

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

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E PATOGENICIDADE DE UM VÍRUS
ISOLADO DE *Thyrineina arnobia* (Stoll, 1782) (LEPIDOPTERA:
GEOMETRIDAE)**

MARIA DE LOURDES NASCIMENTO

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia – Área
de concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP
Abril-2001

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

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E PATOGENICIDADE DE UM VÍRUS
ISOLADO DE *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (LEPIDOPTERA:
GEOMETRIDAE)**

MARIA DE LOURDES NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP –
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia – Área
de concentração em Proteção de Plantas.

BOTUCATU - SP

Abril-2001

...olha, repara, ausculta: essa riqueza sobrando a toda pérola, essa ciência
sublime e formidável, mas hermética,
essa total explicação da vida, esse nexos primeiro e singular,
que nem concebes mais, pois tão esquivo
se revelou ante a pesquisa ardente em que te consumiste... vê, contempla,
abre teu peito para agasalhá-lo”...

Drummond

A minha querida família por aceitar sem
resignação a minha ausência nos momentos
de maior necessidade de minha presença,

OFEREÇO

**A DEUS,
AGRADEÇO**

Aos meus queridos amigos conquistados
ao longo desta trajetória que de uma certa
forma contribuíram para a realização
deste trabalho,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), Câmpus de Botucatu, pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenadoria de Assistência à Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização do curso;

Ao Professor Dr. Carlos Frederico Wilcken, do Depto. de Proteção Vegetal, área Entomologia da FCA/UNESP, pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho, apoio e orientação na condução desta pesquisa;

Ao Professor Dr. Elliot W. Kitajima do Depto. de Fitopatologia, Entomologia, e Zoologia Agrícola, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, pela co-orientação e pela preciosa colaboração na etapa referente a microscopia eletrônica de transmissão;

Ao Professor Dr. Jorge A. M. Rezende do Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, pelo imenso apoio nas etapas de caracterização do vírus;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Proteção de Plantas da FCA/UNESP, em especial Wilson B. Crocomo, Carlos G. Raetano, Édison L. Furtado, Marli T. de Almeida Minhoni, Marcelo A. Pavan, Luiz C. Forti, e Nilson L. de Souza, pela amizade, ensinamentos transmitidos e contribuição à minha formação profissional;

Ao Professor Dr. José Raimundo de Souza Passos do Depto. de Bioestatística da UNESP, pela preciosa contribuição nas análises estatísticas;

Aos Amigos do laboratório de Virologia Vegetal da ESALQ/USP, em especial a querida amiga Marília G. Della Vecchia pela paciência e ajuda preciosa na condução dos trabalhos. E ao Quelmo Silva de Novaes pela ajuda nas etapas de purificação do vírus, e ao José Edivaldo Buriola pela amizade e apoio em todos os momentos que precisei;

Aos funcionários do Depto de Proteção Vegetal, em especial aos técnicos de laboratório, Nivaldo L. Costa e Gislaine Braga pela ajuda em várias etapas deste trabalho,

à funcionária Maria de Fátima A. Silva pelo carinho, apoio e palavra amiga nos momentos difíceis e à secretária Vera Lúcia da Silva Mendes pelo apoio e amizade;

Aos amigos de curso Angelo Ottati, Carlos de Mattos, Patrícia Leitão, Fernanda B. Sarro, Salvatore de Angeles, Vânia M. Ramos, Nilson Satoru, Hélio Minoru e Ostenildo R. Campos, pela troca de conhecimentos, apoio, compreensão e amizade;

Ao meu querido amigo e irmão Valmir Costa por todo amor a mim dedicado ao longo dessa trajetória;

À querida amiga Adriana M. Labinas pela troca de conhecimentos, amizade, carinho e palavra amiga em todos os momentos e pela preciosa ajuda na elaboração do summary;

Aos amigos Adriano Reis da Silveira e Vera Lúcia P. Salazar pela amizade sincera, compreensão, carinho e preciosa ajuda nos momentos difíceis;

Às amigas Aldenise A. Moreira, Silvia Bordin, Maria A. C. Boareto, Ana Paula P. de Andrade, Roseli C. Fenille, Rosa Oliveira, Jaqueline Verzignassi, Rita de Cássia F. Alvarez e Andreia Fortes pela amizade, palavras de carinho nos momentos difíceis e pelo agradável convívio;

Às amigas da república de Piracicaba, Rosa Molina, Elizabet Ramos, Norma Minon e a querida Mônica Josene, por todas as palavras de carinho e apoio sempre presente.

SUMÁRIO

PÁGINAS

RESUMO	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 – Importância da eucaliptocultura para economia nacional, danos e controle dos lepidópteros desfolhadores.....	8
2.2 - Controle biológico de pragas florestais com entomopatógenos.....	10
2.3 – Caracterização e importância dos vírus tipo “CrP-like viruses”	1413
2.4 – Caracterização de vírus.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 - Criação de <i>T. arnobia</i>	22
3.2 – Origem do vírus.....	23
3.3 - Descrição e adaptação da metodologia de multiplicação do vírus	23
3.4 - Descrição e adaptação das metodologias de purificação do vírus.....	23
3.5 - Microscopia eletrônica	25
3.6 - Produção do antissoro	25
3.7 - PTA-ELISA	26
3.8 - Coloração do gel de poliacrilamida.....	27
3.8.1 – Transferência do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose (Técnica de Western Blot)	27
3.9 – Extração de RNA total e isolamento do RNA a partir de vírus purificado.....	29

3.10 – Análise de sobrevivência para verificar patogenicidade e/ou especificidade do vírus em lagartas de <i>T. arnobia</i> e em outras espécies de lepidópteros	30
3.10.1 – Testes para avaliar a patogenicidade do vírus em fezes do predador <i>Podisus nigrispinus</i> (Heteroptera: Pentatomidae).....	31
3.10.2 - Análise estatística	32 31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 - Multiplicação do vírus em colônias de laboratório.....	33
4.2 – Purificação do vírus de <i>T. arnobia</i>	34
4.3 - Microscopia eletrônica	36
4.4 – Sorologia.....	48 43
4.5 – Reação sorológica (Western blot) e gel de poliacrilamida 12 %.....	49 44
4.6 – Extração de RNA total e isolamento do RNA a partir de vírus purificado.	58 51
4.7 – Análise de sobrevivência para verificar especificidade e/ou patogenicidade do vírus de <i>T. arnobia</i> no próprio hospedeiro e em outras espécies de insetos.....	61 53
4.7.1 – Patogenicidade do TaV em fezes do predador <i>P. nigrispinus</i> (Hemiptera: Pentatomidae).....	76 65
5. CONCLUSÕES.....	7968
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8069

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar um novo vírus isométrico, possivelmente do grupo do “CrP-like viruses”, isolado de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), a lagarta parda do eucalipto, e avaliar seu potencial como bioinseticida viral. Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios da FCA/UNESP, Botucatu, SP e ESALQ/USP, Piracicaba, SP. *Thyrinteina arnobia* Vírus (TaV), proveniente de lagartas doentes coletadas na região de Itatinga em 1996 e Lençóis Paulista SP em 1997, foi multiplicado em lagartas de *T. arnobia* da criação estoque do laboratório. A mortalidade em lagartas de primeiro ao quarto instar foi de 100%. Fêmeas provenientes de lagartas infectadas no sexto instar originaram adultos com fertilidade bastante reduzida quando comparadas com fêmeas sadias. Através de análises de sobrevivência verificou-se a suscetibilidade em cada instar de lagartas de *T. arnobia* ao TaV. As lagartas em todos os instares exibiam sintomas característicos de virose. Amostras das suspensões do vírus purificado foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, sendo visualizada uma grande quantidade de partículas do tipo picornavirus, de aproximadamente 30 nm em diâmetro. Partículas menores de 15 nm, sugerindo vírus satélite, também foram detectadas. As proteínas da capa protéica do TaV foram sorologicamente detectadas usando antissoro produzido em coelho. A capa protéica do

vírus é composta de três proteínas de pesos moleculares 47, 60 e 66 kDa. O tamanho do RNA genômico varia entre 4 a 6 kb. Através de secções ultrafinas, verificou-se que a infecção de lagartas de *T. arnobia* pelo TaV parece limitar-se ao epitélio do tubo digestivo, onde ocorre acúmulo dos vírions. Um efeito citopático característico foi a formação de corpos multivesiculares, aparentemente derivados de mitocôndrias. Ensaio preliminares indicaram que o TaV não infecta *Bombyx mori* e *Spodoptera frugiperda*, mas *Sarsina violascens* e *Iridopsis* sp. foram suscetíveis. TaV manteve-se infectivo após passar pelo trato digestivo de *Podisus nigrispinus*, um predador natural de *T. arnobia*, sugerindo também seu papel na dispersão deste vírus.

Palavras chave: lagarta parda, vírus entomopatogênico, controle biológico, microscopia eletrônica

PARTIAL CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF A VÍRUS ISOLATED OF *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE). Botucatu, 2001. 81p. Tese (Doutorado em agronomia/Proteção de Plantas). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARIA DE LOURDES NASCIMENTO

Adviser: CARLOS FREDERICO WILCKEN

SUMMARY

The present work aimed to characterize a new virus, possibility belonging to CrPV like viruses group, isolated from *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), the eucalyptus brown looper, and to evaluated its potencial to use as virus bioinsecticide. The experiments were carried out at the laboratory from FCA/UNESP Botucatu - SP and ESALQ/USP Piracicaba- SP. *Thyriniteina arnobia* virus (TaV) came from sick caterpillars collected in Itatinga, SP in 1996 and in Lençóis Paulista SP in 1997 and colonies were replicated in *T. arnobia* caterpillars reared in laboratory. The caterpillars mortality from the first to the fourth instar was 100%. Caterpillars infected in the sixth instar and could reach the adult stage showed females with reduced fertility when compared to health ones. Through the survivorship analysis was possible to verify the caterpillars susceptibility to TaV in each *T. arnobia* instar. All larvae instars exhibited viruses characteristic symptoms. Purified virus suspension samples were observed at the transmission eletronic microscopy and it was visualized a large quantity of picornavirus particles measuring about 30 nm of diameter. Shorter particles with 15 nm were detected, suggesting the existence of satellite virus. The TaV virus cover proteins was serologically detected using antisera produced in rabbit. This cover is composed by three proteins with molecular weight of 47, 60 and 66 kDa. The genomic RNA size varies from 4 to 6 kb. Through ultraslim sections, it was possible to verify that *T. arnobia* caterpillars infection due to TaV seem to be limited to midgut epithelium, where there has the virions

accumulation. The characteristic cytopathic effect was multivesicular bodies formation, apparently due to mitochondrial derivation. Preliminary assays indicated that TaV did not infect *Bombyx mori* and *Spodoptera frugiperda* but infected *Sarsina violascens* and *Iridopsis* sp. TaV kept its infectivity after having been passed by *Podisus nigrispinus* midgut, a natural predator of *T. arnobia*, suggesting its role in TaV dispersion in the field.

Key words: eucalyptus brown looper, entomopathogenic virus, biological control, electronic microscopy

1. INTRODUÇÃO

A área plantada de *Eucalyptus* no mundo é de aproximadamente 10 milhões de hectares. O Brasil responde por cerca de 30% dessa área. O eucalipto tem sido a espécie florestal mais utilizada em reflorestamentos homogêneos. A área florestal em 1999 era de 2.965.880 hectares de eucalipto. Em relação ao mercado interno o setor de base florestal brasileiro gera receitas da ordem de US\$ 20 bilhões, oferece 700 mil empregos diretos e 2 milhões de indiretos. Contribuiu, em 1999, com US\$ 2 bilhões em impostos e participou com 4,0 % no PIB nacional. Nesse cenário o Brasil exportou cerca de US\$ 3,5 bilhões no ano de 1999, sendo que a celulose é o produto de base florestal que representa participação mais expressiva no mercado mundial com 5,2 % dos negócios internacionais (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1999).

Como qualquer monocultura, o aumento da área plantada proporciona sérios problemas no equilíbrio biológico e o desenvolvimento de pragas, principalmente insetos desfolhadores como formigas, lepidópteros e coleópteros, cujos danos geram grandes prejuízos e queda de produtividade. Dentre os lepidópteros desfolhadores que tem se destacado pela severidade de seus danos evidencia-se *Thyrintina arnobia* Stoll 1782 (Lepidoptera: Geometridae) que é considerada como a principal praga entre os lepidópteros desfolhadores de eucalipto (Anjos et al., 1987;

Branco, 1995).

Considerando-se que o ecossistema de uma floresta homogênea é bastante frágil, e que o uso de inseticidas convencionais pode trazer sérios danos ao equilíbrio, acredita-se que os produtos de baixo impacto ecológico, utilizados isoladamente e/ou em um programa de manejo integrado de pragas possam ser de grande valia no controle de lagartas desfolhadoras (Zanuncio, 1993).

As viroses de insetos tem sido muito estudadas, devido ao interesse geral dessas patologias e, mais particularmente, por causa de seu potencial ambientalmente favorável ao manejo de pragas (Evans e Shapiro, 1997).

Vários produtos à base de vírus têm sido registrados para uso no controle de pragas nos Estados Unidos e na Europa (OECD 1995), entretanto poucos são comercialmente produzidos no mundo. O melhor exemplo poderia ser atribuído ao uso do *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta desfolhadora *Anticarsia gemmatalis* na cultura da soja no Brasil. Mais de um milhão de hectares são pulverizados anualmente com resultados satisfatórios de controle e retorno estimado de 50 milhões de dólares/ano (Moscardi, 1998).

Também o *Baculovirus erinnys*, para controle do mandaróv-da-mandioca, *Erinnys ello* vem ganhando destaque em Santa Catarina, Paraná e Nordeste do Brasil. O Baculovírus spodoptera para controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho, também tem se destacado em Minas Gerais e Nordeste (Flores et al. 1992)

Os EUA e Canadá dispõe de produto comercial registrado a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), *Nucleopoliedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (VG) para uso em floresta (Lewis 1981; Huber 1986). Segundo Alves (1997) os produtos microbianos a base de vírus representam 15 % do mercado mundial de biopesticidas.

De acordo com dados do IBAMA (1998), no Brasil apenas três produtos biológicos são registrados para uso em florestas, são os produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e var. *aizawai*, e nenhum produto à base de vírus.

Trabalhos recentes tem enfatizado a importância dos vírus da provável família Picornaviridae com potencial para o controle de pragas. Nakashima et al. (1998), estudaram as propriedades de um provável picornavirus patogênico ao percevejo *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae). Williamson e Wechmar (1995) estudaram o efeito de dois vírus na metamorfose, fecundidade e longevidade do percevejo verde *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). Muscio et al. (1987) relataram a ocorrência de picornavirus infectando *T. infestans* um dos percevejos transmissores da doença de chagas. Czibener et al. (2000) seqüenciaram completamente o genoma do Triatoma virus (TrV). Chao et al. (1986), caracterizaram um vírus tipo picorna isolado de *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae).

Normalmente vírus de insetos do tipo picorna, como são mencionados na literatura, apresentam partículas extremamente pequenas, o genoma é composto por um RNA de fita simples e polaridade positiva. As partículas medem entre 25 a 35 nm em diâmetros com formas isométricas não envelopadas e simetria icosaédrica (Scotti, 1994; Stanway et al. 2001).

Os primeiros registros de vírus do tipo picorna em lepidópteros foram em Uganda, em florestas de pinheiro, na década de 70, em infestações de *Gonometa podocarp*i (Lepidoptera: Lasiocampidae). O surto foi controlado pelo vírus caracterizado posteriormente e referido como Gonometa virus-GoV (Scotti, 1994).

Stanway et al. (2001) analisaram o genoma do CrPV, DCV, PSIV, RhPV, HiPV e TrV e verificaram que a organização genômica destes vírus difere dos picornavirus de mamíferos. Os autores sugerem no mínimo três novas famílias para estes vírus. Apesar das diferenças físico-químicas e biológicas entre estes vírus, foram eles agrupadas em um “gênero flutuante” nomeado “vírus tipo paralisia em Grilos” (Crickt paralysis-like viruses [CrP-like viruses]).

O presente trabalho objetivou caracterizar um novo vírus, possivelmente do grupo do “CrP-like viruses”, isolado de *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae), a lagarta parda do eucalipto e avaliar seu potencial como bioinseticida viral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Importância da eucaliptocultura para economia nacional, danos e controle dos lepidópteros desfolhadores

A área plantada de *Eucalyptus* no mundo é de aproximadamente 10 milhões de hectares. O Brasil responde por 30% dessa área. O eucalipto tem sido a espécie florestal mais utilizada em reflorestamentos homogêneos no Brasil. A área total florestal em 1999 era de 2.965.880 hectares de eucalipto. O estado de maior plantio de eucalipto é Minas Gerais com 1.535.290 hectares, seguido de São Paulo com 574.150 hectares. O corte do eucalipto para industrialização ocorre aos 7 anos de idade, num regime que permite até 3 rotações sucessivas e econômicas, com ciclo de até 21 anos (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1999).

O Brasil consome cerca de 350 milhões de m³ de madeira roliça por ano. Em relação ao mercado interno o setor de base florestal brasileiro gera receitas da ordem de US\$ 20 bilhões, oferece 700 mil empregos diretos e 2 milhões de indiretos. Contribuiu, em 1999, com US\$ 2 bilhões em impostos e participou com 4,0 % no PIB nacional. Nesse cenário, o Brasil exportou cerca de US\$ 3,5 bilhões no ano de 1999, sendo que a celulose é o produto de base florestal que representa participação mais

expressiva no mercado mundial com 5,2 % dos negócios internacionais (Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1999).

A adaptação de espécies nativas de insetos ao exótico *Eucalyptus* tem ocorrido de maneira acelerada, em função da riqueza de nossa flora em representantes de Myrtaceae, família à qual pertence os eucaliptos. Atualmente existe no Brasil uma vasta gama de insetos nativos que causam danos de ordem econômica, sendo que estes danos vem aumentando de intensidade ano a ano (Anjos et al., 1986; Zanuncio et al., 1990).

Cerca de 300 espécies de insetos estão associadas a plantios de eucalipto, sendo mais de 10% consideradas pragas, pertencentes a várias ordens e famílias e que provocam danos às plantas em todas as fases do seu ciclo silvicultural, estendendo-se até a madeira processada (Santos et al. 1996).

Berti Filho (1981) relatou que, desde o fim da década de 1940, os lepidópteros desfolhadores têm despertado a atenção dos pesquisadores devido à ação devastadora de suas lagartas.

Segundo Branco (1995), Anjos et al. (1987,1986 e 1981) e Otero (1974), já foram identificadas dezenas de lepidópteros desfolhadores associados aos plantios de eucalipto no Brasil, dentre os quais destaca-se *T. arnobia*, considerada a principal praga desta cultura.

Como qualquer monocultura, o aumento da área plantada proporciona o desenvolvimento de pragas, principalmente insetos desfolhadores como formigas, lepidópteros e coleópteros, cujos danos geram prejuízos e queda de produtividade. Dentre os lepidópteros desfolhadores que têm se destacado pela severidade de seus danos evidencia-se *T. arnobia* (Anjos et al., 1987; Branco, 1995).

T. arnobia tem uma distribuição geográfica que vai desde o México, América Central até América do Sul (Norte da Argentina) (Pedrosa-Macedo, 1998). No Brasil, existem registros de sua ocorrência no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Pernambuco, Maranhão, Pará e Amazonas. Conhecida

como “lagarta de cor parda”, “lagarta mede palmo” ou simplesmente “lagarta parda” pela coloração quase sempre castanha apresentada nos últimos ínstaes (Berti Filho, 1974, 1981 e 1991; Anjos et al. 1987; Barros et al., 1993 e Cunha et al. 1994).

A ocorrência de surtos e danos foram registrados por diversos autores, Berti Filho (1974) mencionou que na fase larval, *T. arnobia* consome, em média, 120,58 cm² de área foliar por lagarta. Conforme Oda e Berti Filho (1978), as perdas decorrentes do desfolhamento por lagartas de *T. arnobia* em *Eucalyptus saligna* com 2,5 e 3,5 anos de idade, foram de 40,4 % para 100 % de desfolha e de 13,2 % para 50 % de desfolha, apenas no ano subsequente à desfolha, em termos de ganho volumétrico de madeira.

