

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO TaV (THYRINTEINA ARNOBIA VÍRUS) NO
CONTROLE DE *Thyrnteina arnobia* (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)**

CASSIANO ORLATO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Março - 2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO TaV (THYRINTEINA ARNOBIA VÍRUS) NO
CONTROLE DE *Thyrintheina arnobia* (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)**

CASSIANO ORLATO

Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP

Março - 2002

A meu pai,

Armelindo Orlato.

A minha mãe,

Sônia Maria Picolo Orlato.

OFEREÇO

**A DEUS,
AGRADEÇO**

A minha avó,

Helena Corrêa Picolo.

Em memória de meus avós,

Eden Picolo,

João Orlato,

Maria Aparecida Bagnara.

DEDICO

“As Multidões Fervilhantes”

“O organismo dos insetos, sob quaisquer critérios, deve ser reconhecido como a mais perfeita de todas as soluções encontradas para o problema da sobrevivência na Terra. Os insetos proliferam tanto nos desertos como nas florestas; vivem perfeitamente nadando sob a água ou arrastando-se na escuridão perpétua de cavernas profundas. Voam acima dos picos do Himalaia e estão em número surpreendente no gelo eterno das calotas polares. O número de insetos existente no mundo está muito além de qualquer possível cômputo. Alguém tentou calcular e concluiu que possivelmente existe a cada momento mais de um quatrilhão. Ou seja, para cada ser humano vivo existe cerca de 1 milhão de insetos, cujo peso reunido ultrapassa doze vezes o de um homem”.

David Attenborough “*A Vida na Terra*” (1979)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken (FCA / UNESP – Botucatu), pela amizade, apoio e orientação na condução desta pesquisa.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida durante a realização do curso.

Aos professores do curso de pós-graduação em Proteção de Plantas (FCA / UNESP – Botucatu), pelos ensinamentos transmitidos, sugestões e atenção dispensada.

Aos funcionários do Depto. de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária (FCA / UNESP - Botucatu), especialmente a Nivaldo L. da Costa, Gislaine Braga, Domingos Paulossi e Vera Lúcia S. Mendes, pelas informações e apoio prestados.

Ao Setor de Supervisão da Fazenda Experimental Lageado (FCA / UNESP - Botucatu) e aos funcionários que trabalharam no preparo e manutenção da área de *E. grandis*, onde foram conduzidos os experimentos de campo.

Aos Profs. Drs. Silvio J. Bicudo e Edivaldo D. Velini (FCA / UNESP), pela cessão dos dados meteorológicos e pelas análises no espectrofotômetro, respectivamente.

Ao Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende (ESALQ / USP - Piracicaba) e a seu orientado, Quelmo Silva de Novaes, pelo apoio prestado no processo de purificação do vírus (TaV).

A minha namorada, Elaine Cristina C. Balestrin, pelas fotos dos experimentos de campo, e por tudo mais.

Aos meus pais, a minha avó e a meu irmão, Daniel Orlato, por toda ajuda, e por eles existirem.

Aos amigos das repúblicas “Masmorra” e “Chácara da Suzi”, em Botucatu – SP, pelos bons momentos vividos, especialmente a João Paulo Damiano, pela ajuda na elaboração do “summary”.

Aos colegas da graduação e da pós-graduação, e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	01
SUMMARY	03
1. INTRODUÇÃO	05
2. REVISÃO DE LITERATURA	08
2.1. <i>Thyriniteina arnobia</i> (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) e espécies florestais hospedeiras.....	08
2.2. Principais grupos de vírus entomopatogênicos.....	12
2.3. Modo de ação e disseminação dos vírus entomopatogênicos.....	15
2.4. Controle microbiano de pragas florestais utilizando vírus entomopatogênicos	17
2.5. Ocorrência de vírus entomopatogênicos em pragas florestais no Brasil.....	26
2.6. Utilização de vírus como método de controle biológico de lagartas desfolhadoras do eucalipto	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. Criação de manutenção.....	33
3.2. Descrição da metodologia de multiplicação do vírus	35
3.3. Descrição e adaptação da metodologia de purificação do vírus	36
3.4. Microscopia eletrônica	37
3.5. Quantificação do vírus no extrato purificado concentrado e nas suas diluições.....	37
3.6. Bioensaios para avaliação do TaV (<i>Thyriniteina arnobia</i> vírus)	39
3.6.1. Bioensaio para avaliação da patogenicidade do TaV sobre os ínstares larvais de <i>T. arnobia</i>	39
3.6.2. Experimentos de semi-campo para avaliação do TaV sobre lagartas de <i>T. arnobia</i>	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1. Bioensaio para avaliação da patogenicidade do TaV sobre os ínstares larvais de <i>T. arnobia</i>	46
4.1.1. Sintomas de contaminação pelo TaV em lagartas de <i>T. arnobia</i>	51

4.1.2. Mortalidade causada pelo TaV em lagartas de <i>T. arnobia</i>	53
4.2. Experimentos de semi-campo para avaliação do TaV	56
4.2.1. Fatores relacionados à eficiência do TaV em condições de semi-campo	63
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE.....	83

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso do TaV (Thyrinteina arnobia vírus) no controle de lagartas de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), em condições de laboratório e de semi-campo. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia Florestal do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, e em área experimental de floresta de *Eucalyptus grandis*, na Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Botucatu – SP. No laboratório, o TaV foi multiplicado, purificado e quantificado. Diferentes concentrações de TaV, obtidas a partir do purificado concentrado, foram submetidas a testes de controle de lagartas de *T. arnobia*, em condições de laboratório e de semi-campo. No laboratório, a patogenicidade do TaV foi avaliada sobre diferentes ínstares larvais de *T. arnobia*. Experimentos de semi-campo foram instalados no inverno de 2000 e no verão de 2001, sendo o TaV pulverizado em plantas de *E. grandis*. As folhas pulverizadas foram coletadas em dias diferentes, e oferecidas a lagartas de *T. arnobia* no laboratório. Verificou-se que o TaV foi capaz de infectar e matar lagartas de *T. arnobia* de 2º, 3º, 4º e 5º

ínstares, em condições de laboratório (temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 13 horas). Os sintomas de contaminação foram observados em 100 % das lagartas que ingeriram folhas de *E. grandis* contaminadas com vírus. Também foi constatada uma alta mortalidade para as lagartas infectadas, apresentando taxas que variaram de 90 a 100 %. O efeito do TaV foi mais intenso sobre lagartas de 2º e 3º ínstars, contaminando-as e matando-as mais rapidamente, quando comparadas às de 4º e 5º ínstars. Nos experimentos de semi-campo, os resultados demonstraram que o TaV foi capaz de infectar e matar lagartas de *T. arnobia* de 4º ínstar, mas o TL_{50} foi considerado prolongado. O aumento do tempo letal (TL_{50}) foi diretamente proporcional ao aumento do período decorrido entre a aplicação do vírus e as coletas de folhas no campo.

**EVALUATION OF TaV (THYRINTEINA ARNOBIA VIRUS) IN CONTROL OF
Thyriniteina arnobia (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)**

Author: Cassiano Orlato

Adviser: Carlos Frederico Wilcken

SUMMARY

The present work aimed to evaluate the use of TaV (*Thyriniteina arnobia* virus) in control of *Thyriniteina arnobia* caterpillars (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), in laboratory conditions and field. The experiments were conducted in the Forest Entomology Laboratory of Plant Production Department, and in an experimental area with *Eucalyptus grandis*, in the São Paulo State University (UNESP), in Botucatu – SP. In laboratory, the TaV was multiplied, purified and quantified. Different concentrations of TaV, obtained from the concentrated purified, were submitted to *T. arnobia* caterpillars test controls, in laboratorial conditions and field. In the laboratory, the pathogenicity of TaV was evaluated over different larval instars of *T. arnobia*. Field experiments were installed in winter (2000) and summer (2001), spraying TaV in *E. grandis* plants. The sprayed leaves were collected in different days and offered to the *T. arnobia* caterpillars in the laboratory. It was observed that TaV was able to infect and kill 2nd, 3rd, 4th and 5th instars *T. arnobia* caterpillars, in laboratory conditions (temperature of 25±0,5 °C, relative humidity of 70±10% and 13 hours photo phase). The contamination symptoms were observed in 100 % of caterpillars that had

ingested the leaves of *E. grandis* contaminated by virus. It was observed a high mortality to the infected caterpillars, varying from 90 to 100 %. The effect of TaV was stronger to the 2nd and 3rd instars caterpillars, contaminating and killing them faster, when compared to 4th and 5th instars. In field experiments, the results demonstrated that TaV was able to infect and kill 4th instar *T. arnobia* caterpillars, but the LT₅₀ was considered extended. The increase of lethal time (LT₅₀) was directly proportional to the increase of period between the virus application and the leaves collects in the field.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus*, da família Myrtaceae, é originário da Austrália, onde existem cerca de 600 espécies diferentes, e Indonésia, sendo introduzido no Brasil em 1862, no município de Amparo – SP. No ano de 1909, a Companhia Paulista de Estradas de Ferro utilizou-o em larga escala para a produção de dormentes. (Andrade, 1928).

A corrida por novas fontes energéticas fez com que o Brasil se antecipasse a um grande número de países no uso da madeira como combustível, sendo que, no final da década de 70, já representava 21,5 % do consumo global de energia (Brito & Barrichelo, 1979).

Atualmente, o eucalipto é a espécie florestal mais utilizada em reflorestamentos homogêneos no Brasil, sendo que a área total ocupada pela cultura em 1999 era de 2.965.880 ha, dos quais 574.150 ha situavam-se no estado de São Paulo (SBS, 2000).

No Brasil, a família Myrtaceae está representada por um grande número de espécies de plantas, desta forma todo um complexo de insetos passou a se desenvolver no eucalipto, apesar dessa ser uma planta exótica. Devido ao fato das florestas de

Eucalyptus serem cultivadas de forma intensiva em grandes áreas, estas estão mais sujeitas aos ataques de pragas (Wilcken, 1991).

Com o aumento da área de cultivo do eucalipto, o número de insetos nativos que se adaptam a ele aumenta rapidamente. Como a maioria das monoculturas, as florestas de eucalipto têm sérios problemas com pragas. Entre as principais pragas do eucalipto estão as formigas cortadeiras e as lagartas desfolhadoras, sendo estas últimas as de maior importância econômica (Berti Filho, 1974; Peres Filho, 1989). Segundo Berti Filho (1978), o número de espécies de lepidópteros desfolhadores chega a 117, podendo ocorrer surtos leves ou violentos.

A lagarta-parda *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) é considerada o principal lepidóptero desfolhador das florestas brasileiras de eucalipto (Anjos et al., 1987). Atualmente as consequências dos danos desta espécie-praga são maiores, devido aos recentes surtos ocorridos no Estado de São Paulo (Wilcken, 1996).

Dentre as práticas utilizadas para o controle de lepidópteros desfolhadores de eucalipto, destaca-se o controle biológico. Zanuncio et al. (1993) citam que o controle biológico consiste na regulação do número de plantas e animais por inimigos naturais, os quais se constituem nos agentes de mortalidade biótica. Neste contexto enquadra-se o controle microbiano, que consiste na utilização racional de patógenos visando à manutenção da população das pragas a níveis não prejudiciais (Alves, 1986).

Dentre os entomopatógenos utilizados destacam-se os vírus, devido à sua alta especificidade aos invertebrados e à sua eficiência no controle de insetos, sendo que, no Brasil, é desenvolvido o maior programa de uso de bioinseticida viral no controle de uma praga. É o caso do *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV) para o controle da lagarta-da-soja

Anticarsia gemmatalis, estimando-se atualmente que a aplicação desse bioinseticida atinja mais de 1 milhão de hectares de soja, em todo o país (Alves, 1998).

As plantações florestais são caracterizadas por um ecossistema frágil, normalmente constituído de maciços extensos e que englobam outros nichos ecológicos (Zanuncio et al., 1993). Desta forma, devemos sempre buscar alternativas de controle que minimizem ou anulem os impactos ambientais provocados por uma possível aplicação de inseticida.

Uma alternativa com potencial futuro para o controle biológico de *T. arnobia* em florestas de eucalipto é a utilização do TaV (Thyrinteina arnobia vírus) como bioinseticida. Testes anteriores com o TaV apresentaram bons resultados, sendo também constatada a sua ocorrência natural no campo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso do TaV no controle de lagartas de *T. arnobia*, em condições de laboratório e de semi-campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) e espécies florestais hospedeiras

De acordo com Berti Filho (1978), o gênero *Thyrinteina* Möschler, 1890, é constituído por 6 espécies, ocorrendo no Brasil *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782), *T. leucoceraea* (Rindge, 1961) e *T. schadeana* (Schaus, 1927).

Chiarelli (1943) cita que *T. arnobia* ocorre desde a América Central e Antilhas Ocidentais até a Argentina. Segundo Berti Filho (1974) e Santos et al. (1983), essa espécie ocorre em quase toda a América do Sul e parte da América Central.

No Brasil, Anjos et al. (1987) citam registros desse inseto na Bahia, Pernambuco, São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Amazonas, Minas Gerais e Espírito Santo.

A relação de plantas hospedeiras para *T. arnobia* no Brasil é bastante estudada para as espécies de eucalipto, sendo os estudos com hospedeiros nativos escassos.

Como hospedeiros exóticos, no Brasil, são listadas as espécies de *Eucalyptus rostrata*, *E. resinifera*, *E. urophylla*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. saligna* e *E. cloeziana*. Como hospedeiros nativos são citados a congonha-dos-sertões ou congonha-do-bugre (*Villaresia congonha*), além das espécies florestais nativas localizadas ao redor ou no sub-bosque de eucaliptais, tais como pau-terra (*Qualea* sp.), tingui (*Mogonia pubescens*), goiabeiras (*Psidium guajava*), cagaiteira (*Eugenia disinterica*), murici (*Byrsonima* sp.), assa-peixe (*Vernonia* sp.) e angico-cangalha (*Peltophorum* sp.) (Zanuncio et al., 1993).

T. arnobia é uma das pragas responsáveis pela queda da produtividade na cultura do eucalipto. Também conhecida por lagarta “mede-palmo”, seus surtos são mais evidentes em solos de baixa fertilidade natural (areias quartzosas, latossolos e podzólicos álicos), onde o estado nutricional das florestas causa distúrbios que podem torná-las mais suscetíveis ao ataque das lagartas (Berti Filho, 1974).

Zanuncio et al. (1994) analisaram os principais lepidópteros (primários e secundários) associados com *Eucalyptus* spp. em nove regiões do sudeste brasileiro. Foram identificadas 11 pragas primárias e 40 secundárias, sendo que a maioria das espécies encontrada foi das famílias Saturniidae, Geometridae, Arctiidae e Notodontidae. *T. arnobia* e outras pragas da família Geometridae e *Eupseudosoma involuta* (Arctiidae) foram relatadas ocorrendo principalmente durante o período seco do ano, de maio a setembro, enquanto os saturnídeos e notodontídeos estiveram presentes durante o ano todo.

De acordo com Rindge (1961), também os adultos de *T. arnobia* são encontrados em atividade durante todos os meses do ano. O mesmo foi observado por Baena (1982) através de um levantamento com armadilha luminosa durante dois anos.

Alves et al. (1994) realizaram um estudo de maio de 1991 a abril de 1992, no município de Niquelândia – GO, identificando que *T. arnobia* é uma praga primária dos eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis* e *E. urophylla*), sendo encontrada com alta frequência em armadilhas luminosas.

Oliveira et al. (1984) demonstraram que, com relação ao ataque de *T. arnobia*, no estado de Minas Gerais, *E. grandis* e *E. saligna* são as espécies mais suscetíveis; *E. urophylla* e *E. cloeziana* são suscetíveis; *E. pellita*, *E. pilularis*, *E. citriodora*, *E. paniculata*, *E. tereticornis* e *E. pyrocarpa* são pouco resistentes; e *E. camaldulensis* é altamente resistente. Entretanto, no estado de São Paulo, Wilcken (1996) concluiu que *E. grandis*, *E. urophylla*, *E. saligna* e *E. cloeziana* são suscetíveis; *E. citriodora*, *E. camaldulensis* e *E. torelliana* são intermediários; e *E. dunni* e *E. globulus* são resistentes.

Com relação aos sintomas em eucalipto, Pigatti et al. (1962) e Berti Filho (1974) observaram que o ataque começa na parte inferior da copa das árvores e prossegue até os ponteiros. Berti Filho (1974) menciona ainda que o ataque tem início na bordadura do talhão, avançando posteriormente para o seu interior. Pigatti et al. (1962) citam também que as lagartas atacam em blocos esparsos, estendendo-se a grandes áreas.

Segundo Macedo (1975), as lagartas se alimentam da folhagem com grande voracidade, inicialmente raspando as folhas e mais tarde devorando-as totalmente. De acordo com Gallo et al. (1988), as lagartas comem as folhas das árvores de forma a deixá-las totalmente desfolhadas e, quando os surtos se repetem, podem paralisar o crescimento das plantas pelos desfolhamentos sucessivos.

As lagartas de *T. arnobia* são ávidas comedoras de folhas e quando seu ataque é intenso, e na falta de alimento, elas passam a devorar as folhas da vegetação nativa existente nas proximidades e no sub-bosque da floresta de eucalipto (Santos, 1978).

A praga é de efeito arrasador em plantações novas de eucalipto, mas danifica também árvores mais velhas (Barbiellini, 1950). Segundo Macedo (1975), em Itu – SP, na Fazenda Nossa Senhora da Conceição, os talhões de *E. citriodora* mais atacados estavam com 6,5 anos, e os talhões vizinhos, com 2,5 anos, apresentavam a praga em menor quantidade. Por este fato, observa-se que *T. arnobia* é uma praga que não escolhe idade, atacando também plantios novos, principalmente quando estes se encontram próximos de plantios mais velhos, onde a praga já desenvolveu uma população suficiente para dispersar e infestar novas áreas (Anjos et al., 1987).

Plantios com baixa incidência de lagartas proporcionam uma difícil observação da presença destes insetos, devido à altura das árvores, e se constituem num quadro calamitoso quando a área já está completamente desfolhada (Prejuízos... 1973). Este fato é reforçado por Berti Filho (1974), citando que o ataque só é percebido quando a maioria das lagartas já atingiu o 5º ínstar, pelo aumento súbito de desfolhamento e pelo ruído da queda das suas fezes.

