

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Priscila Stinguel

**Estudo biológico e comportamental de lagartas de *Spodoptera frugiperda*
visando à produção de *Baculovirus spodoptera***

ALEGRE
ESPÍRITO SANTO – BRASIL
2016

PRISCILA STINGUEL

**Estudo biológico e comportamental de lagartas de *Spodoptera frugiperda*
visando à produção de *Baculovirus spodoptera***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Produção Vegetal

Orientador: Prof^o Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior

ALEGRE

ESPÍRITO SANTO – BRASIL

2016

**Estudo biológico e comportamental de lagartas de *Spodoptera frugiperda*
visando à produção de *Baculovirus spodoptera***

PRISCILA STINGUEL

Aprovada em:

Comissão Julgadora:

Dr. Fernando Hercos Valicente

EMBRAPA

Prof. Dr. Dirceu Pratissoli

CCA/UFES

Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago

CCA/UFES

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às pessoas mais importantes da minha vida...

Pelo que me ensinaram e transmitiram...

Pelo apoio incondicional...

Pelo que sou...

Pelo que me tornei...

Aos meus pais e irmão... João Luiz, Helena e Alex.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades que me foram dadas e me dar força para concluir mais uma etapa;

Aos meus pais, João Luiz e Helena, pelo amor, incentivo e confiança e ao meu irmão Alex, pelo carinho e apoio;

Aos meus familiares, por compreenderem minha ausência em muitos momentos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior, pela oportunidade, confiança, tempo, paciência e amizade;

Ao meu coorientador, Professor Dr. Hugo Bolsoni Zago, pelo tempo, conselhos e sugestões;

Ao Dr. Fernando Hercos Valicente, pela co-orientação e pelo auxílio quando requisitado;

Ao Engenheiro da UFES e amigo, Carlos Eduardo Costa Paiva, por todos os ensinamentos, pela paciência, pelas correções, por ajudar em cada decisão, pela ajuda com a estatística e, por se comportar muitas vezes como um “co-orientador”;

Ao Prof. Dr. Dirceu Pratisoli, por aceitar fazer parte da comissão julgadora, pela dedicação diária ao NUDEMAFI e conseqüentemente oferecer a estrutura necessária ao desenvolvimento científico;

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do CCA- UFES, por possibilitar a continuidade dos meus estudos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (PPGE – UFV) e, aos professores, Simon Elliot, Raul Narciso Carvalho Guedes e Terezinha Della Lucia pelo aprendizado e oportunidade durante o período que cursei disciplinas no PPGE – UFV;

Aos integrantes do Setor de Entomologia do NUDEMAFI, pelo apoio e estrutura disponibilizada para execução desse trabalho;

As agências de fomento e apoio científico, FAPES, CNPq e FINEP, pelo financiamento direto e indireto do projeto;

Aos “irmãos” do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Lorena Contarini Machado, Valderson Cabral de Arruda, Romário Vargas Garcia, Laura Vaillant Ribeiro e Wilker Pinheiro Lima, pelo companheirismo, amizade, ajuda braçal e intelectual;

A graduanda em Agronomia e estagiária do Laboratório de Entomologia, Ana Clara Thezolin Azevedo, pela ajuda nos ensaios experimentais e acima de tudo pela amizade;

Aos amigos da “Família NUDEMAFIA”, Ingrid Schimidt, Débora Melo, José Romário (Obrigada por sua disponibilidade em me ajudar com a estatística sempre que precisei), Carlos Magno, Leonardo Mardgan, Victor Pirovani, Anderson Poleze, Cássia Said, Tia Carlota e demais integrantes do laboratório, pela amizade, pelas conversas descontraídas, pelos conselhos e pelas reuniões sempre regadas a muitas risadas;

Enfim, a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente para mais esta conquista... MUITO OBRIGADA!!!

BIOGRAFIA

Priscila Stinguel, nascida em Laranjal, zona rural do município de Itaguaçu, Estado do Espírito Santo, no dia 27 de dezembro de 1988, primogênita da família composta de dois filhos de João Luiz Stinguel e Helena Corona Stinguel. Fez os estudos fundamentais na Escola Municipal de Educação Infantil e ensino fundamental “Pedro Thomazini” e concluiu o ensino médio e técnico na antiga Escola Agrotécnica Federal de Colatina (IFES, Campus Itapina). Aos 19 anos ingressou na Universidade Federal do Espírito Santo, na cidade de Alegre, com o propósito de se tornar Engenheira Agrônoma. Durante a graduação, fez parte da equipe do NUDEMAFI/Entomologia, estagiando e participando do programa de iniciação científica, onde teve a oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente. Aos 16 dias de fevereiro de 2016, defendeu sua dissertação, para obtenção do título de mestre em Produção Vegetal, pela mesma Universidade.

"Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa de se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entrar no oceano é que o medo desaparece, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de tornar-se oceano."

Osho

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I | 10 |
| INTRODUÇÃO GERAL | 10 |
| RESUMO - | 11 |
| ABSTRACT | 13 |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 15 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 24 |
| CAPITULO II | 29 |
| Condições térmicas e fenológicas ideais para a produção in vivo de SfMNPV em <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) | 29 |
| RESUMO – | 30 |
| ABSTRACT..... | 31 |
| INTRODUÇÃO..... | 32 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| AGRADECIMENTOS..... | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 42 |
| CAPITULO III | 53 |
| Como minimizar o efeito do comportamento canibal de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) no processo de multiplicação <i>in vivo</i> de SfMNPV? | 53 |
| RESUMO | 54 |
| ABSTRACT..... | 55 |
| INTRODUÇÃO..... | 56 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 57 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 59 |
| AGRADECIMENTOS..... | 61 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |
| CONCLUSÕES GERAIS..... | 68 |

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

STINGUEL, Priscila, M.^a., Universidade Federal do Espírito Santo, fevereiro de 2016. **Estudo biológico e comportamental de lagartas de *Spodoptera frugiperda* visando à produção de *Baculovirus spodoptera*.** Orientador: Hugo José Gonçalves dos Santos Junior. Co-orientadores: Hugo Bolsoni Zago e Fernando Hercos Valicente.