Atualmente, devido a grande extensão de área plantada, o risco de contaminação ambiental, o grande porte das árvores, aumento nos custos de produção, desenvolvimento de resistência das pragas aos inseticidas comerciais e quebra no sistema de controle natural da floresta, o controle químico tem sido pouco utilizado. O controle biológico têm demonstrado resultados satisfatórios, principalmente com uso da bactéria *Bacillus thuringiensis*.

Diversas empresas de reflorestamentos comerciais de eucalipto realizam criações de predadores como *Podisus nigrispinus* e *Montina confusa* e parasitóides do gênero *Trichogramma* para liberações nas épocas de surtos. O uso de vírus também pode ser uma alternativa de controle satisfatória principalmente pela especificidade à praga alvo, fato este que contribui para que atuem outros inimigos naturais presentes na floresta.

2.2 - Controle biológico de pragas florestais com entomopatógenos

A adoção de um produto microbiano como prática de controle biológico tem sido mais freqüente quando o uso dos produtos químicos não é possível devido à resistência da praga a esses produtos, contaminação humana e ambiental. Nessas situações, as vantagens dos produtos biológicos são maiores em relação aos químicos convencionais, além de possuírem um histórico de segurança sobre o ambiente

e a saúde humana. De acordo com dados do IBAMA (1998), no Brasil apenas três produtos biológicos estão registrados para uso em florestas; são aqueles à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e var. *aizawai* e nenhum produto à base de vírus.

Existem alguns registros de ocorrência natural de patógenos em lepidópteros desfolhadores de eucalipto no Brasil. Em 1976, no município de Coronel Fabriciano, MG, ocorreu um surto de *Sabulodes caberata caberata* Guenée, 1857 em 300 ha de *E. grandis* e *E. saligna*, que foi debelado pela ação de uma doença com características viróticas, cujo agente causal não foi identificado. Na região de João Pinheiro, MG, no período de 1983/1986, em condições de campo, surgiu uma epizootia em lagartas de *T. arnobia* e que configurou como um dos elementos importantes para a redução da população da praga. Algumas empresas de reflorestamento da região chegaram a realizar pulverizações em áreas infestadas pela praga, com macerado de lagartas doentes. O agente causal foi enviado para identificação, mas não foi obtido nenhuma definição taxonômica (Zanuncio *et al.* 1993).

Uma das primeiras tentativas de utilização de vírus para controle de insetos ocorreu em 1942, com a introdução de um Vírus da Poliedrose Nuclear (VPN) em populações de *Lymantria monacha*, em florestas de *Pinus*, na Alemanha (Huber 1986). Balch e Bird (1944) citados por Moscardi, (1998) relataram a importância do controle natural exercido por um NPV de *Gilpinia hercyniae*, 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 não havia ainda se estabelecido, para aumentar o controle natural de *G. hercyniae*.

Lymantria dispar é uma das principais pragas em florestas da América do Norte. Seu ataque nestas áreas chega a atingir mais de 5 milhões de acres por ano (Reuveni, 1995). Em estudos realizados por Reardon e Podgwaite (1976) e Raimo *et al.* (1977), citados por Reuveni, (1995), os autores mencionaram uma correlação positiva entre a incidência natural do VPN no campo e os parasitóides

Cotesia melanoscelus e *Parasetigena agilis*. Fêmeas de *Cotesia* transmitiriam o vírus para lagartas sadias quando em contato com lagartas infectadas. Pulverizações de VPN e liberações destes inimigos naturais, provocaram um controle de 90 % na população de *L. dispar*.

Trabalhos de Woods et al. (1991) e Weseloh e Andreadis (1986) relataram a dinâmica da transmissão do vírus da poliedrose nuclear em populações de campo e de laboratório de *L. dispar*. O NPV atua como um importante fator responsável na redução da alta densidade desta mariposa. A contaminação do ambiente pelas fezes das lagartas doentes e rompimento do tegumento de lagartas em alto estado de infecção, desempenharam importante papel no mecanismo de transmissão do patógeno bem como a sua disseminação entre e dentro das gerações de *L. dispar*. Os autores mencionaram que as larvas de primeiro instar que morrem mais rápido tendem a acumular-se na folhagem atuando como fonte de inóculo para larvas de instares mais avançado ou mesmo para surtos posteriores.

Em 1978, o Serviço Florestal Americano obteve o registro do NPV de *L. dispar* através da Agência de Proteção Ambiental (EPA) com o nome de Gypcheck. A partir daí cerca de 11000 hectares de florestas foram tratadas entre 1978 e 1993. O produto é utilizado no Canadá, EUA e Europa (Reuveni, 1995).

Os primeiros registros de vírus do tipo picornavirus em lepidópteros foi em Uganda, em florestas de pinheiro (*Pinus patula*), na década de 70, infestadas por *Gonometa podocarpi*. O surto foi controlado pelo vírus que foi caracterizado posteriormente e denominado Gonometa vírus (GoV). O vírus foi recuperado de larvas e pupas infectadas e foi muito eficiente no controle de populações da praga no campo (Scotti, 1994). Entretanto, até o momento não há registro de nenhum produto à base de GoV.

Larvas de himenópteros desfolhadores de florestas, principalmente do gênero *Neodiprion*, incluindo *N. sertifer*, *N. lecontei*, e *N. suanei*, tem sido motivo de grande esforço de controle através de vírus, na América do Norte e na Europa. O VPN de *N. sertifer* é o mais utilizado, tendo sido registrado nos EUA, em

1983, com a marca NEOCHECK . Um isolado do vírus foi produzido na Finlândia pela empresa Kemira OY que até 1982, comercializou este NVP, na região dos países Escandinavos, para pulverização de aproximadamente 9 mil hectares. Em 1983, uma formulação do NVP de *N. lecontei*, denominada Lecontvirus, foi registrada no Canadá. Este vírus foi produzido em campo, através de aplicações em florestas de pinheiro altamente infestadas pelo inseto; as larvas moribundas foram coletadas e congeladas para posterior, moagem, liofilização e formulação (Reuveni, 1995).

Em floresta de *Pinus* no Canadá, as lagartas dos ponteiros *Choristoneura fumiferana*, *C. occidentali*, e *C. pinus* foram controladas através de pulverização aérea de Baculovirus, em uma área de 2140 hectares. Em outra área de 16000 hectares, as mesmas pragas foram controladas com o mesmo vírus no ano seguinte (Reuveni, 1995). O autor menciona ainda que nenhum registro de epizootia foi notificado naquela região.

No Brasil apenas três produtos à base de *B. thuringiensis* foram registrados para controle de pragas em florestas. A eficiência desta bactéria para *T. arnobia*, *Sarsina violascens*, *Eupseudosoma involuta* e *Euselasia apisaon* tem sido comparável à dos produtos químicos no controle destes insetos. Foi em Minas Gerais, para controle de *T. arnobia*, que chegou a infestar mais de 300.000 hectares de eucalipto de uma vez, que o uso de *B. thuringiensis*, em florestas, tomou um grande impulso. (Zanuncio *et al.* 1993).

No Canadá e EUA, vários produtos à base *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* acham-se registrados para uso em floresta. Pulverizações aéreas tem sido feita com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* para o controle dos lepdópteros *Lymantria dispar* e *Orgyia leucostigma* (Lep.: Lymantriidae), *Choristoneura fumiferana* (Lep.: Tortricidae), *Lambdina fiscellaria fiscellaria* (Lep.: Geometridae). Apesar dos resultados serem sempre satisfatórios do ponto de vista de controle, os autores mencionaram que esta bactéria não apresenta especificidade para outras espécies de lepidópteros presentes na floresta (Van Frankenhuyzen *et al.* 1992) .

2.3 – Caracterização e importância dos vírus tipo “CrP-like viruses”

Embora baculovirus e reovirus tenham recebido mais atenção, outros grupos de vírus ocorrem em populações de insetos e no conjunto tem despertado interesse em seu potencial uso como bioinseticida (Evan & Shapiro 1997, Maddox 1994).

Segundo Scotti (1994), vírus tipo picorna apresentam partículas isométricas medindo cerca de 30 nm em diâmetro. Compreendem três principais grupos: vírus da paralisia em grilos (CrPV), *Drosophila C* vírus (DCV) e *Gonometa* vírus (GoV), os quais apresentam propriedades comparáveis aos Picornavirus que infectam vertebrados.

Os picornavirus de insetos (“CrP-like virus”) na maioria dos casos replicam-se no citoplasma das células epidérmicas do canal alimentar e gânglios nervosos. Insetos infectado apresentam movimentos descoordenados por causa da progressiva paralisia das pernas posteriores e morrem rapidamente. Os ortópteros e lepidópteros normalmente não apresentam sinais da doença nos primeiros estágios. Há casos em que insetos que adquiriram o vírus na fase larval mais adiantada (últimos instares) apresentam adultos debilitados e inférteis com morte rápida (Reinganum et al., 1970; Reinganum e Scotti 1976; Scotti, 1994).

Vírus das família Picornaviridae, Comoviridae e Caliciviridae são normalmente referidos como tipo picorna, devido a similaridade morfológica das partículas e propriedades fisicoquímicas, assim como os da família Sequiviridae. Picorna e calicivirose infectam mamíferos, enquanto as comovirose e sequivirose infectam plantas. Muitos vírus com propriedades biofísicas similar às picornavirose tem sido isolados de várias espécies de insetos. Conhecimentos sobre sua seqüência de nucleotídeos e organização genômica ainda são deficientes e assim suas relações taxonômicas ainda se acham em discussão (Sasaki et al., 1998).

Segundo Czibener et al. (2000) e Johnson e Christian (1998), *Drosophila C virus* (DCV), *Plautia stali intestine virus* (PSIV), *Rhopalosiphum padi virus* (RpV), *Himetobi P virus* (HPV), *Triatoma virus* (TrV) e *cricket paralysis vírus* (CrPV) são vírus que apresentam propriedades físicoquímicas semelhantes aos da família Picornaviridae. Entretanto, a organização genômica destes vírus difere dos demais desta família. Baseado nessa premissa os autores sugerem uma nova família para aqueles vírus.

Rozas Dennis et al. (2000) estudaram quatro métodos para detectar partículas virais em colônias de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) coletados no campo e em colônias de laboratório.

O DCV foi isolado em populações de laboratório de *Drosophila melanogaster*, na década de 1960 (Scotti, 1994). Estudos de Johnson e Christian (1998) sugerem que, devido a organização genômica do DCV, este pertença a uma família indefinida. Os autores mencionaram ainda que a capa protéica do DCV apresenta três principais proteínas de 31, 30 e 28 kDa. Outras duas também foram encontradas, 37 e 8,5 kDa. Estas proteínas foram nomeadas de VP1, VP2, VP3, VP0 e VP4, respectivamente, por causa da aparente similaridade com os picornavírus. Foi demonstrado que a proteína VP0 do DCV é precursora da VP3 e VP4. Há evidências de que as proteínas do capsídeo são transformadas de uma proteína precursora distinta de cerca de 100 kDa em tamanho. O tamanho da partícula é de 28 nm; o genoma apresenta um RNA variando de 7,3 a 8,8 kb em tamanho.

Comparações da sequência de amino ácidos de várias proteínas de vírus das famílias Sequiviridae, Comoviridae e Picornaviridae demonstraram que o DCV apresenta algumas similaridades com alguns representantes destas famílias, mas não com outros. Estes dados apresentam argumentos para sugerir que o DCV e, provavelmente, o CrPV devam ser colocados em um grupo à parte (Johnson e Christian 1998).

Vírus similares aos picornavírus tem sido encontrados em várias espécies de afídeos, mas poucos são purificados e caracterizados. Dentre os mais

estudados pode-se citar, Rhopalosiphum padi virus (RhPV), aphid lethal paralysis virus (ALPV), Sitobion avenae virus (SAV) e Acyrthosiphon pisum virus (APV). Este último foi isolado do pulgão da ervilha *Acyrtosiphon pisum*. O APV é isométrico com diâmetro de 31 nm. A capa protéica deste vírus é composta de quatro principais proteínas com massa molecular de 34, 23, 24, e 66 kDa, respectivamente. O genoma é um RNA de fita simples e polaridade positiva de aproximadamente 10 kb (Van Der Wilk et al. 1997).

Estudos recentes de Stanway et al. (2001), revelaram que o APV teria um RNA subgenômico. O APV parece ser filogeneticamente distinto do novo gênero, “CrP-like viruses”.

Rhopalosiphum padi virus (RhPV), infecta um limitado número de espécies de afídeos, e inclui três vetores comuns do nanismo amarelo da cevada (barley yellow dwarf viruses): *R. padi* (L.), *R. rufiabdominalis* (Sasaki), e *Schizaphis graminum* (Rondani). Apesar de as infecções do RhPV não apresentarem efeito letal para os afídeos, estes apresentam uma redução da longevidade e fecundidade em função da doença. Não há registro de replicação deste vírus nas células da planta, que é utilizada como reservatório passivo. RhPV é isométrico com 27 nm em diâmetro, capa protéica composta de três proteínas de 28, 29 e 30 kDa, análogas às proteínas VP2, VP3 e VP1 dos picornavirus. O genoma do RhPV é de aproximadamente 10 kb, maior do que os picornavirus. Análises do RNA de fita dupla (dsRNA) sugere que o RhPV produz RNAs subgenômicos. A seqüência de nucleotídeos sugere a inclusão do RhPV no mesmo grupo em que se encontram DCV, PSIV e CrPV (Moon et al., 1998).

O CrPV foi descoberto durante um programa de criação massal de grilos (*Teleogryllus commodus*) em campos da Austrália, na década de 1960. Os insetos jovens começavam com paralisia seguida de morte (Scotti 1994). Moore et al. (1980) informaram que o CrPV apresenta partícula isométrica de 27 nm em diâmetro, a capa protéica composta de quatro proteínas de 34, 32, 31 kDa e uma proteína menor de 43 kDa correspondente a VP0 dos picornavirus de mamíferos, apresentou RNA de 7,4 a 8,3 kb.

Nakashima *et al.* (1998) estudaram as propriedades de um possível picornavirus isolado do percevejo *Plautia stali* e o nomearam como Vírus do Intestino de *Plautia stali* (PSIV), baseado no sítio de multiplicação do vírus no intestino do inseto. Apesar de o PSIV ser sorologicamente distinto do *Nezara viridula* vírus-1, é capaz de infectar os percevejos *N. viridula* e *Halyomorpha halys*.

Sasaki *et al.* (1998) informaram que PSIV é isométrico com 30 nm de diâmetro; sua capa protéica apresenta três principais proteínas de 33, 30 e 26 kDa, uma proteína média de 35 kDa e uma proteína menor de 4,5 kDa. O genoma é 9,1 kb.

Williamson e Wechmar (1995) isolaram e caracterizaram dois possíveis picornavirus do percevejo verde *N. viridula*, *N. viridula* vírus tipo 1 (NVV-1) e *N. viridula* vírus tipo 2 (NVV-2) e estudaram o efeito destes vírus na metamorfose, fecundidade e longevidade destes percevejos. A longevidade e fecundidade de adultos infectados foi significativamente menor que a de adultos sadios. A capa protéica do NVV-1 é composta de três proteínas de peso molecular 32,1; 31,5 e 30,7 kDa e RNA de 9,4 kb em tamanho. O NVV-2 apresentou uma proteína de 73,8 kDa e duas menores de 16,5 e 13,5 kDa e RNA de 6,2 kb.

Muscio *et al.* (1987) isolaram um vírus com características de picornavirus infectando *T. infestans*, um dos percevejos vetor do *Trypanosoma cruzi* transmissor da doença de chagas. Os insetos doentes apresentavam movimentos descoordenados, paralisia das pernas posteriores seguida de morte. As partículas deste vírus mediam cerca de 30 nm de diâmetros e que ocorriam em abundância no cérebro, corpo gorduroso, tubos de Malpighi e intestino.

Chao *et al.* (1983) caracterizaram um provável picornavirus isolado de *Pseudoplusia includens* com propriedades físicoquímicas, sorológicas e citopatologia semelhantes ao vírus da paralisia em grilo, *Teleogryllus oceanicus*, (CrPV_{vic}). Eletroforese em gel de agarose demonstrou que o RNA apresenta uma banda de peso molecular 5,6 kb e apenas uma proteína de 55 kDa foi detectada. Baseado

nestes dados os autores sugeriram sua inclusão no grupo dos CrPV_{vic} (vírus da paralisia em grilo) tendo sido designado como CrPV_{ark}.

Vírus isométrico, de 30 nm em diâmetro, foi isolado de um lepidóptero desfolhador de palmáceas, *Latoia viridissima* (Lepidoptera: Limacodidae). A capa protéica é composta de duas principais proteínas (VP1, VP2) de peso molecular, 30 e 31 kDa. O genoma é um RNA de fita simples cujo peso molecular foi de 8,5 kb (Fedière et al. 1990).

Monsarrat et al. (1995) isolaram um vírus do tipo picorna, de 27 nm em diâmetro, da lagarta rosada do algodoeiro *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera, Gelechiidae). Contudo, este vírus não apresentou efeito infeccioso esperado à praga hospedeira após passar por processos de purificação. A capa protéica apresenta três proteínas de 31,7, 32,6 e 47,4 kDa. Partículas do vírus foram encontradas no citoplasma das células epiteliais do intestino dos insetos, formando arranjos paracrystalinos. O vírus foi transmitido verticalmente para os insetos adultos.

O GoV foi encontrado infectando *Gonometa podocarpi* (Lepidoptera: Lasiocampidae) uma praga de pinheiro (*Pinus patula*) na Uganda, nos anos 70. O vírus foi recuperado de larvas e pupas infectadas e foi muito eficiente no controle de populações da praga no campo. As lagartas de *G. podocarpi* infectadas pelo GoV apresentaram degeneração de mitocôndrias e membrana celular e o citoplasma ficou tomado por partículas virais. As células do trato digestivo foram afetadas e as células do corpo gorduroso foram completamente degeneradas (Scotti, 1994)

2.4 – Caracterização de vírus

A avaliação das relações evolucionárias entre os principais grupos de microrganismos entomopatogênicos e o delineamento do conceito de espécie são ainda pouco conhecidos para muitos organismos com potencial como agente de controle biológico (Sosa-Gomez et al., 1998).

Vírus de insetos tem despertado interesse desde as descobertas iniciais, devido ao interesse geral no entendimento das patologias induzidas e mais particularmente por causa do seu potencial ambientalmente favorável ao manejo de pragas. Durante muitos anos sua identificação era baseada somente nos sintomas, fato esse que originou vários nomes descritivos baseado na etiologia da doença. Somente nos anos 40 e 50 através dos trabalhos pioneiros de Steinhaus (1956) citado por Evans & Shapiro (1997), foi possível a identificação do agente causal dessas doenças em insetos. Através das técnicas de microscopia eletrônica foi possível descrever vários grupos de vírus de acordo com as combinações de sintomas e características morfológicas da partícula. O desenvolvimento de técnicas bioquímicas e moleculares a partir dos anos 60 e seu contínuo refinamento abriu o caminho para mais detalhes taxonômicos destas viroses e a identificação tem se tornado mais rápida (Evans & Shapiro 1997).

O diagnóstico para identificação usando microscopia eletrônica, é uma ferramenta efetiva para distinguir as principais características dos grupo de vírus. Secções ultra finas de tecidos do corpo e órgãos ou preparações de vírus purificadas pode revelar um diagnóstico das características necessárias no processo de identificação (Evans & Shapiro 1997). Evidentemente essas características devem ser relacionadas com as mencionadas na literatura para o grupo de vírus em questão.

As técnicas bioquímicas e moleculares utilizadas no processo de caracterização de um vírus podem ser consideradas como uma ferramenta de confirmação ao exposto em microscopia eletrônica quanto às características da partícula nas células dos hospedeiros. São procedimentos especializados de custo relativamente alto, que pode fornecer informações precisas de gênero e até de espécies de vírus dentro de um determinado grupo (Evans & Shapiro 1997).