Segundo Berti Filho (1974), na fase larval, *T. arnobia* consome em média 120,58 cm² de área foliar por lagarta, sendo que este ataque só é notado quando as lagartas já estão desenvolvidas, devido ao fato de que as injúrias apresentadas são pouco notadas nos primeiros ínstars, mas quintuplicam do quarto para o quinto ínstar.

De acordo com Oda & Berti Filho (1978) um ataque de *T. arnobia* causa uma perda média de volume de madeira de 40,4% (25,6 m³/ha) para 100% de desfolha

e 13,2% (8,3 m³/ha) para árvores com 50% de desfolha, em povoamentos de *E. saligna* com 2,5 a 3,5 anos de idade.

Segundo Berti Filho (1974), o período embrionário de *T. arnobia* dura 10 dias e apresenta uma viabilidade de 94,70%. As lagartas apresentam 6 ínstar, sendo que, no último ínstar, essas atingem 50 mm de comprimento. A duração média da fase larval é de 26,8 dias a uma temperatura de 25 °C. A pupa mede aproximadamente 18 mm (machos) e 28 mm (fêmeas), e a duração média deste estágio é de 9,3 dias, variando de 7 a 10 dias. No caso dos adultos, a longevidade média é de 3,4 dias para os machos e de 7 dias para as fêmeas. O ciclo de vida de *T. arnobia*, desde ovo até adulto é, em média, de 53,1 dias para as fêmeas e de 49,5 dias para os machos.

Santos et al. (2000), estudando o desenvolvimento de lagartas de *T. arnobia*, em condições de laboratório, verificaram que a duração média do período larval foi de 37 dias, para machos e fêmeas que se alimentaram de folhas de *E. urophylla*. A fase de pupa apresentou uma duração média de 10,7 e 9,4 dias, para machos e fêmeas, respectivamente.

2.2. Principais grupos de vírus entomopatogênicos

Segundo o último relatório do ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus), de 1995, os vírus que infectam insetos podem ser divididos em 5 grupos distintos. O grupo “A” é composto por vírus com DNA de fita dupla (dsDNA), o grupo “B” por vírus com DNA de fita simples (ssDNA), o grupo “C” é formado por vírus com RNA de

fita dupla (dsRNA), o grupo “D” por vírus de RNA de fita simples (ssRNA), sentido negativo, e o grupo “E” por vírus de ssRNA, sentido positivo (Ribeiro et al., 1998).

Entre os vírus de dsDNA encontram-se as famílias Poxviridae, Iridoviridae, Polydnviridae e Baculoviridae, sendo esta última a de maior interesse em entomologia aplicada, representada pelos gêneros *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). Baculoviridae apresenta nucleocapsídeo helicoidal, em forma de bastonete, com 30 a 35 nm de diâmetro e 250 a 300 nm de comprimento, envolto por uma membrana (Ribeiro et al., 1998).

Os *Nucleopolyhedrovirus* são os que induzem à formação da poliedrose nuclear, cujos poliedros medem de 0,15 a 15 µm de diâmetro, sendo que atualmente são conhecidos NPV's em pelo menos 7 ordens de insetos e uma ordem de crustáceos. Os *Granulovirus* são formados por partículas similares às do NPV, mas oclusas individualmente, formando grânulos com cerca de 0,15 x 0,5 µm, sendo encontrados somente em lepidópteros (Ribeiro et al., 1998).

Sobre os vírus de ssDNA, Ribeiro et al. (1998) citam que o grupo é composto por uma única família, chamada Parvoviridae, compreendendo vírus isométricos de 18 a 26 nm. Os parvovírus têm sido encontrados em dictiópteros, dípteros, lepidópteros, odonatos e ortópteros, apresentando potencial para uso como bioinseticida.

Os vírus de dsRNA são representados pelas famílias Reoviridae e Birnaviridae. A família Reoviridae é composta por vírus que têm partículas isométricas de 60 a 80 nm de diâmetro, sendo formada por vários gêneros, dos quais apenas *Cypovirus* infecta exclusivamente insetos. Na família Birnaviridae são encontrados vírus isométricos, com 60 nm de diâmetro (Ribeiro et al., 1998).

Ribeiro et al. (1998) citam que as famílias Rhabdoviridae, Bunyaviridae, e o gênero *Tenuivirus* (sem família designada), compõem o grupo dos vírus de ssRNA, sentido negativo. Rhabdoviridae apresenta partículas virais baciliformes, de 45 a 100 nm x 100 a 430 nm, e podem infectar os artrópodos vetores (mosquitos, ácaros, pulgões e cigarrinhas).

Os vírus de ssRNA, sentido positivo, estão distribuídos em 6 famílias diferentes, sendo Picornaviridae, Caliciviridae, Nodaviridae, Tetraviridae, Flaviviridae e Togaviridae. Os vírus da família Picornaviridae apresentam partículas isométricas, com 22 a 30 nm de diâmetro, sendo encontrados vários vírus que infectam insetos, mas ainda sem definição taxonômica. Nodaviridae é composta por vírus que infectam somente insetos (coleópteros, lepidópteros e dípteros), apresentando partículas de 30 nm de diâmetro. Já os vírus da família Tetraviridae, com partículas isométricas de 40 nm, infectam somente lepidópteros (saturnídeos, limacodídeos e noctuídeos) (Ribeiro et al., 1998).

Segundo Scotti (1994), os picornavírus de insetos são partículas que contêm RNA no genoma. Esses vírus compreendem três principais grupos: vírus da paralisia em grilos (CrPV), *Drosophila C* vírus (DCV) e *Gonometa* vírus (GoV). São vírus de RNA estudados com propriedades comparáveis às dos vírus de vertebrados que têm sido formalmente aceitos como parentes da família Picornaviridae. São vírus extremamente pequenos, com fita única ou dupla de RNA no genoma. O tamanho destes vírus varia em torno de 25 a 35 nm de diâmetro, com formas isométricas não envelopadas.

Nascimento (2001), realizou o estudo de caracterização do vírus de *T. arnobia* (TaV), analisando, no microscópio eletrônico, preparações purificadas obtidas a partir de lagartas infectadas, sendo encontradas, predominantemente, partículas isométricas de 30

nm de diâmetro, e, em menor quantidade, partículas isométricas de 15 a 17 nm de diâmetro. Estas últimas ainda não têm natureza esclarecida, mas é possível que elas representem um vírus satélite do TaV.

Partículas de 25 a 30 nm, semelhantes às encontradas em preparações purificadas do TaV, foram encontradas com frequência no epitélio do intestino de lagartas infectadas, mas não de sadias. As partículas foram também notadas no lúmen do intestino, junto às microvilosidades, e no citoplasma das células epiteliais do intestino, geralmente formando agregados paracristalinos (Nascimento, 2001).

Segundo Nascimento (2001), as partículas isométricas de 30 nm de diâmetro, encontradas nas suspensões de vírus e nos tecidos do intestino de lagartas, representam o TaV, e sugerem que este vírus pode pertencer à família Picomaviridae, juntamente com outros vírus descritos para outras espécies de insetos.

2.3. Modo de ação e disseminação dos vírus entomopatogênicos

De uma forma geral, o modo de ação dos vírus entomopatogênicos baseia-se na ingestão dos poliedros, que contém os vírions (partículas de vírus), por via oral, através da ingestão de folhas, caules de plantas ou mesmo pela ingestão do córion dos ovos, esta última restringindo-se aos insetos recém eclodidos (Alves, 1986).

Alves (1986) descreve que, em condições alcalinas ($\text{pH} > 7,5$) do tubo digestivo (mesêntero), os poliedros são dissolvidos, liberando os vírions, que em contato com as microvilosidades intestinais, liberam os capsídeos nas células epiteliais do intestino. Nessas células ocorre a “infecção primária”, caracterizada por multiplicação, sendo que as partículas

recém formadas podem atingir outros tecidos suscetíveis do hospedeiro, onde ocorrerá a produção de grande quantidade de nucleocapsídeos e, posteriormente, a formação de cristais. Esta grande produção de cristais caracteriza a “infecção secundária”, provocando o rompimento da parede celular.

De acordo com Alves (1986), durante a infecção secundária ocorre a disseminação dos vírus, onde os insetos liberam grandes quantidades de poliedros através dos líquidos regurgitados e dos excrementos pastosos, que representam importantes fontes de inóculo para outros insetos que vivem no mesmo habitat. Outra fonte de inóculo é o inseto morto, em estado de podridão, importante para a manutenção das epizootias. Moscardi (1986) cita que o processo, desde a infecção até a morte da lagarta, dura em média de 6 a 7 dias.

Para os vírus da família Picornaviridae, a replicação ocorre no complexo associado com a membrana citoplasmática. O início da infecção ocorre com a ligação do vírion ao receptor específico, encaixado na unidade da membrana plasmática. A RNA transferase desencadeia o processo de transcrição do RNA viral no genoma da célula hospedeira. O RNA viral liberado passa a atuar junto ao ribossomo, induzindo a formação da RNA transferase (Rueckert, 1996).

Nascimento (2001) descreve que, aparentemente, a infecção pelo TaV se limita ao epitélio do intestino, embora mais exames devam ser requeridos para confirmar este fato. A presença dos CMV's (corpos multivesiculares) representa uma característica marcante da infecção pelo TaV, e as vesículas em seus interiores talvez representem o sítio de replicação do RNA viral.

2.4. Controle microbiano de pragas florestais utilizando vírus entomopatogênicos

Em florestas, insetos da ordem Lepidoptera sujeitos à aplicação de baculovírus incluem *Lymantria dispar*, *Orgyia pseudotsugata*, *Choristoneura fumiferana*, *C. occidentalis*, *C. pinus*, *Panolis flammea* e *Hyphantrea cunea* (Moscardi, 1999).

Uma das primeiras tentativas de utilização de vírus para o controle de insetos ocorreu em 1942, com a introdução de um vírus de poliedrose nuclear (NPV) em populações de *Lymantria monacha* em florestas de *Pinus* na Alemanha (Huber, 1986).

Em 1944, Balch e Bird relataram a importância do controle natural exercido por um NPV de *Gilpinia hercyniae* (Hymenoptera), introduzido acidentalmente no Canadá junto com parasitóides importados da Europa para o controle biológico do inseto. Os autores sugeriram a introdução do NPV em áreas onde o patógeno ainda não havia se estabelecido, com a finalidade de aumentar o controle natural de *G. hercyniae* (Moscardi, 1998). Este é o mais importante exemplo de controle biológico clássico de insetos por baculoviroses. Nenhuma medida de controle tem sido requerida contra *G. hercyniae* no Canadá durante os últimos 50 anos (Cunningham, 1995; citado por Moscardi, 1999).

Um vírus da família Picornaviridae foi encontrado causando uma epizootia em *Gonometa podocarpi* (Lepidoptera: Lasiocampidae) na Uganda, em florestas de *Pinus patula*, no ano de 1970. O vírus foi isolado e caracterizado, e o nome *Gonometa* vírus (GoV) foi proposto por Scotti (1994). O vírus foi recuperado de larvas e pupas infectadas e foi muito eficiente no controle das populações da praga no campo (Scotti, 1994).

Orgyia pseudotsugata McDunn., *O. antiqua* (L.) e *O. mixta* Sn. (Lepidoptera: Lymantriidae), pragas de coníferas na América do Norte, que ocorrem

comumente nas regiões oeste do Canadá e dos Estados Unidos, são altamente suscetíveis a dois vírus de poliedrose nuclear, um de simples e outro de múltiplos vírus envelopados (respectivamente, SV e BV). *O. leucostigma* (J. E. Smith), espécie da região oriental, foi também infectada no campo pelo SV e artificialmente no laboratório com BV (Cunningham & Hughes, 1976).

Uma pesquisa foi desenvolvida em *Pseudotsugata menziesii* sobre surtos da mariposa *O. pseudotsugata* em Idaho (EUA). O tratamento com NPV resultou em diminuição nos níveis populacionais da praga (Stipe, 1988).

O. pseudotsugata alimenta-se vorazmente do abeto *P. menziesii*, sendo capaz de desfolhar grandes áreas florestais, causando a morte das árvores durante o surto. O manejo utilizando OpNPV (vírus de poliedrose nuclear) para controlar este inseto, tem reduzido significativamente a mortalidade e o desfolhamento das árvores (Otvos et al., 1998).

De acordo com Otvos et al. (1998), estudos têm demonstrado que a introdução do OpNPV no início do surto reduz efetivamente os danos às árvores. Algumas características do OpNPV são citadas, tais como: alta especificidade (infecta somente a espécie alvo), infecção altamente efetiva (causa grande mortalidade das larvas), sua infecção causa epizootia, com ação relativamente lenta, levando de 6 a 8 semanas para matar as larvas.

Moscardi (1998) cita que o NPV de *O. pseudotsugata* foi registrado em 1976 nos EUA com o nome comercial de “TM Biocontrol 1” e, no Canadá, com o nome de “Virtuss”; citado também por Cunningham (1995).

Cunningham (1995) cita que surtos de *O. pseudotsugata* ocorridos na Columbia Britânica, no Canadá e no sul do Novo México, são eliminados com epizootias de NPV, mas não antes de sérios prejuízos e árvores mortas. Ambos, vírus de nucleocapsídeo

simples (SNPV) e vírus de múltiplos nucleocapsídeos (MNPV), foram isolados de larvas do inseto. Em 1983, o MNPV foi utilizado pelo Serviço Florestal do Canadá, sendo aplicado na dose de $2,5 \times 10^{11}$ PIB / ha num volume de 10 litros / ha, embora haja evidências de que doses menores proporcionem resultados satisfatórios. Entre 1971 e 1982, 1.508 ha foram tratados com “TM Biocontrol 1” nos EUA e Canadá, e entre 1974 e 1982, 165 ha foram tratados com “Virtuss” no Canadá.

Em 1974, no Japão, foi registrado o produto “Matusukemin”, baseado em CPV (vírus de poliedrose citoplasmática), sendo utilizado para o controle de *Dendrolimus spectabilis* em cerca de 3.300 ha de florestas de *Pinus* no Japão e China, com um bom controle do inseto (Moscardi, 1998).

Smimoff et al. (1977) citam que larvas mortas de *Glena bisulca* Rindge (Lepidoptera: Geometridae), um sério desfolhador de *Cupressus lusitanica*, foram coletadas na Colômbia durante o inverno de 1975, estando infectadas com um vírus de granulose. O vírus, do gênero Baculovírus, foi encontrado com cápsulas normal e irregular.

Microorganismos patogênicos e não patogênicos, incluindo fungos, bactérias, vírus e nematóides, foram isolados de 108 espécies de pragas coletadas em florestas na Columbia Britânica, entre 1949 e 1969. O vírus de poliedrose nuclear e o vírus de granulose foram isolados de 53 espécies (Morris, 1983).

Doane & McManus (1981) discorrem sobre outro importante exemplo bem sucedido de controle microbiano de uma praga florestal utilizando vírus. Trata-se do NPV (vírus de poliedrose nuclear) de *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae), conhecida como a mariposa cigana ou “gypsy moth”, praga das florestas do nordeste dos Estados Unidos

e outras partes do mundo. A pesquisa extensiva com patógenos, incluindo *B. thuringiensis* e o NPV, resultou no registro deste vírus como um bioinseticida, em 1978.

Doane & McManus (1981) citam ainda que a ausência de efeitos ambientais maléficos e o potencial de auto perpetuação do vírus aumentaram muito o seu valor como uma ferramenta no controle de *L. dispar*.

Em 1978, o Serviço Florestal Americano (USDA) obteve o registro do NPV de *L. dispar*, através da Agência de Proteção Ambiental (EPA), com o nome de “Gypchek”. Após isso, 11.000 ha de florestas foram tratadas entre os anos de 1978 e 1993. O produto é utilizado no Canadá, Europa e Estados Unidos (Reuveni, 1995).

Moscardi (1998) cita que o “Gypchek” está sendo produzido por empresas privadas mediante convênio com o Serviço Florestal Americano (USDA). De acordo com Huber (1986), este bioinseticida foi aplicado em aproximadamente 3.880 ha de florestas nos EUA e no Canadá, entre 1976 e 1982. Preparações comerciais desse NPV estão sendo utilizadas na China e na antiga União Soviética, onde foram aplicadas em 53.000 ha, em 1978 (Moscardi, 1998).

Cunningham (1995) relata que, no Canadá, o primeiro surto sério de *L. dispar* ocorreu em Ontário no ano de 1981. Em 1982, 63 ha foram pulverizados com “Gypchek” proveniente do Serviço Florestal do Canadá, através do Serviço Florestal Americano (USDA). As pulverizações foram realizadas quando as larvas estavam se alimentando ativamente, sendo que o intervalo entre duas aplicações foi de 3 a 5 dias. O uso de NPV é preferido ecologicamente em áreas sensíveis, onde *B. thuringiensis* pode ter um impacto em lepidópteros não alvos.

Woods et al. (1989) cita que a importância da casca de árvores contaminada, na transmissão do vírus de poliedrose nuclear para larvas de *L. dispar* foi avaliada em condições de campo no *Quercus velutina*, em Massachusetts (EUA), durante maio e outubro de 1985 e em maio de 1986. Logo após uma epizootia, larvas de *L. dispar*, emergidas recentemente, foram retiradas de troncos de árvores, os quais foram desinfetados com hipoclorito de sódio e pulverizados com o NPV ($3,5 \times 10^5$ PIB / cm²). A mortalidade das larvas devido à infecção viral foi relacionada ao grau de contaminação da superfície da casca das árvores de *Q. velutina*, indicando que a casca tem um importante papel na transmissão do NPV, particularmente no ano seguinte a uma epizootia.

Murray & Elkinton (1990) também verificaram a importância da casca contaminada por NPV na transmissão da doença para altas densidades populacionais de *L. dispar*, no ano seguinte a uma epizootia. Foi observada maior mortalidade provocada pelo NPV em larvas do inseto eclodidas de massas de ovos colocadas em substratos da casca de árvores tratada com vírus, do que em larvas eclodidas de massas de ovos colocadas em substratos da casca sem tratamento.