RESUMO - A utilização de bioinseticida a base de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) possui potencial para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), porém sua obtenção em larga escala depende da maximização da produção *in vivo*. Assim, alguns fatores biológicos e comportamentais devem ser estudados para aperfeiçoar a produção de SfMNPV com intuito de disponibilizar um bioinseticida eficiente, economicamente viável e que possa ser usado no manejo de *S. frugiperda* nos mais diversos sistemas agrícolas. Entre os fatores relacionados ao hospedeiro, a temperatura e a idade para inoculação do vírus são de extrema importância, pois interferem diretamente no ciclo de vida e na replicação viral. O comportamento também deve ser avaliado, para evitar condições de criação do hospedeiro que favoreçam o canibalismo e causa prejuízo na multiplicação *in vivo* do SfMNPV. Assim, objetivou-se determinar a melhor condição térmica para criar as lagartas e a idade ideal, para inocular e multiplicar o vírus no hospedeiro, bem como, verificar a ocorrência do comportamento canibal em lagartas de *S. frugiperda*. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), localizado no Centro de Ciências Agrárias da UFES, em Alegre, Espírito Santo, Brasil. A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas, a primeira para determinar a condição térmica e a idade ideais para criar e inocular, respectivamente, o hospedeiro com o vírus, para multiplicação *in vivo* de SfMNPV. A segunda etapa foi para avaliar o comportamento canibal de lagartas da espécie *S. frugiperda* criadas a 22, 25 e 31°C, inoculadas com SfMNPV quando com idades de 10, 8 e 4 dias, respectivamente, e mantidas em diferentes densidades populacionais (5, 10, 25 e 50 lagartas por recipiente). A mortalidade diminuiu com o aumento da temperatura e da idade do hospedeiro nas temperaturas de 25, 28 e 31 °C. O aumento na taxa de canibalismo foi

diretamente proporcional à densidade populacional quando as lagartas foram criadas a 22 °C, inoculadas aos 10 dias de idade e 25 °C, inoculadas aos 8 dias e atingiram 63,5 e 62,5%, respectivamente na densidade populacional de 50 lagartas. Mas, quando as lagartas foram criadas a 31°C e inoculadas com idade de 4 dias, a densidade populacional não afetou o comportamento canibal, taxa média de 24%, inferior aos outros tratamentos com 50 lagartas por recipiente. Demonstrando que é viável para a multiplicação viral, criar lagartas a 31 °C e aos 4 dias de idade inocular o vírus, podendo a partir de então colocar até 50 lagartas por recipiente, o que reduz a mão-de-obra necessária para individualizar as lagartas e otimiza o espaço físico em uma biofábrica. Portanto, se para otimizar o processo produção viral e o serviço em uma biofábrica, é preciso maximizar a produção viral, reduzir o tempo de multiplicação do vírus e o canibalismo entre as lagartas, com ausência de contaminação da criação, a temperatura e idade ideais para criação massal de *S. frugiperda* e inoculação do vírus nas lagartas, respectivamente, visando produção de baculovírus em larga escala são de 31 °C e 4 dias.

Palavras-chave: MIP, controle biológico, entomopatógenos

ABSTRACT- The use of bioinseticida as base of *Spodoptera frugiperda* multiple Nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) or *Baculovirus spodoptera*, as it is vulgarly known, has potential to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), however it's obtainment in large scale depends on maximizing the in vivo production. Thereby, some biologic and behavioral factors should be studied to improve the production of SfMNPV in order to provide an efficient bioinseticida, economically viable and that it could be used on the handling of *S. frugiperda* on several agricultural systems. Nevertheless, among the factors related to the hosts, the temperature and the age to virus inoculation are of utmost importance, as respectively, they directly interfere on life cycle and on the quantities of virus obtained from viral replication. Beside these, behavior should also be evaluated, so to avoid conditions that encourage cannibalism, evidencing the insects lab multiplication, and it could undermine the in vivo production of SfMNPV. So, this project aimed to determine the thermal conductivity and ideal age for insects breeding and inoculation with SfMNPV and to verify the occurrence of cannibalism behavior in *S. frugiperda*. The experiments were conducted in Laboratório de Controle Microbiano de Insetos do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), located in the Centro de Ciências Agrárias, UFES, Alegre, Espírito Santo, Brasil. Therefore, this study was conducted in two stages, the former was to determine the thermal condition and the ideal age for in vivo production of SfMNPV and the latter was aimed to evaluate the *S. frugiperda* cannibalism behavior in different population densities of multiplication and temperature. The results show that in the first step, the increase of temperature and hosts age make mortality decrease, it can be more evident at temperatures of 25, 28 and 31 °C. The highest production inoculated OB/100lag were at temperatures of 22 °C and armyworms being 8 and 10 days old; 25°C and armyworms being 6, 7 and 8 days old, 28°C and armyworms being 4 and 6 days old and 31°C and armyworms being 4 and 6 days old. The *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus virus (SfMNPV) can be multiplied at 22°C and armyworms being 8 and 10 days old, 25 °C and armyworms being 6, 7 and 8 days old, 28 °C and armyworms being 4 and 6 days old, and 31 °C and armyworms being 4 and 6 days old for greater production of inoculated OB/100lag. Based on the first stage results, we

evaluated the cannibal behavior in different population densities (5, 10, 25 and 50 armyworms) of the insects multiplied at 22, 25 and 31 °C, being 10, 8 and 4 days old respectively. The lower cannibalism occurred in the density of 5 armyworms, being statistically equal in all treatments, while the highest was with 50 armyworms, in treatments at 22 and 25 °C, and the latter being statistically similar (63.5 and 62.5%, respectively), whereas this same density, cannibalism at 31°C temperature was only 23%, statistically differing from the others. This demonstrates that it is feasible at this temperature to create a lot of armyworms in a single container (50 armyworms), in addition to reduce required manpower to individualize, and there will be less need need for physical space for a biofactory. Therefore, considering viral production, mortality, contamination absence, time, equivalent weight, cannibalism and service optimization, age and optimum temperature for mass rearing of *Spodoptera frugiperda*, in order to produce baculoviruses in large scale are 31 °C and 4 days old.

Keywords: IPM, biological control, entomopathogens

INTRODUÇÃO GERAL

Uma das formas de tornar possível o aumento da produtividade das culturas econômicas é através da redução das perdas decorrentes devido a diversos fatores, tais como: climáticos, edáficos, antrópicos e biológicos. Dentre os biológicos, podemos destacar a ocasionada por insetos, que estão distribuídos nos mais diversos ambientes (CASTRO, 1999) Os insetos representam o maior grupo de organismos da Terra, com uma estimativa de 4 a 10 milhões de espécies, mas apenas cerca de 5% são consideradas de importância econômica, dentre as quais as pragas agrícolas (SCHOONHOVEN et al., 2005).