A caracterização sorológica tem suas bases na capacidade que possui o sistema imunológico dos vertebrados, de reconhecer as moléculas estranhas (antígenos) ao sistema. Como resultado da estimulação do sistema imunológico são produzidas proteínas denominadas anticorpos, que interagem em reações específicas

(antígeno-anticorpo), as quais podem ocorrer “in vitro”, formando complexos de baixa solubilidade, que podem ser visualizados ou avaliados, quantitativamente ou qualitativamente (Sosa-Gomez et al., 1998).

Por volta de 1960, foi possível pela primeira vez organizar um sistema de classificação baseado inteiramente nas propriedades do próprio vírus, por um comitê de especialistas, denominado International Committee of Virus Taxonomy (ICTV). Foi proposto um sistema de classificação hierárquica considerando em ordem de importância: tipo de ácido nucléico (DNA ou RNA), forma da partícula (helicoidal, isométrica e complexa) e presença ou ausência de membrana. Com relação à morfologia dos vírus, os estudos feitos ao microscópio eletrônico mostraram inicialmente uma grande variedade de formas, mas exames mais detalhados, feitos após a introdução da técnica de contrastação negativa, evidenciaram essencialmente que todos os vírus poderiam ter: forma helicoidal, quando as subunidades protéicas se dispõem em hélice; isométrica (ou icosaedral) quando essas subunidades formam um envoltório de forma icosaedral (sólido geométrico de vinte faces triangulares). Com relação à nomenclatura dos componentes virais, o complexo protéico que protege o ácido nucléico nas partículas, usualmente formado por um número limitado de polipetídeos, é denominado de capsídeo e as subunidades que o compõe, de capsômero. O conjunto ácido nucléico e capsídeo é referido como nucleocapsídeo (Ribeiro et al. 1998).

O ICTV reúne-se periodicamente para promover ajustes na classificação e analisar as propostas de inclusão/exclusão/alterações/fusões de espécies, gêneros, famílias etc., e produz um relatório atualizando a taxonomia dos vírus. O último comitê, dirigido por Murph e outros, produziu o relatório em 1995. Quando existem informações suficientes reconhece-se uma dada espécie de vírus indicando-lhe um gênero (tentativas de se usar nomenclatura binomial latina foram abandonadas). Os gêneros são reunidos em subfamílias ou famílias, e apenas uma ordem está reconhecida (Monogavirales). A terminologia taxonômica formal, adotada pelo ICTV sugere o nome da família seguido do gênero em itálico e o nome do inseto hospedeiro. No caso da família Picornaviridae os gêneros reconhecidos só ocorrem em vírus que infectam

apenas vertebrados, mas há vários que atacam insetos e aguardam definição taxonômica (Ribeiro et al. 1998).

Um novo grupo de estudos dos vírus da família Picornaviridae membros do ICTV, informaram que os vírus tipo picorna descritos até agora permanecem sem definição taxonômica. Pesquisas tem demonstrado que a organização genômica destes vírus difere das picornavíruses de mamíferos, e sugerem no mínimo três novas famílias para agrupá-los. Apesar das diferenças fisicoquímicas e biológicas entre estes vírus, todos foram agrupadas num “gênero flutuante” nomeado “víruses tipo paralisia em Grilos” (Cricket paralysis-like viruses [CrP-like viruses]) (Stanway et al. 2001).

Mais recentemente, a identificação precisa de isolados se tornou um pré-requisito para o registro e a obtenção da patente de um produto comercial. Isto facilita o acompanhamento da pureza durante os processos de produção e comercialização dos agentes de controle microbiano, monitoramento da eficiência e da persistência do isolado no meio ambiente (Sosa-Gomez et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu e Laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. A parte pertinente a microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no NAP/MEPA, ESALQ/USP.

3.1 - Criação de *T. arnobia*

Lagartas de *T. arnobia* provenientes da criação estoque do Departamento de Produção Vegetal da UNESP Campus de Botucatu, foram criadas conforme Wilcken (1997), para multiplicação do vírus e para testes de patogenicidade. As lagartas foram alimentadas com dieta artificial conforme Wilcken (1997).

3.2 – Origem do vírus

Lagartas mortas e apresentando sintomas de infecção por vírus foram coletadas no campo durante um surto de *T. arnobia* em florestas de *E. grandis* nos municípios paulistas de Itatinga em 1996 e Lençóis Paulista em 1997. As lagartas foram armazenadas em congelador a - 20°C.

3.3 - Descrição e adaptação da metodologia de multiplicação do vírus

Lagartas infectadas com o vírus provenientes de áreas de *Eucalyptus* foram levadas ao laboratório para multiplicação do vírus. As lagartas foram maceradas na presença de tween 80® e misturadas em água destilada esterilizada (10 lagartas grandes mortas ou 20 pequenas para 7,0 ml de água). A suspensão viral foi filtrada em gaze ou algodão, sendo estes esterilizados em lâmpada germicida antes do uso. Lagartas provenientes da criação estoque (de primeiro ao sexto instar) foram alimentadas com folhas de *Eucalyptus grandis* previamente pulverizadas com a suspensão viral preparada. Lagartas infectadas no laboratório foram mantidas em condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C) umidade relativa ($60 \pm 5\%$) e fotofase de 14 horas. Lagartas mortas durante o ensaio foram armazenadas em freezer a -10 °C, para purificações posteriores do vírus.

3.4 - Descrição e adaptação das metodologias de purificação do vírus

O vírus foi purificado por duas metodologias diferentes. A primeira foi baseada em trabalhos de Nakashima *et al.* (1998), Williamson and von Wechmar (1992), com algumas modificações. Lagartas mortas com o vírus no laboratório foram maceradas e misturadas com tampão fosfato (KH_2PO_4 e Na_2HPO_4) 0,1M, pH 7,2, 10 ml de tampão por grama de tecido de lagarta. A suspensão viral foi

filtrada em gaze e em seguida centrifugada a 10.000g (8.000 rpm), em ultra centrífuga (rotor ss 34) por 20 min. O sobrenadante foi centrifugado em colchão de sacarose a 100.000g (29.000 rpm), em ultra centrífuga (rotor T30) por duas horas. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato 7,2 depositado em gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) a 34 % e centrifugado a 39.500 rpm por 16 horas, a 6°C (rotor SW41), conforme metodologias de Chao *et al.* (1983), Chao *et al.* (1986) e Nakashima *et al.* (1998) com algumas modificações. A banda contendo o vírus foi coletada com auxílio de uma pipeta de Paster e após diálise foi armazenada.

O segundo processo utilizado na purificação do vírus segue a metodologia descrita por Van Den Heuvel *et al.* (1997). os insetos foram triturados em liquificador com tampão fosfato 0,1M, pH 7,1, numa proporção de 7 ml/g de tecido de inseto. O extrato foi clarificado adicionando-se 1:1 (v/v) de clorofôrmio e 1-butanol e centrifugado a 10.000 rpm (rotor GSA) por 15 minutos. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se triton X-100 (1% v/v), polietilenoglicol 8000 (PEG) (8% v/v) e cloreto de sódio 0,4M, respectivamente. A suspensão foi agitada por uma hora, seguida de repouso de uma hora. Em seguida centrifugou-se 12.000 rpm por 20 minutos. O pellet formado foi ressuspenso em tampão fosfato e depositado sobre colchão de sacarose de 15 % e centrifugado a 29.000 rpm por 3 horas (rotor T30). O pellet formado foi ressuspenso em tampão fosfato e depositado sobre gradiente de equilíbrio de cloreto de céσιο, constituído de cinco camadas (1,2-1,6 g/cm³) e centrifugado por 16 horas a 31.000 (rotor SW 41). As bandas formadas foram coletadas e dializadas.

Foi feita diálise em tampão fosfato 0,1M diluído (1/10 do volume inicial) (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 (Dialysis Tubing) com uma porosidade de 25 Angstroms. Em seguida o vírus foi coletado e armazenado em freezer a -20 °C para avaliações posteriores.

As preparações virais foram analisadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta, usando-se a faixa de comprimento de onda de 260 a 280 nm. As suspensões do purificado nas duas metodologias descritas foram transferidas para

telinhas de cobre cobertas com Formvar® e posteriormente contrastadas com acetato de uranila 1%, e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900

3.5 - Microscopia eletrônica

Extratos brutos, semi purificados, e purificados obtidos a partir de lagartas de *T. arnobia* sadias e lagartas exibindo sintomas de viroses, experimentalmente infectadas em laboratório, foram examinados ao microscópio eletrônico de transmissão para visualização das partículas do vírus. As preparações foram contrastadas negativamente com acetato de uranila 1% e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão (técnica de imersão rápida “leaf dip”).

Para visualização dos vírions *in situ*, lagartas de *T. arnobia* sadias ou infectadas experimentalmente com vírus foram dissecadas em solução de Ringer e fragmentos de diferentes partes do corpo (intestino, músculo, ectoderme) imersos imediatamente numa solução fixadora de Karnovsky modificado (2,5% glutaraldeído +2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio pH 7,2, 0,05M + CaCl₂ 0,001M). Após 2-6 h de fixação os tecidos foram lavados no tampão e fixados por 2 horas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, desidratados em uma série crescente de acetona, infiltrado e emblocado na resina de baixa viscosidade Spurr. Os blocos foram seccionados em um ultramicrotomo Leica Ultracut UCT equipado com navalha de diamante Diatome. As secções foram coletadas em telinhas de cobre 150/200 mesh cobertas com película de Formvar®, contrastadas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo de Reynolds (Kitajima & Nome, 1999) e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

3.6 - Produção do antissoro

Para a produção de antissoro em coelho foi utilizado um animal da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 3 meses de idade, cedido pelo Biotério

da UNESP. Inicialmente foi coletada uma amostra de sangue do animal para obtenção de soro normal. A preparação viral purificada foi emulsionada com adjuvante incompleto de Freud em iguais proporções, sendo a mistura injetada via intramuscular na coxa do animal. Semanalmente foi aplicado 1 ml da emulsão contendo 200 µl do vírus purificado, num total de 5 imunizações. Uma semana após a última injeção, o sangue foi coletado através de cortes feito na veia marginal da orelha do coelho. Foram coletados em torno de 30 ml de sangue. Após a coagulação, o soro foi coletado e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O soro sangüíneo foi transferido para recipientes eppendorf, os quais foram etiquetados e armazenados a -20 °C, conforme metodologia desenvolvida por Chao et al. (1983), Chao e et al. (1986).

3.7 - PTA-ELISA

Para verificar a presença do vírus de *T. arnobia*, foi feito o teste sorológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”), com algumas modificações da forma descrita por Mowat & Dawson (1987). Utilizou-se o antissoro produzido para esta finalidade. Lagartas sadias e infectadas foram maceradas individualmente em almofariz na presença de tampão carbonato (0,015 M Na₂CO₃, NaHCO₃ pH 9,6) ao vírus purificado também foi adicionado o mesmo tampão, na diluição de 1:20, sendo então colocados 100 µl destas amostras por pocinho, em uma placa de ELISA, usando o mínimo de 2 pocinhos por amostra. Promoveu-se a incubação por 1,5 hora a 37°C, seguida de 3 lavagens consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH₂ PO₄, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na₂ PO₄, 0,003 M KCl, pH 7,4 + 0,5 mL Tween 20/L), adicionando-se posteriormente 100 µl de antissoro específico diluído 1:1000 em tampão Tris-HCl, (0,2 M Tris-HCL, 0,15 M NaCl, pH 7,2). Novamente a placa de ELISA foi incubada por 1,5 hora a 37°C e lavada com PBS-Tween 3 vezes consecutivas. Posteriormente 100 µl de imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-8025), diluída 1:32.000 em tampão Tris-HCl, pH 7,2 foram adicionados em cada pocinho, promovendo-se a incubação e as

lavagens como detalhadas para as fases anteriores. Decorrido o período de 1,5 h foram colocados 100µl do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA N-9389), diluído em dietanolamina (0,6 mg/ml), em cada pocinho. O substrato foi incubado à temperatura ambiente, no escuro, por 30 a 60 minutos. A reação foi avaliada medindo-se a absorbância a 405 nm em leitor de ELISA da marca Metertech Σ 960. Uma amostra foi considerada positiva quando seu valor de absorbância foi superior a 3 vezes o valor de absorbância de macerados de lagartas sadias. Amostras de lagartas infectadas com o vírus a ser testado e o vírus purificado, denominado controle positivo, e as amostras de lagartas sadias, controles negativos, foram utilizados em cada teste.

Também foi realizado o teste sorológico ELISA para as lagartas dos testes de especificidade utilizando-se o mesmo antissoro. As espécies utilizadas foram: *Bombyx mori* (Lep.: Bombycidae), *Sarsina violascens* (Lep.: Lymantriidae), *Iridopsis* sp, (Lep.: Geometridae) e *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae).

3.8 - Coloração do gel de poliacrilamida

O gel foi removido das placas de vidro e incubado no fixador do gel por 15 minutos em agitador (agitação leve e constante). Em seguida o fixador foi removido e o gel foi incubado no corante coomassie stain 0,1 % por mais 15 minutos. Após os procedimentos mencionados, o gel foi incubado em solução para descolorir por aproximadamente 18 horas e fotografado em seguida.

3.8.1 – Transferência do gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose (Técnica de Western Blot)

Lagartas de *T. arnobia* sadias e infectadas com vírus foram maceradas e misturadas em tampão TE 1X (Tris 1,0 M, pH 7,4, EDTA 0,5 M, pH 8,0) na proporção de 0,25 g de amostra para 500 µl de tampão. Desta suspensão retirou-se 200 µl e misturou-se a 200 µl de tampão de dissociação (TRIS 0,5 M, pH 6,8, SDS 5%,

β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0,05%, glicerol 5%). A suspensão assim preparada foi colocada em eppendorfs e levemente homogeneizada. A desnaturação das proteínas foi completada incubando-se as amostras em água fervente por 5 minutos, seguida de centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos (centrífuga 5415 c).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se um aparelho “Bio Rad Mini Protean II”. O gel de separação foi composto por acrilamida 12,5%, água destilada, TRIS 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,1%, APS 0,1 % e TEMED 0,033 % e o gel de empilhamento (carregamento) por acrilamida 4%, água destilada, TRIS 1,0 M, pH 6,8, SDS 1%, APS 1% e TEMED 0,05%. Cada canaleta recebeu em média de 7 a 10 μ l da amostra a ser analisada. Uma canaleta recebeu 7 μ l de proteínas marcadoras, com peso molecular na faixa de 10 a 250 kDa (Raimbow, Amersham LIFE SCIENCE). Promoveu-se a eletroforese por 20 minutos a 95 Volts, até a linha frontal do azul de bromofenol atingir o gel separador. Em seguida a voltagem foi elevada para 125 Volts. A corrida foi interrompida quando as amostras chegaram na base gel.

Posteriormente as proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, empregando-se tampão de transferência (TRIS 1,0 M, glicine 1,5%, metanol 20%). A transferência foi feita em um aparelho “Bio Rad Mini Trans-blot cell”, por 90 minutos a 0,25 mA.

A membrana contendo as proteínas das amostras foi submetida a uma reação sorológica, a fim de revelar a presença da proteína da capa protéica do vírus analisado. Inicialmente a membrana foi lavada por 2 a 3 minutos com TBS (TRIS 0,002 M, pH 7,4 , NaCL 0,15 M + Tween 20 {0,05%}). Em seguida foi incubada em TBS/Tween contendo 7 % de leite em pó desnatado, por 30 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se a membrana para uma suspensão de anticorpo específico contra o vírus a ser testado, diluído 1:1.000, em TBS/Tween contendo leite em pó desnatado 7,0%, incubando-a sob agitação constante, durante 3 a 4 horas, à temperatura ambiente (ou durante a noite a 4°C). A membrana foi lavada por 2 a 3 minutos, 3 vezes, consecutivamente, com TBS/Tween. A seguir a membrana foi incubada, por 2 a 3 horas

sob agitação constante à temperatura ambiente, em uma solução contendo imunoglobulina G (IgG) conjugada com fosfatase alcalina (SIGMA A-8025), diluída 1:32.000 em TBS/Tween + leite em pó desnatado 7,0%. Depois desse período lavou-se a membrana em TBS/Tween, durante 2 a 3 minutos cada vez. Finalmente adicionou-se o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato/nitro blue tetrazolium, pH 9,5 (NBT/BCIP – SIGMA B-5655), diluído em água destilada, adicionou-se 50 µl do substrato NBT, 25 µl de BCIP e 1,0 ml de tampão AP Buffer (Fosfatase alcalina 10 X) e completou-se o volume para 10 ml de água destilada. Parou-se a reação lavando-se a membrana com água destilada. O peso molecular das proteínas da capa protéica foram medidos através do programa estatístico Imager Master® VDS (Softwares version 3) – Phamacia Biotech.

3.9 – Extração de RNA total e isolamento do RNA a partir de vírus purificado

Pesou-se 0,4 g de lagarta infectada e macerou-se em almofariz com gelo seco. Às lagartas maceradas adicionou-se 900 µl de STE, 50 µl 10% de SDS, 1000 µl phenol/clorofôrmio e 20 µl de β-mercaptoetanol. Os ingredientes foram bem misturados e transferidos para tubos plásticos (ependorfs) e centrifugados por 15 minutos, a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado 500 µl de fenol clorofórmio e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo onde depositou-se 50 µl de acetato de sódio (3 M, pH 5,2), adicionou-se também 1 ml de etanol 95% (álcool etílico). Homogeneizou-se levemente e armazenou-se a -20°C por uma hora e meia. Em seguida centrifugou-se as amostras a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após esta fase, o etanol foi retirado ficando o pellet, este foi ressuscendido em 500 µl de álcool 70 % e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi deixado para secar dentro do ependorfe por aproximadamente 20 minutos. Em seguida o

pellet foi resuspendido em 100 µl de ddH₂O; 0.2 µl 0,1M de DTT e 0,2µl de inibidor de RNase.

Metodologia de isolamento do RNA a partir de vírus purificado

Em eppendorf, depositou-se 20 µl de SDS 20% em 200 µl de vírus purificado. Incubou-se a 55°C em banho maria por cinco minutos. Em seguida adicionou-se igual volume de Tris fenol, pre-aquecido a 55°C, homogeneizou-se por cinco segundos em agitador de tubos e centrifugou-se a 10.000 g por dois minutos. Removeu-se a fase aquosa, adicionou-se igual volume de clorofórmio (álcool isoamil: clorofórmio) na proporção de 24:1. Agitou-se por 5 segundos e centrifugou-se a 10.000 rpm por um minuto. Removeu-se a fase superior e adicionou-se 0,5 volume de acetato de amônia 7,5M e 2,5 volume de etanol gelado 100%. Os eppendorfs foram homogeneizados delicadamente e armazenados a -20°C por uma hora. Em seguida centrifugou-se a 12.000 g por 25 minutos. Ao pellet formado adicionou-se 200 µl de etanol gelado a 70%. Centrifugou-se a 12.000 g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o pellet formado permaneceu por 15 minutos exposto para evaporar o excesso de líquido. Após este tempo, o pellet foi ressuspendido em 20 µl de tampão TE livre de RNase. Todo o processo de extração do RNA foi feito a 4°C. O gel de agarose foi preparado a 0,8 % em tampão TBE (1/10 do volume inicial) e brometo de etídio 0,05%. As amostras contendo RNA foram preparadas usando-se blue juice e H₂O DPC livre de Rnase. Foi colocado uma média de 10 µl de RNA por canaleta. O marcador foi preparado usando-se DNA Ladder (250 a 10.000 pares de bases) e o corante Loading Dye, foi adicionado 6 µl por canaleta.

