fotofase: escotofase (14h:10h) e umidade (60±10% UR).

2.2.5 Fixação, persistência e morfologia das partículas virais (corpos de oclusão) sobre os substratos vegetais

Os vírus de poliedrose nuclear foram nebulizados, com aparelho inalador (NS respiramax, Brasil), sobre os substratos (soja e algodão), a uma suspensão necessária para aplicar aproximadamente 10^7 CO.cm⁻² (ou 0,1 corpos de oclusão.µm⁻²), em água deionizada em 0,01% de Tween 80. A aplicação foi realizada em ambiente fechado, contendo 3 vasos de cada uma das culturas avaliadas. Em um período de 1, 3 e 8 dias após a aplicação, 1 folha/folículo de cada um dos vasos foram coletados para análise por microscopia eletrônica de varredura. A fixação das amostras foi através do método de vapor de tetróxido de ósmio e metalização com ouro (QUATTLEBAUM; CARNER, 1980). O experimento foi repetido a campo, com o ChinNPV sendo pulverizado sobre os substratos com pulverizador de pressão constante, pressurizado com CO₂ (Herbicat), equipado com bico do tipo duplo leque (TJ60-11002VS, Teejet) com gota muito fina e vazão de 300 L.ha⁻¹. A concentração utilizada neste caso foi de 6×10^{12} CO.ha⁻¹, em água deionizada com 0,01% de Tween 80. Neste experimento, amostras foram coletadas logo após a aplicação do vírus e 2 e 6 dias depois da aplicação. Para a análise de campo, a fixação das amostras seguiu o protocolo de rotina do laboratório de microscopia eletrônica e microanálise – LMEM, da Universidade Estadual de Londrina. Após coletadas, as amostras foram mantidas durante a noite em fixador primário a 4°C (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 2% e tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2). As amostras foram posteriormente enxaguadas três vezes durante 10 min cada em temperatura ambiente (tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2). Em seguida foram fixadas em 1% de tetróxido de ósmio durante 30 min, enxaguadas três vezes em tampão cacodilato de sódio durante 10 min cada e desidratadas através de uma série alcoólica (metanol 30, 50, 70, 90 e 100% durante 10 min cada). Posteriormente ocorreu a secagem ao ponto crítico seguida da metalização com ouro.

A presença e o aspecto dos corpos de oclusão poliédricos sobre os diferentes substratos foram estudados utilizando microscopia eletrônica de varredura (FEI Quanta 200 FEG FEI Co., Eindhoven, The Netherlands).

Os dados de temperatura e a umidade do ambiente durante o experimento em ambiente fechado foram determinados por datalogger (Instrutherm, HT-70,

Brasil), enquanto os dados meteorológicos do período de realização do experimento a campo foram obtidos da estação meteorológica da Embrapa Soja, Londrina/PR.

2.2.6 Exposição dos corpos de oclusão sobre a superfície foliar

Para estudar o efeito da química da superfície da planta sobre os NPVs foi empregada a técnica utilizada por Stevenson, D'cunha e Grzywacz (2010). Os corpos de oclusão foram suspensos em 50 mL de água deionizada e aplicados na superfície foliar dos substratos (soja e algodão) na concentração de 10^8 CO.mL⁻¹ em 0,01% de Tween 80, utilizando um borrifador manual. Após 72 h, os corpos de oclusão foram recuperados através de lavagem em água contendo Tween 80 0,01% durante 2 h, sob agitação constante de 100 rpm.min⁻¹ e temperatura ambiente em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal – TE421). Os NPVs foram concentrados por centrifugação a 7000 g durante 15 min. Após eles foram ressuspensos em água destilada autoclavada e congelados a -20°C antes da contagem e bioensaio. Os bioensaios com os vírus recuperados foram realizados utilizando o método “droplet feeding” (HUGHES e WOOD, 1981).

Para determinar a quantidade de vírus a ser utilizada, a concentração letal mediana (CL₅₀) foi determinada utilizando seis concentrações: 20, 40, 80, 160, 320 e 640 CO.lagarta⁻¹. O controle negativo consistiu apenas de solução de água destilada, corante alimentício (10%) (água, etanol, corante azul brilhante FCF, eritrozina e tartrazina, Mix coralin azul jeans) e sacarose (5%). A suspensão viral foi fornecida para lagartas de terceiro ínstar em jejum (300 nL.lagarta⁻¹) em bandejas tipo “Bio-assay tray Bio-BA-128-USA”, compostas por oito divisórias com 16 compartimentos cada. Após 24h, foram transferidas para bandejas de 32 células contendo dieta artificial, as lagartas que visualmente apresentaram alteração na cor do sistema digestório devido à presença do corante. Trinta e duas lagartas foram usadas para cada concentração. A mortalidade foi avaliada diariamente durante 12 dias.

Após definida a CL₅₀, o bioensaio foi repetido utilizando o vírus recuperado das folhas de soja e algodão. O teste consistiu de quatro tratamentos, sendo um controle negativo (composto apenas de corante, sacarose e água), um controle positivo (contendo vírus da suspensão viral estoque), um tratamento contendo o

vírus recuperado das folhas de algodão e um contendo o ChinNPV recuperado dos folíolos de soja. Os bioensaios foram repetidos quatro vezes e foram conduzidos em câmaras B.O.D. a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 14:10 (Luz:Escuro) e umidade relativa de $60\% \pm 10\%$. Os bioensaios foram avaliados diariamente até o décimo segundo dia após o início do experimento.

2.2.7 Efeito dos compostos da superfície foliar sobre a fixação dos corpos de oclusão

A extração dos compostos da superfície foliar de soja e algodão foi realizada conforme descrito por Mendonça (2000) com algumas modificações. Duas folhas de cada cultura foram mergulhadas por 30 s em 10 mL de cinco diferentes solventes (Hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e a mistura clorofórmio:metanol (3:1)). Os compostos extraídos foram colocados em frascos de vidro e secos a vácuo. A área das folhas utilizadas em cada extrato foi determinada por medidor eletrônico de área foliar (LI-COR, modelo 3100, USA).

Após secas, as amostras foram ressuspensas em seus respectivos solventes, utilizando volume de 300 μL para cada 50 cm^2 de área foliar. O teste de fixação realizado foi adaptado de Sosa-Gómez, Boucias e Nation (1997), onde 50 μL de cada extrato foram pipetados sobre lâminas de vidro. Esperou-se o solvente evaporar e em seguida as lâminas foram nebulizadas com uma suspensão de vírus suficiente para aplicar 0,1 $\text{CO} \cdot \mu\text{m}^{-2}$. Dois minutos após o fim da aplicação, as lâminas foram mergulhadas em 60 mL de água destilada e agitadas levemente por 10 vezes para remover as partículas virais que não foram fixadas.

A contagem dos vírus remanescentes foi realizada em um total de 10 campos microscópicos (microscópio ótico com contraste de fase) de cada lâmina a fim de estimar qual dos cinco solventes analisados teve a capacidade de reter o maior número de corpos de oclusão. Como testemunhas foram utilizados cada um dos solventes, individualmente. A obtenção dos extratos foi feita em triplicata e para cada um deles foram montadas três lâminas distintas.

Para a análise qualitativa dos compostos da superfície foliar, os resíduos obtidos com os extratos foliares ressuspensos em seus respectivos solventes, foram avaliados através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando

cromatoplasmas de sílica gel 60, Merck. O benzeno foi utilizado como fase móvel (MONQUERO et al., 2004). Como reveladores foram empregados o anisaldeído sulfúrico e o reagente de Vaughn (WAGNER; BLANDT, 1996).

2.2.8 Análise estatística

As variáveis respostas porcentagem de lagartas, pré-pupas e pupas dos indivíduos sobreviventes ao final da avaliação e o tempo médio de mortalidade (dias) foram analisadas através de delineamento experimental completamente casualizado variando o número de tratamentos e as repetições para cada um dos bioensaios realizados, conforme mostrado nos itens 2.2.4 e 2.2.6. Já a fixação dos corpos de oclusão foi analisada pelo delineamento experimental inteiramente casualizado com os tratamentos em arranjo fatorial: uma testemunha e duas culturas combinadas com cinco solventes e três repetições. Cada repetição continha três lâminas e 10 campos microscópicos por lâmina (item 2.2.7). Os dados das variáveis respostas dos diferentes bioensaios foram submetidos aos testes para verificar as pressuposições de normalidade e independência dos resíduos (SHAPIRO; WILK, 1965; PARENTE, 1984), a homogeneidade de variância dos resíduos dos tratamentos (BURR; FOSTER, 1972) e não-aditividade do modelo (TUKEY, 1949). Após as análises exploratórias e atendidos os pressupostos, foram realizadas as Análises de Variâncias (ANOVA) e a comparação múltipla de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (STEEL, TORRIE, 1960) pelo software estatístico SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute, 2009). Quando os dados não atenderam à normalidade e homogeneidade de variâncias, eles foram transformados aplicando-se a transformação raiz quadrada ou logarítmica e então submetidos à ANOVA.

A determinação da concentração letal mediana (CL_{50}) foi determinada por análises de Probit (FINNEY, 1971), através do software Polo Plus (LeOra Software, 2006).

O tempo médio de mortalidade em cada um dos bioensaios foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$TMM = \frac{\sum (D1 \times N + D2 \times N2 \dots + Dn \times Nn)}{NT}$$

Onde:

D = dia da avaliação;

N = número de lagartas mortas pelo ChinNPV naquele dia;

NT = Número total de lagartas mortas pelo ChinNPV.

Para os dados de mortalidade, o modelo utilizado foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial entre os tratamentos, as subamostras e as repetições para experimento descrito no item 2.2.6 e entre os tratamentos, as subamostras, as repetições e os dias de coleta de material vegetal no bioensaio citado no item 2.2.4. Nos casos em que os efeitos das subamostras e a interação entre tratamentos vs subamostras não apresentaram significância estatística o modelo utilizado foi o completamente casualizado. Os dados de mortalidade foram avaliados pela Análise de Sobrevivência por Riscos Competitivos (PINTILIE, 2006, CARMES, 2015). A análise de sobrevivência permite a avaliação dos dados relacionados ao tempo até a ocorrência de um evento de interesse, o qual é chamado tempo de falha (COLOSIMO; GIOLO, 2006). Na presença de riscos competitivos tem-se, então, que os indivíduos estão sob risco de falha por k causas diferentes e que a ocorrência de uma das k causas impede que se observe a ocorrência de qualquer outra. Seja $k = 1, 2$ denota as causas (1 = morte por vírus e 2 = morte por causas desconhecidas). Esta análise permite também a observação parcial da variável resposta quando o evento não é observado (censura). Estudos indicaram que, na presença de riscos competitivos, há situações em que o risco da causa específica num grupo é maior do que no outro (GRAY, 1988). A função $F_k(t)$ fornece a probabilidade de morte pela causa k em cada t (dia). As curvas de incidência/proporção acumulada do risco de morte das lagartas foram comparadas pela abordagem não paramétrica do teste de Gray (1988), calculando-se as estimativas pontuais para o total de dias de duração do bioensaio (Item 2.2.6). Quando ocorreu interação entre as covariáveis (tratamentos vs dias), as curvas de incidência acumulada foram ajustadas pelo modelo semiparamétrico proposto por Fine e Gray (1999) (Item 2.2.4). Neste caso, o modelo permite somente a avaliação dos tratamentos que apresentaram mortalidade pelas duas causas consideradas. Dessa forma, os tratamentos controle (dieta artificial (T1), folha de algodão (T2) e folha de soja (T3)) não foram incluídos no ajuste. O *software* R, versão 3.4.1 (R CORE TEAM, 2014) foi utilizado para a análise de sobrevivência e comparação das curvas pelo teste de Gray ou ajuste do modelo por Fine-Gray por meio dos pacotes *cmprsk* e *survival*, (GRAY, 2014).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Persistência do NPV de *Chrysodeixis includens* nas culturas da soja e algodão

Os dados de mortalidade submetidos à análise de sobrevivência com modelo ajustado por Fine-Gray indicaram que houve diferença tanto entre os tratamentos quanto entre os dias após a aplicação do vírus. As estimativas das proporções acumuladas de morte pelo ChinNPV, referentes à interação dos tratamentos com os diferentes dias é apresentada na tabela 2.1. Nela é possível observar que as maiores estimativas (0,856 e 0,853) foram provenientes do tratamento dieta artificial e ChinNPV, nos dias um e três após a aplicação do vírus. Já o menor valor estimado (0,144) foi devido ao tratamento com folha de algodão e vírus, no último dia de avaliação.

Tabela 2.1: Estimativas da incidência/probabilidade de mortalidade acumulada para cada tratamento no 12º dia, considerando os quatro dias após aplicação do vírus em que os bioensaios foram montados.

Tratamentos	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 8
T4	0,794	0,856	0,853	0,601
T5	0,653	0,815	0,609	0,144
T6	0,483	0,753	0,638	0,371

Nota: T4 = dieta + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV.

Quando as curvas de incidência acumulada para a morte causada pelo ChinNPV foram agrupadas pelos dias após a aplicação do vírus, foi possível observar diferenças entre elas (Figura 2.1). Da mesma forma, os intervalos de confiança apresentados na tabela 2.2 indicaram que houve diferença entre todas as curvas apresentadas, sendo que a mortalidade de lagartas no tratamento dieta artificial e ChinNPV foi superior aos demais em todos os dias avaliados (figura 2.1). As lagartas alimentadas com folhas de algodão tiveram maior mortalidade em relação à soja nos dias zero e um, mas foram mais afetadas pelo tratamento nos dias três e oito após a aplicação do vírus, apresentando menor probabilidade de morte das lagartas.