Os dados mais recentes indicam que os insetos-praga causam uma perda anual média de 7,7% na produção agrícola no Brasil e por este motivo, os agricultores estão abandonando as boas práticas de combate às pragas e aumentando o uso de produtos químicos (GOULART et al., 2015). Apesar disso, existem preocupações sobre os prejuízos inerentes ao uso indiscriminado, tais como: a contaminação da terra, ar e água. Além do desenvolvimento de resistência em pragas alvo, afetar negativamente organismos não-alvo e impacto ao ser humano e sua saúde (FITCHES et al., 2010; AL-ZAIDI et al., 2011).

Essa preocupação reforça a necessidade de uma nova visão de exploração dos recursos naturais à disposição da agricultura, pois há uma demanda social pela qualidade do meio ambiente e por alimentos livres de agrotóxicos. Uma estratégia é o Manejo Integrado de Pragas (MIP), que pode ser definido como a seleção inteligente e o uso das ações para o controle de pragas que irá assegurar consequências favoráveis, econômica, ecológica e socialmente aceitas (VALICENTE, 2015). visando uma redução ou eliminação significativa de inseticidas químicos (HAASE et al., 2015). A utilização de bioinseticidas à base de baculovírus tem vantagens como ferramenta no MIP, incluindo alta especificidade, segurança ao homem, animais e plantas e facilidade de manipulação genética (BEAS-CATENA et al., 2014). Dadas as características, são agentes de controle ideais para inclusão no manejo integrado e sua ação inseticida é especialmente útil (BARRERA, et al., 2011; HATEM, et al., 2011; ADEL-SATTAR, et al., 2012; BEAS-CATENA et al., 2014). Assim, o setor agrícola deve atender a alta demanda da população, não por

quantidade, mas sim por qualidade de alimento produzido, aliando os avanços na produtividade e qualidade de produtos agrícolas, garantindo a segurança ambiental e a inocuidade de alimentos.

Entre as espécies de insetos-praga, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a principal praga do milho no Brasil. Porém, é uma espécie polífaga, pois se alimenta de diversas plantas, inclusive de interesse econômico, dentre as quais: algodoeiro, soja, alfafa, amendoim, arroz, aveia, batata, batata-doce, cana-de-açúcar, trigo e algumas hortaliças como o tomate, além de utilizar outros hospedeiros alternativos (POGUE 2002; SILOTO, 2002; CAPINERA, 2008; BARROS et al., 2010).

Em condições de altas densidades populacionais, *S. frugiperda* pode causar perdas severas de 57,6 e 70% na produção de milho e soja, respectivamente. Essas perdas ocorrem principalmente quando as culturas são implantadas em épocas favoráveis ao aparecimento deste inseto (VALICENTE et al., 2010).

Esse inseto-praga está presente em praticamente todos os estados do Brasil, favorecida pelas condições climáticas e pela disponibilidade e diversificação de plantas hospedeiras, o que mantém o ciclo biológico o ano todo (SILOTO, 2002). Esta praga é endêmica do Hemisfério Ocidental e possui uma alta capacidade migratória, sendo favorecida pela elevada capacidade de dispersão dos adultos ao longo da faixa de distribuição de suas plantas hospedeiras (SPARKS, 1979).

Como descrito, o movimento migratório de *S. frugiperda* entre os cultivos pode ser favorecido quando ocorre o plantio em áreas próximas de diferentes culturas com fenologias distintas, como soja, milho e algodão, cultivados no verão e de plantas de cobertura na entressafra, como o milheto (NAGOSHI, 2009). Esse fato pode ser a causa da ocorrência mais frequente da praga em culturas onde anteriormente era considerada praga esporádica ou secundária (BARROS et al., 2010).

Como desfolhadoras, as espécies do gênero *Spodoptera* tem grande importância econômica devido à voracidade. Portanto, quando a adoção de medidas de manejo não são eficientes, estes podem causar níveis de desfolhamento além da capacidade de tolerância da planta e

consequentemente causar danos significativos à lavoura. Desta forma, é necessário primeiramente conhecer a biologia e o seu hábito comportamental para que as medidas de manejo sejam adequadas e satisfatórias (MOSCARDI et al., 2012).

Entre as medidas de manejo, a amostragem e o monitoramento, são fundamentais para manter a sanidade da lavoura, evitando ou reduzindo os prejuízos decorrentes dos insetos-praga. Com relação a *S. frugiperda*, as perdas podem ser irreparáveis devido o hábito alimentar e comportamento desta espécie, além do fato de que as lagartas sobreviventes podem migrar para outras culturas (CAPINERA, 2008; MARTINELLI et al., 2006).

Em algumas culturas, como é o caso do milho, as lagartas de *S. frugiperda* costumam se abrigar no interior das plantas, e, com isso, ficam protegidas dos inseticidas, isso devido o “efeito guarda-chuva”, causado pelas plantas bem desenvolvidas, cujas folhas formam uma barreira protetora de difícil penetração pelos produtos (MOSCARDI et al., 2012). Porém, por serem polífitas, acabam se aproveitando de vários hospedeiros nos diferentes agroecossistemas, contribuindo para o aumento da densidade populacional em todas as épocas do ano (WAQUIL et al., 2002).

Entre as táticas de manejo de *S. frugiperda*, têm-se o controle cultural, recomenda além da rotação de culturas, a “rotação de genes” (VALICENTE, 2015), com objetivo de reduzir o aparecimento de resistência a campo (DIEZ-RODRÍGUEZ & OMOTO, 2001); o controle com fitoquímicos, com a utilização principalmente de extratos de nim, *Azadirachta indica*; tamarindo, *Tamarindus indica* L. (Fabaceae) e catingueira, *Caesalpinia bracteosa* Tul. (Fabaceae), sendo que o de nim atua na ecdise do inseto (GÓES et al., 2003), porém, mesmo com outras alternativas de manejo, o uso de inseticidas químicos ainda é muito presente (VALICENTE, 2009).

Entretanto, os inseticidas são perigosos se usados de forma intensiva e incorreta. Essa preferência ao uso do controle químico deve-se à facilidade de adoção pelo agricultor, por ser um método efetivo e com resultados mais rápidos (BEAS-CATENA et al., 2014). Falhas no controle de pragas têm sido constantes, comprometendo a produtividade e elevando os custos de produção, às vezes relacionado ao surgimento de casos de resistência dos

insetos aos inseticidas químicos e a eliminação dos organismos benéficos (VALICENTE et al., 2010).

Nos sistemas agrícolas convencionais, os efeitos provocados pelas alterações na biodiversidade e no desequilíbrio entre os níveis tróficos tornam o controle da *S. frugiperda* cada vez mais difícil e oneroso. Na cultura do milho, uma estratégia recomendada para o manejo dessa praga é o uso de plantas geneticamente modificadas, comumente conhecidas como plantas Bt, terminologia adotada devido à inclusão de um gene específico da bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, o qual produz uma proteína tóxica ao inseto. (BOREGAS et al., 2013).