3.10 – Análise de sobrevivência para verificar patogenicidade e/ou especificidade do vírus em lagartas de *T. arnobia* e em outras espécies de lepidópteros

Foram realizados testes com outras espécies de lepidópteros para verificar possíveis efeitos patogênicos do vírus de *T. arnobia* em *B. mori*, *S. violascens*, *Iridopsis* sp, e *S. frugiperda*. Grupos de 30 insetos de cada espécie mencionada, (com exceção de *B. mori* e *S. frugiperda*, cujo n=50), foram mantidos individualmente em potes de acrílico e alimentados por um dia com folhas de *Eucalyptus grandis* previamente pulverizadas com extrato bruto de lagartas doentes. Para *B. mori* foram oferecidas folhas de amora e para *S. frugiperda*, folhas de milho. Todas as folhas foram previamente descontaminadas com hipoclorito de sódio (4,0%) e lavadas por quatro vezes em água esterilizada, conforme recomendações de Moscardi et al. (1996). Para obtenção do extrato, macerou-se 10 lagartas doentes e adicionou-se 7 ml de água destilada esterilizada. A mistura foi então coada em algodão esterilizado e aplicado 200 µl em cada folha. Para cada espécie foi utilizado um grupo de insetos como controle e receberam como alimento folhas pulverizadas com água destilada esterilizada.

3.10.1 – Testes para avaliar a patogenicidade do vírus em fezes do predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)

Foram também realizados testes com o predador *P. nigrispinus* (5 casais individualizados). Aos predadores foram oferecidas lagartas de *T. arnobia* vivas, cinco dias após infectadas com o vírus. Os predadores foram alimentados com essas lagartas doentes durante aproximadamente 10 dias. Todos os dias foram coletadas as fezes, e misturadas com água destilada e armazenadas em freezer para testar a virulência das partículas virais eliminadas por estes predadores em lagartas de *T. arnobia* sadias. Para o grupo de predadores do controle foram oferecidas lagartas sadias.

Após se alimentarem com folhas contendo as fezes e prováveis partículas virais, as lagartas mortas foram submetidas a processo de purificação. O purificado foi avaliado em microscópio eletrônico.

3.10.2 - Análise estatística

Ao conjunto de dados obtidos, foram aplicadas técnicas de Análise de Sobrevida – área da estatística que estuda tempo até a ocorrência de um evento, no caso morte dos hospedeiros. É comum nesse tipo de dados a presença de observações censuradas, isto é, por algum motivo não foi possível observar a ocorrência do evento (o indivíduo sobreviveu ao tempo de estudo ou morreu por outra causa).

Deste modo, inicialmente, foram utilizadas técnicas não paramétricas para o ajuste das curvas de sobrevivência para cada instar, dentro de cada hospedeiro, através do estimador de Kaplan-Meier (1958). Para verificar a existência de possíveis diferenças (com relação à sobrevivência) entre os instares, foi utilizado o teste Log-Rank – cuja estatística tem assintoticamente distribuição Qui-Quadrado. Numa segunda etapa, foi ajustado o modelo semi-paramétrico de Cox (1972), com o qual foi possível obter a razão de risco entre dois instares e compará-los pelo Teste de Wald.

Ao conjunto de dados referentes a oviposição dos insetos adultos foi aplicada uma análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Multiplicação do vírus em colônias de laboratório

TaV proveniente de lagartas coletadas doentes (nos municípios paulistas de Itatinga em 1996 e Lençóis Paulista em 1997), foi multiplicado em colônias de lagartas de *T. arnobia* da criação estoque do laboratório de criação de insetos. Foram elaboradas análises de sobrevivência para cada instar que será discutida no item 4.7. A mortalidade em lagartas de primeiro ao quarto instar foi 100%. Lagartas infectadas no sexto instar e que atingiram a fase adulta apresentavam fêmeas com fertilidade bastante reduzida quando comparadas com fêmeas sadias (Quadro 1).

O presente estudo concorda em parte com os resultados obtidos por Williamson e Wechmar (1995) que estudaram o efeito do N. viridula vírus tipo 1 (NVV-1) e N. viridula vírus tipo 2 (NVV-2), na fecundidade e longevidade do percevejo verde *Nezara viridula*. Os autores verificaram que a longevidade e fecundidade de adultos infectados foi significativamente reduzida em comparação aos insetos sadios.

Rozas Dennis et al. (2000) verificaram que o Triatoma virus (TrV) provoca alta mortalidade nos primeiros instares do *T. infestans*. Os insetos de

último instar que sobreviveram à infecção apresentaram significativa redução na fecundidade.

As lagartas em todos os instares exibiam sintomas característicos de virose, como perda de líquidos através do aparelho bucal, fezes pastosas, interrupção do processo alimentar em torno de 24 horas após ingestão de folhas contaminadas. Depois de mortas apresentavam o tegumento flácido rompendo-se com facilidades. Não foi verificado sintoma de paralisia entre as lagarta doentes como os relatados para CrPV e DCV (Reinganum & Scotti, 1976; Scotti, 1994).

Quadro 1. Número médio de ovos e percentual de eclosão de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) provenientes de lagartas sadias e infectadas com TaV. Botucatu (SP), 2001.

	Adultos sadios		Adultos infectados	
			VC	DMS
Nº médio de ovos	843,8 a	543,8 b	35,0	20,9
Eclosão (%)	92,3 a	31,9 b	31,7	16,6

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste Tukey (P<0,05)

4.2 – Purificação do vírus de *T. arnobia*

Foram feitas 8 purificações do vírus de *T. arnobia* a partir de lagartas infectadas experimentalmente em laboratório. As metodologias utilizadas mostraram-se bastante eficientes. Amostras das suspensões do vírus purificado foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, sendo visualizadas uma grande quantidade de partículas do tipo picornavírus de aproximadamente 30 nm em diâmetro. Partículas menores de 15 nm, sugerindo vírus satélite, também foram detectadas (Figura 2B). Através da segunda metodologia de purificação foi possível separar as partículas

de 30 nm das de 15 nm. Nas primeiras purificações não foi possível observar a presença dessas partículas menores nas amostras do purificado, pois as lagartas eram coletadas mortas para a purificação. Estudos de Büchen-Osmond e Gibbs (2001) demonstraram que em infecções por picornavirus entre 6 e 10 horas após infecção começa o processo de lise nas células e liberação de partículas virais. Após 48 horas grande quantidade de partículas podem ser encontradas. Baseado nestes estudos acredita-se que os insetos mortos provavelmente já tenham eliminado grande quantidade de partículas. Segundo Chao et al. (1983) que caracterizaram um vírus isométrico de *Pseudoplusia includens*, o ideal não é esperar que o inseto morra pois muitas partículas virais são eliminadas através das fezes.

TaV purificado foi aplicado às folhas de *Eucalyptus grandis* e oferecidas às lagartas sadias para avaliar a infectividade das partículas. Os sintomas verificados foram idênticos aos sintomas observados por lagartas que foram alimentadas com folhas pulverizadas com extrato bruto de lagartas doentes. Entretanto as lagartas que foram alimentadas com o vírus purificado, em todos os instares avaliados, levaram mais tempo para morrer (Figura 1).

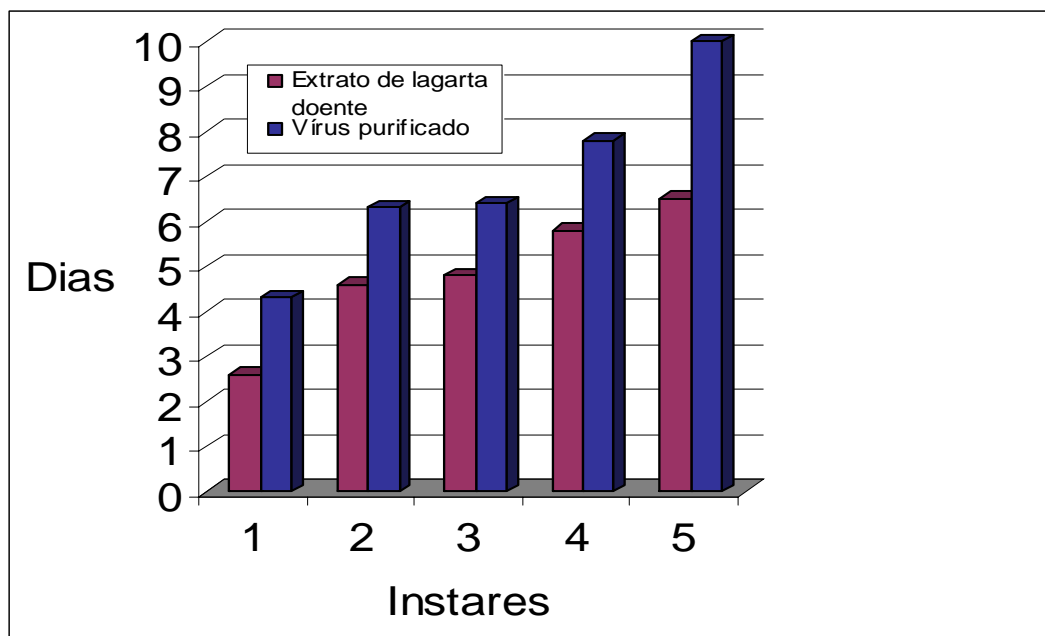


Figura 1. Número médio de dias que as lagartas de *Thyrintaina arnobia* (Stoll, 1782) levaram para morrer após se alimentarem com folhas de *Eucalyptus grandis* pulverizadas com extrato de lagartas doentes e vírus purificado. Botucatu (SP), 2001.

Uma possível explicação seria a grande quantidade de partículas vazias do vírus sem RNA, sem infectividade, que se acumula durante o processo de purificação (Williamson e von Wechmar, 1992). Verificou-se também que após 30 horas mais de 90% dos insetos que ingeriram tanto extrato de lagartas doentes quanto vírus purificado paravam completamente o processo alimentar.

Esse fato também foi verificado por Monsarrat et al. (1995) para *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) em que o período larval foi significativamente prolongado e a mortalidade foi menor a medida em que os insetos avançavam em seus instares, quando estes ingeriram partículas virais purificadas.

Outra hipótese pode estar relacionada com a pureza do material que foi oferecido às lagartas de *T. arnobia*. O extrato bruto de lagartas doentes pode conter outros microrganismos que potencialize o efeito do vírus nos insetos levando os a morrerem mais rápido.

4.3 - Microscopia eletrônica

Partículas isométricas de cerca de 30 nm foram encontradas consistentemente nos extratos de lagartas infectadas (Figura 2 A), mas não de sadias. Em preparações purificadas a partir de lagartas infectadas, foram constatadas predominantemente partículas de 30 nm em diâmetro, mas houve ocorrência também de partículas isométricas menores de 15-17 nm em diâmetro (ponta da seta -Figura 2 B).

Em secções ultrafinas, partículas de 25 a 30 nm, semelhantes às encontradas em extratos e preparações purificadas, (Figuras 2 A e B), foram

consistentemente encontradas no epitélio do intestino de lagartas doentes (Figuras 3 A, 3 B, 3 C, 3 D e 3 E), mas não nas sadias. Em outros tecidos examinados (músculos, ectoderma) as partículas não puderam ser detectadas. Foram elas também notadas no lumen do intestino, junto às microvilosidades (Figura 3 A). Estas partículas ocorriam também no citoplasma das células epiteliais do intestino, geralmente formando agregados paracristalinos (Figuras 3 B*, 4 C*). Outra característica marcante da maioria das células infetadas era a presença de corpos multivesiculares (CMV) cerca de 1 μm em diâmetro, limitado por uma ou duas membranas e de contorno circular ou elíptico (Figuras 3 B, 3 C, e 3 E; 4 A e 4 B). As vesículas contidas nestes CMV tinham cerca de 0,1 μm em diâmetro e frequentemente continham um material finamente fibrilar e usualmente encontravam-se distribuídas na periferia do CMV. Estes CMV possivelmente derivam de mitocôndrias, pois foram encontrados alguns deles com dupla membrana ostentando ainda as cristas, típicas de mitocôndrias (Figuras 4 B). Em células em início de degeneração o perfil dos CMVs tornam-se irregulares e com um conteúdo denso (Figura 3 D). Alguns destes CMVs apareciam parcial ou totalmente envoltos por cisternas do retículo endoplasmático (Figuras 3 E; 4 B). Não há relatos de vesículas similares na literatura consultada sobre o efeito citopático de vírus de inseto, mas CMV similar foi descrito no caso de infecção por Tombusvirus, um vírus de planta de morfologia similar (Francki et al. 1985) ao vírus de *T. arnobia*. Outro efeito citopático peculiar foi a presença de cristais formados por partículas isométricas de ca. 15 nm em diâmetro em áreas livres de organelas celulares, mas sem membrana envoltória no citoplasma e que parecem corresponder às partículas de similar dimensão, encontradas em preparações purificadas que talvez possa representar um vírus satélite (Figuras 4 C e 4 D). Sua natureza ainda não está esclarecida.

Larvas em estado avançado de infecção, apresentavam a maioria das células do epitélio intestinal significativamente alteradas e provavelmente disfuncionais fato este que deve resultar na morte do inseto.

As partículas isométricas de ca 30 nm em diâmetro, encontradas em suspensões purificadas e nos tecidos do intestino de lagartas, devem representar o

vírus de *T. arnobia* e tentativamente coloca-o junto aos prováveis vírus tipo picorna descritos em outras espécies de insetos. Aparentemente a infecção se limita ao epitélio do intestino, embora mais exames sejam requeridos para confirmar este fato. As partículas presentes no lumen provavelmente derivam de células epiteliais infectadas e eliminadas no ciclo de renovação do epitélio e é provável que sejam eliminadas com as fezes. A presença dos CMVs representa uma característica marcante da infecção pelo vírus de *T. arnobia* e as vesículas em seu interior talvez representem o sítio da replicação do RNA viral. Há indícios de que os CMVs derivem de mitocôndrias, pois em várias ocasiões foram observados CMVs em diferentes estágios de formação em que se notam cristas em seu interior.

Dados de Suzuki et al. (1993), revelaram que o principal sítio de replicação do Himetobe P Vírus (HiPV), em *Laodelphax striatellus*, seriam as células epiteliais do intestino. Este fato também foi registrado para várias viroses tipo picorna como: vírus da paralisia em grilos (CrPV), Drosophila C vírus, Rhopalosiphum padi vírus e vírus da paralisia letal em afídeos. Os autores mencionaram ainda que o sítio de replicação nos tecidos dos insetos varia dependendo do hospedeiro e combinações do vírus. Também o Plautia stali Intestine Vírus (PSIV) do percevejo *Plautia stali* apresenta sítio principal de replicação no intestino do inseto, fato este que lhe confere o nome (Sasaki et al., 1998).

Já se encontram publicadas várias descrições de efeitos citopáticos associados à infecção por vírus similares a picornavirus em insetos de diferentes ordens (Reinganum et al., 1970; Kitajima, 1976; Mussen & Furgala, 1977; Scotti, et al., 1981; Chao et al., 1986; Gildow & D'Arcy, 1990; Laubascher et al., 1992; Suzuk et al., 1993; Monsarrat et al., 1995; Lery et al., 1997; van den Heuvel et al., 1997; Nakashima et al., 1998). Em todos esses efeitos citopáticos, presumíveis partículas virais (PPV) de ca.25 nm em diâmetro nas secções, foram encontradas no citoplasma, dispersos ou formando agregados e eventualmente arranjos cristalinos como sucedeu também no caso do vírus de *T. arnobia* (Figuras 3 B, C e D e 4 A). Há raros relatos de sua presença no núcleo (Suzuki et al., 1993). Através de técnicas de imunomarcção

com ouro coloidal, algumas destas PPVs foram identificadas como de natureza viral (Suzuki et al., 1993; Laubascher et al., 1992; van den Heuvel et al., 1997).

Embora em alguns insetos essas PPVs tenham sido encontradas em diferentes tecidos, no caso do vírus de *T. arnobia* elas foram encontradas apenas no epitélio do tubo digestivo, em especial no intestino médio. Como observado por Suzuki et al. (1993) com a cigarrinha *Laodelphax striatellus* infectada pelo Himetobe P virus, mesmo em estágios avançados da infecção foram observadas células aparentemente normais e funcionais em meio a células infectadas e muitas delas sofrendo processo de degeneração. PPV foram também notadas no lumen do tubo digestivo (Figura 3 A).

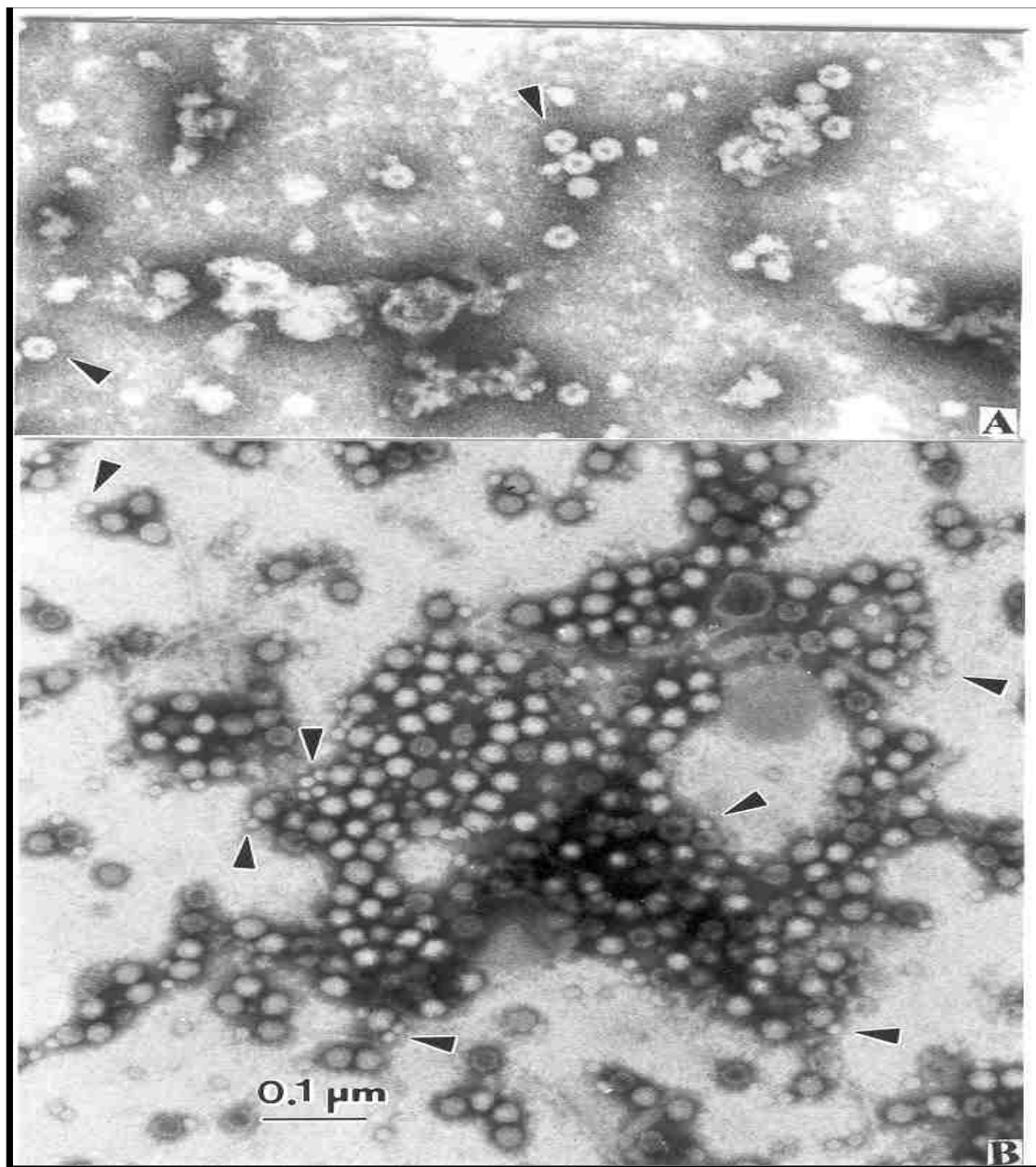


Figura 2. (A). Partículas isométricas de ca. 30 nm em diâmetro, presentes em extratos de lagartas infectadas pelo vírus da *Thyrinteina arnobia* (ponta da seta). (B) Preparação purificada contendo partículas similares às presentes no extrato. Também estão presentes partículas isométricas menores, de ca. 15 nm em diâmetro (ponta da seta).