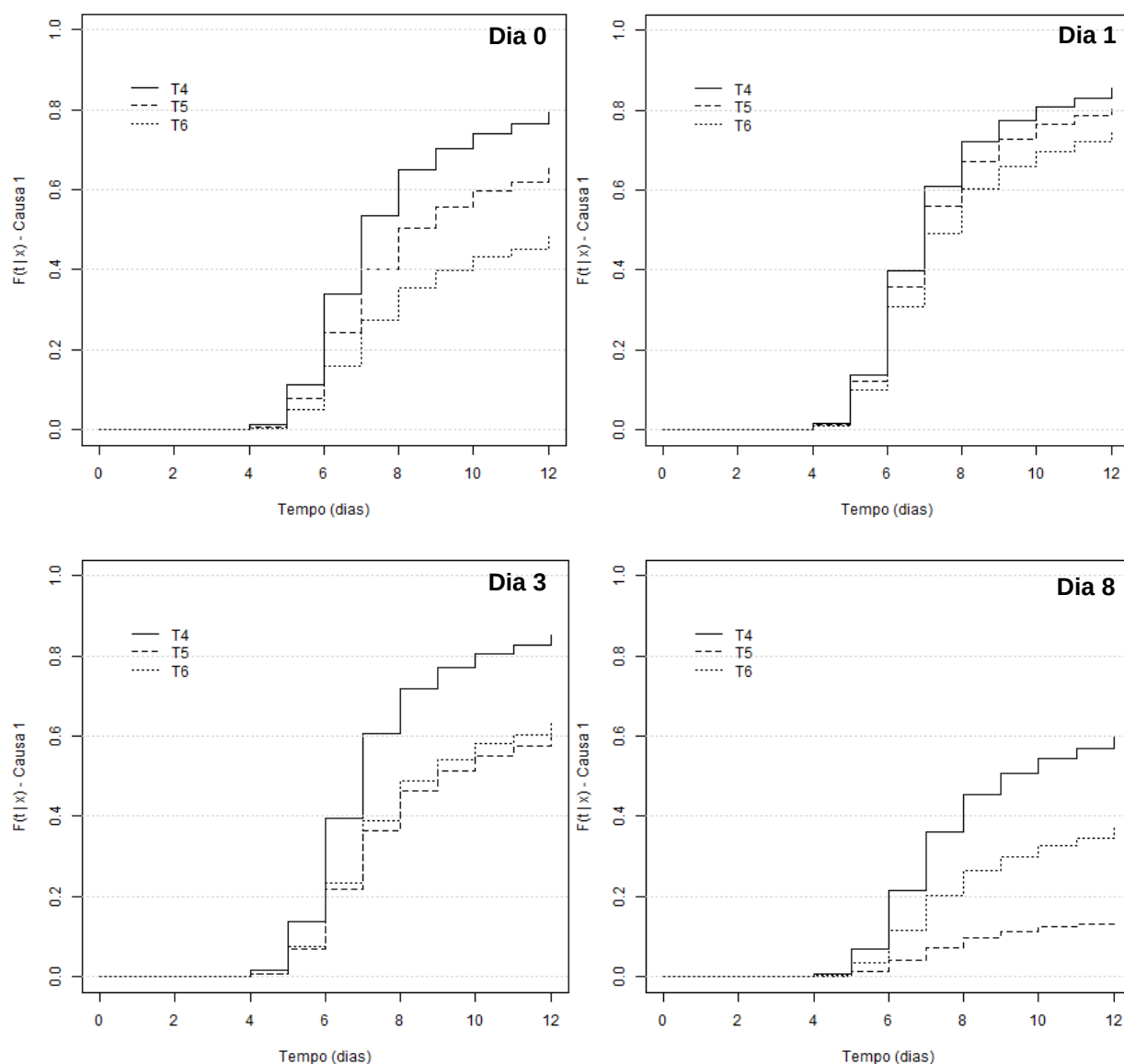


Figura 2.1 Curvas de proporção acumulada de morte $[F(t|x)]$ pelo ChinNPV para os tratamentos T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV, fixando os dias após a aplicação do vírus em que os bioensaios foram montados.

No dia zero, é possível observar que o risco de morte por vírus associado à curva da incidência da dieta artificial foi estimado em 1,5 e 2,4 vezes maior que às de folha de algodão e soja, respectivamente (Figura 2.1 e Tabela 2.2).

Comparativamente ao dia zero, nota-se que a mortalidade de lagartas um dia após a aplicação do vírus aumentou na presença de ambos os substratos foliares (T5 e T6), ficando próximas à da dieta artificial (T4) (Figura 2.1). Ao final do experimento, as mortalidades acumuladas para este dia foram estimadas em 0,856, 0,815 e 0,753, para dieta e ChinNPV, folha de algodão e ChinNPV e folha de soja e ChinNPV, respectivamente (Tabela 2.1).

Três dias após a aplicação do vírus, a mortalidade de lagartas relativas à dieta e vírus permaneceu elevada e similar às observadas nos dias zero e um, enquanto as curvas dos demais tratamentos apresentaram uma redução (Figura 2.1). A mortalidade causada pelo controle (dieta artificial e vírus) foi de 2 e 1,9 vezes superior às verificadas no algodão e soja, respectivamente (Tabela 2.2).

O bioensaio montado oito dias após a aplicação do vírus apresentou as menores taxas de mortalidade em relação aos demais dias avaliados (Tabela 2.1 e Figura 2.1). A maior diferença entre os tratamentos foi observada entre dieta artificial e algodão, onde a estimativa da morte causada pela dieta e vírus foi 5,9 vezes superior àquela causada quando as lagartas se alimentaram de folhas de algodão (Tabela 2.2).

Tabela 2.2: Razão de risco de morte e intervalo de confiança para a comparação dos tratamentos dois a dois quando os dias são agrupados, no contexto do modelo de Fine-Gray.

Dias*	Interação	Razão**	IC_95%
0	T4 versus T5	1/0,670 = 1,492	(1,148; 1,945) ¹
	T4 versus T6	1/0,417 = 2,398	(1,739; 3,300) ¹
	T5 versus T6	0,670/0,417 = 1,607	(1,516; 1,696) ¹
1	T4 versus T5	1,226/1,066 = 1,150	(1,139; 1,161) ¹
	T4 versus T6	1,226/0,885 = 1,385	(1,336; 1,438) ¹
	T5 versus T6	1,066/0,885 = 1,204	(1,172; 1,238) ¹
3	T4 versus T5	1,214/0,593 = 2,047	(2,005; 2,087) ¹
	T4 versus T6	1,214/0,641 = 1,894	(1,892; 1,895) ¹
	T6 versus T5	0,641/0,593 = 1,081	(1,059; 1,103) ¹
8	T4 versus T5	0,581/0,098 = 5,928	(4,725; 7,565) ¹
	T4 versus T6	0,581/0,294 = 1,976	(1,914; 2,049) ¹
	T6 versus T5	0,294/0,098 = 3,000	(2,467; 3,643) ¹

Nota: T4 = dieta artificial + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV. Em que : IC = intervalo de confiança. * Dias após a aplicação do vírus nas plantas/dieta em que o bioensaio foi montado. ** Razão exponencial entre os tratamentos (Indica quantas vezes a mortalidade causada por um tratamento é maior que o outro, estimados pelo modelo de Fine-Gray). (¹) As funções de incidência acumulada diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Fine-Gray (Os IC_95% que contêm o valor 1,000 indicam que não é possível afirmar que existam diferenças (ao nível $\alpha = 5\%$) entre as 2 curvas comparadas).

Quando as curvas de incidência acumulada para a morte causada pelo ChinNPV foram agrupadas por tratamentos, foi possível observar a influência de cada tratamento nos diferentes dias após a aplicação do vírus (Figura 2.2).

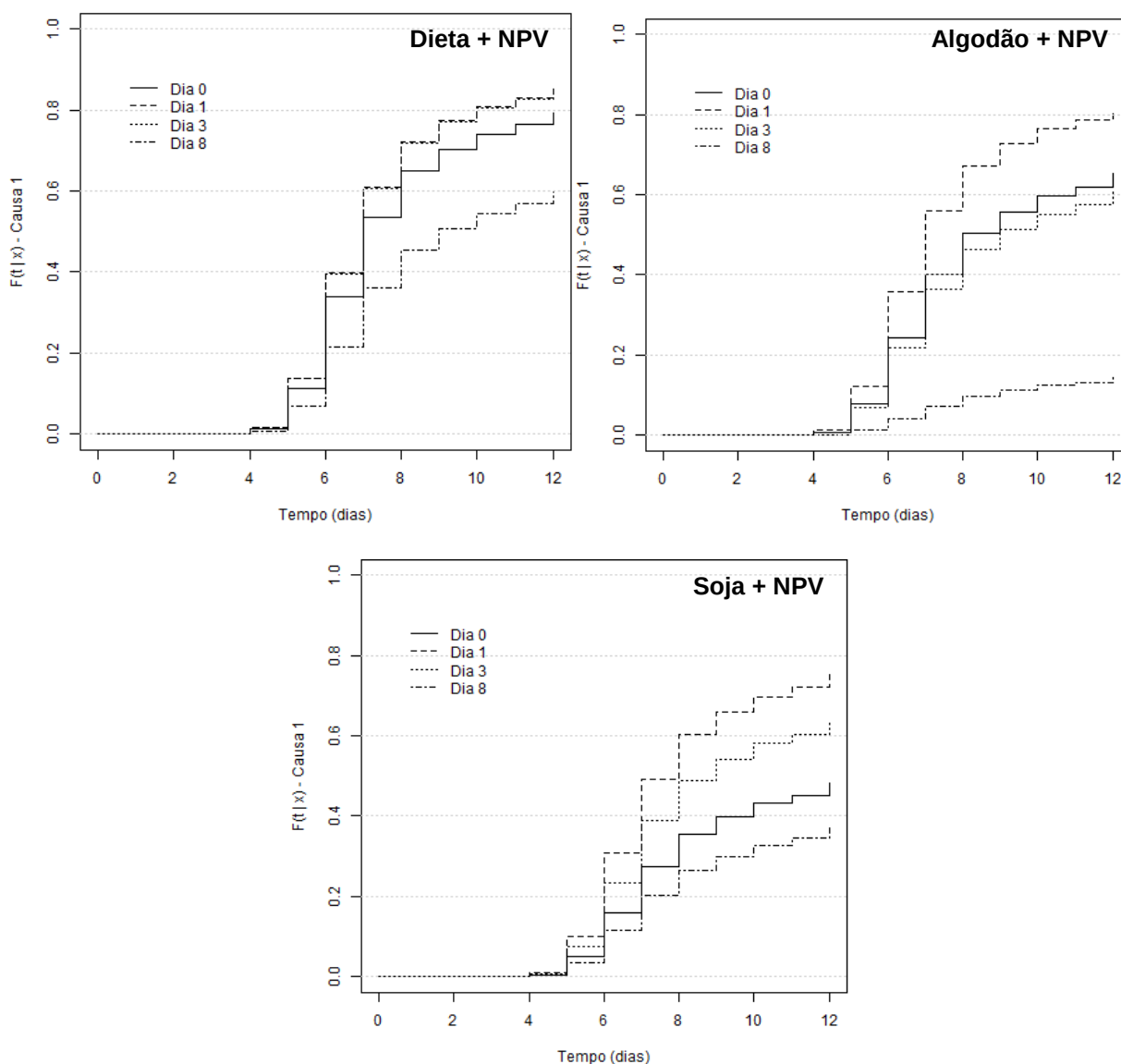


Figura 2.2 Curvas de proporção acumulada de morte $[F(t|x)]$ pelo ChinNPV nos dias 0, 1, 3 e 8 após a aplicação do vírus nas plantas/dieta, fixando os diferentes tratamentos.

A partir da figura 2.2 é possível observar que as mortalidades foram elevadas para o tratamento com dieta artificial e vírus nos dias zero, um e três após a aplicação do vírus, decrescendo no oitavo dia. Isso indica que o vírus aplicado sobre dieta artificial não alterou sua eficiência pelo menos nos primeiros três dias de avaliação. Após oito dias, no entanto, há um decréscimo considerável na

mortalidade embora a estimativa de morte pelo vírus para esse dia ainda seja de 0,601 ou 60,1% (Tabela 2.1).

Em todos os tratamentos com folha, a mortalidade das lagartas pelo ChinNPV no mesmo dia da aplicação do vírus (data zero) foi inferior ao dia um. Tanto para algodão quanto para a soja, o ajuste pelo modelo de Fine-Gray, indicou que houve diferença entre todas as curvas de incidência acumuladas (Figura 2.2 e Tabela 2.3).

Tabela 2.3: Razão de risco de morte e intervalo de confiança para a comparação dos dias dois a dois quando os tratamentos são agrupados, no contexto do modelo de Fine-Gray.

Tratamento	Interação entre os dias*	Razão**	IC_95%
T4	D1 versus D0	$1,226/1 = 1,226$	(0,942; 1,597)
	D1 versus D3	$1,226/1,214 = 1,010$	(1,007; 1,014)
	D1 versus D8	$1,226/0,581 = 2,210$	(1,976; 2,254) ¹
	D3 versus D0	$1,214/1 = 1,214$	(0,929; 1,586)
	D3 versus D8	$1,214/0,581 = 2,089$	(1,963; 2,222) ¹
	D0 versus D8	$1/0,581 = 1,721$	(1,237; 2,392) ¹
T5	D1 versus D0	$1,066/0,670 = 1,591$	(1,578; 1,606) ¹
	D1 versus D3	$1,066/0,593 = 1,797$	(1,711; 1,822) ¹
	D1 versus D8	$1,066/0,098 = 10,877$	(8,193; 14,482) ¹
	D0 versus D3	$0,670/0,593 = 1,129$	(1,102; 1,155) ¹
	D0 versus D8	$0,670/0,098 = 6,837$	(5,099; 9,178) ¹
	D3 versus D8	$0,593/0,098 = 6,051$	(4,625; 7,946) ¹
T6	D1 versus D0	$0,885/0,417 = 2,122$	(2,078; 2,162) ¹
	D1 versus D3	$0,885/0,641 = 1,381$	(1,334; 1,426) ¹
	D1 versus D8	$0,885/0,294 = 3,010$	(2,832; 3,211) ¹
	D3 versus D0	$0,641/0,417 = 1,537$	(1,457; 1,620) ¹
	D0 versus D8	$0,417/0,294 = 1,418$	(1,362; 1,485) ¹
	D3 versus D8	$0,641/0,294 = 2,180$	(1,986; 2,407) ¹

Nota: T4 = dieta + ChinNPV; T5 = folha de algodão + ChinNPV; T6 = folha de soja + ChinNPV. Em que: IC = intervalo de confiança. * Dias após a aplicação do vírus nas plantas/dieta em que o bioensaio foi montado. ** Razão exponencial entre os tratamentos (Indica quantas vezes a mortalidade causada por um tratamento é maior que o outro, estimados pelo modelo de Fine e Gray). ⁽¹⁾ As funções de incidência acumulada diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Gray (Os IC_95% que contêm o valor 1,000 indicam que não é possível afirmar que existam diferenças (ao nível $\alpha = 5\%$) entre as 2 curvas comparadas).