Cunningham (1995) relata que, entre 1971 e 1983, em florestas de *Pinus* do Canadá, as lagartas dos ponteiros *Choristoneura fumiferana*, *C. occidentalis* e *C. pinus* foram controladas através de pulverização aérea de baculovírus em uma área em torno de 2.140 ha, principalmente com NPV. Em outra área de 16 ha, as mesmas pragas foram controladas através da aplicação de GV. Nenhum registro de epizootia foi notificado nesta região.

Na Columbia Britânica, foi registrado o ataque da lagarta *C. occidentalis*, nos anos de 1976, 1978 e 1982, numa área de 252 ha, sendo o controle realizado

através da pulverização de NPV. Em 1982, 172 ha foram tratados com GV. Estudos realizados de 1982 a 1985 não constataram o estabelecimento de epizootias por nenhum dos dois vírus (Cunningham, 1995).

Ives & Cunningham (1980) relatam que o vírus de poliedrose foi encontrado em larvas de *Operophtera bruceata* Hulst (Lepidoptera: Geometridae) de dois locais na Columbia Britânica em 1957. Foram realizados testes de campo em três álamos (*Populus tremuloides*), em Alberta, em 1979. Nestas árvores o vírus foi pulverizado na concentração de 106-107 PIBs (corpos poliédricos de inclusão) / ml, em larvas de 1º ínstar; e de 106, 107 e 108 PIBs / ml, em larvas de 2º e 3º ínstars, num volume de aplicação de 350 litros / ha. Todos os tratamentos proporcionaram algum grau de proteção contra o desfolhamento.

Percy et al. (1983) citam um NPV do tipo multicapsídeo e um vírus de poliedrose citoplasmática (CPV) infectando *Nepytia freemani* Munroe (Lep.: Geometridae), uma praga do pinheiro *Pseudotsuga menziesii*, na Columbia Britânica, em 1981.

Três espécies de Lepidoptera, da família Limacodidae, são conhecidas como desfolhadoras de palmáceas na Costa do Marfim: *Latoia viridissima* Holland, *L. pallida* Möschl e *Casphalia extranea* Walker. Durante surtos de *L. viridissima*, o primeiro em junho de 1979 e o segundo em setembro de 1983, epizootias naturais foram observadas e as larvas mortas foram coletadas. Foi constatado que o vírus de *L. viridissima* é muito eficiente, sendo que, em cinco dias após a infecção, a mortalidade atingiu 89 % das larvas (Fedièrre et al., 1990).

Cunningham (1990) menciona que larvas de himenópteros desfolhadores de florestas, principalmente do gênero *Neodiprion*, incluindo *N. sertifer*, *N.*

lecontei e *N. suanei* (Hymenoptera: Diprionidae), têm sido controladas através de vírus na América do Norte e na Europa. O vírus de poliedrose nuclear (NPV) de *N. sertifer* é o mais utilizado, tendo sido registrado nos Estados Unidos em 1983 com a marca “Neocheck”. Um isolado do vírus foi produzido na Finlândia pela empresa Kemira OY, que até 1982 comercializou o NPV na região dos países escandinavos, para aproximadamente 9.000 ha de florestas. Na Inglaterra este NPV foi registrado com o nome de “Virox”.

Em 1976, na Suécia, foi realizada uma revisão geral sobre controle biológico das pragas florestais de importância econômica. Eidmann (1976) cita que dentre os métodos para o controle das pragas estava inclusa a utilização do NPV de *N. sertifer*.

A transmissão do NPV de *N. sertifer* ocorre através de dispersão, do solo em direção à superfície das folhas das plantas. Porém em florestas, onde a distância entre o solo e as folhas é grande, esta forma de transmissão não é comum. Algumas possibilidades de transmissão podem ser por pássaros que se alimentam de larvas contaminadas na terra, e por formigas (Olofsson, 1988)

O NPV de *N. sertifer* é extremamente efetivo devido ao hábito gregário das lagartas, onde a infecção de um indivíduo resulta na mortalidade total da colônia. O vírus infecta as células epiteliais do intestino médio, e as lagartas expelem os vírus em suas fezes e também regurgitam-no (Cunningham, 1995).

Cunningham (1995) cita ainda que o vírus é freqüentemente produzido no campo em florestas intensamente infestadas. O NPV de *N. sertifer* tem sido testado e operacionalmente utilizado em mais países do que outros baculovírus, e nos últimos 40 anos, desde 1949, pulverizações aéreas e terrestres têm sido conduzidas no Canadá, EUA,

Alemanha, Reino Unido, Finlândia, Suécia, Noruega, Rússia, Áustria, Polônia, Iugoslávia e Itália.

O himenóptero *N. lecontei* é encontrado somente na América do Norte e tem como característica comum em relação à praga do pinheiro europeu (*N. sertifer*), o hábito gregário de suas larvas. *N. lecontei* é a principal praga das plantações de pinheiro vermelho, em Ontário e Quebec. Um extensivo programa foi criado para o desenvolvimento do SNPV no Canadá em 1976, e aplicações aéreas foram conduzidas entre 1976 e 1980, realizando-se testes de impacto toxicológico e ambiental (Cunningham, 1995).

Em 1983, uma formulação do NPV de *N. lecontei*, denominada de “Lecontvírus”, foi registrada no Canadá. Este vírus é produzido no campo através de aplicações em florestas de pinheiro altamente infestadas pelo inseto, sendo as larvas moribundas coletadas e congeladas para posterior liofilização, moagem e formulação (Cunningham, 1990). Entre 1976 e 1993, 6.003 ha foram tratados com “Lecontvírus”. A dosagem recomendada foi de 5×10^9 OB / ha, com volume de aplicação de 10 litros / ha para pulverização aérea, e de 20 litros / ha para aplicações terrestres (Cunningham, 1995).

As espécies de insetos desfolhadores do *Pinus patula* de maior importância, em Papua Nova Guiné, incluem *Lymantria ninayi* (Lep.: Lymantriidae) e *Alcis papuensis* (Lep.: Geometridae). Surtos destas duas espécies têm ocorrido, e as viroses são as principais limitantes das populações destes insetos (Roberts, 1987).

A cultura da casuarina, árvore da família Casuarinaceae, no Egito, foi atacada por muitos insetos destruidores de madeira, especialmente após os 14 ou 15 anos de idade. As mais importantes pragas eram *Kaloterme flavicollis*, Isoptera, (atacando *Casuarina glauca*, *C. cunninghamiana* e *C. equisetifolia*); *Stromatium fulvum* (atacando somente *C.*

glauca) e *Macrotoma palmata* (atacando *C. glauca* e *C. equisetifolia*). O vírus de poliedrose nuclear (NPV) foi citado como agente de controle biológico para cupins (Hassan et al., 1990).

Evans et al. (1991) citam que antes de 1973, a mariposa *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae) era conhecida por níveis endêmicos no pinheiro escocês (*Pinus sylvestris*), mas em meados de 1970 surtos deste inseto foram descobertos em plantações de pinheiro exótico (*Pinus contorta*), na Escócia. Entre 1982 e 1988, foi realizado o refinamento dos métodos de controle para o desenvolvimento e uso alternativo de ingredientes ativos, incluindo Diflubenzuron e vírus de poliedrose nuclear (PfNPV), e também o aperfeiçoamento dos equipamentos e técnicas de aplicação.

Cunningham (1995) relata que na Escócia ocorreu um surto em 1976, em floresta de *Pinus*, no qual foram encontradas lagartas da mariposa *P. flammea*. Foi verificado que este inseto é suscetível ao *Mamestra brassicae* NPV. Na Escócia, entre 1986 e 1988, o MbNPV foi pulverizado em aproximadamente 905 ha de florestas, utilizando-se a dosagem de $2,2 \times 10^{11}$ PIB / ha. Em 1992, 100 ha na ilha de Lewis foram pulverizados com o MbNPV, o qual foi adquirido da Rússia.

Entre 1992 e 1994, larvas e pupas de *L. monacha* (Lepidoptera: Lymantriidae), *Dendrolimus pini* (Lep.: Lasiocampidae) e *Diprion similis* (Hym.: Diprionidae), de diferentes talhões florestais estavam infectados com o vírus de poliedrose nuclear, em florestas de três províncias na Alemanha. A proporção de indivíduos infectados diferia dependendo da espécie de hospedeiro, localização geográfica e estação climática, variando de 25 a 100 %, sendo a taxa de infecção mais comum em torno de 75 %. Em conjunto com outros agentes biológicos, parasitóides, predadores, bactérias e fungos

entomopatogênicos, os vírus patogênicos a insetos devem ser utilizados para retardar surtos de pragas florestais (Gleissler, 1995).

Cunningham (1990), citado por Moscardi (1998), apresenta uma revisão sobre o uso de agentes microbianos, incluindo vírus, para o controle de pragas florestais. O autor destaca que os vírus têm sido utilizados em pequena escala, muito aquém do potencial de emprego desses agentes. Isto se deve ao fato de que a sua produção é realizada apenas por instituições governamentais, havendo a necessidade de interesse da iniciativa privada para a expansão de sua produção e uso em florestas.

2.5. Ocorrência de vírus entomopatogênicos em pragas florestais no Brasil

No Brasil, Alves (1986) cita a ocorrência de alguns vírus em pragas de florestas, com destaque para o NPV (vírus da poliedrose nuclear) e para o GV (vírus da granulose) de *T. arnobia*, ocorrendo em condições de campo e de laboratório.

Larvas e pupas de *Eupseudosoma aberrans* (Lepidoptera: Arctiidae) e *E. involuta* foram coletadas em plantações de *Eucalyptus* spp., em Minas Gerais e São Paulo, sendo levadas ao laboratório. Sete insetos parasitóides e o vírus de poliedrose nuclear foram obtidos, dos quais *Lespesia* sp. (Diptera: Tachinidae), *Brachymeria ovata* (Hymenoptera: Chalcididae) e o NPV foram os mais importantes (Ohashi & Berti Filho, 1988).

De acordo com Gallo et al. (1988), além do controle biológico de *T. arnobia* com parasitóides e inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis*, as viroses específicas também são eficientes.

Em 1976, no município de Coronel Fabriciano, MG, ocorreu um surto da lagarta *Sabulodes caberata caberata* em 300 ha de *E. grandis* e *E. saligna*, que foi debelado pela ação de uma doença com características virais, cujo agente causal não foi identificado (Zanuncio et al., 1993). Este autor cita ainda que, na região de João Pinheiro, MG, no período de 1983/86, em condições de campo, surgiu uma epizootia em lagartas de *T. arnobia* e que configurou como um dos elementos importantes para a redução da praga, sendo que algumas empresas de reflorestamento da região chegaram a realizar pulverização em áreas infestadas pelo inseto com o macerado de lagartas infectadas.

Batista Pereira et al. (1995), estudaram a mortalidade de *T. arnobia* causada por parasitóides e entomopatógenos em plantios de *E. grandis* no município de Itatinga - SP, verificando que a taxa de mortalidade, sem controle ambiental, era de 5 % para ovos, 62 % para larvas e 14 % para pupas. A taxa de mortalidade de larvas e pupas era maior em amostras coletadas na bordadura do talhão do que no interior, sendo observado um maior percentual de entomopatógenos também na bordadura do talhão.

No caso de *T. arnobia*, o TaV pode ser um importante agente de controle microbiano, principalmente devido aos bons índices de controle proporcionados por este patógeno, não só quando ocorre naturalmente no campo, mas também em testes preliminares de laboratório e de semi-campo.

2.6. Utilização de vírus como método de controle biológico de lagartas desfolhadoras de eucalipto

Zanuncio et al. (1993) citam que os principais métodos de controle de lagartas desfolhadoras de eucalipto podem ser agrupados em: 1) controle biológico (parasitóides, predadores e patógenos); 2) controle etológico (baseado nos estudos de fisiologia dos insetos); 3) controle físico (fogo, armadilhas luminosas, etc.); 4) controle mecânico (coleta manual, barreiras, etc.); 5) controle químico (inseticidas químicos); e 6) controle por resistência de plantas. Quando são utilizados patógenos (fungos, bactérias e vírus) para o controle de uma determinada praga, o método de controle biológico empregado pode ser chamado de controle microbiano.

Pschorn-Walcher (1977) cita que para o planejamento de um programa de controle biológico faz-se necessário estabelecer se a espécie da praga é nativa ou introduzida. Para isso devem ser analisados os critérios histórico, geográfico (distribuição), ecológico (espécies de insetos associadas ao ambiente humano), biológico, taxonômico e parasitológico. O próximo passo, após a descoberta sobre a natureza da praga, é estabelecer a origem geográfica da espécie alvo. Em seguida, é necessário estabelecer um inventário, o mais completo possível, de parasitos, predadores e patógenos associados com a praga alvo.

Alves (1998) afirma que, para a maioria das pragas importantes, existe um patógeno capaz de regular a sua população, o que demonstra o grande potencial do controle microbiano. Os patógenos que atacam as pragas florestais aparecem naturalmente, podendo ocorrer enzooticamente ou provocar epizootias que arrasam as populações de insetos.

As viroses de insetos têm sido estudadas por muitos anos, devido ao intrínseco interesse no estudo geral de doenças de invertebrados e, mais particularmente, por causa do seu potencial como agentes ambientalmente benéficos no controle de pragas (Evans, 1986).

Entwistle (1986) e Evans & Entwistle (1987), citados por Cunningham (1990), afirmam que as viroses, transmitidas horizontalmente de inseto para inseto e verticalmente de geração para geração, são agentes altamente convenientes para o controle de pragas.

Os vírus entomopatogênicos ocorrem naturalmente no campo, podendo controlar parcial ou totalmente a população de lagartas desfolhadoras, mas, na maioria das vezes de forma tardia, quando a praga já causou um dano expressivo (Zanuncio et al., 1993).

Vírus de insetos são encontrados principalmente entre os lepidópteros, em espécies pertencentes às famílias Arctiidae, Bombycidae, Geometridae, Lasiocampidae, Lymantriidae, Nymphalidae, Olethreutidae, Noctuidae, Pieridae, Psychidae, Thaumetopoeidae, Tineidae, e Tortricidae; em *Tipula* spp. (Diptera: Tipulidae) e em *Melolontha* spp. (Coleoptera) (Stairs, 1972).

Burges et al. (1980), citados por Sant'Ana & Silva (1994), relatam que o vírus da poliedrose nuclear (NPV) e o vírus de granulose (GV) são conhecidos como Baculovírus, sendo ambos seletivos, efetivos, seguros e, sob condições favoráveis, apresentam estabilidade.

Os Baculovírus ocorrem somente sobre o Filo Arthropoda, sendo que quase a totalidade pertence à classe Insecta (Alves, 1986). Os vírus GV e NPV são relativamente específicos em relação aos seus hospedeiros, sendo encontrados em muitos

insetos economicamente importantes, principalmente em lepidópteros e himenópteros (Fuxa, 1987).

Alves (1998) afirma que os vírus entomopatogênicos podem ser utilizados como inseticidas microbianos, em substituição aos inseticidas químicos. Os vírus da família Baculoviridae têm sido isolados de mais de 700 invertebrados, incluindo as ordens Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Neuroptera, Trichoptera e Thysanura, assim como em Crustaceae (Murphy et al., 1995; citado por Moscardi, 1999). Algumas de suas características, como especificidade e segurança para organismos não alvos, fazem com que os Baculovírus se tornem agentes desejáveis nos programas de manejo integrado de pragas (Moscardi, 1999).

De acordo com Alves (1986) os vírus podem ser utilizados de três maneiras no controle de pragas florestais: como inseticidas microbiológicos, ou em colonização, ou em programas de manejo integrado. O inseticida microbiológico atua independentemente da densidade populacional da praga, devido às doses relativamente altas. Já a colonização baseia-se na transferência de pequena quantidade de inóculo através da introdução de insetos contaminados, cadáveres ou pulverizações do inóculo em populações sadias. O manejo integrado se dá pela interação entre grupos de patógenos, patógenos com parasitos e predadores, e a pouco estudada associação entre patógenos e defensivos agrícolas.

O manejo integrado de pragas (MIP) é mais ambientalmente seguro do que as tentativas para erradicar completamente as pragas usando o controle químico, assim o controle biológico é mais utilizado em programas de MIP (Hollander, 1991).

Inseticidas microbianos são rapidamente inativados na superfície de folhas ou acículas quando comparados à persistência dos inseticidas químicos, portanto, a

escolha do momento das aplicações é mais crítica. Geralmente os inseticidas biológicos ou microbianos são menos utilizados que seus correspondentes químicos, mas podem ser tão efetivos quando aplicados devidamente (Cunningham, 1990).

Howarth (1980), citado por Hollander (1991), explica que todos os inseticidas químicos são ambientalmente nocivos. O controle químico possui efeitos tóxicos tanto ao homem quanto aos animais, portanto, a substituição pelo controle biológico traria segurança, maior seletividade e benefícios ecológicos. Por exemplo, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* é um agente de controle biológico contra pragas da ordem Lepidoptera, porém não é tóxico a insetos não lepidópteros, e não causa efeitos em vertebrados (Miller et al., 1983; citado por Hollander, 1991).

O método de controle mais empregado para se controlar as áreas com surtos de *T. arnobia* é o controle microbiano, com a aplicação de *B. thuringiensis*, e vários trabalhos já foram realizados testando-se diferentes formulações deste entomopatógeno (Anjos et al., 1987; Ribeiro & Oliveira, 1987; Alves & Wilcken, 1990). Contudo, a resistência de insetos a inseticidas microbianos à base de *B. thuringiensis* foi estudada e constatada por Tabashnik (1994).

Wilcken & Orlato (1998) afirmam que uma alternativa com potencial futuro para o controle biológico da lagarta parda *T. arnobia* em florestas de eucalipto é a utilização de vírus entomopatogênico como bioinseticida.

Comparando-se vírus com *B. thuringiensis*, encontram-se vantagens e desvantagens. Os vírus são altamente específicos a seus hospedeiros e, geralmente, um vírus diferente tem que ser desenvolvido para cada praga. O grande problema com os vírus é que eles devem reproduzir-se em células vivas, enquanto *B. thuringiensis* pode ser produzido pela

fermentação. A principal vantagem no uso de baculovírus em florestas é o fato de que alguns causam epizootias (Cunningham, 1990).