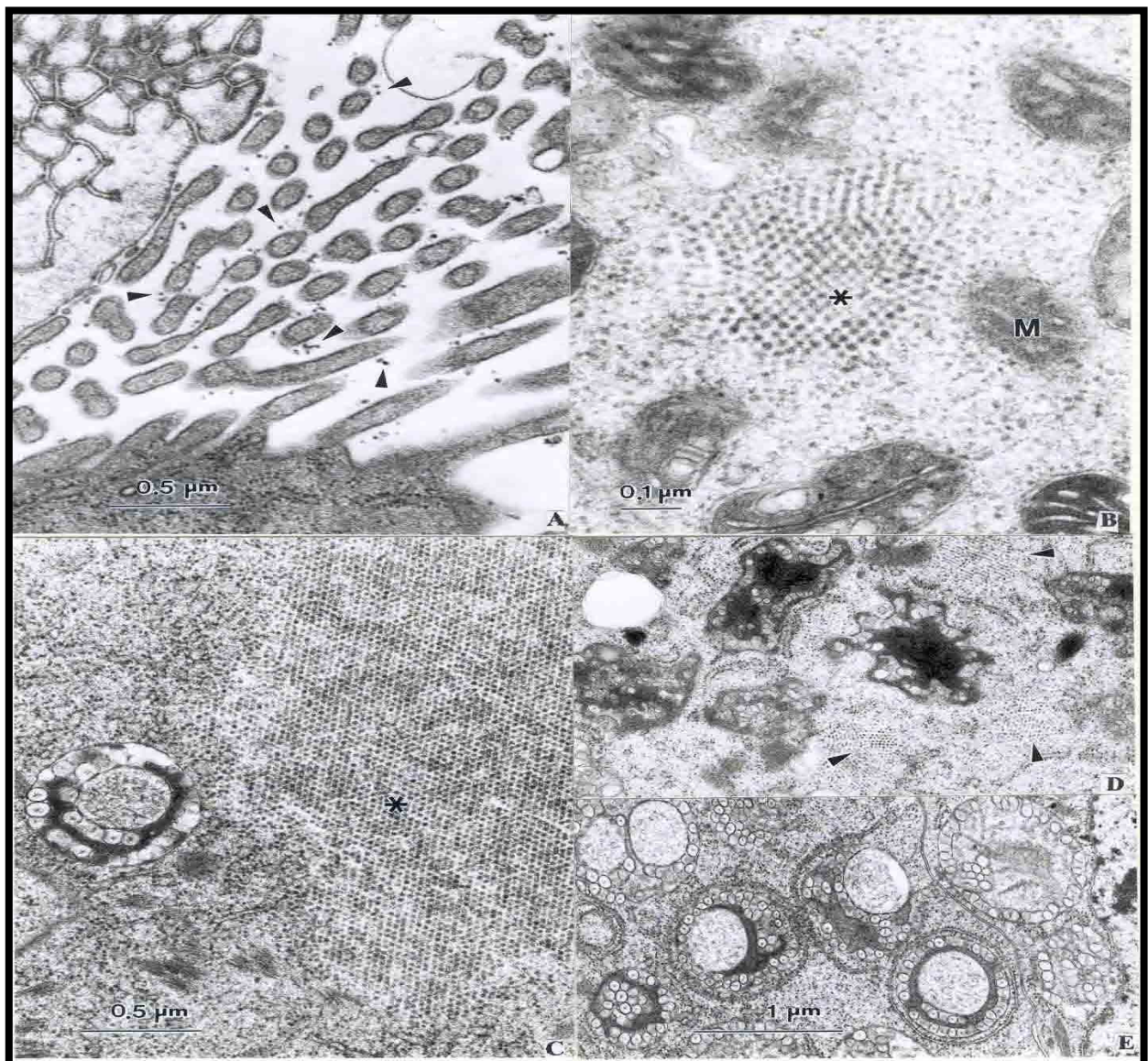


Figura 3. Micrografias eletrônicas de secções ultrafinas do epitélio do intestino de lagartas de *Thyrinteina arnobia* experimentalmente infectadas pelo vírus. (A) Parte apical do epitélio mostrando microvilosidades e presumíveis partículas

no lume (ponta da seta). (B e C) Parte do citoplasma de célula epitelial, contendo presumíveis partículas (*), M – mitocôndria. (D e E) Detalhe do corpo multivesicular. Em D, podem se ver agregados das presumíveis partículas virais (ponta da seta). Em E, alguns dos corpos multivesiculares acham-se envoltos pelo retículo endoplasmático.

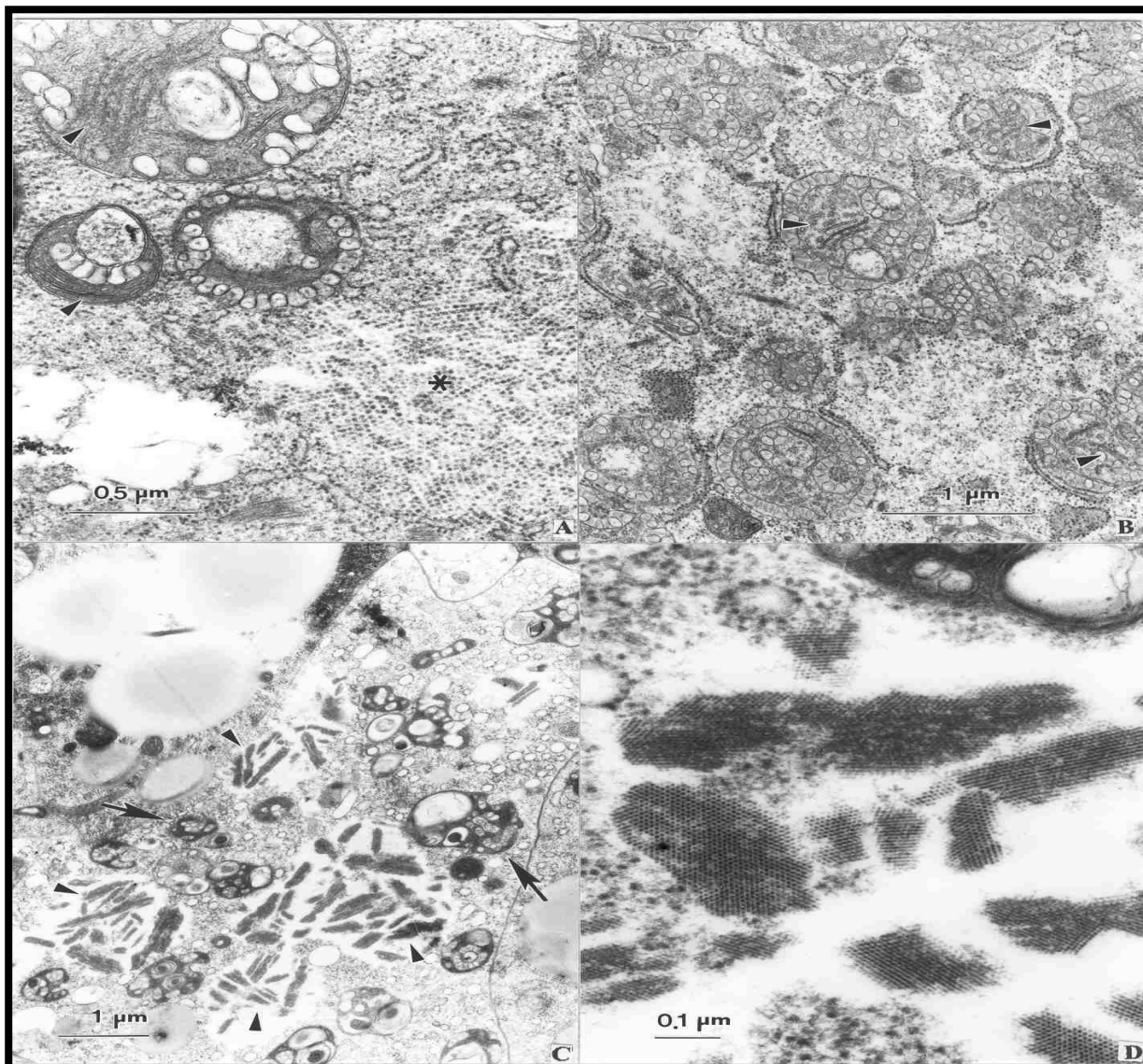


Figura 4. (A) Corpos multivesiculares parecem estar se originando de mitocôndrias, mostrando cristas (ponta da seta) no seu interior. (B) Grupo de corpos multivesiculares, alguns deles ostentando cristas em seu interior (ponta da seta). (C) Vista geral de célula epitelial infectada, mostrando corpos multivesiculares (setas) e grupos de partículas em arranjos paracristalinos (ponta da seta). Estes paracristais são formados de partículas isométricas menores, de ca. 15 nm em diâmetro, como pode se ver no detalhe em (D).

Figura 3. ~~Micrografias eletrônicas de seções ultrafinas do epitélio do intestino de lagartas de *Thyrinteina arnobia* experimentalmente infectadas pelo vírus. (A) Parte apical do epitélio mostrando microvilosidades e presumíveis partículas no lume (ponta da seta). (B e C) Parte do citoplasma de célula epitelial, contendo presumíveis partículas (*), M — mitocôndria. (D e E) Detalhe do corpo multivesicular. Em D, podem se ver agregados das presumíveis partículas virais (ponta da seta). Em E, alguns dos corpos multivesiculares acham-se envoltos pelo retículo endoplasmático.~~

~~Figura 4. (A) Corpos multivesiculares parecem estar se originando de mitocôndrias, mostrando cristas (ponta da seta) no seu interior. (B) Grupo de corpos multivesiculares, alguns deles ostentando cristas em seu interior (ponta da seta). (C) Vista geral de célula epitelial infectada, mostrando corpos multivesiculares (setas) e grupos de partículas em arranjos paracristalinos (ponta da seta). Estes paracristais são formados de~~

~~partículas isométricas menores, de ca. 15 nm em diâmetro, como pode-se ver no detalhe em (D).~~

4.4 – Sorologia

TaV foi sorologicamente detectado usando antissoro produzido em coelho. O antissoro reagiu fortemente contra as proteínas da capa protéica do TaV, e reagiu contra o vírus purificado e extratos de lagartas infectadas em ensaios de PTA-ELISA. A absorbância para o vírus purificado foi $1,779 \pm 0,074$. A absorbância para extrato de lagartas de *T. arnobia* sadias (controle negativo) foram $0,148 \pm 0,051$ enquanto que para as amostras de lagartas infectadas (controle positivo) a leitura foi $1,167 \pm 0,054$. (Quadro 1).

Os valores de absorbâncias obtidos para as lagartas de *B. mori* sadias (controle negativo) foram $0,239 \pm 0,014$ e para lagartas doentes $1,452 \pm 0,039$ (controle positivo). Os valores obtidos para *S. frugiperda* foram $0,072 \pm 0,024$ para o controle negativo e $0,425 \pm 0,045$ para o controle positivo. Para *S. violascens*, os valores obtidos foram $0,136 \pm 0,047$ controle negativo e $1,457 \pm 0,034$ para o controle positivo. Para o geometrídio *Iridopsis* os valores obtidos foram $0,093 \pm 0,021$ controle negativo e $1,452 \pm 0,076$ para o controle positivo (Quadro 2).

Todas as espécies mencionadas receberam como alimento folhas de seus respectivos hospedeiros previamente pulverizadas com o extrato bruto de lagartas de *T. arnobia* infectadas por TaV.

O antissoro produzido reagiu fortemente contra as proteínas da capa protéica do vírus de *T. arnobia*. Entretanto reagiu também em outras espécies de insetos que receberam como alimento folhas contaminadas com extrato de lagartas de *T. arnobia* infectadas. Uma hipótese é a probabilidade do vírus permanecer dentro do corpo do inseto e este não desenvolver a doença como foi verificado para as espécies de *B. mori* e *S. frugiperda*, cuja mortalidade observada não ultrapassou 10 % e os insetos que completaram o ciclo total foi superior a 90%. O vírus foi oferecido para as lagartas nos primeiros instares e não foi observado mortalidade até o quinto instar para as duas espécies avaliadas. Ao contrário da espécie hospedeira do vírus *T. arnobia* cujo índice de mortalidade é altíssimo nos primeiros instares larvais (Quadro 4) item 4.7.

Quadro 2. Valores médios de absorvância (A_{405}) obtidos para *Thyrnteina arnobia* e diferentes espécies de insetos alimentadas com folhas contendo extrato de lagartas de *T. arnobia* doentes, a partir do antissoro produzido contra as proteínas da capa protéica do vírus. Botucatu (SP), 2001.

Espécies	Valores de absorvância (\pm desvio padrão)	
	Lagarta sadia	Lagarta infectada
<i>T. arnobia</i>	0,148 \pm 0,051	1,167 \pm 0,054
<i>S. violascens</i>	0,136 \pm 0,047	1,457 \pm 0,034
<i>Iridopsis</i> sp	0,093 \pm 0,021	1,452 \pm 0,076
<i>B. mori</i>	0,239 \pm 0,014	1,452 \pm 0,039
<i>S. frugiperda</i>	0,072 \pm 0,042	0,425 \pm 0,045

4.5 – Reação sorológica (Western blot) e gel de poliacrilamida 12 %

Lagartas doentes e o vírus purificado com e sem partículas satélites foram submetidos a um teste de Western-blot com antissoro contra a capa protéica do vírus de *T. arnobia*. Observou-se que houve reação sorológica positiva, visualizada através das bandas de peso moleculares 47, 60 e 66 kDa respectivamente (16 determinações) (Figura 5). Estas proteínas também foram observadas no gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue 0,1 % (Figura 6).

Nas linhas 2 e 6 (Figura 5) a terceira proteína de 66 kDa não apareceu, esse fato pode estar associado a ausência de partícula satélite na amostra ou a sua quantidade não ter sido suficiente para formar a banda de proteína. A reação sorológica foi positiva tanto para vírus purificado (linhas 1 e 5), para vírus purificado sem partícula satélite (linhas 2 e 6) quanto para lagartas doentes (linhas 3 e 7). O

antissoro reagiu fortemente contra a proteína de 60 kDa (linhas 1, 2, 3, 5, 6 e 7) presente em todas as amostras de vírus purificado e lagartas doentes. Uma quarta proteína de aproximadamente 18 kDa também foi detectada em alguns geis, entretanto não foi observada na reação sorológica.

Segundo Williamson e von Wechmar (1992), é possível que algumas proteínas sejam perdidas no processo de purificação, como tem sido observado em outros vírus tipo picorna. Nas lagartas doentes a presença dessa proteína de 18 kDa também não teve frequência nos geis.

Segundo Monsarrat et al. (1995) muitos vírus do tipo picorna são conhecidos por apresentarem uma proteína fácil de ser detectada. A proteína de 60 kDa (Figura 5) foi facilmente marcada através da reação sorológica. Entretanto a proteína de 47 kDa foi fortemente marcada no gel de poliacrilamida corado com coomassie Blue 0,1 % (Figura 6).

Segundo Nakashima et al. (1998) os picornavirus de vertebrados apresentam três principais grupos de proteínas (VP1, VP2, VP3) e uma proteína menor (VP4). Normalmente as partículas imaturas apresentam uma outra proteína estrutural denominada (VP0) que se divide para formar as VP2 e VP4 em partículas perfeitamente desenvolvidas. Em vírus de inseto tipo picorna normalmente as proteínas da capa protéica dos vírus são em torno de três e apresentam peso molecular variando entre 25 e 45 kDa.

Baseado nas afirmações de Nakashima et al. (1998) e também com as observações do (Quadro 3), verificou-se pouca similaridade entre os vírus tipo picorna até agora estudadas e o vírus de *T. arnobia*, mencionado como TaV. Apesar do tamanho do genoma do TaV apresentar semelhança ao Pseudoplusia includens icosaédrico vírus (PIIV) e ao Nezara viridula vírus tipo 2 (NVV-2), as outras propriedades destes vírus diferem do TaV. Entre essas propriedades pode-se citar o tamanho da partícula e peso molecular das proteínas e tamanho do ácido nucléico.

Entretanto, a maioria dos vírus descritos no Quadro 3, apresentam desenvolvimento da doença nas células epiteliais do intestino, sítio de

replicação normalmente se limita às organelas citoplasmáticas, semelhante ao TaV. Outra característica comum é o efeito citopático registrado para a maioria dos vírus tipo picorna como pode ser verificado no item 4.3.

Vírus das famílias Picornaviridae, Comoviridae, Caliciviridae e Sequiviridae, normalmente são chamados vírus tipo picorna, devido a similaridade morfológica das partículas e propriedades físicoquímicas. Muitos vírus que tem propriedades biofísicas similar aos picornavirus tem sido isoladas de várias espécies de insetos. Suas relações taxonômicas ainda não estão bem esclarecidas (Sasaki et al., 1998). TaV embora tenha suas características morfológicas, peso molecular das proteínas e o tamanho de seu genoma divergentes dos demais vírus incluídos no grupo do “CrP-like viruses”, deva ser aí incluído até que se possa esclarecer melhor o relacionamento entre todos eles.

Apesar da grande quantidade de estudos relatar a importância das viroses tipo picorna para o controle biológico de pragas, apenas dois vírus isolado de *Latoia viridissima*, praga de Palmaceae e *Gonometa podocarp*i, praga de pinheiro; foram testados em campo (Fedièrre et al., 1990 e Scotti, 1994).

Czibener et al. (2000) e Rozas Dennis et al. (2000) mencionaram haver uma certa relutância no uso destes vírus tipo picorna para o controle biológico de pragas, pelo fato de muitos vírus patogênicos a mamíferos pertencerem a esta família. Os vírus de mamíferos estudados não apresentam a mesma organização genômica dos vírus tipo picorna que infectam insetos sendo que este último aguarda uma definição taxonômica.

No caso do TaV sugere-se um estudo de avaliação de risco sobre organismos benéficos presentes no habitat onde este vírus será utilizado, bem como seu efeito sobre a saúde humana e organismos benéficos como abelhas, ácaros e cupins decompositores, minhocas etc. No presente trabalho foi realizado uma prévia de avaliação de risco com *Bombyx mori*, e como foi observado o vírus não apresentou efeito deletério sobre este organismo. O Brasil já dispõe de legislação específica para

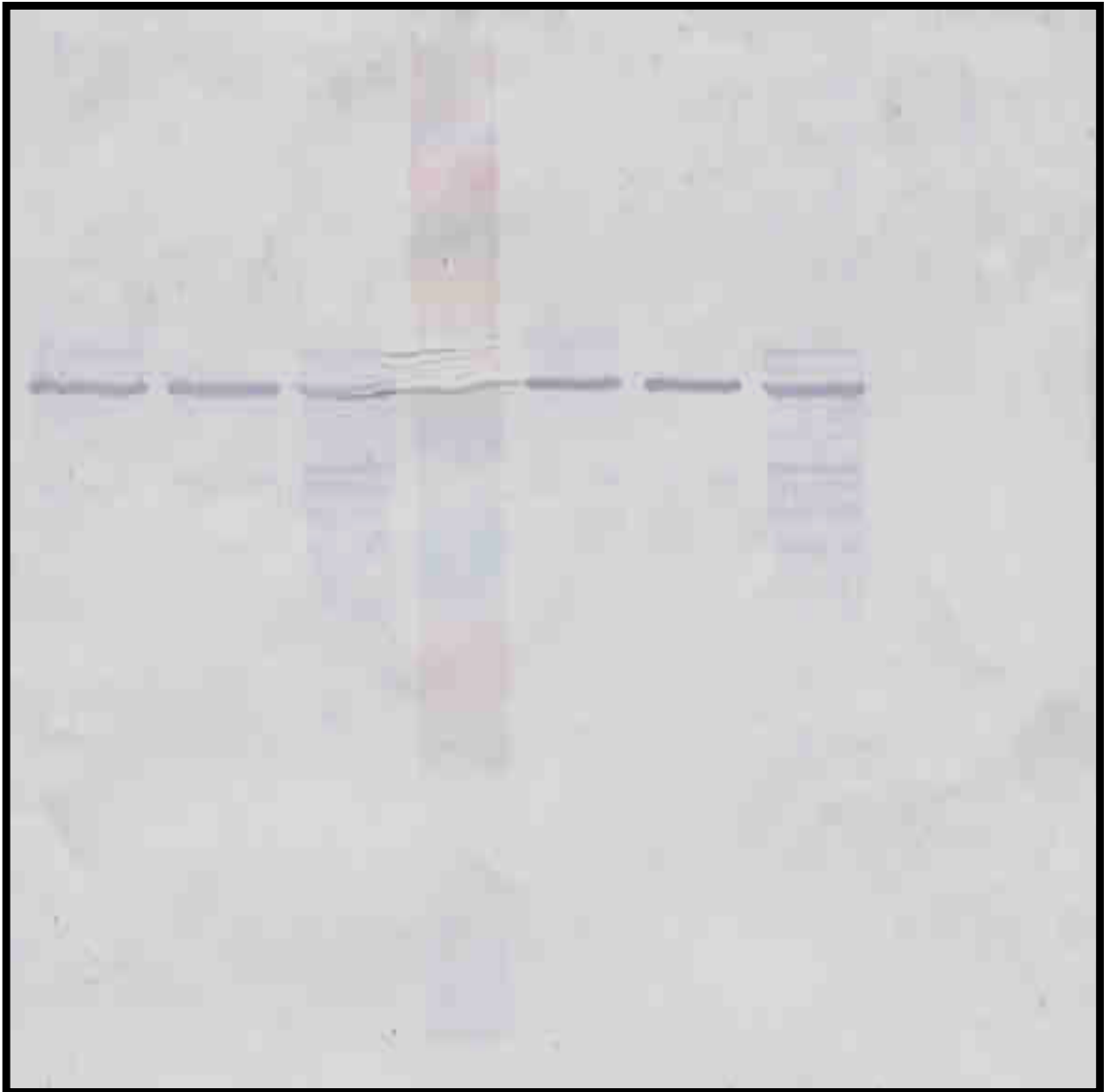
esta finalidade e os protocolos de avaliação de risco foram baseados nos da Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA).