A resistência de populações de insetos a diferentes grupos de inseticidas químicos, a demanda da sociedade por alimentos saudáveis, a segurança do ambiente e da saúde humana, têm levado a busca de alternativas para o manejo de pragas, como o controle biológico (O'CALLAGHAN e BROWNBRIDGE, 2009; CHANDLER et al., 2011; ISHTIAQ et al., 2012). A utilização correta de um agente de controle biológico natural pode trazer diversas vantagens ao agronegócio, por agir diretamente sobre o inseto-praga, reduzindo assim, sua densidade populacional e evitando a adoção de táticas de manejo mais agressivas ao ambiente, como é o caso do uso inadequado dos inseticidas químicos (FIGUEIREDO et al., 2006).

Assim, uma alternativa para a redução do uso de inseticidas químicos sintéticos é o controle biológico, que é a regulação da população de insetos-praga por inimigos naturais (PARRA et al., 2002). Os organismos vivos que atuam como agentes do controle biológico constituem o grupo formado pelos parasitoides, predadores e patógenos.

Outra particularidade que qualifica o controle biológico como uma excelente alternativa para o manejo de insetos-praga é baseado na possibilidade de associá-lo com outros métodos de controle, tais como controle cultural, físico, comportamental e, até mesmo o controle químico, utilizando para isso inseticidas seletivos aos entomopatógenos e entomófagos (PARRA, 2000).

Entre os principais inimigos naturais utilizados no controle biológico de *S. frugiperda*, destacam-se: a bactéria *B. thuringiensis* (VALICENTE 2008;

LEMES, 2015;) o vírus SfMNPV (VALICENTE, 2009; CUARTAS, 2014) e parasitoides do gênero *Trichogramma* (CRUZ, 2004; CAMERA, 2010).

Considerando apenas os vírus entomopatogênicos podemos destacar a família *Baculoviridae*, a qual é dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* (JEHLE et al., 2006), sendo que, esta é baseada na especificidade do hospedeiro. O *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), ou simplesmente, *Baculovirus spodoptera*, integra o gênero *Alphabaculovirus*, que inclui todos os *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) de lepidópteros formadores dos fenótipos virais BV (*budded virus*) e ODV (*occlusion-derived virus*) (PAIVA, 2013), os quais são específicos para a fase larval dos seus insetos hospedeiros (INCEOGLU et al., 2001).

Segundo Castro et al. (1999), o ciclo de vida dos Baculovírus é bastante peculiar e se diferencia de outros vírus, por produzir dois tipos de progênes infecciosas com funções diferentes (GRANADOS & FEDERICI, 1986), mas essenciais para a sua propagação natural. A forma ocluída do vírus (PDV) é responsável pela transmissão de inseto para inseto, enquanto a forma não ocluída (BV) é responsável pela transmissão de célula para célula, em um mesmo indivíduo (infecção sistêmica).

As partículas virais do baculovírus ficam expostas nas folhas pulverizadas, e a lagarta quando se alimenta, proporciona a entrada dos occlusion bodies (OB) virais no sistema digestivo (SOUZA, 2013), assim, como o intestino médio dos insetos é alcalino, os OBs são dissolvidos liberando os vírions. Então as membranas se fundem às membranas das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio. Logo, os 20 nucleocapsídeos passam pelo citoplasma da célula e penetram nos poros nucleares até chegar ao núcleo e liberar o DNA viral, ocorrendo à transcrição dos genes do vírus e a replicação. Esses nucleocapsídeos que se formaram no núcleo passam pela membrana nuclear e atravessam a membrana basal da célula, adquirindo um novo envelope. Quando os BVs chegam à hemolinfa e ao sistema traqueal do inseto, se espalham e provocam infecções secundárias em outros tecidos do corpo do inseto. Nas células destes tecidos formam-se BVs e ocorre a disseminação célula á célula. Quando o estágio da infecção já está avançado, ocorre a oclusão dos vírions. Os núcleos dessas células tornam-se repletas de

OBs, liberando esses na hemolinfa do hospedeiro e causando a ruptura das membranas celulares (MOSCARDI & SOUZA, 2002).

O processo de infecção por baculovírus apresenta uma sequência de etapas desde a ingestão do vírus até a morte: primeiro, a infecção debilita o inseto, comprometendo sua capacidade motora e de alimentação; fazendo com que lagartas infectadas se desloquem para as partes superiores da planta hospedeira e morram após determinado tempo; o inseto apresenta corpo com aspecto opaco (branco-leitoso) em relação à lagarta sadia; essas alterações começam entre 48 e 72 horas após a infecção, e após alguns dias, dependendo da espécie hospedeira e do vírus, ocorre o rompimento do corpo do inseto liberando grande quantidade de vírus no ambiente (MOSCARDI 1999). Lagartas infectadas por *Baculovirus spodoptera* apresentam coloração rosada (PAIVA, 2013) e o crescimento pode diminuir pela redução da alimentação (FEDERICI, 1999).

O SfMNPV é um vírus de poliedrose eficiente contra *S. frugiperda* (BARRETO et al., 2005) e, por ocorrer de forma natural e ser específico, como outros baculovírus, é um ótimo candidato para programas de manejo integrado dessa espécie de inseto-praga (MOSCARDI, 1999).

Por sua vez, a busca por novos isolados é constante, pois é necessário selecionar estirpes mais virulentas e que possam ser introduzidas nos programas de manejo de diversos insetos-praga. Entre as instituições de pesquisa, a Embrapa Milho e Sorgo (Laboratório de Controle Biológico, Sete Lagoas – MG), destaca-se pelo trabalho realizado na caracterização e seleção de isolados de Baculovírus virulentos a *S. frugiperda* (BARRETO et al., 2005).

Em estudos realizados no campo, Valicente & Costa (1995), comprovaram a virulência do Baculovírus *spodoptera* as larvas de *S. frugiperda* e verificaram que a mortalidade das larvas foi diretamente proporcional com a dosagem do vírus, alcançando até 90,7%. Contudo, outros estudos comprovam o decréscimo da mortalidade quando a infecção com *Baculovirus spodoptera* ocorre em lagartas mais velhas (VALICENTE et al., 1988).