A maior diferença registrada entre os dias após a aplicação do vírus foi no tratamento com algodão onde no dia um a razão do risco de morte das lagartas foi 10,9 vezes superior à mortalidade observada no dia oito (Tabela 2.3).

2.3.2 Fixação, persistência e morfologia das partículas virais (corpos de oclusão) sobre os substratos vegetais

- Experimento em ambiente controlado

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, no período de um, três e oito dias após a aplicação do vírus sobre a superfície foliar de soja e algodão permitiu a identificação de diferenças na disposição dos poliedros entre as culturas. Enquanto nos folíolos de soja os poliedros formaram maior quantidade de agregados, nas folhas do algodão eles distribuíram-se mais uniformemente. Cabe ressaltar, que o vírus foi nebulizado sobre as plantas com formação de gotas menores que 10 μm .

Visualmente não foram identificadas diferenças entre os poliedros presentes na superfície foliar de soja e algodão decorridos um, três e oito dias após a aplicação (Figura 2.3 a 2.5). No entanto, em alguns casos, os poliedros que se encontravam agregados apresentaram certa deformação com aparente fusão entre eles (Figuras 2.3 C e F, 2.4 B, C, E e F e 2.5 B, C, E e F), com maior destaque para os que se encontram nos folíolos de soja.

O fato de as células foliares não terem mantido sua turgescência, é devido à metodologia aplicada no processo de preparação das amostras para a microscopia eletrônica de varredura, que neste caso utilizou o vapor de tetróxido de ósmio para a fixação e que promove uma desidratação rápida das células.

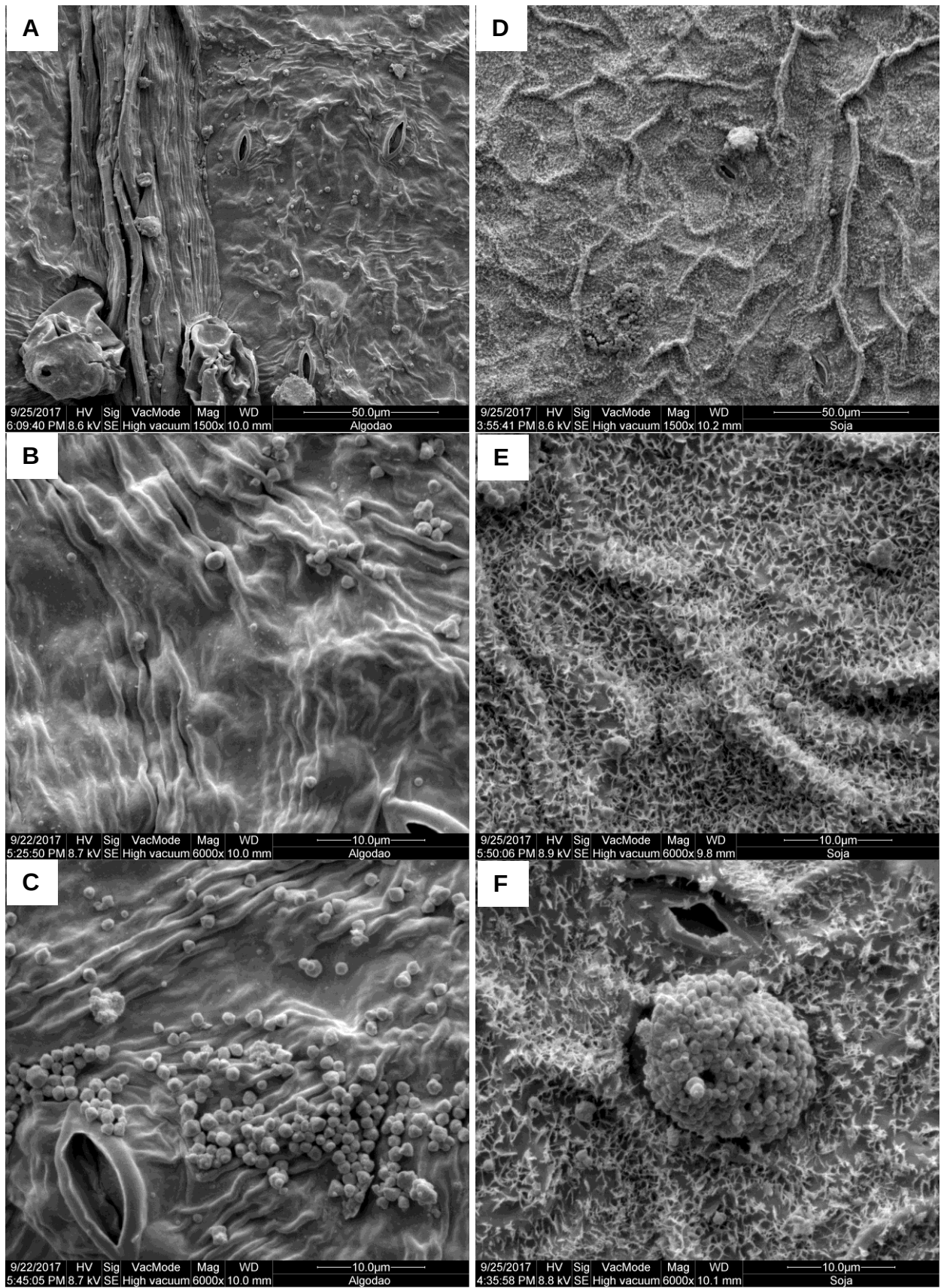


Figura 2.3: Dia 1. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície adaxial de folhas de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F). Sendo A e D = mag. 1500x; B e E = imagem aleatória mag. 6000x e C e F = imagem dirigida mag. 6000x

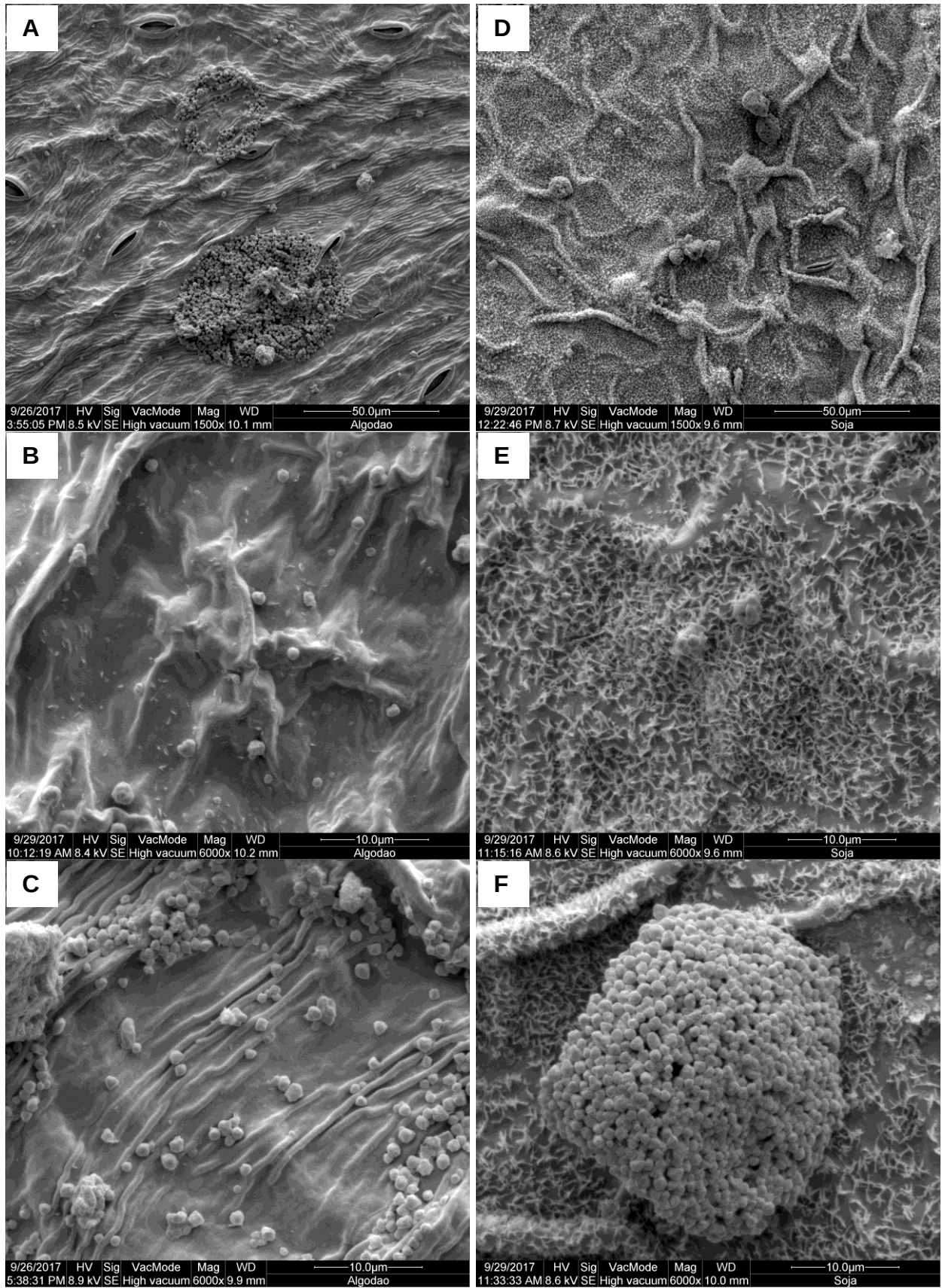


Figura 2.4: Dia 3. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície adaxial de folhas de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F). Sendo A e D = mag. 1500x; B e E = imagem aleatória mag. 6000x e C e F = imagem dirigida mag. 6000x.

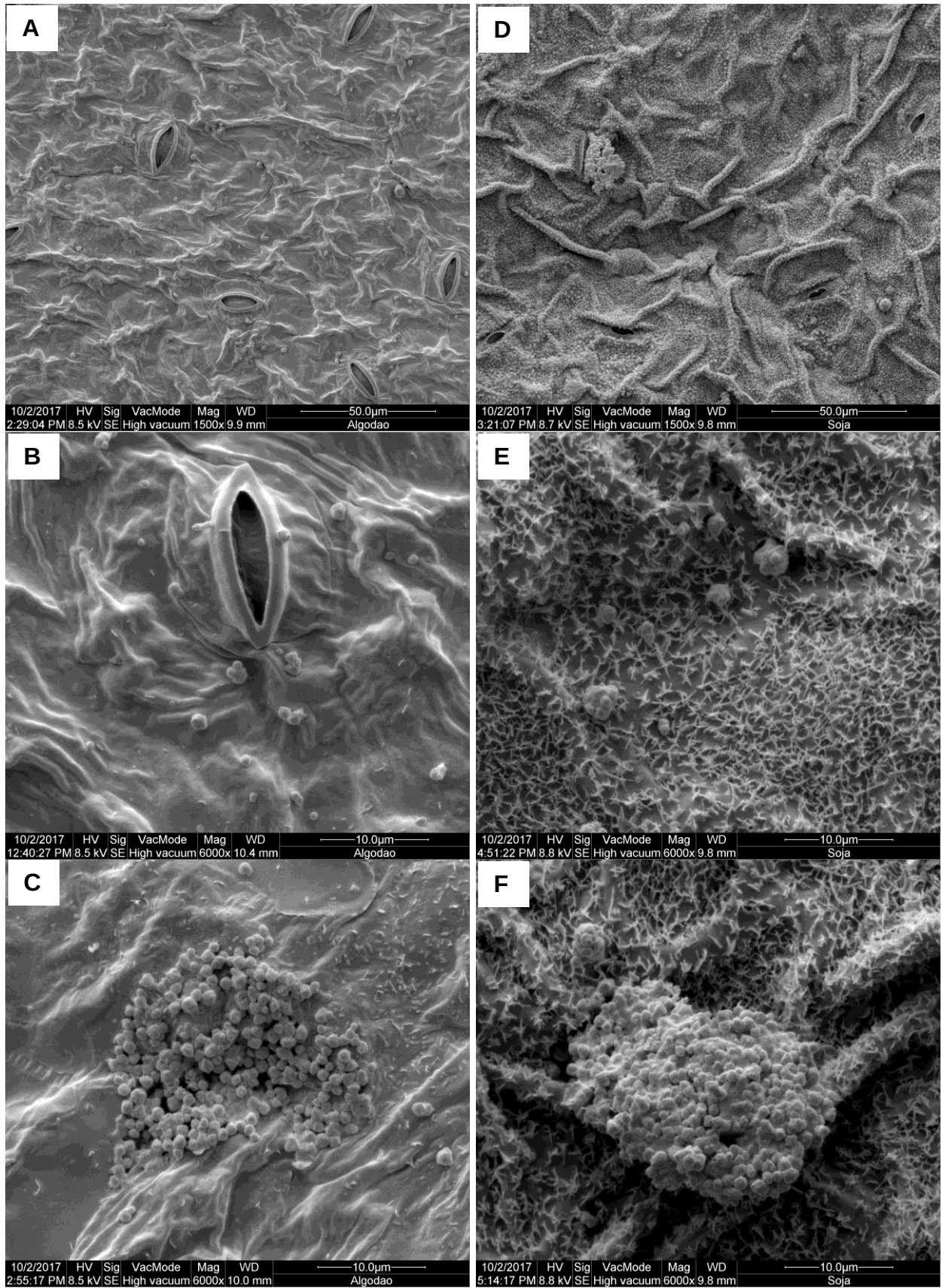


Figura 2.5: Dia 8. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície adaxial de folhas de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F). Sendo A e D = mag. 1500x; B e E = imagem aleatória mag. 6000x e C e F = imagem dirigida mag. 6000x

A umidade relativa do ar no período de duração do experimento variou entre 44,9 e 69,6% com os maiores valores sendo observados nos três últimos dias de avaliação, enquanto a temperatura máxima foi superior a 31 °C nos cinco primeiros dias após a nebulização do vírus sobre as plantas (Tabela 2.4). Cabe destacar que as folhas não foram molhadas durante os oito dias de realização do experimento.

Tabela 2.4: Dados de temperatura e umidade relativa do ar durante o período de duração do experimento.