Huber (1986) relata que as formulações comerciais de bioinseticidas virais são geralmente aplicadas via aérea, com níveis de controle excelentes, superiores aos obtidos com *B. thuringiensis*.

Moscardi et al. (1996), ao avaliarem a atividade do vírus de poliedrose nuclear após a sua passagem pelo trato digestivo de sete insetos predadores, sendo eles *Nabis capsiformis* e *Podisus* sp. (Hemiptera); duas espécies de *Callida* spp., *Calosoma granulatum*, *Eriopis connexa* e *Lebia concinna* (Coleoptera), constataram que os sete predadores eliminaram poliedros de NPV de *A. gemmatilis* altamente infectivos, com maior quantidade detectável nas primeiras 24 horas. Esses autores citam ainda que no caso de *C. granulatum*, 93 % dos corpos poliédricos de inclusão (PIB) foram excretados em 24 horas. Os predadores, ao ingerirem as lagartas de *A. gemmatilis* infectadas pelo NPV, tornam-se importantes agentes disseminadores, o que contribui para a promoção de epizootias do patógeno em populações da praga.

Os vírus podem ser disseminados no ambiente por agentes que atuam no controle biológico de pragas. Insetos predadores de lepidópteros, quando se alimentam de indivíduos contaminados, eliminam em seus excrementos grande quantidade de vírus. Excrementos do predador *Montina confusa* (Hemiptera: Reduviidae), após este se alimentar de lagartas de *T. arnobia* infectadas com vírus, foram diluídos em água destilada e a suspensão obtida foi pincelada sobre folhas de *E. grandis*. Em seguida, as folhas foram oferecidas a lagartas sadias de *T. arnobia*, sendo que as mesmas contaminaram-se pelo vírus após a ingestão do alimento, morrendo posteriormente (Orlato & Wilcken, 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia Florestal do Departamento de Produção Vegetal, Setor de Defesa Fitossanitária, e em área experimental de floresta de *Eucalyptus grandis*, na Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Botucatu – SP. Os experimentos de laboratório foram conduzidos em sala climatizada (temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 13 horas). Simultaneamente, foi criada *T. arnobia* em dieta artificial, conforme metodologia desenvolvida por Wilcken (1996).

3.1. Criação de Manutenção

Ovos de *T. arnobia* foram obtidos de uma criação em dieta artificial mantida no Laboratório de Entomologia Florestal. Nesta criação, adultos machos e fêmeas de *T. arnobia* foram mantidos em tubos de PVC de 20,0 cm de altura x 10,0 cm de diâmetro,

ferrados com papel jornal. As posturas foram desinfetadas com formol 1% durante 15 minutos e enxaguadas com água destilada, sendo colocadas em copos plásticos de 7,8 cm de altura x 4,3 cm de diâmetro, fechados com tampa de pressão, os quais foram mantidos no laboratório.

Após a eclosão das lagartas, as mesmas foram transferidas com pincel (nº 0) para tubos de vidro de fundo chato, de 8,5 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro, sendo colocadas 5 lagartas em cada tubo contendo dieta artificial (quadro 1) proposta por Wilcken (1996).

Quadro 1. Componentes da dieta artificial utilizada para a criação de *Thyrinteina arnobia*.

Componentes	Quantidade para 1 litro
Germe de trigo	12,50 g
Levedura de cerveja	9,00 g
Farinha de milho	67,30 g
Farelo de soja	25,50 g
Leite desnatado	5,30 g
Óleo de soja	5,30 ml
Sais de Wesson	2,00 g
Solução vitamínica de Vanderzant	0,10 ml
Nipagin	1,35 g
Ácido ascórbico	3,60 g
Ácido sórbico	0,68 g
Formaldeído	0,50 ml
Ágar	16,00 g
Água destilada	844,00 ml

Wilcken (1996), modificada de Grisdale, (1985)

As lagartas foram mantidas nestas condições até atingirem o 3º ínstar, quando foram individualizadas e transferidas para outro tubo de dieta com as mesmas dimensões do anteriormente citado, contendo a mesma dieta artificial. Assim que as lagartas atingiram a fase de pupa, foram transferidas para tubos de PVC, conforme descrito anteriormente.

3.2. Descrição da metodologia de multiplicação do vírus

Lagartas de *T. arnobia* infectadas com vírus, provenientes de áreas de *E. grandis* nas regiões de Botucatu e Itatinga – SP (1995), e de Lençóis Paulista - SP (1996), foram coletadas durante surtos ocorridos nestas localidades, sendo levadas ao laboratório para armazenamento em freezer, a uma temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, objetivando-se a multiplicação do vírus.

Dez lagartas contaminadas de *T. arnobia*, de 4^o e 5^o ínstaes, foram descongeladas e, em seguida, maceradas em pistilo e gral, adicionando-se gradativamente 20 ml de água esterilizada. A suspensão obtida foi filtrada em papel-filtro e, após isso, foram adicionados mais 80 ml de água esterilizada e 1 ml de espalhante adesivo “tween 20”.

Foram utilizadas lagartas de *T. arnobia* de 4^o ínstar, provenientes da criação estoque mantida em laboratório, em lotes de 100 insetos para cada ensaio de multiplicação do vírus, sendo transferidas de tubos de vidro contendo dieta artificial, para placas plásticas de 6 cm de diâmetro x 2 cm de altura.

Para as lagartas, foram oferecidas folhas de *E. grandis* durante um período de 24 horas, sendo as folhas previamente lavadas e desinfetadas com hipoclorito de sódio, numa fase de adaptação ao novo alimento. No dia seguinte, folhas tratadas com a suspensão viral foram oferecidas às lagartas. A aplicação do vírus foi realizada com uma micropipeta, sendo pipetados 100 μl da suspensão viral em cada folha. Em seguida, o vírus foi espalhado sobre a superfície de cada folha com um pincel, sendo as mesmas deixadas secando ao ar livre, antes de serem oferecidas às lagartas. A troca de alimento foi realizada a cada dois dias, oferecendo-se novas folhas, não infectadas com vírus.

Os ensaios foram conduzidos em sala climatizada (temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 13 horas). Lagartas mortas durante os ensaios foram coletadas diariamente e armazenadas em freezer (-10 °C), sendo utilizadas em novas multiplicações do vírus e, posteriormente, no processo de purificação do vírus.

3.3. Descrição e adaptação da metodologia de purificação do vírus

Lagartas mortas no laboratório (com peso total de 20,15 g), em ensaios de multiplicação do vírus, foram maceradas e misturadas com tampão fosfato (KH_2PO_4 e Na_2HPO_4) 0,1M, pH 7,1; 10 ml/g de tecido de lagarta, de acordo com a metodologia de purificação desenvolvida por Nakashima et al. (1998); adaptada de Williamson and von Wechmar (1992). A suspensão viral foi coada em gaze e em seguida filtrada em celite “diatomaceous earth” e centrifugada a 10.000 g (8.000 rpm, em centrífuga mod. Sorvall ss-4, rotor ss 34) por 20 min. O sobrenadante foi centrifugado em colchão de sacarose a 100.000 g (29.500 rpm, em centrífuga mod. Beckman L8-60M, rotor T30) por 2 horas. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato, pH 7,1, e adicionado em gradiente de cloreto de cério (CsCl) a 34 % e centrifugado a 150.000 g (39.500 rpm, em centrífuga mod. Beckman L8-60M, rotor SW41) por 16 horas, conforme metodologias de Chao et al. (1983), Chao et al. (1986), Nakashima et al. (1998), com adaptações por Nascimento (2001). A banda formada no gradiente de cloreto de cério foi coletada e armazenada. Foi realizada diálise em tampão fosfato 0,1M, diluído 10 X, ou seja, 150 ml de tampão fosfato 0,1M para 1350 ml de água destilada, a 4 °C, por 18 horas, com 3 trocas de tampão a cada 6 horas, utilizando-se

membrana de celulose com uma porosidade de 25 Å. Em seguida, o vírus purificado concentrado foi coletado e armazenado em freezer a -20°C , para avaliações posteriores.

3.4. Microscopia eletrônica

Extratos brutos, semi purificados e purificados, foram obtidos a partir de lagartas sadias de *T. arnobia* e de lagartas infectadas em bioensaios de multiplicação do vírus. As preparações foram transferidas para telinhas de cobre cobertas com formvar e, posteriormente, contrastadas negativamente com acetato de uranila 1%, em seguida foram examinadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, do Departamento de Produção Vegetal – FCA / UNESP (técnica de imersão foliar rápida “leaf dip”), sendo visualizada uma grande quantidade de vírus isométricos, cujas partículas mediam aproximadamente de 25 a 30 nm (nanômetros) de diâmetro.

3.5. Quantificação do vírus no extrato purificado concentrado e nas suas diluições

Para a quantificação do TaV (Thyrinteina arnobia vírus) no extrato purificado concentrado e nas suas diluições, respectivamente, 1:50 e 1:100, foi utilizado um coeficiente de extinção do vírus ($c.e.v = 1,7$), baseado no coeficiente de extinção encontrado por Longworth et al. (1973) para o vírus do lepidóptero *Gonometa podocarpi* (GoV), um vírus da família Picornaviridae (provável família do TaV), constituído de partículas isométricas de 30 nm.

Amostras do purificado concentrado e de suas diluições foram submetidas à leitura da absorvância (Abs_{260}) em espectrofotômetro no Departamento de Produção Vegetal – FCA / UNESP, para quantificação das partículas virais, em comparação à água esterilizada pura (padrão). O vírus purificado concentrado apresentou um aumento no valor da absorvância no comprimento de onda (λ) de 260 ($Abs_{260} = 2,7$), evoluindo para o pico de absorvância, conforme demonstrado na Figura 1.

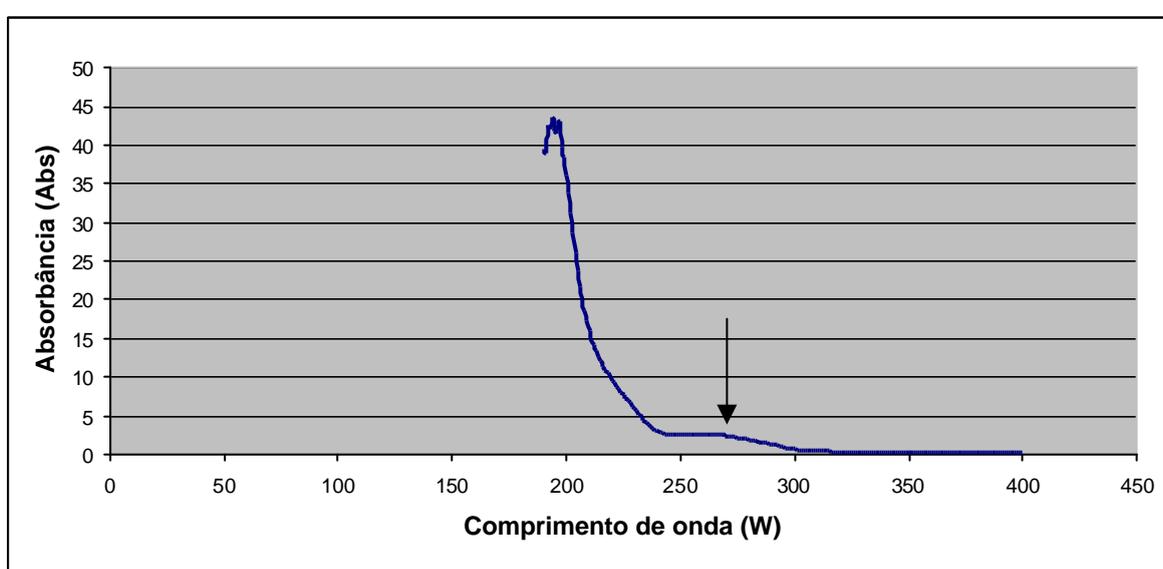


Figura 1. Valores de absorvância (Abs) em relação ao comprimento de onda (λ), após leitura do TaV purificado concentrado no espectrofotômetro. Botucatu, 2001.

No comprimento de onda (λ) de 260, as leituras de absorvância (Abs_{260}) obtidas para o purificado concentrado e suas diluições foram: purificado concentrado = 2,7, diluição 1:50 = 1,83 e diluição 1:100 = 1,03. A concentração estimada de vírus para as três amostras foi calculada através da fórmula $[] = Abs_{260} / c.e.v.$, onde: $[]$ = concentração estimada de partículas de vírus (mg / ml); Abs_{260} = valor da absorvância no comprimento de onda (λ) de 260; $c.e.v.$ = coeficiente de extinção do vírus (1,7). Foram obtidas as seguintes concentrações estimadas de vírus (mg de partículas de vírus / ml de suspensão): vírus

purificado concentrado = 1,59 mg / ml; diluição 1:50 = 1,08 mg / ml; diluição 1:100 = 0,61 mg / ml.

3.6. Bioensaios para avaliação do TaV (Thyrinteina arnobia vírus)

A metodologia para os bioensaios de laboratório, descrita a seguir, foi baseada e modificada a partir das metodologias utilizadas por Morales & Moscardi (1993) e Sant'ana & Silva (1994).

3.6.1. Bioensaio para avaliação da patogenicidade do TaV sobre os ínstares larvais de *T. arnobia*

Foi avaliada a patogenicidade do TaV sobre lagartas de *T. arnobia* de 2º, 3º, 4º e 5º ínstares larvais. Foram utilizadas lagartas provenientes da criação em dieta artificial, mantidas no laboratório.

O TaV foi obtido de lagartas de *T. arnobia* contaminadas em ensaios de multiplicação do vírus, mantidas em freezer a uma temperatura de -10 °C, sendo submetido ao processo de purificação do vírus, um único lote de lagartas, com peso total de 20,15 g.

Para a instalação do bioensaio de avaliação da patogenicidade do TaV sobre larvas de diferentes ínstares de *T. arnobia*, foram preparadas duas diluições do vírus, tomando-se alíquotas do extrato de vírus purificado concentrado (1,59 mg de partículas de vírus / ml de suspensão). Com uma micropipeta foram retiradas duas alíquotas do vírus purificado concentrado, uma de 200 µl e outra de 100 µl. Em seguida foram adicionados, a

cada uma das alíquotas, 10 ml de água esterilizada e 0,1 ml de espalhante adesivo “tween 20”, resultando nas diluições preparadas de 1:50 (1,08 mg / ml) e de 1:100 (0,61 mg / ml), respectivamente.

O bioensaio foi instalado utilizando-se de 150 lagartas para cada ínstar larval de *T. arnobia*, sendo 50 lagartas para cada concentração de vírus e 50 para a testemunha, num total de 600 lagartas utilizadas ao longo do período de avaliação. O bioensaio foi instalado em duas etapas distintas, a primeira avaliando-se o 2º e 3º ínstars e a segunda avaliando-se o 4º e 5º ínstars.

As lagartas de *T. arnobia* foram transferidas de tubos de vidro contendo dieta artificial, para placas plásticas de 6 cm de diâmetro x 2 cm de altura, sendo acondicionadas individualmente. Para cada lagarta mantida nas placas, foram oferecidas folhas de *E. grandis* durante um período de 24 horas, sendo as folhas previamente lavadas e desinfetadas com hipoclorito de sódio (0,5 %), numa fase de adaptação ao novo alimento.

No dia seguinte foram oferecidos discos de folhas infectados com vírus, com 2,4 cm de diâmetro e área foliar de 4,52 cm², durante um período de 24 a 48 horas, para que ocorresse a ingestão total do alimento. De acordo com a concentração de vírus testada, em cada disco de folha foi previamente pipetado 40 µl da suspensão viral, os quais foram espalhados sobre a superfície com um pincel, sendo os discos deixados secando ao ar livre, antes de serem oferecidos às lagartas. Para as testemunhas foram oferecidos discos de folhas sem vírus. A troca de alimento foi realizada a cada 48 horas, fornecendo-se novos discos não tratados para todas as lagartas.

A escolha de *E. grandis* como alimento se deve aos resultados encontrados por Wilcken (1996), que verificou que *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. grandis* e *E.*

cloeziana oferecem condições favoráveis para o desenvolvimento e reprodução de *T. arnobia*. *E. grandis* é também a espécie mais plantada no Brasil entre as demais espécies do gênero *Eucalyptus*.

O bioensaio foi conduzido em sala climatizada. Os dados foram coletados diariamente, sendo avaliados a mudança de ínstar (24 a 48 horas após a instalação do teste), os sintomas de contaminação (excrementos pastosos e regurgitação), a mortalidade e a pupação.

O delineamento experimental utilizado para o bioensaio foi inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

3.6.2. Experimentos de semi-campo para avaliação do TaV sobre lagartas de *T. arnobia*

Os experimentos de semi-campo foram conduzidos numa área experimental de floresta de *E. grandis*, na FCA / UNESP, em Botucatu – SP. Foram instalados dois experimentos de campo para a avaliação do vírus sob condições ambientais variáveis, em setembro de 2000 (inverno) e março de 2001 (verão).

Durante os experimentos, os dados meteorológicos foram registrados, sendo fornecidos pela estação meteorológica do Setor de Agricultura e Melhoramento Vegetal da FCA / UNESP, localizada a cerca de 100 m da área experimental. A execução dos experimentos foi baseada na metodologia utilizada por Van Frankenhuyzen & Nystron (1989), modificada.

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas distintas, sendo que a 1ª consistiu na pulverização (costal motorizado) da suspensão de vírus sobre as plantas no campo e na coleta programada das folhas pulverizadas para, na 2ª etapa, serem utilizadas na instalação de bioensaios de laboratório, com lagartas de *T. arnobia*. A área experimental era constituída de plantas de *E. grandis*, com cerca de 1 ano de idade, livres de pragas e doenças.

Para o preparo da suspensão de TaV foram utilizadas lagartas de *T. arnobia* de 4º ínstar, preservadas em freezer, as quais foram infectadas e mortas por diluições do vírus purificado concentrado, durante o bioensaio de avaliação da patogenicidade do TaV sobre os ínstars larvais de *T. arnobia*.

O vírus purificado concentrado (1,59 mg de partículas de vírus / ml de suspensão) foi obtido a partir de 20,15 g de lagartas mortas em ensaios de multiplicação do vírus. Desta forma, através da extrapolação dos dados do vírus purificado concentrado (peso de lagartas e concentração do vírus), foram estimadas as concentrações de vírus aplicadas durante as pulverizações no campo.