Ao avaliar a interação do *Baculovirus spodoptera* em uma alta concentração e os inimigos naturais da *S. frugiperda*, Figueiredo et al. (2009) observaram que, após a aplicação do inseticida biológico a porcentagem de plantas atacadas caiu até 14,5%, e a presença de parasitoides e inimigos

naturais foi significativa, corroborando com Figueiredo (2004), que observou que a aplicação do *Baculovirus spodoptera* não diminuiu a ocorrência dos inimigos naturais de *S. frugiperda* pela sua seletividade.

A utilização de vírus entomopatogênicos como estratégia no manejo integrado de pragas, pode ser uma maneira efetiva de proteger o ambiente sem impacto sobre insetos benéficos e vertebrados, incluindo o homem. Considerando que Baculovirus são ambientalmente seguros e esse reconhecimento aumenta o potencial dos mesmos como alternativa aos inseticidas químicos (BARRETO et al., 2005). Segundo Lapointe et al. (2012), diversas espécies de vertebrados, incluindo o homem, foram expostas a várias espécies de Baculovirus, em testes toxicológicos, os quais demonstraram a segurança ambiental dos inseticidas microbianos à base de vírus.

Como descrito anteriormente, dependendo do isolado e do hospedeiro infectado, pode ocorrer o rompimento do tegumento do inseto e conseqüentemente liberação de vírus no ambiente. Contudo, existem isolados que mesmo com o avanço do processo infeccioso, não provocam o rompimento imediato do tegumento da lagarta após a morte da mesma (VALICENTE et al., 2008). Considerando a necessidade de produção de SfMNPV em grande quantidade, isso para atender a demanda de um bioinseticida, essa característica confere a redução dos custos de produção *in vivo*, uma vez que proporciona um menor manuseio do inseto até o seu processamento, logo, ocorrerá uma menor perda de partículas virais e facilita a manipulação, levando a uma redução na mão-de-obra necessária à produção do bioinseticida a base de SfMNPV.

Apesar disso, a etapa de formulação representa um dos principais entraves à comercialização de produtos microbianos à base de baculovirus, sendo que esta se divide em duas áreas: aquela relacionada à estabilidade durante o armazenamento (vida de prateleira) e aos fatores importantes à aplicação de campo. Assim, o objetivo principal é produzir um preparo estável na qual a viabilidade do vírus é preservada ou mesmo aumentada (MASCARIN, 2009), que aperfeiçoe a aplicação e ingestão do vírus pelo inseto, que maximize a persistência no campo, que seja estável durante armazenamento e que facilite o manuseio do produto pelo agricultor (JONES & BURGESS, 1998), além de excluir a presença de outros microrganismos

contaminantes, pois cada lote de vírus produzido não deve representar um risco para a saúde humana ou para o ambiente (CABALLERO, 2009).

Apesar da eficiência de baculovírus permanecer inalterada por muitos anos quando armazenado sob condições ideais, (SIREESHA et al., 2010), os bioinseticidas virais são sensíveis à radiação UV, sendo rapidamente desativados quando expostos principalmente ao espectro UV-B (280-310 nm), que é considerado o responsável também pela inativação de outros entomopatógenos (bactérias, fungos e protozoários) sob condições naturais (CABALLERO et al., 2009; VILLAMIZAR et al., 2009;). Assim, há a necessidade do uso de inertes e outras substâncias protetoras contra a radiação UV, contribuindo para a eficiência desses agentes de controle no campo ao longo do tempo (MASCARIN, 2009).

A maximização da obtenção de vírus a partir de lagartas infectadas é necessária para viabilizar a produção em larga escala de um bioinseticida a base de Baculovírus, pois, de acordo com Moscardi et al. (2011), até o presente momento, o uso de Baculovírus é apenas 0,5% do total, apresentando pouca influência no mercado mundial de bioinseticidas e pelo fato de que, atualmente tem-se utilizado basicamente plantas Bt como único método de controle (BOREGAS et al., 2013).

Por outro lado, é necessária uma melhor compreensão dos fatores bióticos e abióticos que influenciam na relação hospedeiro/patógeno e conseqüentemente na produção de poliedros virais. Mediante o exposto, pesquisas que selecionem isolados com alta capacidade de virulência e que possuam características que favorecem a produção *in vivo* de SfMNPV são essenciais para o desenvolvimento de um bioinseticida para ser implementado visando ao manejo de *S. frugiperda*.

Outro fator importante que deve ser levado em conta durante o processo de formulação de um produto microbiano à base de Baculovirus é o comportamento canibal da lagarta de *S. frugiperda*. O canibalismo é frequente mesmo quando há disponibilidade de alimentos (CHAPMAN, 1999). E essas altas densidades podem afetar a susceptibilidade da infecção viral (GOULSON & CORY, 1995), além disso, pode reduzir o número de larvas infectadas por vírus, bem como a quantidade de vírus produzido (MOSCARDI et al., 1997). Uma maneira de diminuir o canibalismo é individualizar as lagartas, porém, o

desenvolvimento deste método requer uma grande quantidade de trabalho, tornando-o inviável.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar alguns aspectos biológicos e comportamentais de *S. frugiperda* visando aperfeiçoar a produção *in vivo* de SfMNPV. Para isso, foi determinada a melhor relação entre a temperatura de desenvolvimento e a idade ideal para a inoculação das lagartas de *S. frugiperda* com SfMNPV, baseando-se nos melhores índices de obtenção dos poliedros virais e, também determinou-se a densidade ideal de insetos para evitar o comportamento de canibalismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZAIDI, A. A., et al. Negative effects of pesticides on the environment and the farmers awareness in Saudi Arabia: a case study. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 21, n. 3, p. 605-611, 2011

BARRETO, M.R., et al. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 67-75, 2005.

BARROS, E. M., J. B. TORRES, e A. F. BUENO. Oviposition, development, and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts of economic importance. **Neotropical Entomology**, v.39, p. 996-1001, 2010.

BEAS-CATENA, A. et al. Baculovirus biopesticides: an overview. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 24, n. 2, p. 362-373, 2014.

BOREGAS, K. G. B. et al. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, v. 72, p. 61-70, 2013.

CABALLERO, P.; et al. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 35, n. 2, p.105-115, 2009.

CAMERA, C. Primeiro relato de *Trichogramma rojasi* parasitando ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Ciencia Rural**, vol.40 n. 8, Santa Maria, Aug. 2010.

CAPINERA, J. L. **Encyclopedia of entomology**. 2. ed. Springer: Dordrecht, The Netherlands, v. 1-4, p. 4346, 2008.

CASTRO, M. E. B. DE.; et al. Biologia molecular de baculovirus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.34, n.10, Brasília Oct. 1999.