Dias após aplicação do ChinNPV	Temperatura do ar (°C)			Umidade relativa do ar média (%)
	Média	Máxima	Mínima	
0	25,2	32,2	16,8	55,5
1	25,3	32,2	19,1	53,7
2	24,9	31,4	18,0	47,5
3	24,8	31,8	17,5	49,9
4	26,2	32,3	20,2	44,9
5	26,1	32,1	21,8	46,1
6	22,9	29,8	17,4	67,0
7	22,1	28,9	16,3	69,6
8	20,5	25,4	16,5	69,4

Dados obtidos por datalogger.

- Experimento em campo

Diferente do que ocorreu quando os vírus foram nebulizados sobre as plantas, a aplicação realizada por meio de pulverizador promoveu a formação de macrogotas, sendo que a superfície de cada uma das culturas utilizadas teve comportamento distinto em relação à suspensão viral aplicada. Enquanto nos folíolos de soja o volume aplicado formou principalmente gotículas bem definidas sobre o limbo foliar e uma fina lâmina próximo e sobre as nervuras, nas folhas de algodão a tensão superficial promovida pela suspensão aplicada foi menor, de forma que as gotas espalharam-se mais facilmente, formando uma lâmina sobre a superfície, o que permite um maior contato entre o vírus e a superfície da planta (Figura 2.6).



Figura 2.6: Disposição da suspensão viral de ChinNPV aplicada com pulverizador com pressão de CO₂ e bico tipo duplo leque (TJ60-11002VS) com gota muito fina sobre a superfície foliar de algodão e soja.

A radiação solar foi maior nos dois primeiros dias após a aplicação da suspensão viral sobre a superfície foliar, atingindo seu máximo em $28,2 \text{ MJ.m}^{-2}$. Este período antecedeu a uma fase de chuva que teve início logo após a coleta de material do segundo dia de análise e acumulou 41,2 mm até o último dia do experimento. Além disso, a temperatura máxima ultrapassou os $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ no período e a velocidade média do vento chegou a $4,2 \text{ m.s}^{-1}$ (Tabela 2.5).

Tabela 2.5: Dados meteorológicos do período de duração do experimento em campo.

Dias após aplicação do ChinNPV	Temperatura do ar (°C)			Umidade relativa do ar média (%)	Precipitação pluviométrica acumulada (mm)	Radiação solar global acumulada (MJ.m ⁻²)	Vento	
	Média	Máxima	Mínima				Velocidade média (m.s ⁻¹)	Direção (°)
0	23,7	31,9	16,2	74,9	0,0	28,0	4,2	92,6
1	26,8	34,9	18,4	63,9	0,0	28,2	2,6	54,3
2	24,5	35,2	18,4	71,4	13,1	17,8	3,0	12,9
3	21,1	24,8	18,1	92,3	0,0	13,0	2,4	95,0
4	21,0	25,7	17,7	93,9	4,9	8,6	2,0	76,1
5	17,8	19,4	16,3	99,9	23,2	5,6	1,8	315,4
6	19,7	24,5	15,8	91,9	0,0	16,3	2,2	97,8

Dados da estação meteorológica da Embrapa Soja, Londrina/PR.

O método adotado para a fixação das amostras (fixador à base de glutaraldeído, paraformaldeído e cacodilato de sódio) e posterior análise microscópica garantiu que as células mantivessem sua turgescência. Os poliedros identificados estavam dispersos sobre a superfície formando pequenos agregados ou isoladamente. A maior parte dos poliedros foi observada nas depressões entre as células da epiderme foliar (Figuras 2.7 a 2.9).

Houve dificuldade maior em identificar a presença dos poliedros, quando as amostras correspondentes ao último dia de análise foram comparadas àquelas coletadas logo após a aplicação do vírus (Figuras 2.9 e 2.7, respectivamente), no entanto, nos folíolos de soja, os poliedros foram encontrados em maior quantidade em relação ao algodão (Figura 2.9 D, E e F).

A cera epicuticular apresentou grande variação tanto na presença quanto na forma, quando comparada àquelas das plantas cultivadas em casa de vegetação, principalmente em relação à soja. Em alguns casos, tanto no segundo quanto no sexto dia após a aplicação do vírus, a cera epicuticular pareceu envolver, mesmo que parcialmente, os corpos de oclusão do ChinNPV (Figura 2.8C e F e 2.9F). Não foram observadas diferenças morfológicas dos poliedros mesmo decorridos seis dias da aplicação do vírus sobre a superfície foliar de soja e algodão.

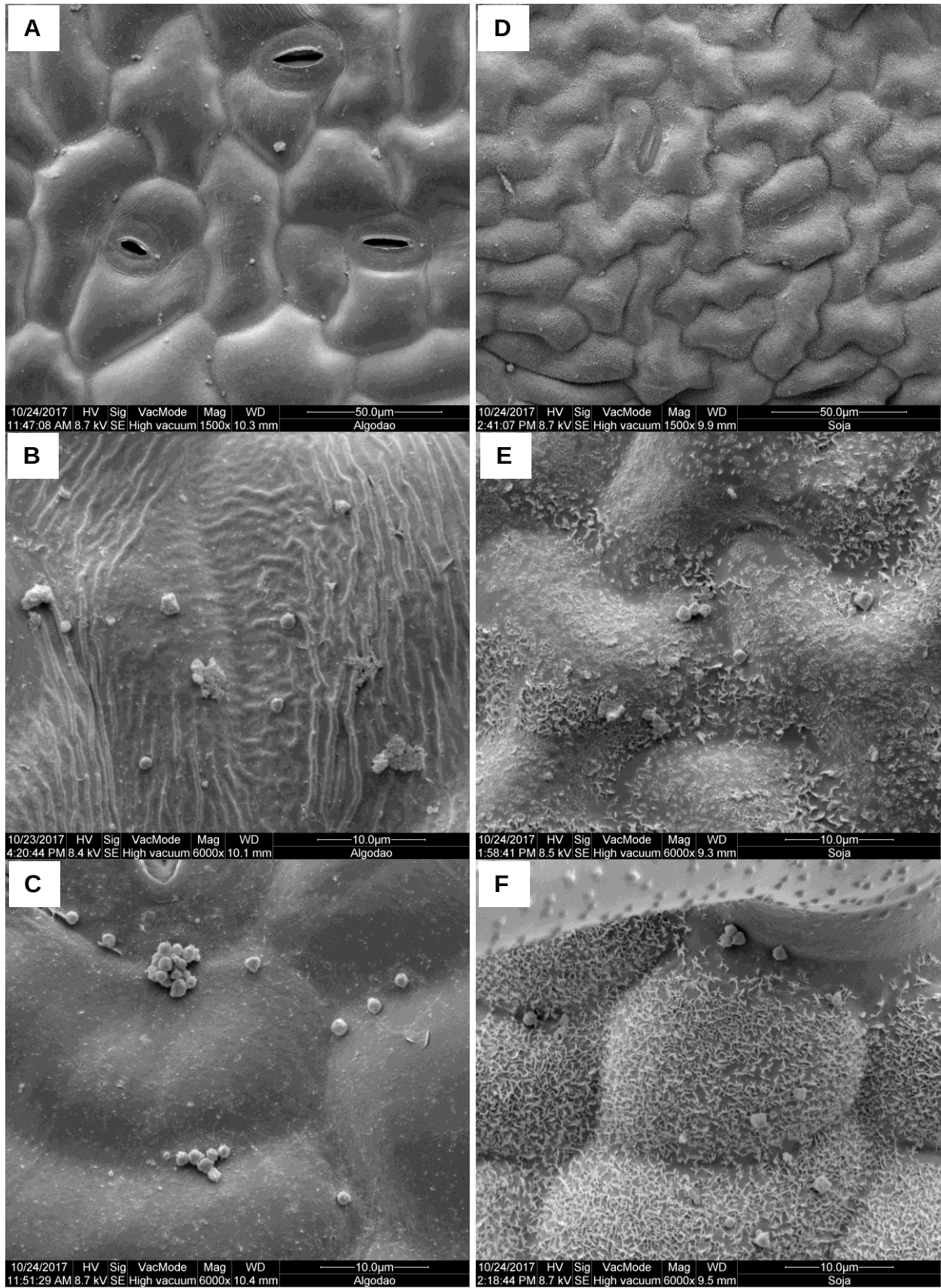


Figura 2.7: Dia 0. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície foliar de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F). Em que A e D = mag. 1500x; B C, E e F = mag. 6000x

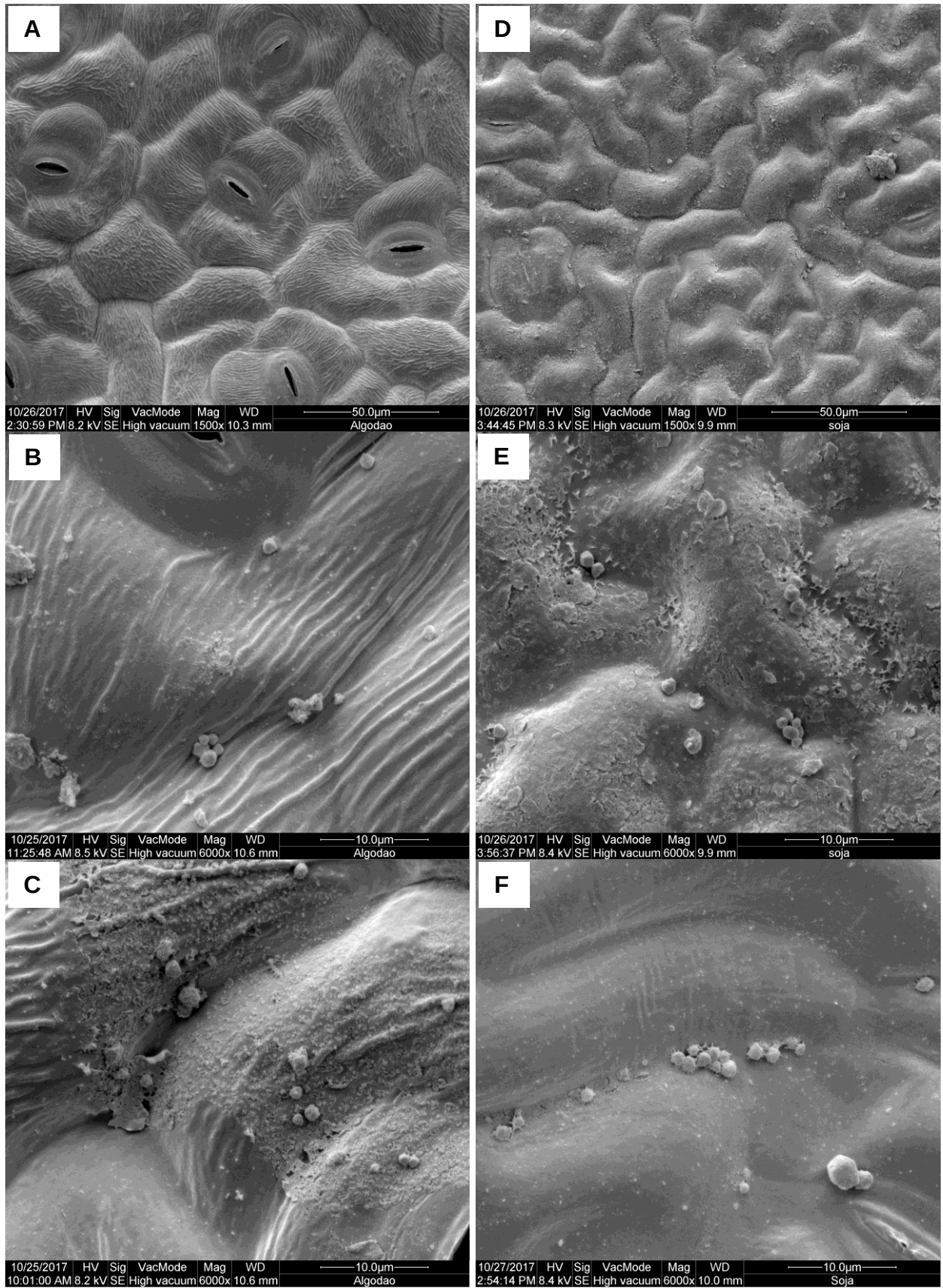


Figura 2.8: Dia 2. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície foliar de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F). Sendo A e D = mag. 1500x; B C, E e F = mag. 6000x.