Para a preparação da suspensão viral, as lagartas foram descongeladas e, em seguida, maceradas em pistilo e gral, adicionando-se gradativamente 20 ml de água esterilizada. Após filtragem em papel-filtro, a suspensão obtida foi misturada dentro do tanque do pulverizador costal, com 10 l d'água e 10 ml de espalhante adesivo "tween 20".

O 1º experimento de campo foi instalado em setembro de 2000, no final do inverno, numa parcela de 200 m² (10 x 20 m), contendo 33 brotações de *E. grandis*, com aproximadamente 2 m de altura. Foi aplicada uma dose de 25 g de lagartas por hectare, correspondente a uma concentração estimada de 1,97 mg de partículas de vírus / ml de

suspensão (quadro 2). Foi também delimitada uma parcela testemunha, com as mesmas dimensões da parcela tratada com vírus. A instalação do experimento e as coletas de folhas foram conduzidas a uma temperatura média (T °C) de 16,5 °C e umidade relativa do ar média (UR %) de 70,2 %, com uma precipitação acumulada de 3 mm para o período de 8 dias.

O 2º experimento de campo foi instalado em março de 2001, no final do verão, sendo aplicadas duas doses distintas, uma em cada parcela de 200 m² (10 x 20 m), cada uma contendo 33 brotações de *E. grandis*, com aproximadamente 2 m de altura. A primeira dose aplicada foi de 25 g de lagartas por hectare, correspondente a uma concentração estimada de 1,97 mg de partículas de vírus / ml de suspensão e a segunda de 50 g de lagartas por hectare, correspondente a uma concentração estimada de 3,95 mg de partículas de vírus / ml de suspensão (quadro 2). Foi também delimitada uma parcela testemunha, com as mesmas dimensões das parcelas tratadas com vírus. A instalação do experimento e as coletas de folhas foram conduzidas a uma temperatura média (T °C) de 21,5 °C e umidade relativa do ar média (UR %) de 75,1 %, com uma precipitação acumulada de 7,8 mm para o período de 8 dias.

Quadro 2. Concentrações de TaV utilizadas (mg / ml), temperatura média (T °C), umidade relativa média (UR %) e precipitação acumulada (P mm) para o período de 8 dias, nos experimentos de campo. Botucatu – SP, setembro / 2000 e março / 2001.

Experimentos de semi-campo	Tratamento 1	Tratamento 2	T (°C)	UR (%)	P (mm)
Setembro / 2000 (inverno)	1,97 mg / ml	-	16,5	70,2	3
Março / 2001 (verão)	1,97 mg / ml	3,95 mg / ml	21,5	75,1	7,8

Cada uma das parcelas experimentais foi pulverizada com vírus (TaV), utilizando-se de um pulverizador costal motorizado, modelo Polijacto PL-55, com bocal de

atomização UBV. O volume de calda aplicado foi equivalente a 500 l / ha, para garantir o bom molhamento das copas de todas as plantas dentro das parcelas.

As folhas pulverizadas foram coletadas no dia da aplicação, e com 1, 2, 3, 5 e 7 dias após a pulverização, sendo levadas para o laboratório para instalação dos bioensaios de avaliação do TaV sobre lagartas de *T. arnobia*. Foi instalado um bioensaio para cada dia de coleta de folhas, sendo utilizadas 25 lagartas de 4º ínstar para cada dose de vírus aplicada e 25 para a testemunha.

Para a instalação dos bioensaios no laboratório, lagartas de *T. arnobia*, de 4º ínstar, foram transferidas de tubos de vidro contendo deta artificial, para placas plásticas de 6 cm de diâmetro x 2 cm de altura, sendo acondicionadas individualmente. Para cada lagarta mantida nas placas, foram oferecidas folhas de *E. grandis* durante um período de 24 horas, sendo as folhas previamente lavadas e desinfetadas com hipoclorito de sódio (0,5 %).

Após esta fase de adaptação ao novo alimento, foram oferecidas folhas pulverizadas com vírus por um período de 48 horas, provenientes da área experimental, de acordo com cada dia de coleta no campo. Para a testemunha foram oferecidas folhas não pulverizadas com o vírus. A troca de alimento foi realizada a cada 48 horas, fornecendo-se novas folhas não pulverizadas para todas as lagartas.

Os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada. Os dados foram coletados diariamente, sendo avaliados a mudança de ínstar (24 a 48 horas após a instalação do teste), os sintomas de contaminação (excrementos pastosos e regurgitação), a mortalidade e a pupação.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de Probit e o TL₅₀ (tempo letal 50 %) foi determinado para os dois experimentos e suas respectivas concentrações de partículas de vírus, em relação aos dias de coleta de folhas de *E. grandis*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bioensaio para avaliação da patogenicidade do TaV sobre os ínstaes larvais de *Thyrinteina arnobia*

Os resultados demonstram que o TaV foi capaz de infectar e matar lagartas de *T. arnobia* de 2º, 3º, 4º e 5º ínstaes larvais, em condições de laboratório (quadros 3, 4, 5 e 6 e figuras 2 e 3). Os sintomas de contaminação, que consistiram de excrementos pastosos e regurgitação, foram observados em 100 % das lagartas que ingeriram folhas de *E. grandis* contaminadas com vírus. Também foi constatada uma alta mortalidade para as lagartas infectadas, apresentando taxas que variaram de 90 a 100 %.

Quadro 3. Porcentagem acumulada de lagartas do 2º ínstar de *T. arnobia* mortas pelo TaV (M) e com sintomas de contaminação pelo TaV (S), para as duas concentrações de vírus utilizadas (1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml). Botucatu – SP, junho / 2000.

AVALIAÇÃO	4 DIAS		5 DIAS		6 DIAS		7 DIAS		8 DIAS		9 DIAS	
	S *	M *	S *	M *	S *	M *	S	M *	S	M	S *	M *
1 V _{1:50} (1,08 mg/ml)	0,28 a	0,06 a	0,74 a	0,26 a	0,88 a	0,34 a	0,94 a	0,70 a	0,98 a	0,94 a	1,00 a	1,00 a
2 V _{1:100} (0,61 mg/ml)	0,22 a	0,04 a	0,64 a	0,12 ab	0,84 a	0,26 a	0,94 a	0,56 a	0,96 a	0,82 b	1,00 a	1,00 a
3 Testemunha	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b
CV (%)	12,69	6,58	10,45	13,23	5,23	13,98	12,59	9,32	9,41	17,36	0,03	0,03
DMS (5 %)	0,197	0,082	0,233	0,203	0,135	0,235	0,088	0,201	0,068	0,113	0,0003	0,0003

Obs: Dados seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * Dados transformados em raiz quadrada de $x + 0,5$.

Quadro 4. Porcentagem acumulada de lagartas do 3º ínstar de *T. arnobia* mortas pelo TaV (M) e com sintomas de contaminação pelo TaV (S), para as duas concentrações de vírus utilizadas (1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml). Botucatu – SP, junho / 2000.

AVALIAÇÃO	6 DIAS		7 DIAS		8 DIAS		9 DIAS		10 DIAS		11 DIAS		12 DIAS		13 DIAS	
	S *	M *	S *	M *	S *	M *	S *	M *	S *	M *	S	M *	S *	M *	S *	M
1 V _{1:50} (1,08 mg/ml)	0,30 a	0,06 a	0,40 a	0,20 a	0,62 a	0,28 a	0,70 a	0,38 a	0,74 a	0,44 a	0,96 a	0,60 a	1,00 a	0,82 a	1,00 a	0,96 a
2 V _{1:100} (0,61 mg/ml)	0,28 a	0,00 a	0,30 a	0,02 b	0,42 b	0,06 b	0,60 a	0,14 b	0,66 a	0,22 b	0,96 a	0,44 a	1,00 a	0,74 a	1,00 a	0,90 a
3 Testemunha	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 c	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b
CV (%)	13,15	5,02	12,70	6,93	10,15	9,38	8,98	9,58	8,73	11,77	10,76	9,30	0,03	5,71	0,03	12,57
DMS (5 %)	0,213	0,062	0,220	0,095	0,199	0,138	0,203	0,154	0,201	0,203	0,076	0,189	0,0003	0,142	0,0003	0,087

Obs: Dados seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * Dados transformados em raiz quadrada de $x + 0,5$.

Quadro 5. Porcentagem acumulada de lagartas do 4º ínstar de *T. arnobia* mortas pelo TaV (M) e com sintomas de contaminação pelo TaV (S), para as duas concentrações de vírus utilizadas (1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml). Botucatu – SP, junho / 2000.

AVALIAÇÃO	6 DIAS		7 DIAS		8 DIAS		9 DIAS		10 DIAS		11 DIAS		15 DIAS		17 DIAS	
	S *	M *	S *	M *	S *	M *	S	M *	S	M *	S *	M *	S *	M *	S *	M
1 V_{1:50} (1,08 mg/ml)	0,46 a	0,04 a	0,68 a	0,06 a	0,86 a	0,08 a	0,94 a	0,18 a	1,00 a	0,30 a	1,00 a	0,42 a	1,00 a	0,84 a	1,00 a	0,98 a
2 V_{1:100} (0,61 mg/ml)	0,40 a	0,00 a	0,72 a	0,02 a	0,90 a	0,04 a	0,92 a	0,16 ab	0,96 a	0,32 a	1,00 a	0,50 a	1,00 a	0,84 a	1,00 a	0,96 a
3 Testemunha	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,00 b				
CV (%)	10,17	6,17	8,02	7,35	5,36	8,04	15,83	11,97	7,45	13,76	0,03	12,26	0,03	6,54	0,03	9,41
DMS (5 %)	0,192	0,081	0,185	0,095	0,139	0,105	0,109	0,174	0,054	0,230	0,0003	0,232	0,0003	0,163	0,0003	0,068

Obs: Dados seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * Dados transformados em raiz quadrada de $x + 0,5$.

Quadro 6. Porcentagem acumulada de lagartas do 5º ínstar de *T. arnobia* mortas pelo TaV (M) e com sintomas de contaminação pelo TaV (S), para as duas concentrações de vírus utilizadas (1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml). Botucatu – SP, junho / 2000.

AVALIAÇÃO	7 DIAS		9 DIAS		11 DIAS		15 DIAS		17 DIAS		18 DIAS		20 DIAS	
	S *	M *	S	M *	S *	M *	S *	M *	S *	M *	S *	M *	S *	M
1 V_{1:50} (1,08 mg/ml)	0,68 a	0,00 a	0,84 a	0,06 a	1,00 a	0,12 a	1,00 a	0,38 a	1,00 a	0,66 a	1,00 a	0,80 a	1,00 a	0,96 a
2 V_{1:100} (0,61 mg/ml)	0,80 a	0,04 a	0,90 a	0,06 a	1,00 a	0,14 a	1,00 a	0,36 a	1,00 a	0,56 a	1,00 a	0,64 a	1,00 a	0,90 a
3 Testemunha	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 b						
CV (%)	7,31	6,17	16,39	8,17	0,03	12,36	0,03	8,96	0,03	8,36	0,03	7,83	0,03	12,57
DMS (5 %)	0,173	0,081	0,106	0,106	0,0003	0,184	0,0003	0,163	0,0003	0,180	0,0003	0,179	0,0003	0,087

Obs: Dados seguidos por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. * Dados transformados em raiz quadrada de $x + 0,5$.

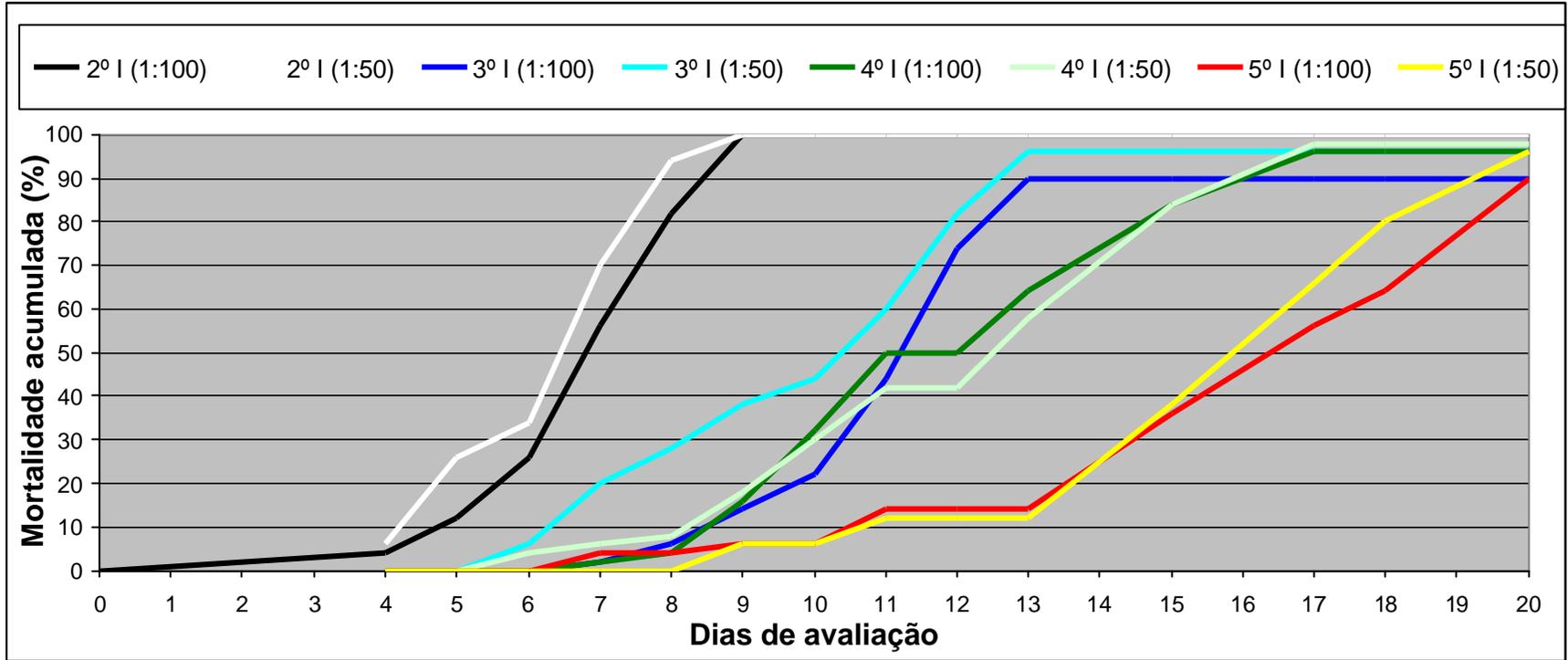


Figura 2. Mortalidade acumulada (%) de lagartas de *T. arnobia* (2^o, 3^o, 4^o e 5^o ínstars), em relação as duas concentrações de vírus utilizadas (1:100 = 0,61 mg / ml e 1:50 = 1,08 mg / ml), para os diferentes dias de avaliação. Botucatu - SP, junho / 2000.

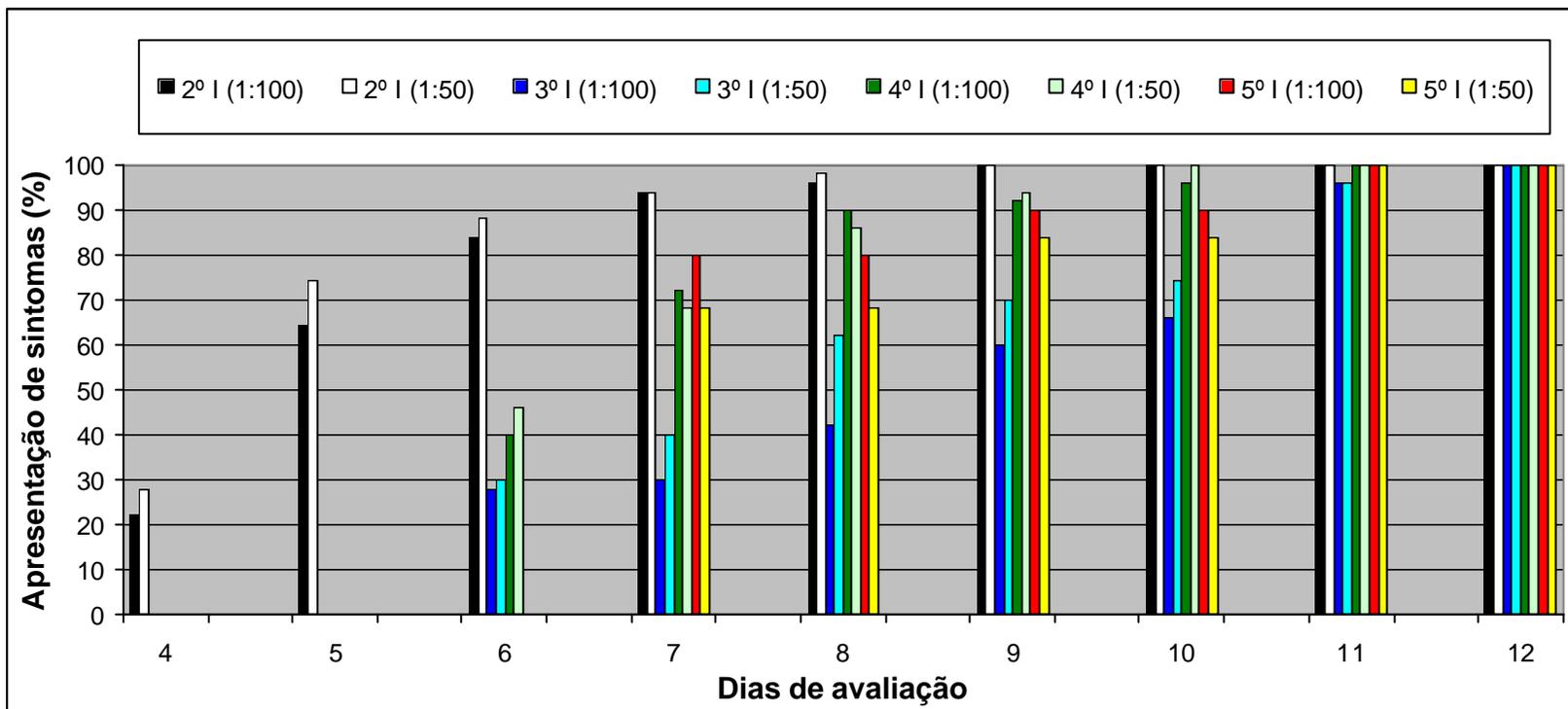


Figura 3. Apresentação acumulada de sintomas (%) em lagartas de *T. arnobia* (2º, 3º, 4º e 5º ínstars), em relação às duas concentrações de vírus utilizadas (1:100 = 0,61 mg / ml e 1:50 = 1,08 mg / ml), para os diferentes dias de avaliação. Botucatu - SP, junho / 2000.