Apesar das preocupações relacionadas aos danos potenciais dos agentes microbianos de controle biológico, a prática tem provado poucos exemplos de efeitos adversos sobre organismos benéficos. Populações de microrganismos aplicados no ambiente normalmente diminuem para uma densidade natural de equilíbrio, freqüentemente para níveis não detectáveis (Podgwaite, 1981, TeBeest, 1982).

Quadro 3. Propriedades do vírus de *Thyrinteina arnobia* (TaV) comparado com outros vírus de RNA tipo picorna. Botucatu (SP), 2001.

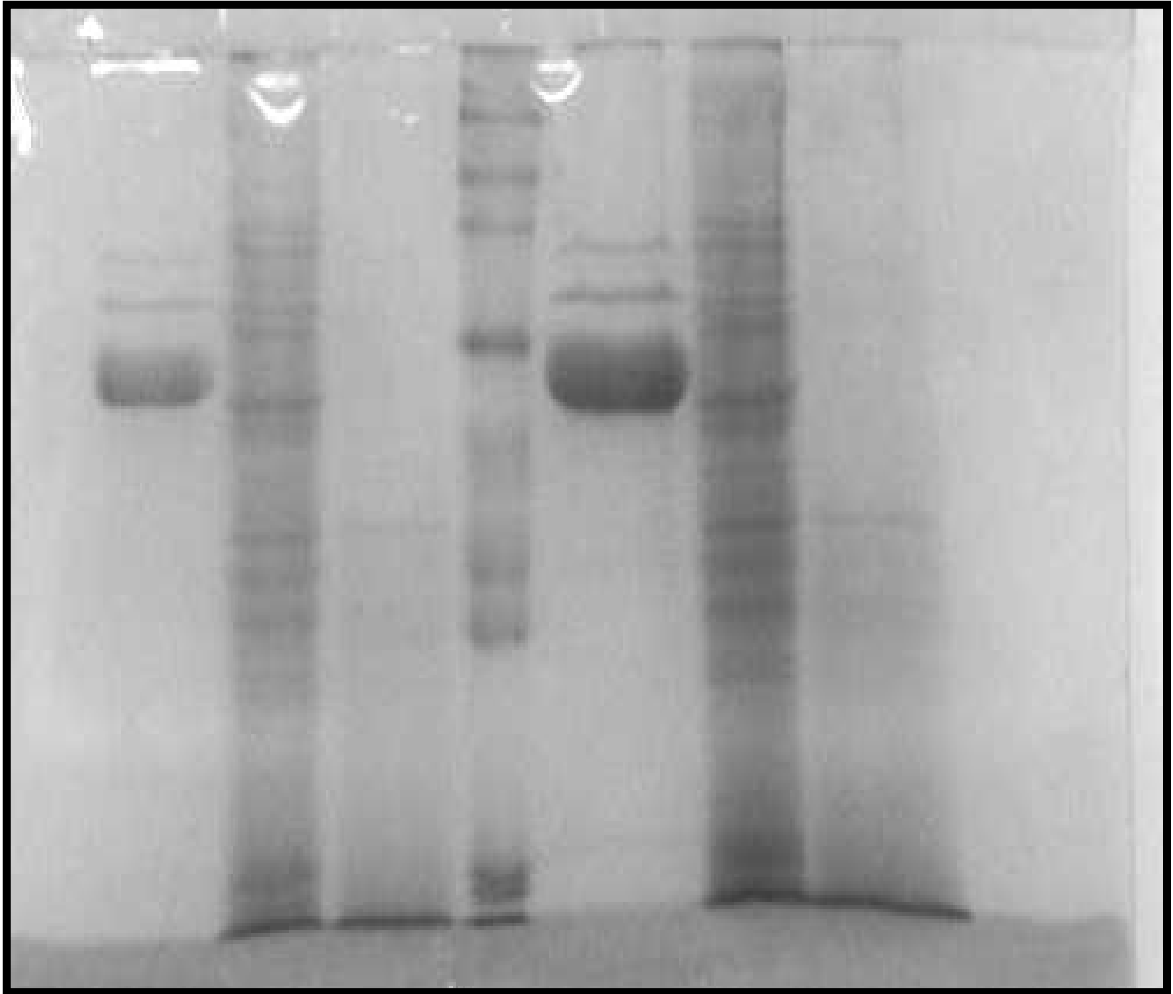
Vírus	Diâmetro (nm)	RNA (kb)	Proteínas kDa	Autores
1. TaV	30	~ 5 – 6	47, 60, 66	
2. NVV-1 (<i>Nezara viridula</i> vírus –1)	29	~ 9,4	30, 31, 30	Williamson e von Wechmar (1992)
3. NVV-2 (<i>Nezara viridula</i> vírus-2)	36	6,2	73,8, 14, 17	Williamson e von Wechmar (1992)
4. PIIV (<i>Pseudoplusia includens</i> icosaédrico vírus)	40	5,6	55	Chao et al. (1983)
5. CrPV (Vírus da paralisia em grilos)	27	7,4 – 8,3	34, 32, 31, (43) ^a	Moore et al. (1980)
6. DCV (<i>Drosophila c</i> vírus)	28	7,3 – 8,8	31, 30, 28, (37) ^a	Johnson e Christian (1998)
7. APV (<i>Acyrtosiphon pisum</i> vírus)	31	~ 10	23, 24, 34, 66	Van Den Heuvel et al. (1997)
8. TrV (<i>Triatoma</i> vírus)	30	~ 10	33, 39, 37, (45) ^a	Czibener et al. (2000)
9. PSIV (<i>Plautia stali</i> Intestine vírus)	30	9,1	26, 30, 33, (35) ^a	Nakashima et al. (1998)
10. ALPV (Aphids letal paralysis vírus)	26-28	9,7	34, 32, 31, (41) ^a	Williason et al. (1988)
11. RhPV _{OFS} (<i>Rhopalosiphum padi</i> vírus _{OFS})	28	10	32, 30, 28, 11, (40) ^a	Williason et al. (1989)
12. RhPV _{ILL} (<i>Rhopalosiphum padi</i> vírus _{ILL})	27	ND ^b	31, 30, 28	Williason et al. (1989)
13. PgV (<i>Pectinophora gossypiella</i> vírus)	27	ND ^b	32, 33, 47	Monsarrat et al. (1995)
14. LVV <i>Latoia viridissima</i> vírus	30	8,5	30, 31	Fedièrre et al. (1990)

^a Proteína menor que corresponde a VP0 das Picornaviruses de mamíferos, ND, não determinada



|

Figura 5. Teste de “Western-blot. Controles positivos: vírus purificado com partículas satélites, 5 μ l/ canaleta (linhas 1 e 5). Lagarta doente (linha 3 e 7). Marcador de peso molecular (RAINBOW) (linha 4). Vírus purificado 5 μ l/ canaleta sem partículas satélites (linhas 2 e 6) e controle negativo, lagarta sadia (linha 8).



|

Figura 6. Gel de Poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue 0,1 %. Vírus purificado 2,5 μ l por canaleta (linha 1). Lagarta doente (linha 2). Marcador de peso molecular (RAINBOW) (linha 3). Vírus purificado 5 μ l por canaleta (linha 4). Lagarta doente (linha 5). Lagarta sadia (linha 6).

4.6 – Extração de RNA total e isolamento do RNA a partir de vírus purificado

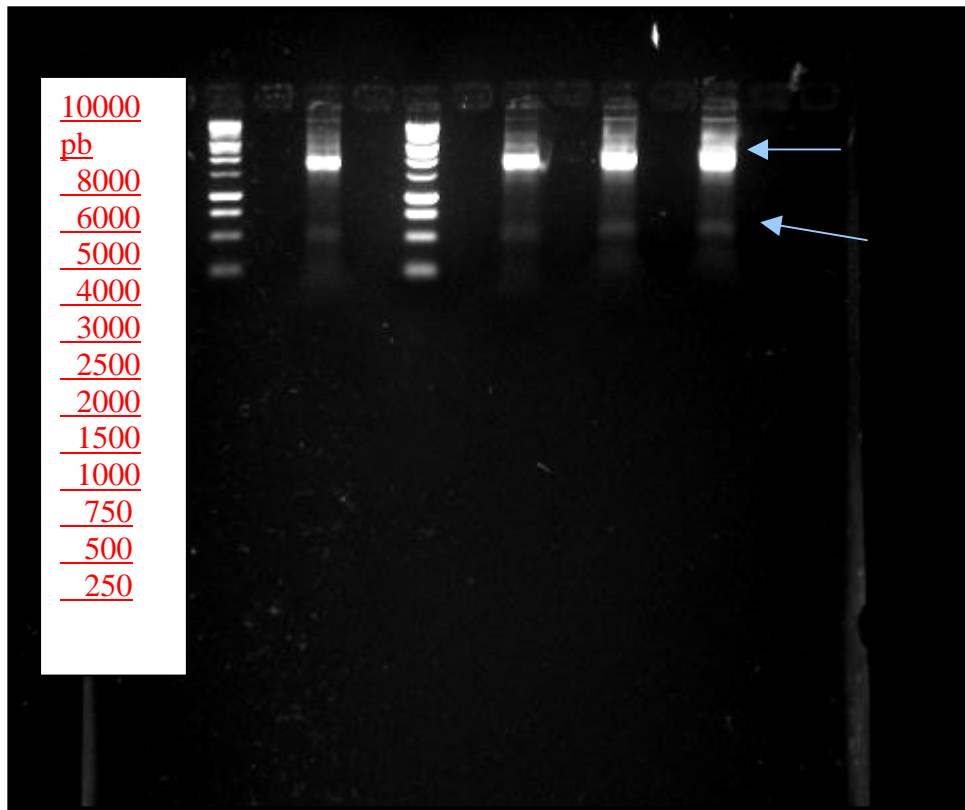
De acordo com a metodologia utilizada não foi possível extrair o ácido nucléico do TaV a partir do inseto infectado. Entretanto, isto pode ser feito a partir do vírus purificado.

O tamanho do RNA do TaV variou entre 4 e 6 kb (média de 10 determinações) (Figura 7) tendo apresentado similaridade com o *Nezara viridula* vírus-2 (NVV-2), isolado do pentatomídeo *Nezara viridula*, cujo tamanho é de 6,2 kb (Williamson e von Wechmar, 1992), com o vírus do lepidóptero *Pseudoplusi includens* (PIIV), de 5,6 kb em tamanho (Chao et al., 1983).

O RNA do TaV apresentou também similaridade com o da família Comoviridae com tamanho de 6,4 kb (Latvala-Kilby e Lehto, 1999).

As comovirose infectam somente plantas, e não há nenhum registro de comovirose em insetos. Muitos vírus que tem propriedades biofísicas similar às picornavíroses tem sido isoladas de várias espécies de insetos. A seqüência de nucleotídeos e o genoma dos vírus de inseto tipo picorna não tem sido bem analisadas e as relações taxonômicas entre esses vírus ainda não estão bem esclarecidas (Sasaki et al., 1998).

Pode ser observado uma segunda banda de RNA de 500 pb (0,5 kb), (Figura 7) este fato pode estar associado às partículas satélites observadas em estudos de microscopia eletrônica. Estudos mais detalhados serão necessários no sentido de avaliar os efeitos isolado destas partículas no inseto.






Figura 7. RNA do TaV. Linha (1) marcador de peso molecular (DNA Ladeer). Linha (2) 2 μ l de RNA. Linha (3) marcador de peso molecular. Linhas (4, 5 e 6) 2,5, 3 e 3,5 μ l de RNA.

4.7 – Análise de sobrevivência para verificar especificidade e/ou patogenicidade do vírus de *T. arnobia* no próprio hospedeiro e em outras espécies de insetos

O anticorpo produzido contra as proteínas da capa protéica do TaV, apresentou reação positiva para *B. mori* e *S. frugiperda* alimentadas com folhas contendo o TaV. A mortalidade observada para as duas espécies não ultrapassou 10 % e os insetos que completaram o ciclo total foi superior a 90%. O vírus foi oferecido para as lagartas nos primeiros instares e não foi observada mortalidade até o quinto instar para as duas espécies avaliadas. Ao contrário da espécie hospedeira do TaV cujo índice de mortalidade é altíssimo nos primeiros instares larvais (Quadro 4). Uma hipótese provável é a do TaV permanecer ou até mesmo replicar-se dentro do corpo do inseto e este não desenvolver a doença.

Quanto a *Iridopsis* sp e *S. violascens*, foi testada a patogenicidade do vírus de *T. arnobia* (TaV) do primeiro ao quinto instar e a mortalidade observada foi semelhante àquela verificada para *T. arnobia* (Quadros 7 e 9). É possível que os insetos estressados tenham se tornado propensos a infecções e que apesar do teste de ELISA ter sido positivo item 4.4, existe a probabilidade de não ser apenas o vírus de *T. arnobia* o responsável pela mortalidade da maioria dos insetos, visto que os insetos foram coletados no campo e estavam na quarta geração de laboratório. Também o extrato bruto de lagartas doentes pode conter outros microorganismos que interajam potencializando o efeito do vírus.

Segundo Fedièrre et al (1990) muitos insetos provenientes do campo apresentam viroses latentes desencadeada por estresse resultantes do confinamento a que são submetidos.

Johnson e Christian (1998), Goldbach & Wellink (1988) e Contamine et al. (1989) verificaram a alta taxa de mutação em vírus de RNA e assim não se pode excluir a possibilidade de ter havido mutantes de TaV capazes de infectarem *S. violascens* e *Iridopsis* sp. induzindo a alta mortandade.

Monsarrat et al. (1995) mencionaram o fato de algumas viroses existirem normalmente em insetos de campo e também em criações de laboratório e não provocarem nenhum efeito em seus hospedeiros. Neste caso, os insetos desenvolvem o seu ciclo biológico sem nenhum sintoma patológico até que um outro patógeno interaja com o patógeno latente e desenvolva um efeito patogênico ao inseto.

Muscio et al. (1988) descreveram a existência de vírus do tipo picorna em *Pseudoplusia includens* e *Triatoma infestans* aparentemente saudáveis. Entretanto, quando os insetos ingeriram o vírus em maiores proporções os sintomas tornaram-se evidentes, seguidos de morte.

Análises de sobrevivência foram elaboradas para *T. arnobia*, *S. violascens* e *Iridopsis* sp. A análise de sobrevivência estuda o tempo até a ocorrência de um evento, no caso a morte dos hospedeiro provenientes de infecções com o TaV. E por se tratar de indivíduos de diferentes instares, é comum nesse tipo de dados a presença de observações censuradas (os insetos sobreviveram ao tempo de estudo ou podem ter morrido por outras causas).

No caso do hospedeiro *T. arnobia*, não houve censura até o quarto instar, a mortalidade verificada foi 100 %. Os percentuais de dados censurados foram de 10,0 e 63,33 % para o quinto e sexto, instares respectivamente (Quadro 4). O percentual de censura aumentou em função dos instares. Pelo fato de ter sido adotado uma dose de vírus desconhecida, optou-se pela CL₉₀ (concentração letal capaz de matar 90 % dos insetos). Observou-se que a dose ministrada foi capaz de matar 100 % dos insetos de primeiro ao quarto instar. No caso da censura argumenta-se com embasamento de estudos de microscopia eletrônica que os insetos morreram em função do patógeno que ingeriram. Através de secções ultra finas do tubo digestivo de *T. arnobia*, foram verificadas grande quantidade de partículas virais em insetos de quarto ao sexto instar.

No caso de um controle da praga com o TaV em campo, de acordo com os resultados obtidos em laboratório, sugere-se que os instares mais

apropriados para controle desta praga seja do primeiro quarto. Normalmente quando se detecta um surto de *T. arnobia* no campo já existem várias gerações sobrepostas. O primeiro instar apresentou maior suscetibilidade ao vírus (Log-Rank: 0,0001), (Figura 8), pois a sobrevivência verificada foi bem menor em relação aos demais instares, ou seja, os insetos morreram mais rápido. Pelo fato do primeiro instar apresentar maior suscetibilidade, isso pode ser favorável do ponto de vista de controle pois numa infestação muito grande da praga as lagartas mortas servem como fonte de contaminação para as lagartas dos demais instares.

Para estudos posteriores sugere-se determinar a quantidade de partículas por inseto por instar, isso pode dar subsídio no cálculo da DL_{50} a partir de inseto morto coletado no campo ou em laboratório.

Quadro 4. Número de mortos e de censurados e frequência de censurados (%), em cada instar para o hospedeiro *Thyrntaina arnobia* infectadas com TaV. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

INSTAR	Total de insetos	Mortos	Censurados	Censurados %
1	30	30	0	0,0
2	30	30	0	0,0
3	30	30	0	0,0
4	30	30	0	0,0
5	30	27	3	10,0
6	30	11	19	63,33
Total	180	158	22	12,22

As razões de riscos de mortes entre os instares (Quadro 5) evidencia que do primeiro ao sexto instar o valor p foi significativo, os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas entre os instares, com a mesma dose. Esse fato pode

ser explicado com base nos mecanismos de defesa do inseto. Quanto maior for o instar menos suscetível pode ser o inseto dependendo da dose ingerida.

Mesmo havendo uma mortalidade de 100 % do primeiro ao quarto instar, a razão de risco de morte foi significativa em função do número de dias que os insetos levavam para morrer dentro dos instares.

Quadro 5. Razão de riscos de mortes entre os instar para *Thyrintaina arnobia*.

Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

Instar	1	2	3	4	5	6
1	-	0,010^(*)	0,005^(*)	0,021^(*)	0,005^(*)	0,001^(*)
2	-	-	0,498^(*)	0,507^(*)	0,501^(*)	0,071^(*)
3	-	-	-	0,132^(*)	0,506^(*)	0,143^(*)
4	-	-	-	-	0,244^(*)	0,035^(*)
5	-	-	-	-	-	0,142^(*)
6	-	-	-	-	-	-

^(*) para valor-p<0,05

1

¹ O risco da lagarta de *T. arnobia* morrer no instar 2 é 0,010 vezes o risco dela morrer no instar 1; ou seja o risco de morte no instar 1 é $1/0,010 = 100$ vezes o risco no instar 2.