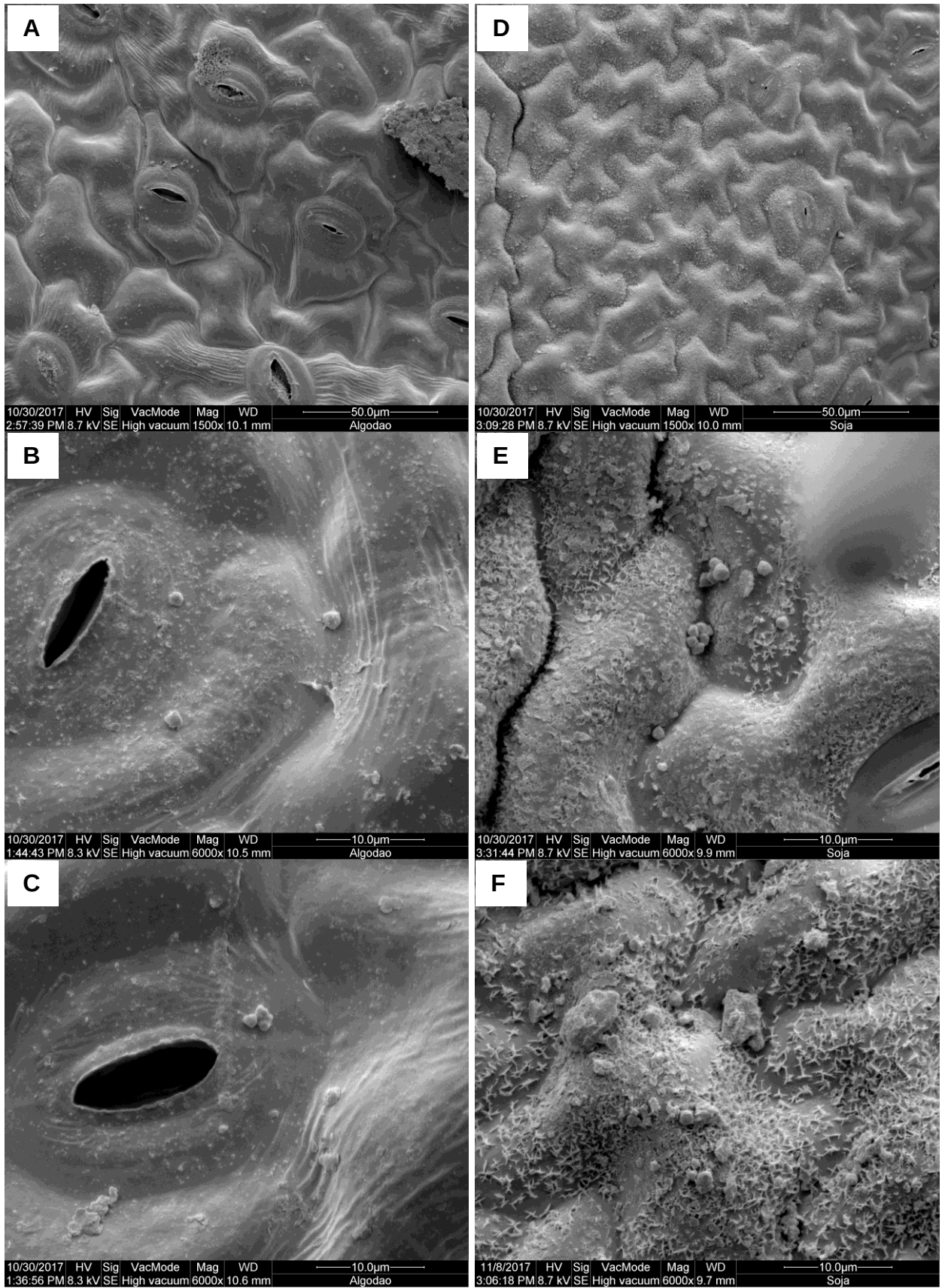


Figura 2.9: Dia 6. Fotomicrografia das partículas virais de ChinNPV sobre a superfície foliar de algodão (A, B e C) e soja (D, E e F) sendo A e D = mag. 1500x; B C, E e F = mag. 6000x

2.3.3 Exposição dos corpos de oclusão sobre a superfície foliar

A concentração letal mediana (CL_{50}) para o teste de “droplet feeding” em lagartas *C. includens* de terceiro ínstar foi de 62 CO.lagarta⁻¹ com intervalo de confiança variando de 34 a 97 corpos de oclusão. Optou-se por utilizar nos bioensaios a concentração de 70 CO.lagarta⁻¹.

Ao avaliar os efeitos dos tratamentos na mortalidade causada pelo ChinNPV, observou-se que as curvas das funções de incidência acumulada apresentaram diferença significativa pelo teste de Gray apenas entre o tratamento composto pelo vírus da solução estoque (T2), que teve maior mortalidade, e o vírus exposto em folha de soja (T4), com o menor registro de lagartas mortas (Tabela 2.6 e Figura 2.10).

Tabela 2.6: Comparação dos tratamentos dois a dois pelo teste não paramétrico de Gray no bioensaio de exposição dos poliedros sobre a superfície foliar de soja e algodão.

Comparação dos tratamentos	Estatística do teste de Gray		Valor <i>p</i>	
	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida	Morte por vírus	Morte por causa desconhecida
T1 versus T2	91,378	4,052	≈ 0,000	0,044**
T1 versus T3	74,996	1,939	≈ 0,000	0,164
T1 versus T4	59,118	4,186	≈ 0,000	0,041**
T2 versus T3	1,551	0,968	0,213	0,325
T2 versus T4	5,778	--	0,016**	≈ 1,000*
T3 versus T4	1,420	1,000	0,233	0,317

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + ChinNPV da solução estoque; T3 = dieta artificial + ChinNPV exposto em folha de algodão; T4 = dieta artificial + ChinNPV exposto em folha de soja. * As curvas não diferem. ** As curvas das funções de incidência acumulada em função do tempo diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste de Gray.

A maior mortalidade causada por vírus ocorreu no sexto e sétimo dia após a inoculação para os três tratamentos avaliados. Já a mortalidade por causa desconhecida foi nula para os tratamentos com o vírus da solução estoque (T2) e o ChinNPV exposto em folha de soja (T4) e atingiu o máximo de 3,3% no tratamento controle (T1) no sétimo dia de avaliação.

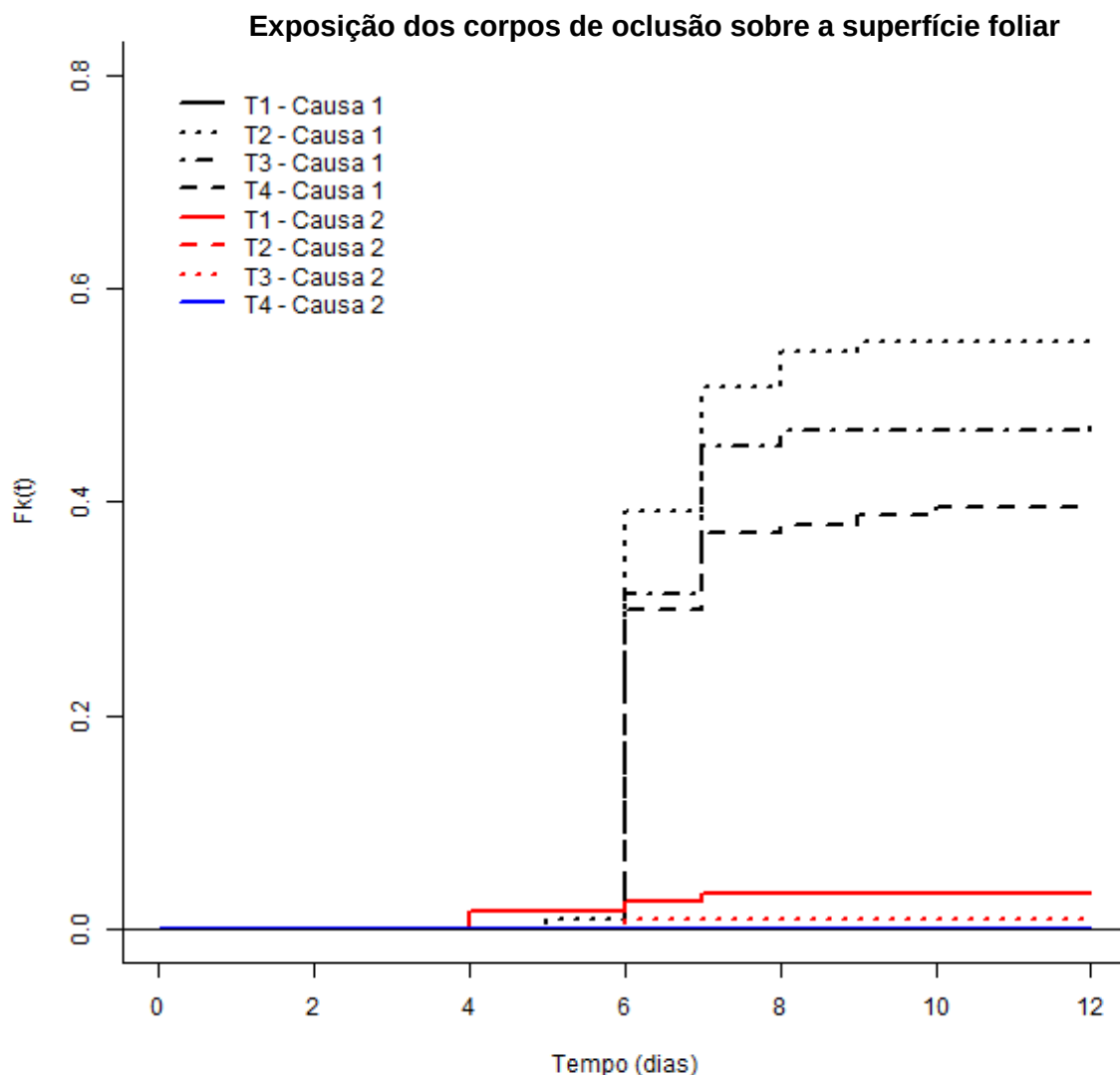


Figura 2.10: Curvas de incidência acumulada em função do tempo $[F_k(t)]$ para as causas 1 (morte por vírus) e 2 (morte por causa desconhecida) no teste de exposição dos poliedros sobre a superfície foliar de soja e algodão. T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + ChinNPV da solução estoque; T3 = dieta artificial + ChinNPV exposto em folha de algodão; T4 = dieta artificial + ChinNPV exposto em folha de soja.

Mais de 60% dos indivíduos sobreviventes ao final do 12º dia após a inoculação com o vírus encontravam-se na fase de pupa, em todos os tratamentos analisados. Além disso, os tratamentos não influenciaram no desenvolvimento dos indivíduos remanescentes quando comparados com o controle negativo composto apenas por dieta (T1) (Tabela 2.7).

Tabela 2.7: Efeito da exposição do ChinNPV sobre a superfície foliar de soja e algodão, na mortalidade e desenvolvimento das lagartas de *Chrysodeixis includens* de 3º ínstar, 12 dias após a inoculação com ChinNPV.

Tratamentos	Mort. 12º dia (%) ± EP		TMM (dias)	Estágio Desenvolvimento (%)		
	Vírus	CD		Lagarta*	pré-pupa**	pupa
T1	0,0 ± 0,0	3,3 ± 1,6		31,9 a	7,8 a	60,3 a
T2	55,0 ± 4,6	0,0 ± 0,0	6,4 a	18,4 a	10 a	71,6 a
T3	48,0 ± 4,6	0,8 ± 0,8	6,5 a	18 a	13 a	69 a
T4	39,5 ± 4,4	0,0 ± 0,0	6,7 a	22,5 a	15,6 a	61,9 a

Nota: T1 = dieta artificial; T2 = dieta artificial + ChinNPV; T3 = dieta artificial + ChinNPV exposto em folha de algodão; T4 = dieta artificial + ChinNPV exposto em folha de soja. CD = causa desconhecida; TMM = Tempo médio de mortalidade. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). * Para atender aos requisitos da análise de variância, aos dados de porcentagem de lagarta aplicou-se a transformação pelo método da raiz quadrada ($x+2$). ** Enquanto que aos dados de porcentagem de pré-pupa a transformação foi logarítmica ($x+2$).

2.3.4 Efeito dos compostos da superfície foliar sobre a fixação dos corpos de oclusão

A área das folhas/folíolos empregados na preparação de cada um dos extratos serviu de base para determinar o volume utilizado para ressuspender cada extrato em seus respectivos solventes, de forma a padronizá-los, antes da utilização no teste de fixação. Os valores de área foliar e volume ressuspensão são apresentados na tabela 2.8.

Tabela 2.8: Área foliar utilizada na extração de compostos da superfície das folhas/folíolos de algodão e soja e volume empregado para ressuspender os extratos após secagem a vácuo.

Cultura	Solvente	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
		Área foliar (cm ²)	Volume ressuspensão (µL)	Área foliar (cm ²)	Volume ressuspensão (µL)	Área foliar (cm ²)	Volume ressuspensão (µL)
Soja	Hexano	61,81	370,86	65,32	391,92	61,68	370,08
	Clorofórmio	69,02	414,12	76,60	459,60	75,23	451,38
	Acetato de etila	78,13	468,78	90,96	545,76	76,41	458,46
	Metanol	65,28	391,68	70,27	421,62	80,80	484,80
	Clorof : metanol	56,20	337,20	81,69	490,14	68,57	411,42
Algodão	Hexano	115,52	693,12	145,58	873,48	157,65	945,90
	Clorofórmio	84,75	508,50	121,08	726,48	130,78	784,68
	Acetato de etila	112,45	674,70	151,27	907,62	137,81	826,86
	Metanol	126,01	756,06	146,73	880,38	132,63	795,78
	Clorof : metanol	97,67	586,02	130,71	784,26	137,80	826,80

A extração dos compostos da superfície foliar de soja e algodão por cinco diferentes solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e a mistura clorofórmio:metanol (3:1)), indicou que o maior número de componentes foi removido pelo clorofórmio, e pela mistura clorofórmio:metanol, como pode ser visualizado na análise por cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 2.11).

A identificação pode ser conferida pelo formato/tamanho das manchas nos cromatogramas e, principalmente, pelos Rf's encontrados. Os perfis cromatográficos obtidos através da extração de compostos das folhas de soja e algodão com clorofórmio e a mistura clorofórmio:metanol, apresentaram duas manchas características para ambas as culturas, indicando a presença de hidrocarbonetos, possivelmente alcanos (Rf 0,83) e ésteres (Rf 0,52), cuja mais aprofundada caracterização requer a aplicação de técnicas analíticas mais elaboradas tal como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

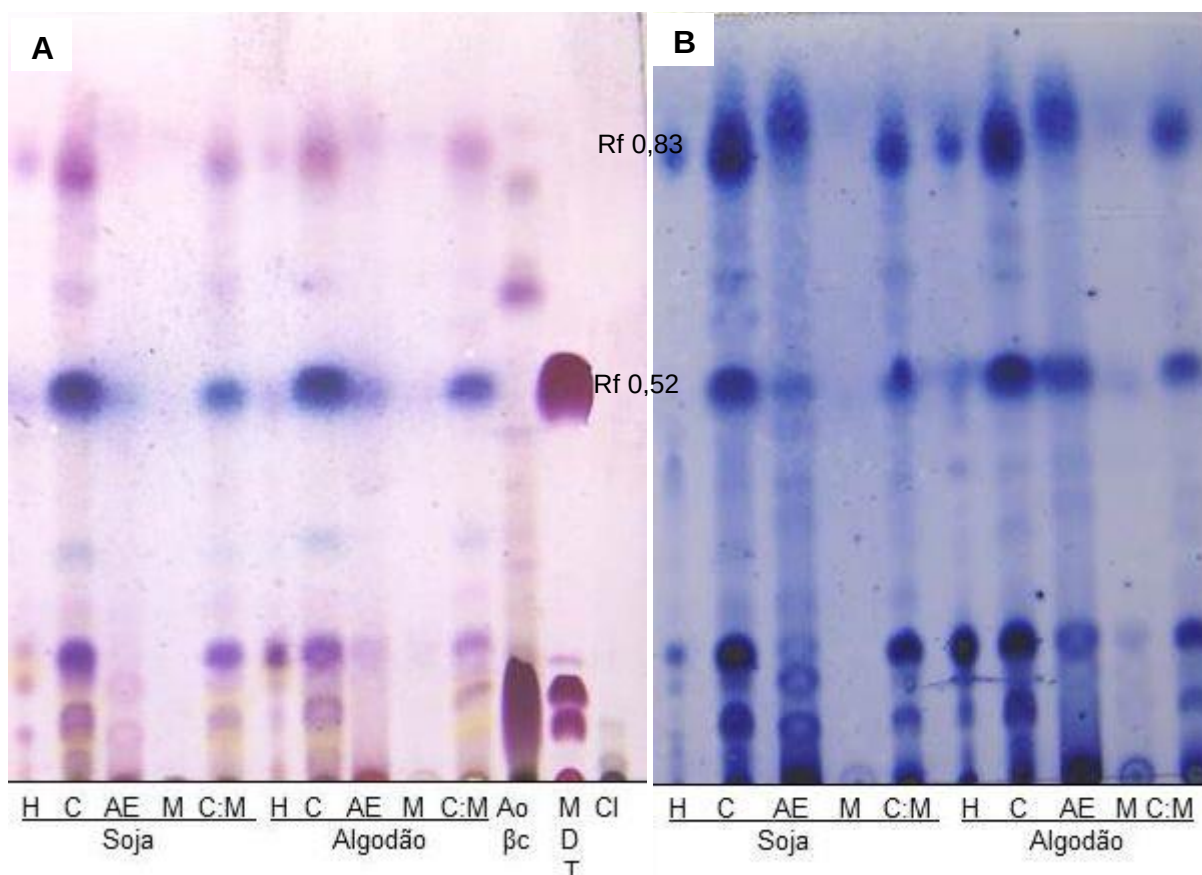


Figura 2.11: Cromatografia em camada delgada dos compostos extraídos da superfície foliar de soja e algodão com cinco diferentes solventes. H = hexano; C = clorofórmio; AE = acetato de etila; M = metanol; C:M = clorofórmio:metanol. A = anisaldeído sulfúrico; B = reagente de Vaughn. Ao = ácido oleico; βc = beta-caroteno; M = monooleína; D = dioleína; T = trioleína; Cl = clorofila.