4.1.1. Sintomas de contaminação pelo TaV em lagartas de *T. arnobia*

Lagartas de *T. arnobia* de 2º, 3º, 4º e 5º ínstars, infectadas pelo TaV, ficaram moribundas, tornando-se mais lentas em seus movimentos, comparadas às lagartas sadias. A perda da capacidade de movimentação, e a parada total do consumo alimentar, foram os primeiros sintomas verificados nas lagartas doentes, sendo que, em 25 % das lagartas de 2º ínstar, foram observados excrementos pastosos e regurgitação.

A parada total do consumo alimentar é o sintoma de contaminação mais importante do ponto de vista econômico, indicando que as lagartas que se apresentam nesta condição não causarão mais desfolha em florestas de *Eucalyptus*, independentemente do tempo que levarão para morrer devido à ação do vírus (quadro 7).

Quadro 7. Frequência de lagartas de *T. arnobia* de 2º, 3º, 4º e 5º ínstars que apresentaram parada total do consumo alimentar, para as duas concentrações de TaV utilizadas (1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml). Botucatu – SP, junho / 2000.

AVALIAÇÃO	4 DIAS		5 DIAS		6 DIAS	
	1,08	0,61	1,08	0,61	1,08	0,61
<i>T. arnobia</i> (2º ínstar)	100 %	100 %	-	-	-	-
<i>T. arnobia</i> (3º ínstar)	96 %	90 %	-	-	-	-
<i>T. arnobia</i> (4º ínstar)	0	0	98 %	96 %	-	-
<i>T. arnobia</i> (5º ínstar)	0	0	0	0	96 %	90 %

Para as lagartas restantes, de 3º, 4º e 5º ínstars, as quais não interromperam o consumo foliar até o sexto dia, ocorreu a parada total do consumo alimentar em avaliações subsequentes, assim como a apresentação de excrementos pastosos e regurgitação. Entretanto, estas lagartas consumiram uma reduzida área foliar do disco de

E. grandis tratado com vírus, possibilitando que as mesmas trocassem de ínstar e atingissem a fase de pupa, sendo também constatada, posteriormente, a emergência dos adultos em condições normais.

Moscardi & Carvalho (1993), estudando o consumo e utilização de folhas de soja por *A. gemmatilis*, infectadas por seu NPV nas doses de 0,5 e 15 PIB / mm², também verificaram uma redução significativa no consumo foliar por lagartas de 2º, 3º, 4º e 5º ínstars, em comparação com o consumo de lagartas sadias. A maior dose de NPV testada proporcionou a parada total do consumo alimentar em 95 % das lagartas de 2º ínstar, 60 % (3º ínstar), 50 % (4º ínstar) e 40 % (5º ínstar), no sexto dia após a infecção

Os sintomas de contaminação (excrementos pastosos e regurgitação) foram verificados inicialmente, em média, em 25 % das lagartas de 2º ínstar, no quarto dia de avaliação, e, posteriormente, em 86 e 100 %, respectivamente, para o sexto e o nono dia, não havendo diferença estatística entre as concentrações de 1,08 mg / ml e de 0,61 mg / ml (quadro 3).

Para as lagartas de 3º e 4º ínstars, os sintomas foram observados no sexto dia de avaliação, respectivamente, em cerca de 29 e 43 % delas. No oitavo dia, para as lagartas de 3º ínstar, foi verificada diferença estatística entre as concentrações de 1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml, sendo que 62 e 42 % das lagartas apresentaram os sintomas, respectivamente. Com doze dias, 100 % das lagartas haviam apresentado os sintomas. Para as lagartas de 4º ínstar, 100 % haviam apresentado os sintomas no décimo dia de avaliação (concentração de 1,08 mg / ml), e no décimo primeiro dia para a concentração de 0,61 mg / ml (quadros 4 e 5).

No sétimo dia de avaliação, em média, 74 % das lagartas de 5º instar apresentaram excrementos pastosos e regurgitação, e, no décimo primeiro dia, 100 % haviam apresentado os sintomas (quadro 6).

4.1.2. Mortalidade causada pelo TaV em lagartas de *T. arnobia*

Com relação à mortalidade proporcionada pelas duas concentrações de TaV testadas (1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml), foi verificada diferença estatística somente em algumas avaliações de lagartas de 2º e 3º ínstars, sendo que para as de 4º e 5º ínstars não houve diferença significativa entre as duas concentrações de vírus, mas apenas entre os tratamentos com vírus e a testemunha.

No quarto dia de avaliação foi observada uma taxa de mortalidade de 10 % em lagartas de 2º instar, sendo que, no oitavo dia houve diferença estatística entre as duas concentrações de vírus utilizadas, com taxas de 94 e 82 %, respectivamente, para as concentrações de 1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml. Com nove dias, 100 % das lagartas haviam morrido (figura 2).

As lagartas de 3º instar começaram a morrer no sexto dia de avaliação, apresentando 6 % de mortalidade para a concentração de partículas de vírus de 1,08 mg / ml. A concentração de 0,61 mg / ml provocou a morte de 2 % das lagartas, no sétimo dia. Nas avaliações de 7, 8, 9 e 10 dias, foram verificadas diferenças estatísticas entre os dois tratamentos, com taxas de mortalidade de 44 e 22 % no décimo dia, e de 96 e 90 % no décimo terceiro dia, respectivamente, para as concentrações de 1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml (figura 2).

Para o 4º ínstar, no sexto dia de avaliação, foi observada a taxa de mortalidade de 4 %, proporcionada pela concentração de 1,08 mg / ml. Já a concentração de 0,61 mg / ml causou a morte de 2 % das lagartas, no sétimo dia. Não houve diferença estatística entre os dois tratamentos, ao longo do período de avaliação. Com dezessete dias foi verificada a mortalidade de 98 e 96 % das lagartas, respectivamente, para as concentrações de 1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml (figura 2).

As primeiras mortes de lagartas de 5º ínstar foram provocadas pela concentração de partículas de vírus de 0,61 mg / ml, apresentando uma taxa de 4 %, no sétimo dia de avaliação. No nono dia, a concentração de 1,08 mg / ml provocou a morte de 6 % das lagartas. Não houve diferença estatística entre os dois tratamentos com vírus, ao longo do período de avaliação. No vigésimo dia, foi constatada a morte de 96 e 90 % das lagartas, respectivamente, para as concentrações de 1,08 mg / ml e 0,61 mg / ml (figura 2).

Gomez et al. (2001), estudando a suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu NPV, em distintos estádios larvais, constataram que lagartas dos dois primeiros ínstars não diferem em suscetibilidade. No entanto, verificaram que as lagartas de 2º ínstar são cerca de três e dezessete vezes mais suscetíveis que as de 3º e 4º ínstars, respectivamente. As lagartas de 5º e 6º ínstars apresentaram baixa suscetibilidade, mesmo a altas doses como as de 1.024.000 e 2.048.000 PIB / ml.

Em experimentos prévios foi constatado que lagartas de *T. arnobia*, de 2º, 3º, 4º e 5º ínstars, adoecem e morrem mais rapidamente quando se alimentam de folhas contaminadas com vírus obtido a partir de um extrato bruto de macerado de lagartas, de 4º e 5º ínstars, do que com vírus purificado concentrado, em condições de laboratório. A diferença nos resultados verificados foi significativa, em relação aos proporcionados pelas diluições do

vírus purificado concentrado (1:100 e 1:50), apresentando uma redução no tempo, em média, de 3 dias, dependendo do ínstar larval e do parâmetro avaliado.

Na suspensão obtida do macerado de lagartas existe provavelmente uma maior concentração de partículas de vírus (mg / ml) do que nas diluições obtidas do purificado concentrado. Nascimento (2001) cita que durante o processo de purificação ocorre uma inativação de parte das partículas de vírus, reduzindo a concentração de partículas viáveis no extrato purificado.

Batista Filho & Augusto (1987) realizaram um estudo em que compararam a eficiência do *Baculovirus anticarsia* (NPV) formulado como óleo emulsionável, do NPV purificado e do NPV impuro, no controle de *A. gemmatalis*, sendo verificado que o vírus impuro comprovou seu alto poder infectivo, causando mortalidade em 90 % das lagartas. Contudo, também foi constatado que o vírus purificado provocou uma mortalidade de 86,7 %.

De modo geral, em condições de laboratório, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o TaV foi eficiente no controle de lagartas de *T. arnobia*, principalmente quando foi considerada a parada total do consumo alimentar, que ocorreu em 4 dias para as lagartas de 2º e 3º ínstars, e em 5 e 6 dias para as de 4º e 5º, respectivamente.

Os resultados permitem afirmar que o efeito do TaV foi mais intenso sobre lagartas de 2º e 3º ínstars, contaminando e matando-as mais rapidamente, quando comparadas às de 4º e 5º ínstars.

A concentração de 1,08 mg / ml apresentou maior eficiência no controle de lagartas de 2º e 3º ínstars, diferindo estatisticamente da concentração de 0,61 mg /

ml em algumas avaliações. Apesar disto, ambas as concentrações proporcionaram altos índices de mortalidade na avaliação final, não havendo diferença estatística entre elas.

As lagartas de 2º ínstar foram mais suscetíveis a ação do vírus, apresentando uma alta taxa de mortalidade em curto espaço de tempo, sendo pouco evidente a fase de morbidez, na qual as lagartas, moribundas, não se alimentaram, eliminaram excrementos pastosos e regurgitaram líquidos.

As lagartas de 4º e 5º ínstars levaram maior tempo para desenvolver os sintomas da doença e para morrer, sendo que ambas as concentrações proporcionaram índices de controle semelhantes ao longo do período de avaliação. Nestes ínstars houve um prolongamento da fase de morbidez, resultando numa maior uniformidade na apresentação de sintomas pelas lagartas moribundas, e numa maior quantidade de excrementos pastosos excretados e de líquidos regurgitados, quando comparadas às lagartas de 2º e 3º ínstars.

Considerando que foram necessários 17 e 20 dias para serem observadas altas taxas de mortalidade, respectivamente, em lagartas de 4º e 5º ínstars, as concentrações de 1,08 mg / ml e de 0,61 mg / ml foram consideradas insuficientes, mas satisfatórias. Já Moscardi & Carvalho (1993), observaram um pico de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis* aos 7 dias após a infecção por NPV, na dose de 15 PIB / mm².

4.2. Experimentos de semi-campo para avaliação do TaV

O TaV permaneceu viável até 7 dias depois de aplicado no campo, infectando as lagartas de *T. arnobia* e causando mortalidade em cerca de 80 % delas. Apesar disto, foi verificado um aumento significativo no TL₅₀, em relação ao obtido para as coletas de folhas de 0, 1, 2, 3 e 5 dias após a aplicação do vírus no campo. Isto pode ser explicado, provavelmente, pela redução da atividade viral devido aos efeitos da radiação solar, especialmente os raios ultravioleta.

Alves et al. (2001), em testes com lagartas de *A. gemmatalis* que se alimentaram de folhas de soja infectadas no campo com extrato bruto de vírus, verificaram uma mortalidade de 20 % em lagartas que consumiram folhas coletadas com 3 dias após a aplicação, e de 13 %, com 6 dias.

No entanto, para o mesmo período, Batista Filho et al. (2001) observaram 78 % de mortalidade em lagartas de *A. gemmatalis*, e de 45 % nas que se alimentaram de folhas coletadas com 7 dias após a aplicação no campo.

Com relação ao 1º experimento de campo, realizado no final do inverno de 2000 (temperatura média de 16,5 °C, umidade relativa do ar média de 70,2 % e precipitação acumulada de 3 mm), os resultados apresentados no quadro 8 e na figura 4, demonstraram que o aumento do tempo letal (TL₅₀) foi diretamente proporcional ao aumento do período decorrido entre a aplicação do vírus e as coletas de folhas no campo.

Não houve diferença significativa entre os valores de TL₅₀ apresentados pelas duas primeiras coletas de folhas, de 0 dia e de 1 dia (TL₅₀ = 14,4 dias). O mesmo foi observado para as coletas de 2, 3 e 5 dias, que apresentaram um TL₅₀ de 16,4 dias. Já a coleta de folhas de 7 dias apresentou um TL₅₀ de 18,1 dias.

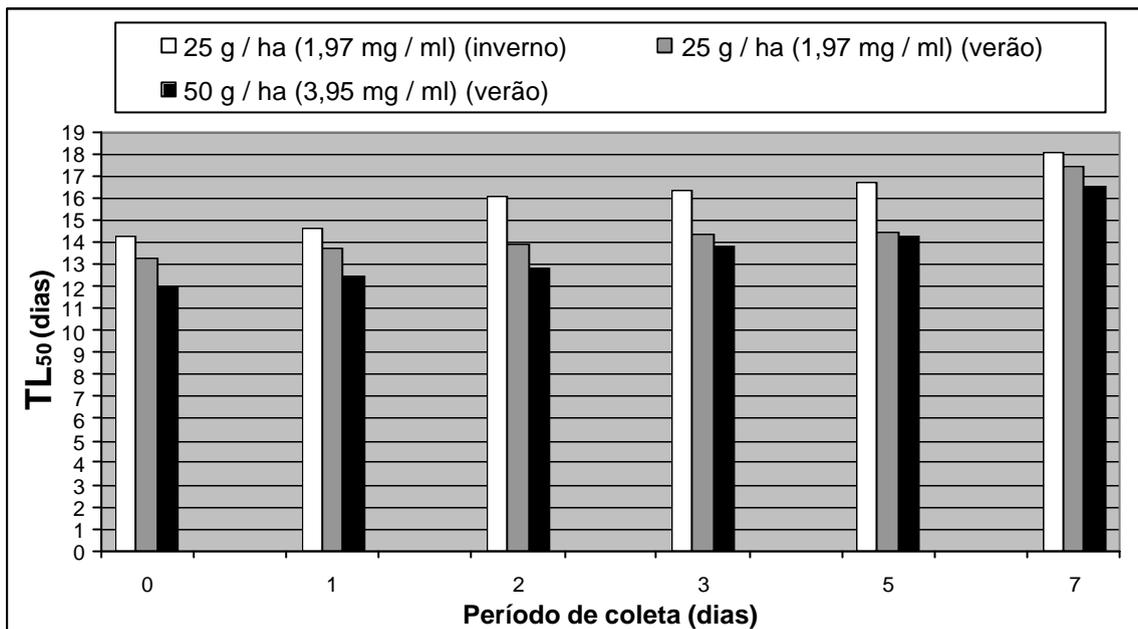


Figura 4. Tempo letal (TL_{50}) para lagartas de 4º ínstar de *T. arnobia* tratadas com TaV nas concentrações de 1,97 mg / ml (equivalente a 25 g de lagartas infectadas / ha) e de 3,95 mg / ml (equivalente a 50 g de lagartas infectadas / ha) em relação aos diferentes dias de coletas de folhas no campo, períodos de inverno e de verão. Botucatu – SP, setembro / 2000 e março / 2001.

De uma forma geral, os resultados demonstraram que o TaV foi capaz de infectar e matar lagartas de *T. arnobia* de 4º ínstar, mas o TL_{50} (tempo letal 50 %) foi considerado prolongado, sendo que os mais altos índices de mortalidade foram verificados, em média, aos 20 dias após as coletas de folhas e ingestão destas pelas lagartas, para ambos os experimentos, de inverno e de verão.

As taxas de mortalidade de *T. arnobia* aumentaram lentamente ao longo do período de avaliação, o mesmo sendo observado para os sintomas de contaminação, contudo, a parada total no consumo alimentar ocorreu, em média, 7 dias após a aplicação do TaV no campo, para as lagartas de 4º ínstar utilizadas nos experimentos de inverno e de verão.

Quadro 8. Tempo letal (TL₅₀) (dias) para lagartas de 4º ínstar de *T. arnobia* tratadas com TaV na concentração de 1,97 mg / ml (equivalente a 25 g de lagartas infectadas / ha) em relação aos diferentes dias de coletas de folhas no campo, período de inverno. Botucatu – SP, setembro / 2000.

COLETA DE FOLHAS	0 DIA	1 DIA	2 DIAS	3 DIAS	5 DIAS	7 DIAS
Tempo letal (TL ₅₀)	14,23	14,60	16,04	16,30	16,72	18,09
TL ₅₀ (limite inferior)	13,42	13,81	14,72	14,83	15,64	17,28
TL ₅₀ (limite superior)	15,19	15,67	17,61	18,58	17,86	19,05
C ² (qui-quadrado)	1,73	1,81	4,06	2,30	4,23	3,74
Graus de liberdade	8	8	7	7	9	10
Significância (0,95)	0,084	0,105	0,146	0,124	0,095	0,095

Obs: Análise de Probit. Valores de χ^2 (qui-quadrado) significativos ao nível de 5 % de probabilidade.

Quadro 9. Tempo letal (TL₅₀) (dias) para lagartas de 4º ínstar de *T. arnobia* tratadas com TaV nas concentrações de 1,97 mg / ml (equivalente a 25 g de lagartas infectadas / ha) e de 3,95 mg / ml (equivalente a 50 g de lagartas infectadas / ha) em relação aos diferentes dias de coletas de folhas no campo, período de verão. Botucatu – SP, março / 2001.