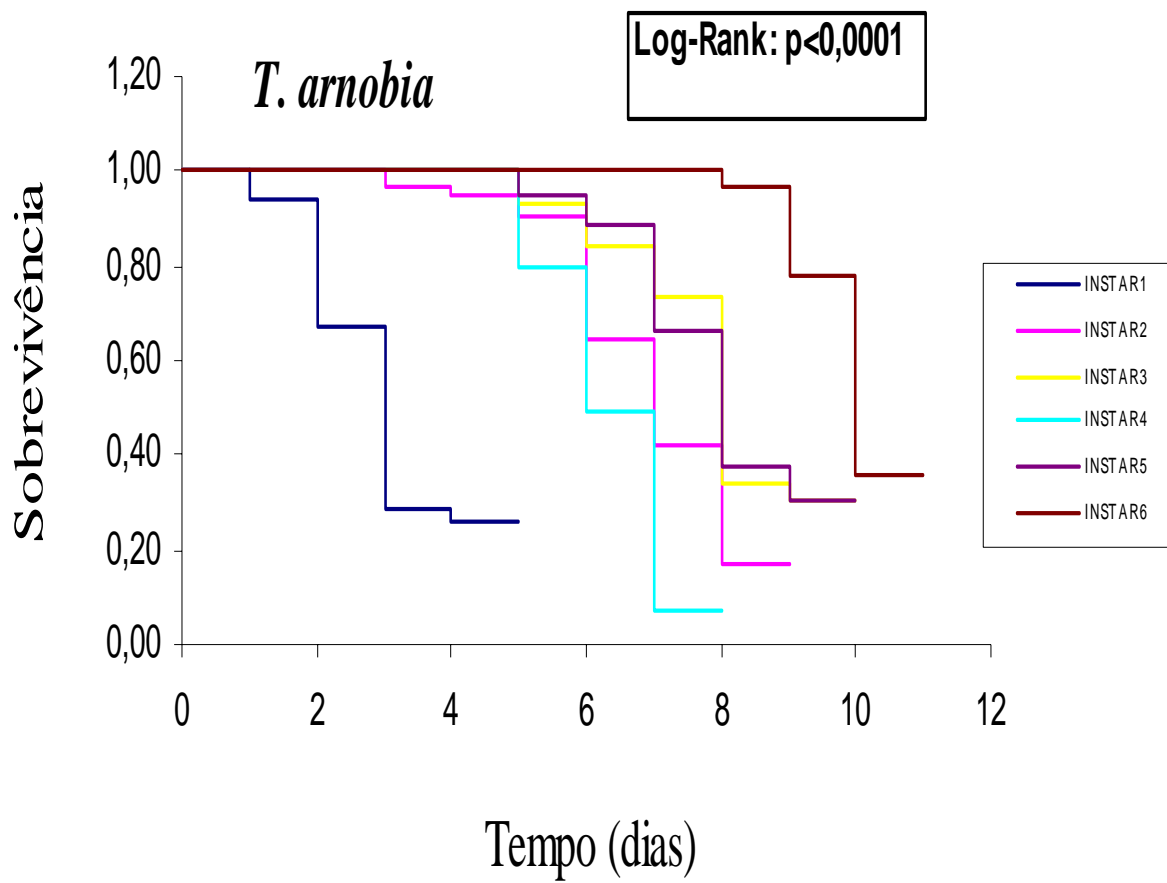


Figura 8. Curvas de sobrevivência para lagartas de *Thyrintaina arnobia*, alimentadas com extrato de lagartas doentes. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

A estatística Log-Rank (Quadro 6), apresentou valor p significativo dentro de todos os instares avaliados. Mesmo sendo o primeiro instar mais suscetível para as três espécies, o teste leva em consideração os dias que cada inseto levou para morrer e este fato realmente diferiu sempre nas três espécies e instares.

Quadro 6 - Estatística Log-Rank e valor-p para cada hospedeiro infectados com TaV.

Hospedeiro	Qui-Quadrado	Gl	Valor-p ^(*)
<i>Iridopsis</i>	59,4244	4	0,0001
<i>S. violascens</i>	28,2285	4	0,0001
<i>T. arnobia</i>	419,6029	5	0,0001

^(*) para valor-p<0,05

A análise de sobrevivência realizada para o geometrídeo *Iridopsis* sp vai ao encontro com as hipóteses de Fedière et al (1990) que mencionaram que muitos insetos provenientes do campo apresentam viroses latentes desencadeadas por estresses resultantes do confinamento. Também com as de Monsarrat et al. (1995) que mencionaram o fato de algumas viroses existirem normalmente em insetos de campo e também em criações de laboratório e não provocarem nenhum efeito em seus hospedeiros. Neste caso, os insetos desenvolvem o seu ciclo biológico sem nenhum sintoma patológico até que um outro patógeno interaja com o patógeno latente e provoque um efeito patogênico ao inseto.

No presente estudo as hipóteses mencionadas podem ser verdadeiras, baseadas nos resultados sorológicos positivos para *Iridopsis* sp item 4.4.

Os percentuais de censuras observados para *Iridopsis* sp foram de 0, 10, 13,3, 16,7 e 26,7 (Quadro 7) para o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto instares respectivamente. Como pode ser verificado os percentuais de dados censurados aumentaram em função dos instares e mesmo assim a mortalidade foi considerada alta.

Argumenta-se a hipótese de que estes insetos por estarem na quarta geração de laboratório poderiam conter outros patógenos latentes que desencadeariam processos de infecções quando em contato com o TaV, ou apresentarem um sítio de replicação semelhantes ao da praga hospedeira do vírus pelo fato de pertencerem a mesma família. Existe a possibilidade de ter havido mutantes de TaV capazes de infectarem *Iridopsis* sp induzindo a alta mortalidade como verificaram Johnson e Christian (1998), Goldbach & Welling (1988) e Contamine et al. (1989) para vírus de RNA em outras espécies de insetos.

Quadro 7. Número de mortos e de censurados e frequência de censurados (%), em cada instar para lagartas de *Iridopsis* sp. infectadas com TaV. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

Instar	Total de insetos	Mortos	Censurados	Censurados %
1	30	30	0	0
2	30	27	3	10,0
3	30	26	4	13,3
4	30	25	5	16,7
5	30	22	8	26,7
Total	150	130	20	13,4

Quadro 8. Razão de riscos de mortes entre os instar para *Iridopsis* sp. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

Instar	1	2	3	4	5
1	-	0,312^(*)	0,279^(*)	0,179^(*)	0,156^(*)
2	-	-	0,953^(ns)	0,575^(*)	0,499^(*)
3	-	-	-	0,603^(ns)	0,523^(*)
4	-	-	-	-	0,867^(ns)
5	-	-	-	-	-

(*) para valor- $p < 0,05$

As razões de riscos de mortes entre os instares para *Iridopsis* sp apresentaram valor $p < 0,05$ não significativo (Quadro 8), quando comparou-se o segundo instar com o terceiro, o terceiro com o quarto e o quarto com o quinto instar. A razão de risco de morte foi significativa quando comparou se o primeiro instar com os demais instares. Diferiu também quando comparou se o segundo instar com o quarto e quinto instares e terceiro com o quinto.

O primeiro instar apresentou maior suscetibilidade ao TaV. Através da curva de sobrevivência (Figura 9) verificou-se que no primeiro instar a sobrevivência dos insetos foi bem menor quando comparada com os demais instares, fato também comprovado quando avaliou-se as razões de riscos de mortes.

No caso de um controle da praga com TaV sugere-se o controle em todos os instares pois mesmo que o inseto demore mais para morrer ele dissemina as partículas através das fezes. Do ponto de vista de controle biológico esse fato pode ser favorável num ecossistema florestal.

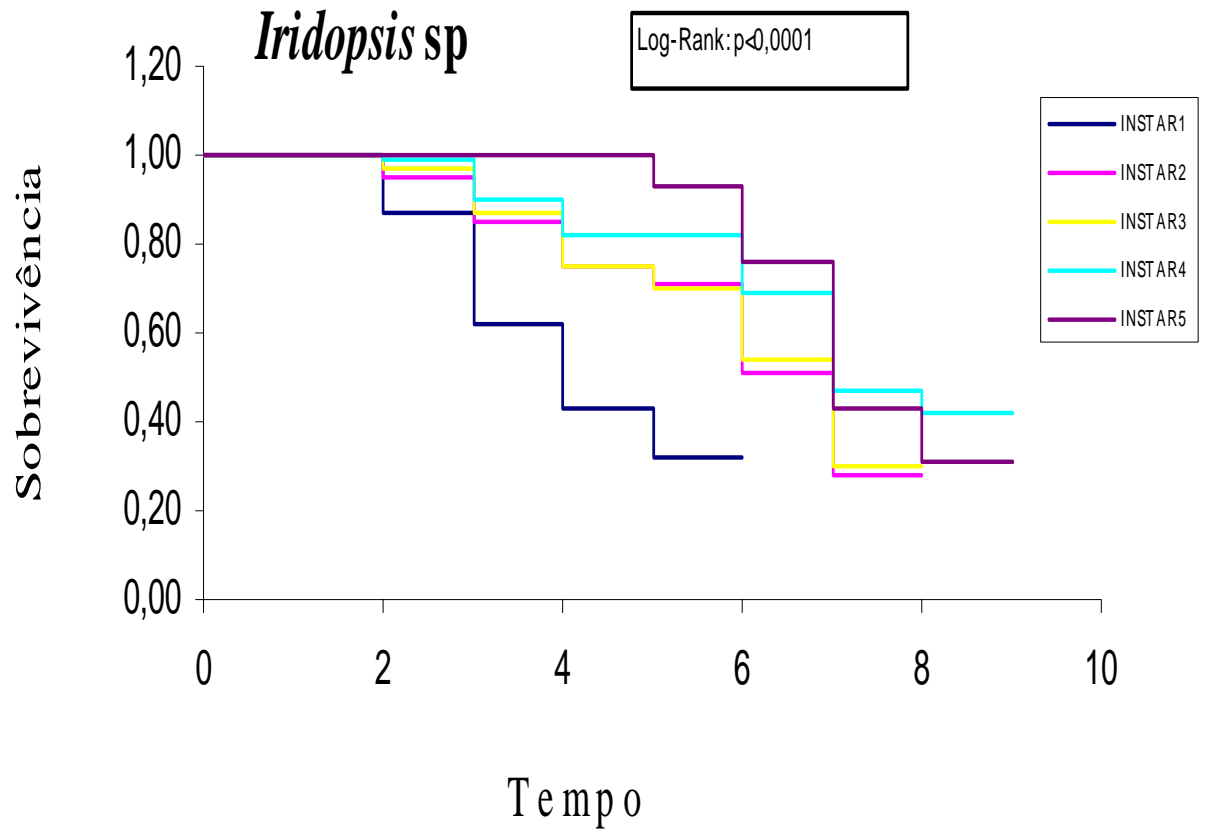


Figura 9. Curvas de sobrevivência para lagartas de *Iridopsis* sp, alimentadas com extrato de lagartas doentes de *T. arnobia*. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

Os percentuais de dados censurados para *S. violascens* foram: 0, 13,3, 13,3, 23,3 e 23,3 para o primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto instares larvais respectivamente. Os percentuais de dados censurados foram maiores quando comparados com os dados dos demais lepidópteros estudados (Quadro 9).

As razões de riscos de mortes observadas apresentaram valor “p” não significativo quando comparou se o primeiro instar com o segundo. Apesar do percentual de censura ser alto para o segundo instar os insetos morreram em dias relativamente iguais. O terceiro instar apresentou diferença em relação ao quarto e o quarto em relação quinto instares larvais. Praticamente houve diferença em todos os instares avaliados (Quadro 10).

A curva de sobrevivência demonstrou que os insetos apresentaram uma redução de sobrevivência semelhante. Entretanto diferiram através do teste Log-Rank: $p < 0,0001$ (Figura 10).

Quadro 9. Número de mortos e de censurados e frequência de censurados (%), em cada instar para lagartas de *Sarsina violascens* infectadas com TaV. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

Instar	Total de insetos	Mortos	Censurados	Censurados %
1	30	30	0	0
2	30	26	4	13,3
3	30	26	4	13,3
4	30	23	7	23,3
5	30	23	7	23,3
Total	150	128	22	14,66

Quadro 10. Razão de riscos de mortes entre os instares para *Sarsina violascens*Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

Instar	1	2	3	4	5
1	-	1,419^(ns)	0,537^(*)	0,464^(*)	0,488^(*)
2	-	-	0,378^(*)	0,327^(*)	0,344^(*)
3	-	-	-	0,863^(ns)	0,908^(ns)
4	-	-	-	-	1,052^(ns)
5	-	-	-	-	-

^(*) para valor-p<0,05

Estudos mais detalhados serão necessários no sentido de avaliar o efeito do TaV na longevidade e fertilidade de *S. violascens*, visto que os insetos dos últimos instares que sobreviveram a infecção atingiram a fase adulta.

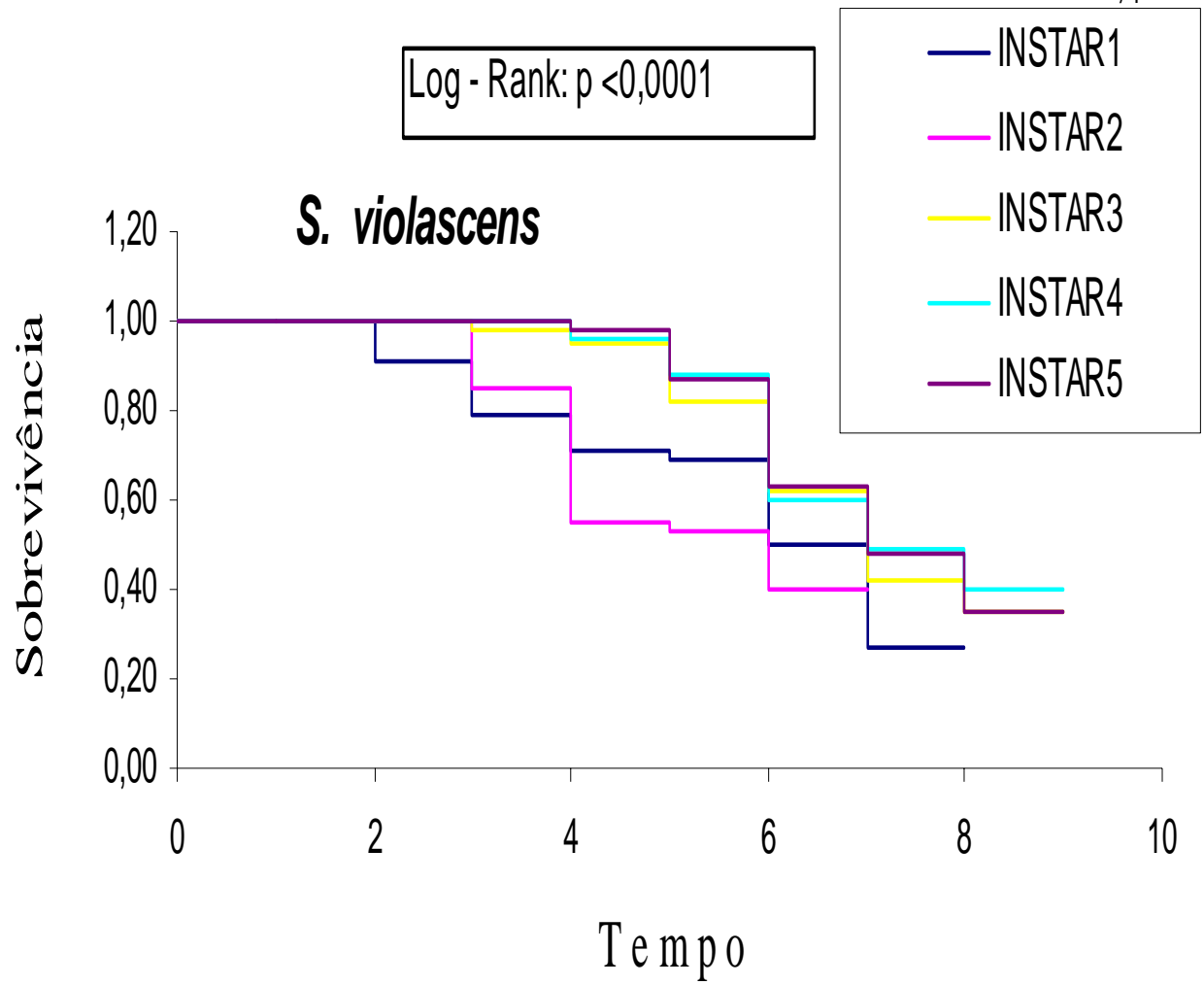


Figura 10. Curvas de sobrevivência para lagartas de *Sarsina violascens*, alimentadas com extrato de lagartas de *T. arnobia* doentes. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h.

4.7.1 – Patogenicidade do TaV em fezes do predador *P. nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae)

Podisus nigrispinus é um dos principais predadores de *T. arnobia* em áreas florestais. Realizou-se este estudo para verificar o potencial infectivo das partículas do TaV após passar pelo trato digestivo deste predador. Constatou-se que as fezes dos predadores colhidas 24 horas após ingestão de lagartas doentes causaram uma mortalidade de 100% em lagartas de *T. arnobia* sadias do primeiro ao terceiro instar, 97 % em lagarta de quarto instar e 90 % em lagartas de quinto instar (Quadro 10). Não houve mortalidade para o grupo de lagartas do controle.

As lagartas mortas foram purificadas e verificou-se a presença das partículas do TaV consistentemente no material purificado.

Quadro 10. Mortalidade de *T. arnobia* após ingerirem folhas com excrementos de *Podisus nigrispinus* alimentados com lagartas contaminadas por TaV. Temperatura: 25 ± 1 °C; UR: $70 \pm 5\%$; Fotofase: 14 h. Botucatu, 2001.

Instar	Nº total de insetos	Nº de mortos	Mortalidade (%)
1	30	30	100,0
2	30	30	100,0
3	30	30	100,0
4	30	29	97,0
5	30	27	90,0
Total	150	146	97,4

O presente estudo concorda em parte com trabalhos realizados por Moscardi et al. (1996), comprovaram que os predadores de *A. gemmatalis* dentre eles *Nabis capsiformis* Germar, *Podisus* sp., *Callida* spp., *Calosoma granulatum* Perty, *Eriopis connexa* (Germar) e *Lebia concinna* Brullé, excretaram grande quantidade de

partículas de baculovirus (CPI) viáveis; vinte e quatro horas após ingerirem lagartas infectadas pelo patógeno.

Estudos realizados por Vasconcelos et al. (1996), demonstraram que os coleópteros predadores, *Harpalus rufipes* De Ger, *Pterostichus melanarius* Illiger e *Agonum dorsale* Pont., após se alimentarem com o lepidóptero *Mamestra brassicae* infectada por baculovirus, disseminaram as partículas virais infectivas por um período de até 15 dias. Os autores mencionaram que poderia haver um mecanismo por meio do qual as partículas virais eram retidas dentro do intestino dos carabídeos, resultando em sua prolongada disseminação no ambiente.

Resultados semelhantes foram registrados por Abbas e Boucias (1984) com o predador *Podisus maculiventris* sobre *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Os autores verificaram que o predador dissemina as partículas infectivas de baculovirus após se alimentar com lagartas infectadas por um período que varia de 3 a 4 dias.

Em estudos de Reardon e Podgwait (1976) e Raimo et al. (1977) citado por Reuveni (1995), verificaram que as fêmeas dos himenópteros parasitóides *Cotesia melanoscelus* e *Parasetigena agilis* transmitiam o VPN para lagartas de *L. dispar* sadias quando em contato com lagartas infectadas. Os autores informaram que pulverizações de VPN e liberações destes inimigos naturais provocaram um controle de 90 % na população de *L. dispar* no campo.

As lagartas de *A. gemmatalis* infectadas por baculovirus, constituem-se em presas fáceis para vários predadores. Dessa forma, esses predadores podem se constituir em importantes agentes de disseminação do vírus, tanto nas áreas de uso do patógeno como para fora delas, contribuindo para a formação de focos primários da doença, os quais são importantes para promover epizootias do patógeno em populações da praga (Moscardi et al., 1996).