Analisando a interação culturas vs. solventes, verifica-se que o extrato obtido com clorofórmio apresentou maior fixação de corpos de oclusão quando proveniente das folhas de soja ($6028,5 \text{ CO.mm}^{-2}$), diferindo dos demais solventes nesta cultura (Tabela 2.9). Nos extratos procedentes da superfície foliar do algodão, os únicos solventes que diferiram foi o clorofórmio ($5297,3 \text{ CO.mm}^{-2}$) com a maior retenção de poliedros e a mistura clorofórmio:metanol ($3537,2 \text{ CO.mm}^{-2}$). A testemunha, por sua vez, não apresentou diferença entre os solventes utilizados.

Enquanto o extrato obtido com clorofórmio reteve o maior número de poliedros na cultura da soja em detrimento à testemunha, o extrato da mistura clorofórmio:metanol apresentou uma inversão onde a testemunha fixou mais poliedros em relação à soja. Já o hexano, o acetato de etila e o metanol proporcionaram fixação semelhante entre todas as culturas analisadas.

Tabela 2.9: Fixação média dos corpos de oclusão do ChinNPV a partir de extratos da superfície foliar de soja e algodão provenientes de cinco diferentes solventes.

Culturas*	Solventes*					Média**
	Hexano	Clorofórmio	Acetato de etila	Metanol	Clorof:Metanol	
Testemunha	4516,1Aa	4862,4Ba	4280,7Aa	3926,0Aa	4351,6Aa	4386,5a
Algodão	4071,3Aab	5297,3ABa	4746,3Aab	4065,1Aab	3537,2ABb	4343,4a
Soja	3449,3Ab	6028,5Aa	3737,9Ab	3079,0Ab	2996,8Bb	3853,5b
Média**	4012,2B	5395,7A	4251,2B	3690,0B	3628,9B	

Nota: (*) Médias seguidas pela mesma letra (maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas) não diferem entre si pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. (**) Médias seguidas pela mesma letra (maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas) não diferem entre si pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.

Embora o efeito da interação (solvente vs cultura) seja significativo, não foi suficiente para explicar o efeito entre os tratamentos. Neste caso, foi necessário incluir as médias marginais para melhor compreender o efeito médio de culturas e solventes. Isso se fez necessário, pois a média de fixação de poliedros da testemunha foi maior e igual à média de vírus fixados pelos extratos provenientes da soja e algodão, respectivamente. Isso indica que a remoção dos compostos da folha influenciou a forma como ocorre a fixação do vírus na planta.

A microscopia eletrônica de varredura caracterizou a superfície foliar das folhas de soja e algodão antes e após a extração de componentes com clorofórmio, onde é possível verificar que mesmo tendo removido a maior quantidade de

compostos, como visto na cromatografia em camada delgada, a remoção da cera não foi completa (Figura 2.12).

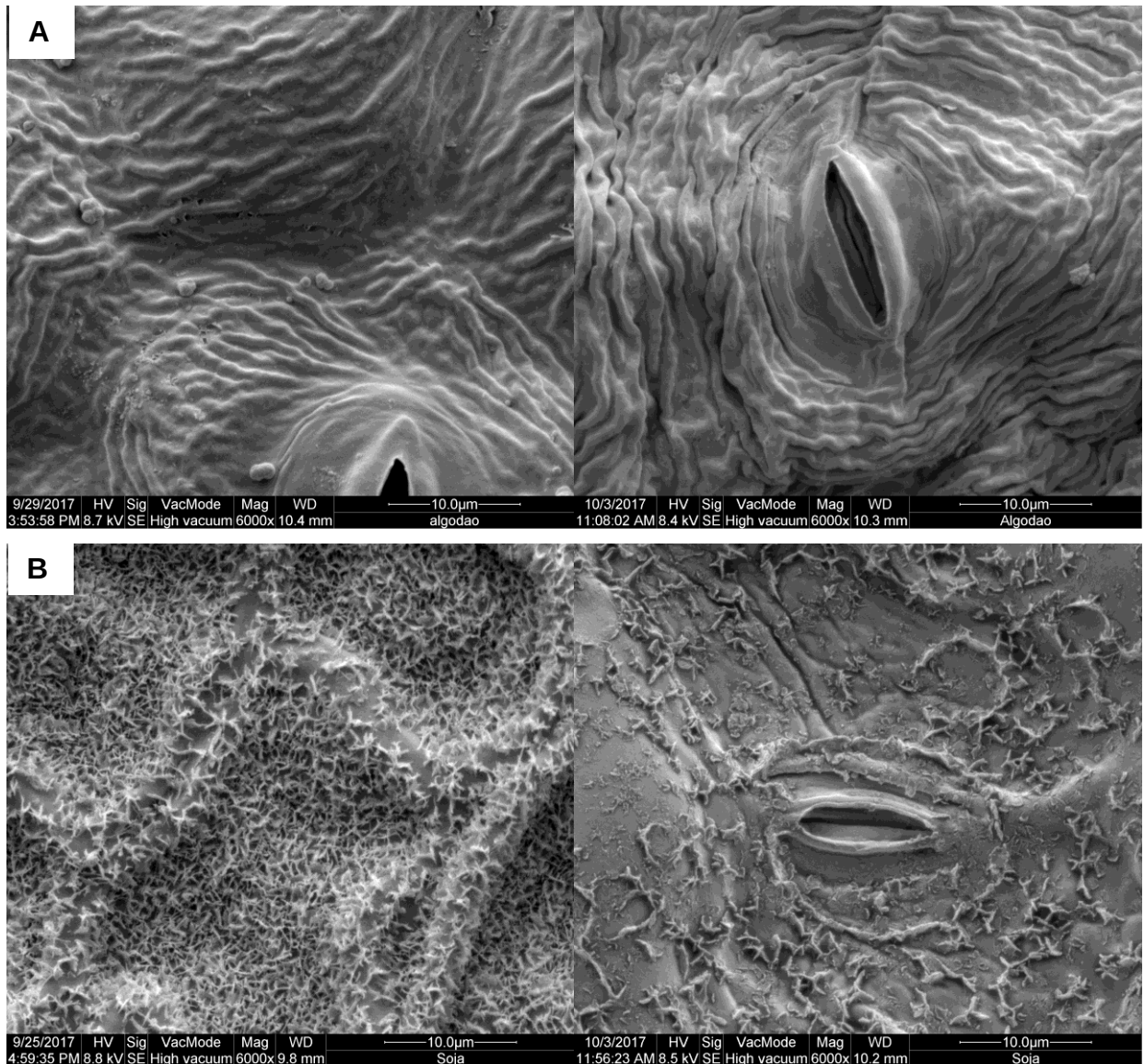


Figura 2.12: Fotomicrografia da superfície de (A) algodão e (B) soja, antes (esquerda) e após (direita) extração da cera com clorofórmio. Magnificação 6000x.

2.4 DISCUSSÃO

Diferentes estudos mostraram evidências de que a planta hospedeira muitas vezes é responsável pela determinação da suscetibilidade de insetos herbívoros ao vírus de poliedrose nuclear, e que cada espécie produz um resultado diferente na suscetibilidade à doença (YOUNG; YEARIAN, 1974, YOUNG; YEARIAN; KIM, 1977, ELLEMAN; ENTWISTLE, 1985, KEATING; YENDOL; SCHULTZ, 1988, ALI et al.,

1998, FARRAR JR; RIDGWAY, 2000, PENG et al., 1999, ALI et al., 2002; RAYMOND et al., 2005, PLYMATE, 2006, STEVENSON; D'CUNHA; GRZYWACZ, 2010).

Quando o ChinNPV foi aplicado sobre plantas de soja e algodão, além de proporcionar mortalidade inferior ao controle positivo (dieta artificial + ChinNPV), houve uma redução significativa da mortalidade a partir do terceiro dia após a aplicação, sendo a estimativa da mortalidade no oitavo dia de apenas 14,4% para o algodão e de 37,1% para a soja. Isso indica que não apenas a atividade viral é comprometida inicialmente pela planta, como o vírus também perde sua eficiência no decorrer do tempo. A redução da persistência viral também foi observada por Young e Yearian (1974), que em condições de campo, relataram pouca atividade do vírus referido como *Heliothis* NPV após 96 h, seja em folha de algodão, tomate ou soja. No entanto, em folha de algodão, a atividade foi perdida principalmente nas primeiras 24 h de estudo. Já Peng e colaboradores (1999) verificaram que o AgNPV perdeu mais de 60% de sua atividade dois dias após ser aplicado sobre a superfície da soja. A inativação mais rápida observada nesses estudos pode estar relacionada à exposição direta da radiação solar durante o dia (YOUNG; YEARIAN, 1974) com possível formação de orvalho durante a noite (YOUNG, YEARIAN; KIM, 1977), o que não ocorreu em casa de vegetação, ou ainda, a diferenças químicas entre cultivares utilizados (KEATING; YENDOL; SCHULTZ, 1988, KEATING; MCCARTHY; YENDOL, 1989).

Embora não determinado neste estudo, a menor mortalidade nos tratamentos com folha logo após a aplicação do vírus (data zero) em relação à data um, pode ter a ver com a liberação de compostos secundários provenientes do simples procedimento da pulverização sobre as plantas. Isso foi verificado por Stevenson, D'cunha e Grzywacz (2010), quando realizaram análise cromatográfica de compostos da superfície foliar antes e após a aplicação de vírus e apenas água sobre plantas de grão de bico e verificaram que a quantidade do isoflavonóide sissotrin aumentava em até três vezes em uma hora após a pulverização, retornando a níveis normais logo em seguida. Esse composto apresentou o aumento mesmo quando apenas água foi aplicada, sugerindo uma defesa da planta em relação ao processo de pulverização e não a presença do vírus especificamente. Ainda assim, esta seria uma evidência de um possível mecanismo de inativação dos vírus de poliedrose nuclear. Da mesma forma, o aumento momentâneo de algum

composto secundário presente nas folhas de algodão e soja pode ter promovido o mesmo efeito verificado por estes autores.

A mortalidade das lagartas quando o vírus foi aplicado sobre a superfície foliar de soja e algodão (bioensaio da persistência) foi menor quando comparado ao controle dieta artificial + ChinNPV, mas quando o vírus foi exposto às folhas por 72 h e depois recuperado, apenas aquele aplicado na superfície da soja apresentou redução da mortalidade quando comparado ao vírus da solução estoque. O vírus exposto ao algodão apresentou mortalidade semelhante aos outros tratamentos. Stevenson, D’cunha e Grzywacz, (2010) avaliando a exposição do HearNPV sobre a superfície foliar de algodão, tomate e grão de bico, verificaram que apenas o vírus em contato com o tecido foliar de grão de bico proporcionou redução na mortalidade de lagartas *H. armigera* e essa interferência ocorreu com apenas 1 h de exposição. Tomate e algodão não afetaram a eficiência do HearNPV mesmo quando permaneceram em contato com a superfície foliar por 24 h. Isso corrobora também com o que foi observado no capítulo 1, onde, pelo menos para o algodão, é válida a informação de que para ter algum efeito, vírus e componente químico que altera a eficiência viral devem ser fornecidos juntos. O mesmo não ocorre com a soja, visto que houve uma redução na morte das lagartas quando o vírus ficou em contato com as folhas durante três dias (72 h), independente se o folíolo foi consumido junto (teste da persistência) ou quando foi removido das folhas e fornecido às lagartas pelo teste do “droplet feeding” (teste da exposição do vírus sobre a superfície foliar). O mecanismo responsável pela redução da atividade do ChinNPV quando este foi exposto à folhas de soja parece ser diferente do apresentado pelo algodão e ainda precisa ser elucidado.

A persistência do vírus sobre a planta não é mediada apenas pela sua possível inativação, mas também pela capacidade do vírus se fixar à superfície e permanecer o maior tempo possível disponível para a lagarta hospedeira. O microrrelevo da superfície foliar e a interação dos corpos de oclusão com a folha também parecem contribuir para a permanência do vírus na planta.