COLETA DE FOLHAS	0 DIA		1 DIA		2 DIAS		3 DIAS		5 DIAS		7 DIAS	
	V _{25 g / ha}	V _{50 g / ha}	V _{25 g / ha}	V _{50 g / ha}	V _{25 g / ha}	V _{50 g / ha}	V _{25 g / ha}	V _{50 g / ha}	V _{25 g / ha}	V _{50 g / ha}	V _{25 g / ha}	V _{50 g / ha}
Tempo letal (TL ₅₀)	13,30	12,01	13,74	12,41	13,90	12,84	14,31	13,82	14,46	14,25	17,43	16,52
TL ₅₀ (limite inferior)	12,38	11,19	12,93	11,52	12,71	11,43	13,19	12,96	13,63	13,10	16,08	15,29
TL ₅₀ (limite superior)	14,38	12,91	14,63	13,36	15,63	14,95	15,61	14,86	15,46	15,61	19,03	17,90
C ² (qui-quadrado)	1,66	3,56	1,35	0,41	11,79	22,78	3,86	7,15	8,69	7,47	5,33	5,89
Graus de liberdade	8	8	8	8	8	8	8	9	9	8	8	8
Significância (0,95)	0,065	0,055	0,066	0,061	0,138	0,255	0,064	0,066	0,066	0,064	0,074	0,067

Obs: Análise de Probit. Valores de χ^2 (qui-quadrado) significativos ao nível de 5 % de probabilidade.

Os valores de TL_{50} obtidos para os diferentes dias de coleta de folhas foram considerados altos, resultando num prolongado período para ser verificada a mortalidade de 50 % das lagartas de *T. arnobia*, em condições de laboratório. Os mais altos índices de mortalidade de *T. arnobia* variaram em torno de 80 %, para as diferentes coletas de folhas, levando, em média, 20 dias para que fossem obtidas estas taxas.

Com base nos resultados observados, pode-se afirmar que a dose de 25 g de lagartas por hectare, correspondente a uma concentração estimada de 1,97 mg de partículas de vírus / ml de suspensão / ha, foi considerada satisfatória no controle das lagartas de *T. arnobia* de 4º ínstar, que se alimentaram de folhas contaminadas, previamente coletadas com 0, 1, 3, 5 e 7 dias após a aplicação do TaV na área experimental. Com relação ao tempo necessário para que ocorresse a parada total do consumo alimentar, o período médio de 7 dias foi considerado satisfatório.

Com relação ao 2º experimento de campo, realizado no final do verão de 2001 (temperatura média de 21,5 °C, umidade relativa do ar média de 75,1 % e precipitação acumulada de 7,8 mm), os resultados apresentados no quadro 9 e na figura 4, também demonstraram que o aumento do tempo letal (TL_{50}) foi diretamente proporcional ao aumento do período decorrido entre a aplicação do vírus e as coletas de folhas no campo.

Para a dose de 25 g de lagartas por hectare, correspondente a uma concentração estimada de 1,97 mg de partículas de vírus / ml de suspensão, não foi verificada diferença significativa entre os valores de TL_{50} apresentados pelas coletas de folhas de 0, 1 e 2 dias ($TL_{50} = 13,6$ dias). O mesmo foi observado para as coletas de 3 e 5 dias, que apresentaram um TL_{50} de 14,4 dias. Já a coleta de folhas de 7 dias apresentou um TL_{50} de 17,4 dias.

Para a dose de 50 g de lagartas por hectare, correspondente a uma concentração estimada de 3,95 mg de partículas de vírus / ml de suspensão, também não foi verificada diferença significativa entre os valores de TL₅₀ apresentados pelas coletas de folhas de 0, 1 e 2 dias (TL₅₀ = 12,4 dias). Para as demais coletas, de 3, 5 e 7 dias, foi verificada diferença significativa entre os valores de TL₅₀ obtidos, sendo, respectivamente, de 13,8, 14,3 e 16,5 dias.

Comparando-se os resultados obtidos pelas duas concentrações estimadas de vírus, utilizadas no experimento de verão, foram verificadas diferenças significativas entre os valores de TL₅₀ apresentados pelos diferentes dias de coleta de folhas, com exceção da coleta de 5 dias, que apresentou TL₅₀ de 14,5 e 14,3 dias, respectivamente, para as concentrações de 1,97 mg / ml e 3,95 mg / ml.

Os valores de TL₅₀ obtidos para os diferentes dias de coleta de folhas no experimento de verão também foram considerados altos, resultando num prolongado período para ser verificada a mortalidade de 50 % das lagartas de *T. arnobia*, em condições de semi-campo.

Para a concentração de 1,97 mg / ml, os mais altos índices de mortalidade de *T. arnobia* variaram em torno de 89 %, para as diferentes coletas de folhas, levando, em média, 21 dias para que fossem obtidas estas taxas. Já para a concentração de 3,95 mg / ml, os índices variaram em torno de 93 %, levando também, em média, 21 dias para que fossem obtidas altas taxas de mortalidade.

Comparando-se os resultados de TL₅₀ obtidos nos experimentos de inverno e de verão, utilizando-se a dose de 25 g de lagartas por hectare, correspondente a concentração de partículas de vírus de 1,97 mg / ml, foram verificadas diferenças

significativas entre os valores de TL_{50} para todos os dias de coleta de folhas, sendo estas mais evidentes nas coletas de 2, 3 e 5 dias, onde os melhores resultados foram obtidos no experimento de verão, apresentando uma diferença de 2 dias em relação aos valores de TL_{50} observados no experimento de inverno.

Ambas as concentrações de vírus utilizadas no experimento de verão reduziram significativamente os valores de TL_{50} , em relação aos observados no experimento de inverno. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que as duas concentrações de vírus testadas foram consideradas satisfatórias no controle das lagartas de *T. arnobia* de 4º ínstar.

4.2.1. Fatores relacionados à eficiência do TaV em condições de semi-campo

Considerando que, para ambos os experimentos, de inverno e de verão, as árvores pulverizadas com TaV possuíam características idênticas, e que as lagartas submetidas aos testes no laboratório encontravam-se todas no 4º ínstar larval, outros fatores, não relacionados às características da planta hospedeira e da praga alvo, estariam influenciando nos diferentes resultados obtidos para os experimentos de inverno e de verão, com relação ao TL_{50} , quando foi utilizada a concentração de partículas de vírus de 1,97 mg / ml.

Dentre os fatores meteorológicos que podem influenciar na persistência do vírus em condições de campo, destacam-se a temperatura e a radiação solar. Segundo Moscardi (1998), temperaturas médias mais amenas podem aumentar o tempo letal do vírus.

Cruz (2000) cita o experimento realizado por Valicente & Cruz (1992), no qual foi avaliado o efeito de três temperaturas fixas, de 15, 26 e 30 °C, na infectividade de lagartas de *S. frugiperda* com baculovírus, sendo constatado que, na menor temperatura, o pico de mortalidade ocorreu 12 dias após a infecção, em contrapartida ao período de 6 dias, observado para as outras duas temperaturas.

Este fator meteorológico pode ter influenciado também nos resultados obtidos nos experimentos de semi-campo com o TaV, talvez explicando os melhores resultados verificados no experimento de verão, no qual foi registrada uma temperatura média de 21,5 °C, superior em 5 °C, em relação aos 16,5 °C registrados durante o experimento de inverno. Moscardi (1998) cita que, apesar das evidências quanto ao efeito da temperatura sobre vírus entomopatogênicos, esse aspecto necessita ser mais bem estudado, principalmente em condições de campo.

Batista Filho et al. (1991) ressaltam que, além de outros fatores, a radiação ultravioleta é uma grande fonte de inativação do baculovírus a nível de campo. A radiação solar também é citada por Moscardi (1998), como sendo o principal fator de desativação de vírus entomopatogênicos em campo.

No extrato bruto de vírus, o efeito protetor contra os raios ultravioleta é proporcionado pela presença de gorduras, proteínas e outros resíduos do inseto hospedeiro (Batista Filho et al., 2001).

No caso do vírus de poliedrose nuclear, sua eficiência pode ser aumentada pela aplicação, ou adição na formulação do patógeno, de adjuvantes que atuem como protetores contra a radiação solar, estimulantes da alimentação e retardantes da evaporação (Batista Filho, 1990).

Batista Filho et al. (2001) testaram a estabilidade e a persistência do extrato bruto e de duas formulações do NPV de *A. gemmatalis*, expostas à radiação solar em condições de campo, verificando que, após 14 dias da aplicação, o extrato bruto de vírus teve uma redução de aproximadamente 70 % em sua atividade original, devido aos efeitos dos raios ultravioleta. Já a formulação com óleo emulsionável teve uma redução de cerca de 40 % em sua atividade, no mesmo período.

Alves et al. (2001), também avaliando a redução na atividade viral do extrato bruto e de formulações do NPV de *A. gemmatalis* expostas às condições climáticas ambientais, observaram uma redução de 50 % para o extrato bruto, 25 % para o pó molhável e de 15 % para o óleo emulsionável, após 6 dias da aplicação.

A radiação solar, especialmente o seu espectro ultravioleta (UV), deve ter influenciado também nos resultados obtidos para o TaV, especialmente quando são considerados os tempos letais, em relação aos diferentes dias de coleta de folhas.

No entanto, quando são comparados os dois experimentos de semi-campo, foi verificada uma pequena diferença entre os valores médios de radiação solar, registrados para os experimentos de inverno e de verão, os quais foram, respectivamente, de 74,03 MJ / m² e de 79,34 MJ / m², indicando que este fator meteorológico não influenciou nos melhores resultados de TL₅₀, observados durante o experimento de verão.

Outra hipótese que pode explicar os resultados obtidos com o TaV, é a provável influência do pH da água utilizada na calda de aplicação, visto que são frequentemente detectadas variações de pH na água fornecida pela rede de água canalizada. Supõe-se que, quanto mais básico o pH da água utilizada, mais rápida é a desativação do vírus em condições de campo, porém são necessárias novas pesquisas para se comprovar isto.

Importante ressaltar novamente que as suspensões de vírus utilizadas nos experimentos de campo foram obtidas de macerados de lagartas de *T. arnobia*, de 4º ínstar, mortas pelo TaV. Suspensões virais obtidas de macerados de lagartas de 5º ínstar, talvez proporcionem uma mortalidade mais rápida de *T. arnobia* em experimentos de semi-campo, devido à maior quantidade de partículas virais presentes em seus corpos, possibilitando a obtenção de concentrações mais altas de vírus.

Além do ínstar larval utilizado para a obtenção da suspensão viral, as concentrações de TaV aplicadas no campo podem ser aumentadas através da utilização de uma maior dose de lagartas infectadas (g / ha), implicando num aumento do custo de produção destas no laboratório. Também é indicada a realização de testes comparativos para avaliação da estabilidade e da persistência do TaV em condições de campo, utilizando-se de extratos brutos, extratos purificados concentrados e de formulações preparadas com coadjuvantes.

5. CONCLUSÕES

O TaV é capaz de infectar e matar lagartas de *T. arnobia* de 2º, 3º, 4º e 5º ínstars larvais, em condições de laboratório. O efeito do TaV é mais intenso sobre lagartas de 2º e 3º ínstars, em relação às de 4º e 5º ínstars.

Em condições de semi-campo, o TaV é capaz de infectar e matar lagartas de *T. arnobia* de 4º ínstar, mas o tempo letal (TL₅₀) é prolongado.

O TaV apresenta um período residual de controle de, pelo menos, 7 dias depois de aplicado no campo.

O aumento do tempo letal (TL₅₀) é diretamente proporcional ao aumento do período decorrido entre a aplicação do vírus e as coletas de folhas no campo.

Em ambas as condições (inverno e verão), as doses de TaV testadas não são suficientes para provocar uma alta mortalidade de lagartas de *T. arnobia*, num espaço de tempo adequado. Apesar disto, as doses são satisfatórias, considerando-se o período necessário para as lagartas cessarem totalmente o consumo de folhas de *E. grandis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. Vírus Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Coord.). *Controle microbiano de insetos*. São Paulo: Manole, 1986. p.171-187.

ALVES, A.N., WILCKEN, C.F. Bioensaio para avaliação da eficiência de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Thyrinteina arnobia* na cultura do eucalipto. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1990, Botucatu. *Anais....* Botucatu.

ALVES, J.B., ZANUNCIO, J.C., FORLIN, A., PIFFER, A.A. Faunistic analysis and population fluctuations of Lepidoptera associated with *Eucalyptus* in Niquelândia, Goiás State, Brazil. *Revista Árvore*, v.18, n.2, p.159-168, 1994.

ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.

ALVES, L.F.A., BATISTA FILHO, A. AUGUSTO, N.T. Fotoprotección de preparaciones del virus de la poliedrosis nuclear (VPNAg) en condiciones de campo y laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas*, v.62, p.60-64, 2001.

ANDRADE, E.N. *O eucalipto e suas aplicações*. São Paulo, 1928. 143 p.

ANJOS, N., SANTOS, G.P., ZANUNCIO, J.C. A lagarta-parda, *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. BOLETIM TÉCNICO. Belo Horizonte: EPAMIG, n.25, 1987. 56 p.

BAENA, E.S. Controle populacional das pragas das florestas de eucalipto e seus inimigos naturais. *Silvicultura*, v.22, p.42-44, 1982.

BARBIELLINI, A. Sobre as pragas de eucalipto, especialmente as lagartas. *Chácaras e Quintais*, v.82, p.37-40, 1950.

BATISTA FILHO, A., AUGUSTO, N.T. Eficiência do *Baculovirus anticarsia* formulado como óleo emulsionável, no controle de *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818. *O Biológico*, v.53, p.57-59, 1987.

BATISTA FILHO, A. *Estudos sobre formulações de Baculovirus anticarsia em condições de laboratório e campo*. Piracicaba, 1990. 72p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade Estadual Paulista.

BATISTA FILHO, A., ALVES, L.F.A., AUGUSTO, N.T., ALVES, S.B. Efeito da radiação ultravioleta sobre *Baculovirus anticarsia* formulado em condições de laboratório. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 4, 1991, São Paulo. *Resumos...*São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico, 1991.

BATISTA FILHO, A., ALVES, S.B., AUGUSTO, N.T., PEREIRA, R.M., ALVES, L.F.A. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology*, v.30, n.3, p.411-416, 2001.

BATISTA PEREIRA, L.G., MARQUES, E.N., SILVA, M.J., GROKE JUNIOR, P.H., PEREIRA NETO, S.D. Mortality rate of *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) by parasitoids and entomopathogens. *Revista Árvore*, v.19, n.3, p.396-404, 1995.

BERTI FILHO, E. *Biologia de Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) e observações sobre a ocorrência de inimigos naturais. Piracicaba, 1974. 74 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

BERTI FILHO, E. Geométrídeos associados a *Eucalyptus* spp. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 3, CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 5, 1978, Ilhéus/Itabuna. *Anais...* Itabuna: CEPLAC, 1978. pág. irreg.

- BRITO, J.O., BARRICHELO, L.E.G. Usos diretos e propriedades da madeira para a geração de energia. *Silvicultura*, v.2, n.12, p.26-28, 1979.
- CHAO, Y. C., SCOTT, H. A., YOUNG III, S. Y. An icosaedral RNA vírus of the soybean looper (*Pseudoplusia includens*). *Journal of General Virology*, v.64, p.1835-1838, 1983.
- CHAO, Y.C., YOUNG III, S.Y., KIM, K.S. Characterization of a Picornavirus isolated from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.47, p.247-257, 1986.
- CHIARELLI, A. Un geometrideo prejudicial a la yerba mate. *Revista Argentina de Agronomia*, v.10, n.3, p.250-5, 1943.
- CRUZ, T. Utilização de Baculovírus no controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. *Controle Biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p.201-230.
- CUNNINGHAM, J.C., HUGHES, K.M. Notes on the nuclear polyhedrosis viruses of tussock moths of the genus *Orgyia* (Lepidoptera). *Canadian Entomologist*, v.108, n.5, p.479-484, 1976.

CUNNINGHAM, J.C. Use of microbials for control of defoliating pests of conifers. In: PROCEEDINGS INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 5, 1990, Adelaide. p.164-168.

CUNNINGHAM, J.C. Baculoviruses as microbial insecticides. In: REUVENI, R. (ed.). *Novel approaches to integrated pest management*. Canadá: CRC Press, 1995. p.262-292.

DOANE, C.C., MCMANUS, M.L. (Eds.). *The gypsy moth: research toward integrated pest management*. FOREST SERVICE. SCIENCE AND EDUCATION AGENCY. TECHNICAL BULLETIN 1584. Washington: U.S. Department of Agriculture, 1981. 757 p.

EIDMANN, H.H. Aspects of biological control of forest insects in Sweden. *Ambio*, v.5, n.1, p.23-26, 1976.

EVANS, H.F. Ecology and epizootiology of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. (eds.). *The biology of baculoviruses: Practical application for insect pest control*. v.2. Boca/Raton: CRC Press, 1986. p.89-132

EVANS, H.F., STOAKLY, J.T., LEATHER, S.R., WALL, A.D., RASKE, A.G. (ed.). Development of an integrated approach to control of pine beetle moth in Scotland. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 18, 1988, Vancouver. *Forest Ecology and Management*. Vancouver, 1991, p.19-28.

FEDIÈRE, G., PHILIPPE, R., VEYRUNES, J.C., MONSARRAT, P. Biological control of the oil palm pest *Latoia viridissima* (Lepidoptera: Limacodidae), in cote d'Ivoire by a new picornavirus. *Entomophaga*, v.35, n.3, p.347-354, 1990.

FUXA, J.R. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IMP. *Annual Review Entomology*, v.32, p.225-251, 1987.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCHHI, R.A., ALVES, S.B. *Manual de entomologia agrícola*. 2ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

GLEISSLER, K. Studies on the occurrence and epidemiological importance of insect-pathogenic viruses in forest pests in the German Federal States of Sachsen-Anhalt, Brandenburg and Mecklenburg-Vorpommern. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v.30, n.2, p.93-98, 1995.

GOMEZ, S.A., MOSCARDI, F., SOSA-GÓMEZ, D.R. Suscetibilidade da lagarta-do-cartucho ao seu vírus de poliedrose nuclear, em distintos estádios larvais. *Revista de Agricultura*, v.76, n.3, p.411-422, 2001.