CHAPMAN, J.W. et al. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. **Ecological Entomology**, v. 24, p. 268–275, 1999.

CHANDLER, D., et al. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. Phil. Trans. R. Soc. B: **Biological Sciences**, v. 366, n. 1573, 1987-1998, 2011.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum*, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas 4p. (**Comunicado Técnico 98**), 2004.

CUARTAS, P. et al. Characterisation of a Colombian granulovirus (Baculoviridae: Betabaculovirus) isolated from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 11, 2014.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da Resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a Lambda-Cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p.311-316 2001.

FEDERICI, B.A. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.), *Methods in biotechnology: Biopesticides, use and delivery*. **Humana Press**, Totowa, v. 5, p. 301-320, 1999.

FIGUEIREDO, M.L.C.; et al. Interaction between *baculovirus spodoptera* and natural enemies on the suppression of *Spodoptera frugiperda* (J. E. smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.8, p.207-222, 2009.

FIGUEIREDO, M. L. C., MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, E. I. Associação entre inimigos naturais e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 5, p.340-350, 2006.

FIGUEIREDO, M.L.C. **Interação de inseticidas e controle biológico natural na redução dos danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho (*Zea mays*)**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (SP). 205p, 2004.

FITCHES, E. C.,et al. Insecticidal activity of scorpion toxin (ButalT) and snowdrop lectin (GNA) containing fusion proteins towards pest species of different orders. **Pest Management Science**, v. 66, n. 1, p. 74-83, 2009.

GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). *The biology of baculoviruses*. Boca Raton: **CRC Press**,v.1, 1986.

GÓES, G. et al. **Efeito de extratos vegetais no controle de *Spodoptera Frugiperda***. Graduando em Agronomia - Bolsista do CNPq/PIBIC/ESAM, Mossoró, p. 47-49, 2003.

GOULART, H. F.; et al. Feromônios: Uma Alternativa Verde para o Manejo Integrado de Pragas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4,p. 1205-1224, 2015.

GOULSON, D.; CORY, J.S. Responses of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) to crowding: interactions with disease resistance, color phase and growth. **Oecol**, v. 104, p. 416–423, 1995.

HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A; ROMANOWSKI, V. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. **Viruses**, v. 7, p. 2230-2267, 2015.

INCEOGLU, A.B., et al. Recombinant baculoviruses for insect control. **Pest Management Science**. v. 57, p. 981-987, 2001.

ISHTIAQ, M.; SALEEM, M. A.; RAZAQ, M. Monitoring of resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) from four districts of the Southern Punjab, Pakistan to four conventional and six new chemistry insecticides. **Crop Protection**. v. 33, p. 13-20, 2012.

JEHLE, J.A., et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, p. 1257- 1266, 2006.

JONES, K. A.; BURGES, H. D. Technology of formulation and application, pp. 7-30. En: Burges, H. D. (Ed.). **Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments**. Kluwer, Dordrecht, p. 496 , 1998.

LAPOINTE, R. THUMBI, D., LUCAROTTI, C.J. Recent advances in our knowledge of baculovirus molecular biology and its relevance for the registration of baculovirus-based products for insect pest population control. In: Larramendy, M.L. e Soloneski, S. (Eds.), **Integrated pest management and pest control Current and future tactics**. Rijeka: InTech, 1, cap. 21, p. 495-536, 2012.

LEMES, A. R. N. et al. Selection of strains from *Bacillus thuringiensis* genes containing effective in the control of *Spodoptera frugiperda*. **Bt Research**, v.6 ,n.1, p. 1-8, Jan, 2015.

MARTINELLI, S., et al. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* populations associated to maize and to cotton in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, n. 99, p. 516–526, 2006.

MASCARIN, G.M. **Controle microbiano da traça-da-batata *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae)**, com granulovirus. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

MOSCARDI F., et al. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: Ahmad, I., F. Ahmad and J. Pichtel (eds) **Microbes and Microbial Technology**. Springer, New York, USA, p.415-445, 2011.

MOSCARDI, F., et al. Artrópodes que atacam as folhas da soja. pp. 213-309. In: Hoffman-Campo, C. B.; CorrêaFerreira, B. S.; Moscardi, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. EMBRAPA, Brasília, Brasil, 2012.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L. Baculovirus para o controle de pragas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 24, p. 21-29, 2002.

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

MOSCARDI, F., LEITE, L.G.; ZAMATARO, C.E. Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): effect of virus dosage, host density and age. **Anais da Sociedade de Entomologia Brasileira**, v. 26, p. 121–132, 1997.

NAGOSHI, R. N. Can the amount of corn acreage predict fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation levels in nearby cotton? **Journal of Economic Entomology**, v. 102, p. 210-218, 2009.

O'CALLAGHAN, M.; BROWNBRIDGE, M. Environmental impacts of microbial control agents used for control of invasive pests. In: Hajek, A. E., T. Glare and M. O'Callaghan (eds) **Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods**. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p.305-327, 2009.

PAIVA, C. E. C. **Multiplicação de *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, julho de 2013.

PARRA, J. R. P. O Controle Biológico e o Manejo de Pragas: passado, presente e futuro. In: GUEDES, J. C.; DA COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria, UFSM, p. 59- 70, 2000.

PARRA, J. R. P. et al. Controle biológico: terminologia. In: PARRA, J.R.P; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, p. 1-16. 2002.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Institute**, Florida, v. 43, p. 1- 202, 2002.

SCOLARI, D. D. G. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. IN: **Visão progressista do agronegócio brasileiro**. Brasília, DF: Fundação Milton Campos, 2006.

SCHOONHOVEN, L.M., VAN LOON, J.J.A, DICKE, M. Insect Plant Biology. **University Press**, Oxford, 2, p. 421, 2005.

SILOTO, R. C. **Danos a biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho**. Dissertação de mestrado- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, p., 93, Piracicaba, 2002.

SIREESHA, K., et al. Effect of different storage conditions on the virulence of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV). **Journal of Dental Research**, v. 34, n. 1, p.65-69. Solter, L.F. and A. E. Hajek (2009). Control, 2010.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist** , v. 62, p.82-87, 1979.

SOUZA, C. S. F. da. **Seletividade do *Baculovirus spodoptera* (SfMNPV) às espécies de lagartas do milho.** Monografia apresentada à Universidade Federal de São João Del Rei, Campus Sete Lagoas, Abril/2013.

VALICENTE, F. H. Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho. **Circular Técnica 208**, Embrapa milho e sorgo, Sete Lagoas, MG Junho, 2015.