Quando o ChinNPV foi pulverizado sobre a superfície de soja e algodão em experimento realizado a campo, a maior incidência de radiação solar ocorreu nos três primeiros dias após a aplicação e não provocou alterações físicas perceptíveis nos poliedros, mesmo após decorridos seis dias. Este fato corrobora com o identificado por Young, Yearian e Kim (1977), Payne (1982) e Elleman e Entwistle

(1985), que atribuíram a inativação do vírus à luz UV, com possíveis alterações no DNA viral que comprometem sua integridade, mas não sua degradação física ou sua perda. Destaca-se que a máxima diária da radiação global acumulada para o período de avaliação foi de $28,2 \text{ MJ.m}^{-2}$. Este valor é superior à máxima diária registrada para os anos de 2014 e 2015 ($27,8$ e $26,1 \text{ MJ.m}^{-2}$, respectivamente) e próxima a máxima observada para os anos de 2016 e 2017¹ ($29,6$ e $31,3 \text{ MJ.m}^{-2}$, respectivamente) (SIBALDELLI; FARIAS, 2014, 2015, 2016) e indica que mesmo com forte incidência da radiação, os poliedros não foram alterados morfológicamente.

Já o menor número de poliedros observados, pode ser atribuído a diferentes fatores. A expansão foliar média que foi de aproximadamente 16,3% (considerando as duas culturas) do primeiro até o último dia de avaliação e a pluviosidade decorrente do período, que iniciou logo após a coleta de material para a análise correspondente a dois dias após a aplicação e atingiu 41,2 mm até a data da última coleta, volume este que representa quase 30% do esperado para todo o mês de outubro em Londrina-PR (IAPAR, 2017). No entanto, tanto Tuan, Tang e Hoo (1989) quanto Pessoa e colaboradores (2014), não atribuíram uma possível perda de poliedros à ocorrência de chuvas, mesmo quando os volumes chegaram a 121 mm em um período de 30 min. Além disso, a velocidade do vento nos três primeiros dias de avaliação foi superior à maior média anual registrada entre 2014 e 2016 que foi de $2,5 \text{ m.s}^{-1}$ (SIBALDELLI; FARIAS, 2014, 2015, 2016) e pode ter contribuído para a perda de poliedros fixados fracamente às folhas devido ao atrito provocado entre elas.

A interação que ocorre entre os corpos de oclusão e a folha parece ser hidrofóbica, e é maior quanto mais hidrofóbico for o substrato (SMALL; MOORE; ENTWISTLE, 1986). Dessa forma, a quantidade de cera epicuticular presente, bem como sua constituição química, influenciam diretamente a fixação de poliedros. Além disso, a forma como a cera se deposita na superfície foliar pode favorecer a ligação dos poliedros por aumentar a superfície de contato, como no caso da soja. Enquanto na soja a cera forma cristais tridimensionais pronunciados em forma de rosetas, que dificultam o molhamento foliar, a do algodão é composta principalmente por ceras finas e com presença de crostas em alguns pontos e são mais facilmente molhadas

¹ SIBALDELLI, R. N. R. (Embrapa soja – Comunicação pessoal, 2018).

pela água (SCHREIBER; SCHÖNHERR, 2009). Dessa forma, assim como visto nas imagens da pulverização a campo, quanto menor a molhabilidade e maior o ângulo de contato das gotículas de água com a superfície da folha, mais hidrofóbico é o limbo foliar (KOCH; BARTHLOTT, 2009). Esse fato parece realmente ter favorecido a fixação do ChinNPV na superfície foliar de soja, que após seis dias exibiu menores perdas de poliedros nas amostras analisadas. No entanto, a menor espalhabilidade do produto devido à hidrofobicidade não interferiu na distribuição dos poliedros no filoplano, visto que os vírus presentes nos folíolos de soja apresentaram distribuição semelhante àqueles das folhas de algodão. O mesmo não vale para a aplicação em ambiente controlado, onde mesmo que a aplicação tenha sido feita com gotas de diâmetro menor que 10 μm , os poliedros presentes na soja formaram grandes agregados. Dessa forma, outros fatores podem ter contribuído. Uma suposição seria que a formação de grandes agregados bem como a possível fusão observada poderia ser resultado da presença de taninos que tem como característica a precipitação de proteínas, embora a presença de taninos seja identificada principalmente quando ocorre injúria prévia à planta (YOUNG; YANG; FELTON, 1995), fato que não ocorreu neste trabalho. A precipitação de proteínas foi observada quando os corpos poliédricos de oclusão foram tratados com extratos fenólicos da folha de carvalho e formaram grandes agregados, mas estes não foram capazes de influenciar na mortalidade das lagartas de *Lymantria dispar* (KEATING; HUNTER; SCHULTZ, 1990). Outros estudos deverão ser realizados para verificar essa possibilidade.

A fixação de poliedros também pode estar ligada ao pH da superfície foliar. Segundo Small, Moore e Entwistle (1986) as interações hidrofóbicas da superfície foliar com os poliedros são inversamente relacionadas ao pH. Quanto maior o pH da superfície foliar, menos os poliedros podem se ligar a elas. Isso pode ter ocorrido com a folha de algodão, cujo pH é relativamente superior ao da soja (YOUNG; YEARIAN, 1974). Essa diferença pode ter contribuído para a menor observação dos poliedros em folhas de algodão em relação às de soja no sexto dia após a aplicação do vírus em campo. Entretanto, Young, Yearian e Kim (1977), verificaram que um aumento no pH e na condutividade elétrica de folhas de algodão, que poderia justificar uma possível perda de poliedros, ocorreu em condições de seca, diferente do observado neste trabalho.

Se as interações hidrofóbicas são as grandes responsáveis pela fixação dos poliedros na folha (SMALL; MOORE; ENTWISTLE, 1986), quando a cera epicuticular foi removida, essa interação não ocorreu da mesma forma, pois o solvente responsável pela extração (testemunha) apresentou fixação igual ao extrato proveniente do algodão e maior que aquele oriundo da soja.

2.5 CONCLUSÕES

A mortalidade das lagartas pelo ChinNPV, observada neste trabalho, foi influenciada negativamente quando este foi aplicado na superfície foliar de soja e algodão.

A persistência do ChinNPV foi afetada pelas plantas de algodão e soja, resultado evidente a partir do terceiro dia após a aplicação. A maior redução de infecção foi observada quando o vírus foi aplicado sobre o algodão.

A nebulização dos poliedros sobre a superfície foliar formou grandes agregados na folha de soja e apresentou melhor distribuição sobre a folha de algodão. Em alguns casos, os poliedros parecem apresentar possível fusão entre eles.

No ambiente de campo, onde o vírus foi pulverizado, a distribuição foi semelhante entre as culturas e, mesmo com alta incidência de radiação solar, os poliedros mantiveram sua estrutura aparentemente intacta mesmo após seis dias de exposição às folhas.

O ChinNPV exposto e recuperado da superfície foliar de soja após 72 h causou redução na mortalidade de lagartas *C. includens*. O mesmo não ocorreu com o vírus exposto ao algodão.

Quando compostos da superfície foliar de soja e algodão foram removidos por diferentes solventes, a interação entre eles e os poliedros foi comprometida.

CONCLUSÃO GERAL

Dadas as condições deste trabalho, a mortalidade de lagartas *C. includens* pelo ChinNPV foi influenciada negativamente pelo tecido foliar tanto de algodão quanto de soja. Enquanto o efeito na mortalidade de lagartas alimentadas com o algodão é observado quando este é fornecido juntamente com o vírus, na soja, o tempo em que o vírus permanece em contato com as folhas parece ser um importante fator na redução da atividade viral. Isso seria um indicativo de que soja e algodão apresentam diferentes mecanismos na inativação do ChinNPV. Mesmo com as restrições impostas pelas plantas à atividade do baculovírus, eles são agentes patogênicos de importantes pragas caracterizadas pela capacidade de desenvolver resistência à produtos químicos. Dessa forma, prospectar o uso de táticas com formulações, doses e o momento da aplicação do baculovírus, pode driblar esta limitação imposta pela planta hospedeira e compensar a perda de atividade provocada pelos tecidos foliares de algodão e soja.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, T. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; CRAVEIRO, S. R.; CUNHA, F.; FONSECA, I. C. B.; MOSCARDI, F.; MARIA ELITA B. CASTRO, M. E. B. Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 105 p. 98-104, 2010.
- ALFORD, A.R.; HAMMOND JUNIOR, A.M. Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with loop lure baited traps. **Journal of Economic Entomology**. v. 75, p. 647-650, 1982.
- ALI, M. I.; FELTON, G. W.; MEADE, T.; YOUNG, S. Y. Influence of interspecific and intraspecific host plant variation on the susceptibility of Heliothines to a baculovirus. **Biological Control**. v. 12, p. 42-49, 1998.
- ALI, M. I.; YOUNG, S. Y.; FELTON, G. W.; MCNEW, R. W. Influence of the host plant on occluded virus production and lethal infectivity of a baculovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 81, p. 158-165, 2002.
- ANDRADE, K.; BUENO, A. F.; SILVA, D. M.; STECCA, C. S.; PASINI, A.; OLIVEIRA, M. C. N. Bioecological characteristics of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts. **Austral Entomology**. v. 55, p. 449-454, 2016.
- BALDIN, E. L. L.; LOURENÇÃO, A. L.; SCHLICK-SOUZA, E. C. Outbreaks of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in common bean and castor bean in São Paulo State, Brazil. **Bragantia**. v. 73, n. 4, 2014.
- BINDER, B. F.; BOWERS, W. S. Precocene II-induced changes in the anatomy of midgut goblet cells of last-instar larvae of *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal Insect Morphology and Embriology**, v. 3, p. 127-134, 1994.
- BOX, G. E. P.; COX, D. R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 26, p. 211-252, 1964.
- BROOKS, M. E.; GORDON, K. H.; DORRIAN, S. J.; HINES, E. R.; HANZLIK, T. N. Infection of its lepidopteran host by the *Helicoverpa armigera* stunt virus (Tetraviridae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 80, p. 97-111, 2002.
- BUENO, R. C. O. F., PARRA, J. R. P., BUENO, A. F., HADDAD, M. L. Desempenho de tricogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 38, n. 3, p. 389-394, 2009.
- BULLOCK, H. R. Persistence of Heliothis nuclear-polyhedrosis virus on cotton foliage. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 9, n. 3, p. 434-436, 1967.

BURLEIGH, J. G. Population dynamics and biotic controls of the soybean looper in Louisiana. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 3, p. 290-294, 1972.

BURR, I. W.; FOSTER, L. A. **A test for equality of variances**. Mimeograph series n. 282. University of Purdue, West Lafayette, 1972, 26 p.

BUSOLI, A. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; FRAGA, D. F.; SOUZA, L. A.; FUNICHELLO, M.; NAIS, J.; SILVA, E. A. Atualidades no MIP algodão no cerrado brasileiro. In: BUSOLI, A. C.; FRAGA, D. F.; SANTOS, L. C.; ALENCAR, J. R. C. C.; GRIGOLLI, J. F. J.; JANINI, J. C.; SOUZA, L. A.; VIANA, M. V.; FUNICHELLO, M. (Eds.). **Tópicos em Entomologia Agrícola IV**. Jaboticabal: Multipress, 2011, p. 117-138.

CADMAN, C. H. Inhibition of plant virus infection by tannins. In PRIDHAM, J. B. **Phenolics in Plant Health and Disease**. Pergamon: New York, 1960, p. 101-105.

CAMPOS, H. de. **Estatística experimental não-paramétrica**. 3.ed. Piracicaba: Esalq, 1979, 343 p.

CARMES, E. R. **Análise de dados de sobrevivência na presença de riscos competitivos**. 2015. 45 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Estatística) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Curitiba, PR, 2015.

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**. v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.

CHAPMAN, R. F. **The Insects: structure and function**. 4. ed. Cambridge: Havard University Press, 1998.

CHIANG, A. S.; YEN, D. F.; PENG, W. K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 47, p. 333-339, 1986.

CIURZYŃSKA, A.; LENART, A. Freeze-Drying – Application in food processing and biotechnology – A review. **Polish Journal of Food And Nutrition Sciences**. v. 61, n. 3, p. 165-171, 2011.

COLOSIMO, E. A.; GIOLO, S. R. **Análise de Sobrevivência Aplicada**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006, 392 p.

CORY, J. S.; HOOVER, K. Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. **TRENDS in ecology and evolution**. v. 21, n. 5, p. 278-286, 2006.

COULIBALY, F.; CHIU, E.; IKEDA, K.; GUTMANN, S.; HAEBEL, P. W.; BRIESE, C. S.; MORI, H.; METCALF, P. The molecular organization of cypovirus polyhedral. **Nature**. v. 446, p. 97-101, 2007.

CRAVEIRO, S. R.; ALEXANDRE, T. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; MOSCARDI, F.; CASTRO, M. E. B. **Caracterização de isolados virais patogênicos à lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*)**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 230, ISSN 01020110).

CRUZ, N. A. da. **Desenvolvimento biológico e alterações morfofisiológicas no intestino médio da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis* resistentes ao baculovírus AgMNPV alimentadas com genótipos de soja**. 2014. 142 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Londrina, PR, 2014.

D'AMICO, V.; SLAVICEK, J. Interactions between nucleopolyhedroviruses and polydnaviruses in larval lepidoptera. In: ADOGA, M. P. (Ed.). **Molecular Virology**. Croatia:INTECH. 2012, p. 125-146.

EISEMANN, C. H.; BINNINGTON, K. C. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. **International Journal for Parasitology**. v. 24, n. 1, p. 15-26, 1994.

ELLEMAN, C. J.; ENTWISTLE, P. F. Inactivation of a nuclear polyhedrosis virus on cotton by the substances produced by the cotton leaf surface glands. **Anais of Applied Biology**. v. 106, n. 1, p. 83-92, 1985

FARRAR JR, R. R.; RIDGWAY, R. L. Host plant effects on the activity of selected nuclear polyhedrosis viruses against the corn earworm and beet armyworm (Lepidoptera:Noctuide). **Environmental Entomology**. v. 29, n. 1, p. 108-115, 2000.

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

FELTON, G. W.; DUFFEY, S. S.; VAIL, P. V.; KAYA, H. K.; MANNING, J. Interaction of nuclear polyhedrosis virus with catechols: Potential incompatibility for host-plant resistance against noctuid larvae. **Journal of Chemical Ecology**. v. 13, p. 947-957, 1987.

FELTON, G. W.; DUFFEY, S. S. Inactivation of a baculovirus by quinones formed in insect-damaged plant tissue. **Journal of Chemical Ecology** v. 16, p. 1211-1236, 1990.