- HASSAN, F.A., EL-LAKANY, M.H. (Ed.), TURNBULL, J.W. (Ed.), BREWBAKER, J.L. (Ed.). Important insect pests of Casuarina in Egypt. In: INTERNATIONAL CASUARINA WORKSHOP, 2, 1990, Cairo. *Advances in Casuarina research and utilization*. Egypt, 1990. p.102-109.
- HOLLANDER, A.K. Environmental impacts of genetically engineered microbial and viral biocontrol agents. In: MARSMOROSCH, K. *Biotechnology for biological control of pests and vectors*. Boca/Raton: CRC Press, 1991. p.251-266.
- HUBER, J. Use of baculovirus in pest management programs. In: GRANADOS, R.R., FREDERICI, B.A. (Eds.). *The biology of baculoviruses*. v.2. Boca/Raton: CRC Press, 1986. p.181-202.
- IVES, W.G.H., CUNNINGHAM, J.C. Application of nuclear polyhedrosis virus to control bruce spanworm (Lepidoptera: Geometridae). *Canadian Entomologist*, v.112, n.7, p.741-744, 1980.
- LONGWORTH, J.F., and PAINE, C.C., MACLEAD, R. Studies on a virus isolated from *Gonometa podocarpi* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Journal of General Virology*, v.18, n.2, p.119-125. 1973.

- MACEDO, N. *Estudo das principais pragas das ordens Lepidoptera e Coleoptera dos eucaliptais do estado de São Paulo*. Piracicaba, 1975. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- MORALES, L., MOSCARDI, F. Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.22, n.3, p.535-540, 1993.
- MORRIS, O.N. Microorganisms isolated from forest insects of British Columbia. *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, v.80, p.29-36, 1983.
- MOSCARDI, F. Vírus Entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (Coord.). Controle microbiano de insetos. São Paulo: Manole, 1986. p.188-202.
- MOSCARDI, F., CARVALHO, R.C.Z. Consumo e utilização de folhas de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.22, n.2, p.267-280, 1993.
- MOSCARDI, F., POLLATO, S.L.B., CORRÊA – FERREIRA, B.S. Atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) após sua passagem pelo aparelho digestivo de insetos predadores. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.25, n.2, p.315-320, 1996.

- MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S.B. (ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p.509-539.
- MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*, v.44, p.257-289, 1999.
- MURRAY, K.D., ELKINTON, J.S. Transmission of nuclear polyhedrosis virus to gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) eggs via contaminated substrates. *Environmental Entomology*, v.19, n.3, p.662-665, 1990.
- NAKASHIMA, N., SASAKI, J., TSUDA, K., YASUNAGA, C., NODA, H. Properties of a new picorna-like virus of the brown-winged green bug, *Plautia stali*. *Journal Invertebrate Pathology*, v.71, p.151-158, 1998.
- NASCIMENTO, M.L. *Caracterização parcial e patogenicidade de vírus isolado de Thyrinteina arnobia (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)*. Botucatu, 2001. 81p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.
- ODA, S., BERTI FILHO, E. Incremento anual volumétrico de *Eucalyptus saligna* Sm. em áreas com diferentes níveis de infestação de lagartas de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). *IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais*, n.17, p.27-31, 1978.

- OHASHI, O.S., BERTI FILHO, E. Natural enemies of *Eupseudosoma aberrans* and *E. involuta* (*E. involutum*) (Lepidoptera: Arctiidae), pests of *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae). *IPEF – Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais*, n.40, p.43-44, 1988.
- OLIVEIRA, A.C., FONSECA, E.P., ANJOS, N., SANTOS, G.P., ZANUNCIO, J.C. Resistance of *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae) to the larval defoliator *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). *Revista Árvore*, v.8, n.2, p.83-107, 1984.
- OLOFSSON, E. Dispersal of the nuclear polyhedrosis virus of *Neodiprion sertifer* from soil to pine foliage with dust. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.46, p.181-186, 1988.
- ORLATO, C., WILCKEN, C.F. Efeito do NPV de *Thyrintina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) sobre ninfas e adultos do predador *Montina confusa* (Hemiptera: Reduviidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17, 1998, Rio de Janeiro. *Resumos...* Rio de Janeiro: Sociedade Entomológica do Brasil, 1998, p.776.
- OTVOS, I.S., MACLAUCHLAN, L.E., HALL, P.M., CONDER, N. A management system to control Douglas-fir Tussock moth, *Orgyia pseudotsugata*, using OpNPV. *Forestry Research Applications*, n.11, p.1-4, 1998.

PERCY, J., CUNNINGHAM, J.C., BURKE, J.M., OTVOS, J.S. Two viruses from western false hemlock looper, *Nepytia freemani* (Lepidoptera: Geometridae). *Canadian Entomologist*, v.115, n.9, p.1239-1241, 1983.

PERES FILHO, O. *Bioecologia de Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) mantida em duas espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae). Piracicaba, 1989. 163 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

PIGATTI, A., MELLO, E.J.R., PIGATTI, P. Seleção de inseticidas orgânicos em laboratório para combate à praga de eucalipto *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782). *O Biológico*, v.28, n.5, p.132-134, 1962.

PREJUÍZOS causados pelo ataque de lepidópteros em plantios de eucaliptos da fomento - Fomento Técnico S/A. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 2, 1973, Curitiba. *Anais....* Curitiba: Federação Industrial do Estado do Paraná, 1973. p.166-167.

PSCHORN-WALCHER, H. Biological control of forest insects. *Annual Review of Entomology*, v.22, p.1-22, 1977.

REUVENI, R. (ed.). Novel approaches to integrated pest management. *Division of plant pathology agricultural research organization Newe Ya'ar Research Center*, Haifa, 32p, 1995.

- RIBEIRO, B.M., SOUZA, M.C., KITAJIMA, E.W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.). *Controle microbiano de insetos*. 2ªed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.481-507.
- RIBEIRO, G.T., OLIVEIRA, A.C. Aspectos operacionais da aplicação de *Bacillus thuringiensis* em áreas reflorestadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11, 1987, Campinas. *Anais....*Campinas: SEB, 1987. p.94-104.
- RINDGE, F.H. A revision of the *Nacophorini* (Lepidoptera: Geometridae). *Bulletin of the America Museun of Natural History*, v.132, n.2, p.87-154, 1961.
- ROBERTS, H. Forest insect pests of Papua New Guinea. 4. Defoliators of *Pinus* (pines) in the highlands. *Harvest*, v.12, n.3, p.103-108, 1987.
- RUECKERT, R.R. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. *Fundamental Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishes, 1996. p.477-522.
- SANT'ANA, J., SILVA, R.F.P. Efeito do vírus de poliedrose nuclear de *Pseudaletia sequax* Françl. (VPNs) sobre três espécies de Noctuídeos. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.23, n.3, p. 443-448, 1994.

SANTOS, G.P. *Estudo da bionomia e controle de Oxydia apidania (Cremer) (Lepidoptera: Geometridae), desfolhador de eucalipto*. Viçosa, 1978. 54p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

SANTOS, G.P., ANJOS, N., ZANUNCIO, J.C. Situação atual da ocorrência de *Thyriniteina arnobia* (Lepidoptera, Geometridae) em eucaliptais de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 7, 1983, Brasília. *Resumos...* Brasília: EMBRATER, 1983. p.54.

SANTOS, G.P., ZANUNCIO, T.V., ZANUNCIO, J.C. Desenvolvimento de *Thyriniteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em folhas de *Eucalyptus urophylla* e *Psidium guajava*. In: *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.29, n.1, p.13-22, 2000.

SCOTTI, P.D. Picornaviruses – insect. *Enciclopedia of Virology*, v.3, p.1100-1103, 1994.

SMIRNOFF, W.A., LONDONO, L.L., ARCKERMANN, H.W. A granulosis virus of *Glena bisulca* (Lepidoptera: Geometridae), a serious defoliator of *Cupressus lusitanica* in Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.30, n.3, p.439-441, 1977.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Estatísticas: Área Plantada com *Pinus* e *Eucalyptus* no Brasil (ha). 1999. [on line]. São Paulo, 2000. Disponível de: word wide web: < URL: http://www.sbs.org.br/area_plantada.htm

- STAIRS, G.R. Pathogenic microorganisms in the regulation of forest insect populations. Forest Insects and Microbial Pathogens. *Annual Review Entomology*, p.355-372. 1972.
- STIPE, L. Douglas-fir tussock moth population assessment and control. *Northwest Environmental Journal*, v.4, n.2, p.339-341, 1988.
- TABASHNIK, B. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Entomology*, v.39, p.47-79, 1994.
- VAN FRANKENHUYZEN, K., NYSTRON, C. Residual toxicity of a high potency formulation of *Bacillus thuringiensis* to spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal Economical Entomology*, v.82, n.3, p.868-872, 1989.
- WILCKEN, C.F. *Estrutura da comunidade de lepidópteros, coletados com armadilhas, que ocorrem em florestas de Eucalyptus grandis Hill ex Maiden*. Piracicaba, 1991. 148p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- WILCKEN, C.F. *Biologia de Thyrinteina arnobia (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em espécies de Eucalyptus e em dieta artificial*. Piracicaba, 1996. 129p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- WILCKEN, C.F., ORLATO, C. Efeito de diferentes concentrações de NPV no controle de *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae) em condições de laboratório. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17, 1998, Rio de Janeiro. *Resumos...* Rio de Janeiro: Sociedade Entomológica do Brasil, 1998, p.775.
- WILLIAMSON, C. AND VON WECHMAR, M.B. Two novel viruses associated with severe disease symptoms of green stinkbug *Nezara viridula*. *Journal of General Virology*, v.73, p.2467-2471, 1992.
- WOODS, S.A., ELKINTON, J.S., PODGWAITE, J.D. Acquisition of nuclear polyhedrosis virus from tree stems by newly emerged gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larval. *Environmental Entomology*, v.18, n.2, p.298-301, 1989.
- ZANUNCIO, J.C. (Coord.). *Manual de pragas em florestas. Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle*. Viçosa: Folha de Viçosa LTDA, 1993. 140p.
- ZANUNCIO, J.C., NASCIMENTO, E.C., GARCIA, J.F., ZANUNCIO, T.V., EVANS, H.F. Major Lepidopterous defoliator of eucalypt in southeast Brazil. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION CONGRESS, 12, 1994, Rio de Janeiro. *Forest Ecology and Management*, v.65, n.1, p.53-63, 1994.

APÊNDICE

Apêndice 1. Fatores climáticos registrados para o mês de setembro de 2000 (1º experimento de campo, 13 à 20/09/2000). Fazenda Experimental Lageado (FCA/UNESP – Botucatu).

Ano	Data	T (°C) média	UR (%) média	Fx. Radiação Total (MJ/m ²)	Precipitação Total (mm/dia)
2000	1/9	15,30	91,10	32,37	31,2
2000	2/9	10,33	97,60	12,70	27,6
2000	3/9	10,65	93,40	13,82	0,1
2000	4/9	10,99	83,40	56,20	0,1
2000	5/9	13,56	79,60	72,40	0,0
2000	6/9	13,08	84,50	38,00	0,1
2000	7/9	15,17	74,90	73,60	0,0
2000	8/9	15,47	78,90	43,87	0,2
2000	9/9	17,65	75,50	58,33	0,2
2000	10/9	19,38	72,30	70,50	0,0
2000	11/9	22,20	64,81	69,40	0,0
2000	12/9	16,92	86,90	25,07	14,8
2000	13/9	19,61	61,26	80,10	0,0
2000	14/9	19,84	63,80	78,83	0,0
2000	15/9	20,92	58,82	66,30	2,9
2000	16/9	11,42	85,80	50,80	0,1
2000	17/9	10,27	77,80	79,77	0,0
2000	18/9	13,86	76,30	71,63	0,0
2000	19/9	17,15	71,20	82,07	0,0
2000	20/9	18,99	66,91	82,70	0,0
2000	21/9	22,91	98,00	23,80	8,6
2000	22/9	16,14	87,60	50,43	0,1
2000	23/9	18,53	80,50	58,23	0,3
2000	24/9	20,62	88,70	57,83	12,1
2000	25/9	16,40	83,00	68,77	0,0
2000	26/9	15,24	77,50	80,97	0,0
2000	27/9	18,33	74,20	76,50	0,0
2000	28/9	20,56	64,71	79,13	0,0
2000	29/9	21,96	49,82	81,20	0,0
2000	30/9	18,91	62,37	68,57	0,0

Apêndice 2. Fatores climáticos registrados para o mês de março de 2001 (2º experimento de campo, 01 à 08/03/2001). Fazenda Experimental Lageado (FCA/UNESP – Botucatu).

Ano	Data	T (°C) média	UR (%) média	Fx. Radiação Total (MJ/m ²)	Precipitação Total (mm/dia)
2001	1/3	22,88	77,20	85,80	0,0
2001	2/3	21,37	75,60	79,67	0,0
2001	3/3	21,01	72,90	90,27	0,0
2001	4/3	21,38	75,40	84,07	0,0
2001	5/3	21,84	74,40	82,40	0,0
2001	6/3	20,99	73,10	82,83	7,8
2001	7/3	21,78	72,10	83,83	0,0
2001	8/3	20,97	80,30	53,87	0,0
2001	9/3	19,35	97,40	41,63	0,5
2001	10/3	18,69	98,70	48,20	15,1
2001	11/3	19,84	90,60	55,43	61,5
2001	12/3	19,72	84,80	76,93	1,1
2001	13/3	21,52	84,10	66,57	0,7
2001	14/3	22,70	78,30	74,43	0,1
2001	15/3	23,70	70,90	82,20	6,5
2001	16/3	23,60	75,80	67,50	0,0
2001	17/3	22,72	78,80	77,73	0,0
2001	18/3	20,26	83,50	58,43	9,3
2001	19/3	21,42	76,90	72,60	9,9
2001	20/3	21,85	80,40	70,07	0,0
2001	21/3	21,18	85,40	78,87	1,6
2001	22/3	23,87	68,83	82,40	2,3
2001	23/3	24,25	66,04	80,23	0,0
2001	24/3	23,63	70,40	77,70	0,0
2001	25/3	22,40	69,97	77,27	0,4
2001	26/3	21,12	75,70	61,70	0,0
2001	27/3	21,40	79,10	72,17	0,2
2001	28/3	18,14	92,30	34,73	0,0
2001	29/3	19,15	87,60	61,07	5,4
2001	30/3	20,09	83,40	79,17	0,5
2001	31/3	20,67	81,30	77,33	0,0

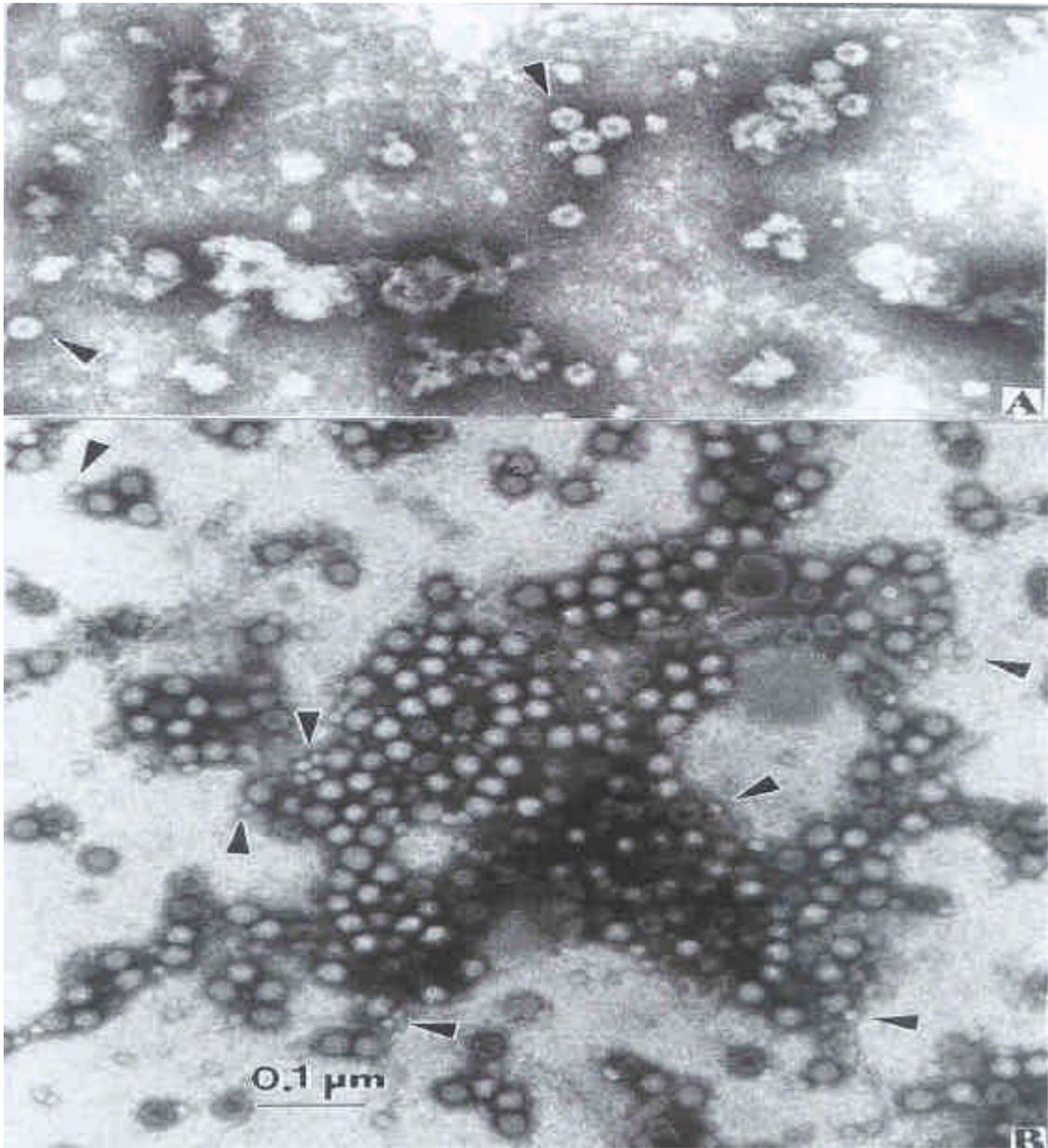


Figura 1. (A) Partículas isométricas de ca. 30 nm em diâmetro, presentes em extratos de lagartas infectadas pelo TaV (ponta da seta). (B) Preparação purificada contendo partículas similares às presentes no extrato. Também estão presentes partículas isométricas menores, de ca. 15 nm em diâmetro (ponta da seta).