No caso do TaV estudos mais detalhados serão necessários para verificar a patogenicidade das partículas eliminadas através das fezes do predador *P.*

nigrispinus em condições de campo e avaliar o tempo em que esses insetos levam eliminando essas partículas viáveis pelas fezes.

No ecossistema florestal existem diversos parasitóides de diferentes famílias, sendo interessante avaliar o poder de disseminação de partículas virais através destes. Isto pode se constituir em importante fator num programa de manejo de praga em reflorestamentos de eucalipto.

5. CONCLUSÕES

Faz-se o registro do primeiro vírus isométrico de 30 nm em diâmetro, infectando *T. arnobia*, referido como Thyrinteina arnobia virus (TaV).

O TaV está incluído no grupo dos “cricket paralysis virus [CrPV]-like viruses” até definições taxonômicas posteriores.

A infecção de lagartas de *T. arnobia* por TaV limita-se ao epitélio do tubo digestivo.

TaV apresenta efeito citopático característico através da formação de corpos multivesiculares, aparentemente derivados de mitocôndrias.

Ocorre a presença de partículas isométricas menores de 15 nm em diâmetro, que podem representar um vírus satélite do TaV.

O vírus de *T. arnobia* (TaV) não é patogênico a *B. mori* e *S. frugiperda*, mas *S. violascens* e *Iridopsis* sp. são suscetíveis.

TaV mantém-se infectivo após passar pelo aparelho digestivo de *Podisus nigrispinus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, M. S. T. & BOUCIAS, D. G. Interaction between nuclear polyhedroses virus-infected *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and a predator *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental Entomology*, v.13, p. 599-602. 1984.

ANJOS, N. dos; SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, J. C. A lagarta-parda *Thyrinteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. Belo Horizonte, EPAMIG, (Boletim Técnico,25), 56p. 1987.

ANJOS, N.; SANTOS, G. P.; OLIVEIRA, A. C. & SOARES, W. C. Ocorrência de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em eucaliptais de Minas Gerais. In: ANAIS DO VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. Fortaleza, 12 a 17 de julho de 1981.

ANJOS, N. ; SANTOS, G. P. ; ZANUNCIO, J. C. Pragas do eucalipto e seu controle, p.50-58. In: **INFORME AGROPECUÁRIO**. Cultura do eucalipto, v.12, n. 141.

1986. ALVES, S. B. The Difficult Changeover of paradigms. In : ARACRUZ NEWS Countdown is on, p. 6-7, 1997.
- BAENA, E. S. Controle populacional das pragas das florestas de eucalipto e seus inimigos naturais. *Silvicultura*, São Paulo, v. 22, p. 42-44, 1982.
- BARROS, M. E. P., ZANUNCIO, J. C., LOPES, F. S., PEREIRA, J. M. M. Análise faunística e flutuação populacional dos lepidópteros-praga de eucalipto em regiões do Maranhão, Bahia, Espírito Santo e São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14, 1993, Piracicaba. *Resumos...* Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil, 1993. p. 676.
- BERTI FILHO, E. Insetos associados a plantações de espécies do gênero *Eucalyptus* nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Piracicaba, 175p. 1981. Tese (Livre-Docente). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- BERTI FILHO, E. Biologia de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) e observações sobre a ocorrência de inimigos naturais. Piracicaba, 1974. 74p. Tese (Doutorado em Entomologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- BERTI FILHO, E., STATE, J. L., CERIGNONI, J. A. Surto de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em *Eucalyptus citriodora* Hook. (Myrtaceae) no estado de São Paulo. *Revista de Agricultura* (Piracicaba), v.66, p. 47, 1991.
- BERTI FILHO, E. & FRAGA, A. I. A. Inimigos naturais para o controle de lepidópteros desfolhadores de *Eucalyptus* sp. *Brasil Florestal*, v. 62, p. 18-22, 1987.

- BRANCO, E. F. Viabilidade econômica do controle de *Thyrintaina arnobia* (Stoll, 1782) (Lep.: Geometridae) com *Bacillus thuringiensis* (Berliner) em povoamentos de *Eucalyptus* spp. Curitiba, 1995. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná.
- BÜCHEN-OSMOND, C. and GIBBS, A. PICORNAVIRUSES. [on line]. Camberra, [2 mar. 2001]. World Wide Web: < URL: www.micro.msb.le.ac.uk/335/Picornaviruses.html.
- CHAO, Y.-C., YOUNG III, S. Y. and KIM, K. S. Characterization of a picornavirus isolated from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.27, p.247-257. 1986.
- CHAO, Y. C. By. SCOTT, H. A. and YOUNG III, S. Y. An Icosaedral RNA vírus of the soybean looper (*Pseudoplusia includens*), *Journal of General Virology*, v.64, p. 1835-1838, 1983.
- CHOI, H., KOBAYASHI, M., KAWASE, S. Changes in infectious flacherie virus-specific polypeptides and translatable mRNA in the midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, during larval molt. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 53, p. 128-131, 1989.
- CONTAMINE, D., PETITJEAN, A. M. & ASHBURNER, M. Genetic resistance to vírus infections: the molecular cloning of *Drosophila* gene that restricts infection by the rhabdovirus sigma. *Genetics*, v. 123, p. 525-533. 1989.
- COX, D. R. Regression models and life-tables (with discussion). *Journal of the Royal Statistical Society. Série B*, v. 34, p. 187-220, 1972.

- CUNHA, A. G., BENEDETTI, V., NOGUEIRA JÚNIOR, C. Avaliação do nível de infestação e dano causado por *Thyrinteina arnobia* em três diferentes estratos de *Eucalyptus saligna*. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 4, 1994, Gramado. *Anais...* Gramado: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 157, 1994.
- CZIBENER, C., La TORRE, J. L., MUCIO, O. A., UGALD, A. R. and SCODELLER, E. A. Nucleotide sequence analysis of Triatoma virus shows that it is a member of a novel group of insect RNA viruses. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 1149-1154, 2000.
- DIENER, T. D. Viroides. In "Advances in Virus Research". [(LAUFFER, M.A. and MARAMOROSCH, (eds.)], Vol. 28, p. 241-283. Academic Press, New York. 1983.
- EVANS, H. & SHAPIRO, M. Viruses. In: LACEY, L. (ed.) *Manual of Techniques in Insect Pathology (Biological Techniques)*. San Diego, Academic Press Ltda., 1997. p.17-53.
- FLORES, M.Z.; SÁ, L. A. N. de; MORAES, G. J. de. Controle biológico: importância econômica e social. *A Lavoura*. Encarte Especial: Manual de Controle Biológico, p. 6-9, 1992.
- 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, p. 347-354, 1990.
- FRANCKI, R. I. B., MILNE, R. G. & HATTA, T. Atlas of plant viruses. 2 vols. Boca Raton, CRC Pres. 1985.

- GILDOW, F. E. & D'Arcy, C. J. Cytopathology and experimental host range of *Rhopalosiphum padi* virus, a small isometric RNA virus infecting cereal grain aphids. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 55, p. 245-257. 1990.
- GOLDBACH, R. WELLINK, J. Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology*, v. 29, p. 260-267, 1988.
- HUBER, J. Use of baculovirus in pest management programs, p.181-202. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICE, B. A. (eds.), *The biology of baculovirus*, v.2. Boca Raton, CRC Press, 276p. 1986.
- JOHNSON, K. N. and CHRISTIAN, P. D. The novel genome organization of the insect picorna-like virus Drosophila C virus suggests this virus belongs to a previously undescribed virus family. *Journal General Virology*, v. 79, p.191-203, 1998.
- KAPLAN, E. L. & MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J. Am. Statist. Assoc.*, v. 53, p.475-481, 1958.
- KITAJIMA, E. W. Isometric, viruslike particles in the green peach aphid *Mysus persicae*; their intracellular localization and distribution within the aphid body. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 28, p. 1-10. 1976.
- KITAJIMA, E. W.; NOME, C. F. Microscopia eletrônica em virologia vegetal. In: DOCAMPO, M. D.; LENARDÓN, S. L. (Ed.). *Métodos para detectar patógenos sistemicos*. Cordoba: IFFIVE-INTATICA, cap. 3, p. 59-87, 1999.
- LATVALA-KILBY, S., LEHTO, K. The complete nucleotide sequence of RNA2 of blackcurrant reversion nepovirus. *Virus Research*, v. 65, p. 87-92. 1999.

- LAUBASCHER, J. M., JAFFER, M. A. & von WECHMAR, M. B. Detection by immunogold cytochemical labeling of aphid letal paralysis virus in the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 60, p. 40-46. 1992.
- LERY, X., FEDIERE, G., TAHA, A., SALAH, M. and GIANNOTTI, J. A New Small RNA Virus Persistently Infecting an Established Cell Line of *Galleria mellonella*, Induced by a Heterologous Infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 69, p. 7-13, 1997.
- MADDOX, J. V. Insect Pathogens as Biological Control Agents. In: *Introduction to Insect Pest Management*. Third Edition. 1994. p. 199-244.
- MANOUSIS, T., ARNOLD, M. K. & MOORE, N. F. Electron microscopical examination of tissues and organs of *Dacus oleae* flies infected with cricket paralysis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*. V. 51, p. 119-125. 1988.
- MOON, S. J., DOMIER, L. L., McCOPPIN, N. K., D'ARCY, C.J. and JIN, H. Nucleitides sequence analysis shows that *Rhopalosiphum padi* virus is a member of a novel group of insect-infecting RNA viruses. *Virology*, v. 243, p. 54-65, 1998.
- MOORE, N. F., KEARNS, A. & PULLIN, J. S. K. Characterization of cricket paralysis virus-induced polypeptides. *Journal of Virology*, v. 33, p. 1-9, 1980.
- MONSARRAT, A., ABOL-ELA, S., ABDEL-HAMED, I., FEDIERE, G., KUHLL., G., EL HUSSEINI, M., & GIANNOTTI, J. A New RNA Picorna – Like virus in the cotton pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Lep.: Gelechiidae) in Egypt. *Entomophaga*, v. 40, p. 47-54, 1995.

- MOSCARDI, F., POLLATO, S. L. B. e CORREA-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, p.315-320, 1996.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo, In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, p. 509-539, cap. 15. 1998.
- MUSCIO, O. A., LATORRE, J. L., SCODELLER, E. A. Small nonoccluded viruses from triatomine bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v.49, p.218-220. 1987.
- MUSSEN, E. C. & FURGALA, B. Replication of sacbrood virus in larval and adult honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 30, p.20-34, 1977.
- NAKASHIMA, N., SASAKI, J., TSUDA, K., YASUNAGA, C. and 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.
- ODA, S.; & BERTI FILHO, E. Incremento anual volumétrico de *Eucalyptus saligna* Sm. em áreas com diferentes níveis de infestação de lagartas de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). *IPEF*, Piracicaba, v. 17, p.27-31, 1978.
- OECD Environment Monograph. - data requirements for registration of biopesticides in OECD member countries, survey results. Paris: OECD, 1995.
- OTERO, L. C. Contribuição ao conhecimento da entomofauna do Parque florestal da Tijuca. *Brasil Forestal*, Rio de Janeiro, v.5, n.19, p. 37-39, 1974.

- PEDROSA-MACEDO, J. H., ROSALES, C. J., SOUZA de, J. L., OLIVEIRA de, E. P. Presencia de *Thyriniteina arnobia* (Stoll 1782) (Lepidoptera: Geometridae) el “medidor pardo” en plantaciones de *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) en San Carlos, Estado Cojedes, Venezuela. *Bol. Entomol. Venez.*, v. 13, p. 887-889, 1998.
- PODGWAITE, J.D. Environmental persistence of gypsy moth NPV. In: DOANE, C.C.; MCMANUS, M.L. ed. **The gypsy moth**: research toward integrated pest management. Washington: USDA, 1981. p. 479-481. (USDA. Technical Bulletin, 1584).
- REINGANUM, C., O’LOUGHLIN, G. T. & HOGAN, T. W. A nonoccluded virus of the field crickets *Teleogryllus oceanicus* and *T. commodus* (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 16, p.214-220. 1970.
- REINGANUM, C. and SCOTTI, P. D. Serological relations between twelve small RNA viruses of insects. *Journal Generation Virology*, v. 31, p.131-134, 1976.
- RIBEIRO, B. M., SOUZA, M. L. & KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, p. 481-507, 1998.
- REUVENI, R. (edt.) **NOVEL APPROACHES TO INTEGRATED PEST MNAGMENTE**. Division of Plant Pathology Agricultural Research Organization Newe Ya`ar Research Center Haifa, Israel. Lewis Publishers, Boca Raton. 32p, 1995.
- ROZAS DENNIS, G. S., La TORRE, J. L., MUSCIO, O. A., GUÉRIN, D. M. A. Direct Methods for Detecting Picorna-like Virus from Dead and Alive Triatomine Insects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v. 95, p. 323-327, 2000.

- RUECKERT, R. R. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication, p. 477-522. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. In: *FUNDAMENTAL VIROLOGY* (Eds. -in- chief). Third Edition. Lippincott – Raven Publishes, Philadelphia 1996.
- SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, J. C.; SANTANA, D. L. Q.; ZANUNCIO, T. V. Descrição das lagartas desfolhadoras, p. 12-66. In: ZANUNCIO, J. C. coord. Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle. **IPEF/SIF**, 140p.: il. 1993
- SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, J. C., ZANUNCIO, T. V. Pragas do eucalipto, p.63-71. In: INFORME AGROPECUÁRIO. A cultura do eucalipto I, v.18, n. 185, 1996.
- SASAKI, J., NAKASHIMA, N., SAITO, H. and NODA, H. Na Insect Picorna-Like Virus, *Plautia stali* Intestine Virus, Has Genes of Capsid Proteins in the 3' Part the Genome. *Virology*, v. 244, p.50-58, 1998.
- SCOTTI, P. D. PICORNAVIRUSES - INSECT. In: *Enciclopedia of virology*, v. 3. Academic Press, p. 1100-1103. 1994.
- SCOTTI, P. D., LONGWORTH, J. F., PLUS, N., CROIZIER, G. & REINGANUM, C. The biology and ecology of strains of an insect small RNA virus complex. *Adv. Virus Res.* V. 26, p. 117-143. 1981.
- SÉRIE INFORMAÇÕES ESTATÍSTICAS DA AGRICULTURA. São Paulo, 1997. V. 8, n. 1, p. 136.

SOSA-GOMEZ, D. R., TIGANO, M. S. & ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (ed.) **Controle Microbiano de Insetos**, 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, p. 731-758. 1998.

STANWAY, G., BROWN, F., CHRISTIAN, P. D., HOVI, T., HYYPIÄ, T. KING, A. M. Q., KNOWLES, N. J., LEMON, S. M., MINOR, P. D., PALLANSCH, M. A., PALMENBERG, A. C., SKERN, T. Taxonomy of the *Picornaviridae*: Species Designations and Three New Genera 2001. [On line]. Austrália [31 of jan. 2001]. Ready for use: ICTV Picornaviridae Study Group. Word Wide Web: < URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/alpha.html>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Estatísticas : Exportação Brasileira de produtos de base florestal 1999. [on line]. São Paulo, s.d.[21 fev. 2001]. Disponível de: Word Wide Web : < URL: <http://www.sds.org.br/expbrasil.htm>

SUZUKI, Y., TORIYAMA, S. MATSUDA, I. and KOGIMA, M. Detection of a Picorna-like Virus, Himetobi P Virus, in Organs and Tissues of *Laodelphax striatellus* by Immunogold Labeling and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Jounal Invertebrate Pathology*, v. 62, p. 99-104, 1993.

TANADA, Y., KAYA, H. K. **Insect Pathology**. Acadedemic Press Limited. Cap. 6, DNA- viral infections: Baculoviridae, p.171-244, 1993.

TEBEEEST, D.O. Survival of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* in rice irrigation water and soil. *Plant Disease*, v. 66, p. 469-472, 1982.

VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M., HUMMELEN, H., VERBEEK, M., DULLEMANS, A. M. and van der WILK, F. Characteristics of Acyrthosiphon pisum Virus, a

Newly Identified Virus Infecting the Pea Aphid. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.70, p. 169-176, 1997.

VAN FRANKENHUYZEN, K.; MILNE, R.; BROUSSEAU, R. and MASSON, L. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains of *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki* to defoliating forest Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 59, p.149-154, 1992.

VAN DER WILK, F. DULLEMANS, A. M. VERBEEK, M. and Van den HEUVEL, J. F. J. M. Nucleotide Sequence and Genomic Organization of Acyrthosiphon Pisum Virus. *Virology*, v. 238, p.353-362, 1997.

VASCONCELOS, S. D. V., WILLIAMS, T., HAILS, R. S. and CORY, J. S. Prey selection and baculovirus dissemination by carabid predator of Lepidoptera. *Ecological Entomology*, v.21, p. 98-104. 1996.

WESELOH, R. and ANDREADIS, T. G. Laboratory assessment of forest microhabitat substrates as sources of the Gypsy moth Nuclear Polyedrosis Virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 48, p. 27-33, 1986.

WILCKEN, C. F. Biologia de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em espécies de *Eucalyptus* e em dieta artificial. Piracicaba, 1997, 129p. Tese (doutorado em Entomologia) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

WILK van der, F., DULLEMANS, A. M., VERBEEK, M. and Van den HEUVEL, J. F. J. M. Nucleotide Sequence and Genomic Organization of Acyrthosiphon Pisum Virus. *Virology*, v. 238, p. 353-362, 1997.

- 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.
- WILLIAMSON, C., RYBICKI, E. P., KASDORF, G. G. F. and von WECHMAR, M. B. Characterization of a new picorna-like virus isolated from aphids. *Journal of General Virology*, v. 69, p. 787-795, 1988.
- WILLIAMSON, C., von WECHMAR, M. B. and RYBICKI, E. P. Further Characterization of *Rhopalosiphum padi* Virus of Aphids and comparison of Isolates from South Africa and Illinois. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 54, p. 85-96, 1989.
- WILLIAMSON, C. and von WECHMAR, M. B. The effects of two viruses on the metamorphosis, fecundity, and longevity of the Green Stinkbug, *Nezara viridula*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 65, p. 174-178, 1995.
- WOOD, H.A. Development and testing of genetically improved Baculovirus insecticides. In: SHULER, M.L.; WOOD, H.A.; GRANADOS, R.R.; HAMMER, D.A. **Baculovirus expression systems and biopesticides**. New York: Wiley-Liss, 1995. p. 91-102, 1995.
- WOODS, S. A. ELKINTON, J. S., MURRAY, K. D., LIEBHOLD, A. M., GOULD, J. R. and PODGWAITE, J. D. Transmission dynamics of a Nuclear Polyhedrosis Virus and predicting mortality in Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations. *Journal of Economic Entomology*, v. 84, p. 423-430. 1991.
- ZANUNCIO, J. C.; ALVES, J. B.; ZANUNCIO, T. V.; GARCIA, J. F. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology Management*. V.65, p. 65-73, 1994.

ZANUNCIO, J. C., MALHEIROS, T. R., ZANUNCIO, T. V. & PADUA, R. L. A. Hemípteros predadores de desfolhadores de *Eucalyptus* spp. In *Resumos...* CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12, Belo Horizonte, p. 465, 1989.

ZANUNCIO, J. C.; FAGUNDES, M.; ANJOS, N.; ZANUNCIO, T. V. & CAPITANI, L. R. Levantamento e flutuação populacional de lepidópteros associados à eucaliptocultura: V – Região de Belo Oriente, Minas Gerais, junho de 1986 a maio de 1987. *Rev. Árv.* V.14, p.35-44, 1990.

ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, G. P.; SANTANA, D. L.; ZANUNCIO, T. V. Controle de Lagartas Desfolhadoras de Eucalipto p. 67-86. In: ZANUNCIO, J. C. (coord.). **Manual de Pragas em Florestas**. Programa cooperativo de monitoramento de insetos em florestas. IPEF/SIF, 140p. 1993.