FINE, J. P., GRAY, R. J. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. **Journal of the American Statistical Association**. v. 94, n. 446, p. 496-509, 1999.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3.ed.. Cambridge: Cambridge University Press, 1971, 333 p.

FUXA, J. R. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 103, p. 27-43, 2004.

GRAY, R. J. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. **Annals of Statistics**, San Francisco, v. 16, p. 1141-1154, 1988.

GRAY, R. J. **cmprsk: Subdistribution analysis of competing risks**. R package version 2.2-7. 2014. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**. v. 69, n. 4, p. 488-497, 1976.

GRZYWACZ, D. Basic and applied research: Baculovirus. In: LACEY, L. A. (Ed.) **Microbial control of insect and mite pests**: From theory to practice. 1. ed. Yakima: Academic Press, 2016, p. 27-46.

HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. **Viruses**. v. 7, p. 2230-2267, 2015.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Tannins and Lignins. In: ROSENTHAL G. A.; BERENBAUM, M. R. (Eds.) **Herbivores**: Their interactions with secondary plant metabolites. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1992, p. 355-388.

HARPER, M. S.; GRANADOS, R. R. Peritrophic membrane structure and formation of larval *Trichoplusia nii* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. **Tissue and Cell**. v. 31, n. 2, p. 202-211, 1999.

HARRISON, R.; HOOVER, K. Baculoviruses and other occluded insect viruses. In: VEGA, F.; KAYA, H. (Eds.). **Insect Pathology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012, p. 73-131.

HERNIOU, E. A.; ARIF, B. M.; BECNEL, J. J.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; HARRISON, R.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; VLAK, J.; M. Baculoviridae. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Eds.). **Virus Taxonomy**. Surrey: Elsevier Academic Press, 2012, p. 163-173.

HERZOG, D. C. Sampling soybean looper on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. C. (Eds.). **Sampling Methods in Soybean Entomology**. New York: Springer, 1980, p. 141-168.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Londrina: EMPRAPA-CNPSO, 1985, 23 p.

HOOVER, K.; KISHIDA, K. T.; DIGIORGIO, L. A.; WORKMAN, J.; ALANIZ, S. A.; HAMMOCK, B. D.; DUFFEY, S. S. Inhibition of baculoviral disease by plant-mediated peroxidase activity and free radical generation. **Journal of Chemical Ecology**. v. 24, p. 1949-2001, 1998.

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**. v. 46, p. 999-1007, 2000.

HUGHES, P. R.; WOOD H. A. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 37, p. 154-159, 1981.

IAPAR. Instituto Agronômico do Paraná. **Cartas climáticas do Paraná**: Precipitação – outubro. 2017 Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=591>>. Acesso em: 15 de dez. 2017.

IGNOFFO, C. M. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. **Florida Entomologist**. v. 75, n. 4, p. 516-525, 1992.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, S. M.; VLAK, J. M. On de classification and nomenclature os baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**. v. 151, p. 1257-1266, 2006.

KATSUBE, T.; TSURUNAGA, Y.; SUGIYAMA, M.; FURUNO, T.; YAMASAKI, Y. Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leave. **Food Chemistry**. v. 113, n. 4, p. 964-969, 2009.

KEATING, S. T.; HUNTER, M. D.; SCHULTZ, J. C. Leaf phenolic inhibition of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Chemical Ecology**. v. 16, n. 5, p. 1445-1457, 1990.

KEATING, S. T.; MCCARTHY, W. J.; YENDOL, W. G. Gypsy moth (*Lymantria dispar*) larval susceptibility to a baculovirus affected by selected nutrientes, hydrogen ions (pH), and plant allelochemicals in artificial diets. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 54, p. 165-174, 1989.

KEATING, S. T.; YENDOL, W. G.; SCHULTZ, J. C. Relationship between susceptibility of gypsy moth larvae (Lepidoptera: Lymantriidae) to a baculovirus and host plant foliage constituents. **Environmental Entomology**. v. 17, n. 6, p. 952-958, 1988.

KOCH, B. K.; BARTHLOTT, W. Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**. v. 367, p. 1487-1509, 2009

KUNIMI, Y.; FUXA, J. R. Volumes ingested by four species of noctuids with reference to peroral droplet bioassay of baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 68, p. 310-311, 1996.

LACEY, L. A. Entomopathogens used as microbial control agents. In: _____. (Ed.) **Microbial control of insect and mite pests**: From theory to practice. 1. ed. Yakima: Academic Press, 2016, p. 03-12.

LeOra Software (2006) **POLO-Plus** 1.0 Probit and Logit Analysis. LeOra Software, Petaluma.

LEVY, S. M. **Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovírus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio**. 2005. 172 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2005.

LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; GREGÓRIO, E. A.; ARREBOLA, N. R.; TOLEDO, L. A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Brazilian Journal of Biology**. v. 64, n. 3b, p. 1-6, 2004.

LÜTHY, P.; HOFMANN, C.; JAQUET, F. Inactivation of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by tannin. **FEMS Microbiology Letters**. v. 28, n. 1, p. 31-33, 1985.

MCLEOD, P. J.; YEARIAN, W. C.; YOUNG, S. Y. Inactivation of Baculovirus *Heliothis* by ultraviolet irradiation, dew, and temperature. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 30, n. 2, p. 237-241, 1977.

MELO, E. C.; RADÜNZ, L. L.; MELO, R. C. A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – Revisão. **Engenharia na Agricultura**. v. 12, n. 4, p. 307-315, 2004.

MENDONÇA, G. G. **Algumas características da superfície foliar de diversas plantas daninhas monocotiledôneas**. 2000. 89 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MATAS, J.A.; HEREDIA, A. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**. v. 22, n. 2, p. 203-210, 2004.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual review of entomology**. v. 44, n. 1, p. 257-289, 1999.

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

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Ártropodes-praga**. 1ed. Londrina:Embrapa, 2012, p. 213-334.

MOSCARDI, M. L. **Passagens sequenciais do múltiplo nucleopoliedrovírus de *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae): Mortalidade e aspectos morfológicos do intestino médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2014. 49 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Londrina, PR, 2014.

MUDGAL, S.; DE TONI, A.; TOSTIVINT, C.; HOKKANEN, H.; CHANDLER, D. Scientific support, literature review and data collection and analysis for risk assessment on microbial organisms used as active substance in plant protection products – Lot 1 Environmental Risk Characterization. **EFSA Supporting Publications**. EN-518. p. 149, 2013.

NIREESHA, G. R.; DIVYA, L.; SOWMYA, C.; VENKATESHAN, N.; NIRANJAN BABU, M.; LAVAKUMAR, V. Lyophilization/Freeze Drying - An Review. **International journal of novel trends in pharmaceutical sciences**. v. 3, n. 4 p. 87-98, 2013.

PALMA, J.; MAEBE, K.; GUEDES, J. V. C.; SMAGGHE, G. Molecular variability and genetic structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an important soybean defoliator in Brazil. **PLoS ONE**. v. 10, n. 3, 2015.

PARENTE, R. C. P. **Aspectos da análise de resíduos**. 1984. 139 f. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 1984.

PAYNE, C. C. Insect viruses as control agents. **Parasitology**. v. 84, p. 35-77, 1982.

PENG, F.; FUXA, J. R.; RICHTER, A. R.; JOHNSON, S. J. Effects of heat-sensitive agents, soil type, moisture, and leaf surface on persistence of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Environmental Entomology**. v. 28, n. 2, p. 330-338, 1999.

PESSOA, V.; CUNHA, F.; BUENO, A. F.; BORTOLOTTI, O. C.; MONTEIRO, T.; RAMOS, V. M. Persistência do baculovírus anticarsia após diferentes regimes pluviométricos. **Ciência Rural**. v. 44, n. 1, p. 5-10, 2014.

PINTILIE, M. **Competing Risks: A Practical Perspective**. Chichester: Wiley, 2006, 226 p.

PLYMATE, R. **Plant-mediated effects on insect-virus interactions**. 2006. 208 f. Thesis (Doctor of Philosophy) - The Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences, State College, PA, 2006.

PLYMATE, 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**. v. 54, p. 737-749, 2008.

QUATTLEBAUM, E. C.; CARNER, G. R. A technique for preparing *Beauveria* spp. for scanning electron microscopy. **Canadian Journal of Botany**. v. 58, n. 15, p. 1700-1703, 1980.

R CORE TEAM (2014). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>

RAYMOND, B.; HARTLEY, S. E.; CORY, J. S.; HAILS, R. S.A. The role of food plant and pathogen-induced behaviour in the persistence of a nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 88, p. 49-57, 2005.

RAYMOND, B.; VANBERGEN, A.; PEARCE, I.; HARTLEY, S. E.; CORY, J. S.; HAILS, R. S. Host plant species can influence the fitness of herbivore pathogens: the winter moth and its nucleopolyhedrovirus. **Plant Animal Interactions**. v. 131. p. 533-541, 2002.

RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Morphological basis of digestion in insects. **Acta Microscopia**. v. 6, p. 71-73, 1997.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus molecular biology**: 3. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>>. Acesso em: 01 out. 2017.

ROHRMANN, G. F. Polyhedrin structure. **Journal of General Virology**. v. 67, p. 1499-1513, 1986.

ROSHANAK, S.; RAHIMMALEK, M.; GOLI, S. A. H. Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. **Journal of Food Science and Technology**. v. 53, n. 1, p. 721-729, 2016.

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

SANTOS, S. R.; SPECHT, A.; CARNEIRO, E.; PAULA-MORAES, S. V.; CASAGRANDE, M. M. Interseasonal variation of *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Brazilian Savanna. **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 61 n. 4, 2017.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's Guide. Version 9.2. Cary: SAS Institute, 2009. 7869 p.

SCHREIBER, L.; SCHÖNHERR, J. **Water and solute permeability of plant cuticles**. Bonn: Springer, 2009, 299 p.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SIBALDELLI, R. N. R.; FARIAS, J. R. B. **Boletim agrometeorológico da Embrapa soja, Londrina, PR – 2014**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1012316>>. Acesso em: 03 de jan. 2018.

SIBALDELLI, R. N. R.; FARIAS, J. R. B. **Boletim agrometeorológico da Embrapa soja, Londrina, PR – 2015**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1044384>>. Acesso em: 03 de jan. 2018.

SIBALDELLI, R. N. R.; FARIAS, J. R. B. **Boletim agrometeorológico da Embrapa soja, Londrina, PR – 2016**. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1067152>>. Acesso em: 03 de jan. 2018.

SLACK, J.; ARIF, B. M. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. In: MARAMOROSCH, K.; SHATKIN, A. (Eds.). **Advances in Virus Research**. Ontario: Elsevier Academic Press. 2007, v. 69, p. 99-165.

SMALL, D. A.; MOORE, N. F.; ENTWISTLE, P. F. Hydrophobic interactions involved in attachment of a baculovirus to hydrophobic surfaces. **Applied and environmental microbiology**. v. 52, n. 1, p. 220-223, 1986.

SMIRNOFF, W. A. The effect of sunlight on the nuclear-polyhedrosis virus of *Neodiprion swainei* with measurement of the solar energy received. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 19, n. 2, p. 179-188, 1972.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Implications of plant hosts and insect nutrition on entomopathogenic diseases. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Insect**

bioecology and nutrition for integrated pest management. Boca Raton: CRC Press, 2012, p. 195-209.

SOSA-GÓMEZ, D. R., LASTRA, C. C. L.; HUMBER, R. A. An Overview of Arthropod-Associated Fungi from Argentina and Brazil. **Mycopathologia**. v. 170, n. 1, p. 61-76, 2010.

SOSA-GOMEZ, D. R.; BOUCIAS, D. G.; NATION, J. L. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 69, p. 31-39, 1997.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MOSCARDI, F.; SANTOS, B.; ALVEZ, L. F. A.; ALVES, S. B. Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios**. Piracicaba:FEALQ, 2008, p. 49-68.

SOSA-GÓMEZ, D.R., DELPIN, K.E., MOSCARDI, F., NOZAKI, M.H., The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**. v. 32, p. 287-291. 2003.

SOUSA, M. E. C.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A.; SIQUEIRA, H. A.; SANTOS, F. A.; ALVES, L. C. Ultrastructure of the *Alabama argilacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) midgut. **Micron**. v. 40, p. 743-749, 2009.

SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 59, p. 343-345, 2015.

SPENCE, K. D.; KAWATA, M. Y. Permeability characteristics of the peritrophic membranes of *Manduca sexta*. **Journal of Insect Physiology**. V. 39, p. 785-790, 1993.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and Procedures of Statistics with Special Reference to the Biological Sciences**. McGraw Hill: New York, 1960, 481p.

STEVENSON, P. C.; D'CUNHA, R. F.; GRZYWACZ, D. Inactivation of Baculovirus by isoflavonoids on chickpea (*Cicer arietinum*) leaf surfaces reduce the efficacy of Nucleopolyhedrovirus against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Chemical Ecology**. v. 36, p. 227-235, 2010.

SWAIN, T. Tannins and lignans. In: ROSENTHAL G. A.; JANZEN, D. H. (Ed.). **Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites**. New York: Academic Press, 1979, p. 657-682.

TUAN, S. J.; TANG, L. C.; HOO, R. F. Factors affecting pathogenicity of NPV preparations to the corn earworm, *Heliothis armigera*. **Entomophaga**. v. 34, n.4, p. 541-549, 1989.

TUKEY, J.W. One degree of freedom for non-additivity. **Biometrics**, v.5, p.232-242, 1949.

VAIL, P. V.; HOSTETTER, D. L, HOFFMANN, D, F. Development of the multi-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses (MNPVs) infectious to loopers (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) as microbial control agents. **Integrated Pest Management Reviews**. v. 4, p. 231-257, 1999.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2.ed. Berlin: Springer, 1996, 384 p.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94, n. 13, p. 6977-6982, 1997.

YOUNG, S. Y.; YANG, J. G.; FELTON, G. W. Inhibitory effects of dietary tannins on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus to *Helicoverpa zea* (Noctuidae: Lepidoptera). **Biological Control**, v. 5, p. 145-150, 1995.

YOUNG, S. Y.; YEARIAN, W. C. KIM, K. S. Effect of dew from cotton and soybean foliage on activity of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 29, p. 105-111, 1977.

YOUNG, S. Y.; YEARIAN, W. C. Persistence of *Heliothis* NPV on foliage of cotton, soybean, and tomato. **Environmental Entomology**. v. 3, n. 2, p. 253-255, 1974.