VALICENTE, F. H., E. S. TUELHER, e E. C. BARROS. Processo de Produção Comercial de Baculovírus em Grande Escala. **Circular Técnica 157**. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas, Brasil, 2010.

VALICENTE, F. H. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus. **Circular Técnico 114**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Dezembro, 2009.

VALICENTE, F. H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. **Circular Técnico 105**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Dezembro, 2008.

VALICENTE, F.H.; et at. Identificação e purificação de um vírus-de-granulose em lagartas-do-cartucho-do-milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.23, p.291-296, 1988.

VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; COTES, A. Efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad insecticida de um nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 35, p. 116-121. 2009.

WAQUIL, J. M.; VILLELA , F. M. F.; FOSTER, E J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v. 1, p.2-11, 2002.

CAPITULO II

Condições térmicas e fenológicas ideais para a produção in vivo de SfMNPV em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO - Bioinseticidas a base de baculovírus são promissores para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). O objetivo foi determinar a temperatura e idade ideais para a multiplicação de lagartas de *S. frugiperda* visando maximizar a produção de *Baculovirus spodoptera*. Folhas de mamona pulverizadas com isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) (1×10^8 OB/mL), que foram acondicionadas em recipientes plásticos (tipo “gerbox”). Os tratamentos foram constituídos pela combinação de cinco idades (4, 6, 7, 8 e 10 dias) e cinco temperaturas (19, 22, 25, 28 e 31°C), com quatro repetições. Ao final do período de inoculação (48 horas), 15 lagartas por tratamento foram individualizadas em copos de acrílico com dieta artificial em BOD nas temperaturas referentes a cada tratamento até a morte ou o estágio de pupa. As médias de mortalidade e os parâmetros de produção (poliedros por lagarta (OB/lag), poliedros por 100 lagartas inoculadas (OB/100lag), peso e lagarta equivalente por hectare) foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Bootstrap para comparação das médias, adotando um nível de significância de 5%. A mortalidade diminuiu com o aumento da idade e temperatura. Para maximizar a produção viral, OB/100lag foi o parâmetro utilizado na escolha dos melhores tratamentos. Portanto, o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) pode ser multiplicado nas temperaturas de 22°C com lagartas inoculadas com idades de 8 e 10 dias, 25 °C e lagartas inoculadas com 6, 7 e 8 dias, 28 °C e lagartas de 4 e 6 dias e 31 °C e lagartas de 4 e 6 dias para uma maior produção de OB/100lag inoculadas.

Palavras-chave: Baculovirus, virulência, temperatura

ABSTRACT - Insecticide baculovirus base are promising for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). The objective, based on the *Baculovirus spodoptera* production parameters, was to determine the ideal temperature and age for larvae of *S. frugiperda* multiplication, aiming the production maximization of *baculovirus spodoptera*. Castor leaves with isolated 6 of *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) at a concentration of 1×10^8 OB/ml (occlusion bodies/mL) and transferred to plastic containers (such as "gerbox"), along with 20 armyworms and kept in BOD for 48 hours. The treatments were a combination of five different ages and five different temperatures (19, 22, 25, 28 and 31 °C), a factorial 5 x 5 disposed completely randomized design with four replications. At the end of the incubation period, 15 armyworms per treatment were individually placed in plexiglass cups with artificial diet in BOD at the temperatures for each treatment until death or pupal stage. The average mortality and the production parameters (polyhedron by armyworm (OB/lag), polyhedron per 100 inoculated armyworms (OB/100lag), equivalent weight and armyworms per hectare) were subjected to variance analysis, and waste analyzed by the Shapiro-Wilk test for normality check. Given the lack of normality, the averages were grouped by Bootstrap test for comparison, adopting a 5% significance level. The mortality rate decreased as the increasing of age and temperature. The OB/100lag production was the parameter used to select the best treatments, it is the mortality result and OB/lag production, as well as the required time for assessing the armyworms mortality. The highest OB/100 lag production were inoculated at temperatures of 22 °C with armyworms being 8 and 10 days old, 25°C with armyworms being 6, 7 and 8 days old, 28°C with armyworms being 4 and 6 days old, and 31°C with armyworms being 4 and 6 days old. *The Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) virus can be spread at 22°C with armyworms being 8 and 10 days old, 25 °C with armyworms being 6, 7 and 8 days old, 28 °C with armyworms being 4 and 6 days old, and 31 °C with armyworms being 4 and 6 days old for greater OB/100lag inoculated production.

Keywords: Baculovirus, virulence, temperature

INTRODUÇÃO

Baculovírus são utilizados para controle de pragas florestais e insetos-praga que atacam culturas de interesse econômico desde 1990 (BARRERA et al., 2011; HATEM et al., 2011; ADEL-SATTAR et al., 2012; BEAS-CATENA et al., 2014). Os bioinseticidas formulados à base de Baculovírus apresentam diversas vantagens aos produtos convencionais, pois são altamente específicos para insetos-praga e ocorrem naturalmente causando epizootias (ALVES, 1998; INCEOGLU et al., 2006). Além disso, existem no mercado mundial aproximadamente 60 bioinseticidas à base de vírus (BEAS-CATENA et al., 2014).

Contudo, apesar de apresentarem resultados satisfatórios, os bioinseticidas possuem algumas desvantagens, tais como: o elevado custo para formulação, além dos aspectos relacionados à velocidade de atuação no campo e a instabilidade provocada pela radiação UV (INCEOGLU et al., 2006).

Assim, o aprimoramento das condições de desenvolvimento das lagartas e de reprodução do vírus são fatores-chaves para aumentar a produção desse vírus (PAIVA, 2013). Entre estes, a temperatura é considerada de extrema importância, pois além de influenciar no desenvolvimento do hospedeiro, afeta também o crescimento celular e a replicação do vírus (SHAO-HUA et al., 1998). Além disso, a temperatura pode ter efeito direto sobre a proteína dos corpos de inclusão e conseqüentemente, reduzir a infectividade do vírus (MICHALSKY et al., 2008; VILLAMIZAR, 2011).

O efeito da temperatura no desenvolvimento viral depende do hospedeiro e da espécie de Baculovírus (PAIVA, 2013). Portanto, deve existir uma sincronia entre o desenvolvimento do hospedeiro e a progressão viral, pois ambos são sensíveis à temperatura (SPORLEDER et al., 2008). Logo, a idade das larvas para inoculação e a concentração de vírus devem ser determinadas para maximizar a produção de poliedros virais (PAIVA, 2013).

Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) apresenta potencial comprovado para o manejo de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (MOSCARDI, 1999; WILLIAMS et al., 1999; GÓMEZ et al., 2010). Contudo, a produção é basicamente pelo sistema *in vivo*, ou seja, é multiplicado em lagartas sadias, sob condições controladas (BEAS-CATENA et al., 2014). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar a

melhor temperatura de criação e idade ideal para inoculação das lagartas de *S. frugiperda* com SfMNPV visando aperfeiçoar o sistema de produção *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES) em Alegre, Espírito Santo, Brasil.

Obtenção e multiplicação dos insetos. A criação massal de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de pupas provenientes do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). No Setor de Entomologia do NUDEMAFI, as pupas foram mantidas em sala climatizada (Temperatura: 26 ± 1 °C; Umidade relativa: 60% e; Fotofase: 12 horas) até a emergência dos adultos. Posteriormente, os adultos foram transferidos para gaiolas de criação (20 cm de diâmetro x 25 cm de altura) revestidas internamente com folha de papel branco, com as extremidades fechadas com tecido do tipo “voile”, sendo oferecida diariamente uma solução de mel a 10% como substrato alimentar. Os ovos foram coletados a cada dois dias e acondicionados em recipientes plásticos e, após a eclosão, as lagartas foram transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas finas para copos de acrílico (40 mL) contendo dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja, de acordo Valicente e Barreto (2003).

Obtenção e produção de SfMNPV. O isolado utilizado neste ensaio (isolado 6), é proveniente do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG), o qual foi selecionado previamente por não provocar o rompimento imediato do tegumento do inseto após a morte (VALICENTE & BARRETO, 1999). O isolado viral foi multiplicado para a obtenção de material a ser utilizado nos experimentos.

Determinação da temperatura de criação e idade ideal para inoculação das lagartas de *S. frugiperda* com SfMNPV. Com o intuito de designar a temperatura de criação e idade ideal para inoculação de SfMNPV

(Isolado 6) em *S. frugiperda* foi avaliado a produção de poliedros virais em insetos criados em 5 (cinco) níveis de temperatura de criação (19, 22, 25, 28 e 31 °C) e 5 (cinco) idades diferentes (4, 6, 7, 8 e 10 dias de idade). Para isso procedeu-se a combinação entre cada fator, idade e temperatura, respectivamente. Por ocasião do ensaio a suspensão foi ajustada para 1×10^8 corpos de oclusão/mL e inoculada através do fornecimento *ad libitum* de folhas de mamona (*Ricinus communis* L.) previamente pulverizadas com 2 mL da suspensão viral/folha (partes adaxial e abaxial) com auxílio de um pulverizador manual, sendo a testemunha tratada com água destilada esterilizada.

As folhas de mamona previamente pulverizadas com a suspensão viral foram transferidas para recipientes plásticos, juntamente com 20 lagartas sadias de *S. frugiperda* e o processo de inoculação se deu através da alimentação dessas folhas. Em todas as soluções, incluindo a testemunha, foi adicionado o surfactante não-iônico Tween 80[®] (Merck Schuchardt, Germany) (polioxietileno-sorbitol, tendo a função de agir como dispersante).

Após 48 horas, 15 lagartas foram individualizadas em copos de acrílico (40 mL) contendo a mesma dieta artificial utilizada para a criação dos insetos, sendo mantidas em câmara climatizada na temperatura correspondente ao respectivo tratamento. A partir daí a avaliação da mortalidade devido à ingestão do vírus foi feita diariamente, finalizando-se na fase pupal, e foi quantificada pela fórmula: $\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{número de lagartas mortas com sintomas}}{\text{número de lagartas mortas com sintomas} + \text{número de pupas}}$. As lagartas mortas com sintomas típicos de infecção por SfMNPV foram recolhidas, durante as avaliações diárias e acondicionadas em freezer a -20 °C, identificando-se os respectivos tratamentos e repetições de origem. Somente foram computadas para efeito do cálculo da mortalidade as lagartas que morreram com sintomas típicos de infecção por vírus.

Para a determinação dos parâmetros de produção de poliedros virais (OB total, OB/lag, OB/100lag, PE e LE) as lagartas dos respectivos tratamentos foram pesadas em balança de precisão, descongeladas e maceradas num almofariz de porcelana para auxiliar a liberação dos corpos de oclusão, *occlusion bodies* (OB). Para a separação das partes mais grosseiras da lagarta o líquido resultante foi filtrado com tecido *voile*.

A solução com as partículas virais foram colocadas em tubos tipo “Falcon” e os volumes foram completados com água destilada até atingirem o volume final de 45 mL. O passo seguinte consistiu da contagem dos poliedros em câmara de Neubauer com o uso de microscópio óptico e aumento de 400 vezes. Para isso foram colocados 10 µL em cada um dos dois campos de contagem presentes numa câmara de Neubauer. Foram realizadas duas contagens por unidade experimental.

A partir do resultado das contagens de poliedros e conhecendo-se o volume de solução viral (45 mL), foi possível determinar a quantidade total de poliedros (OB total), bem como, o número médio de poliedros por lagarta morta (OB/lag), o qual foi obtido dividindo-se o valor de OB total pelo número de lagartas mortas em cada tratamento e repetição, bem como o número de poliedros por cada cem lagartas inoculadas com o vírus (OB /100lag), que é o resultado da multiplicação da mortalidade e o poliedro por lagartas.

O parâmetro lagarta equivalente (LE), que corresponde ao número de lagartas necessárias para obtenção de uma dose de baculovírus formulado, foi estimado tendo como base a utilização de $3,0 \times 10^{11}$ OB por dose. Cada dose corresponde a 50 g do bioinseticida formulado na forma de pó molhável a ser aplicado em um hectare (1ha) de área plantada com milho. O mesmo cálculo foi realizado para o parâmetro peso equivalente (PE), que corresponde à massa de lagartas necessárias para obtenção de uma dose de baculovírus formulado, porém, utilizando valor de OB total pela massa total das lagartas (g), dentro de cada repetição por tratamento.

Análise dos dados. Os parâmetros avaliados foram mortalidade, poliedros por lagartas (OB lag), poliedros por 100 lagartas inoculadas com o vírus (OB/ 100 lag), peso equivalente e lagarta equivalente.

O modelo experimental adotado foi o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (5 x 5) perfazendo assim 25 (vinte e cinco) tratamentos com 4 (quatro) repetições contendo 15 (quinze) lagartas/repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância sendo os resíduos analisados pelo teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade. Dada à ausência de normalidade, as médias foram agrupadas pelo teste de Bootstrap (RAMOS & FERREIRA, 2009) adotando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As temperaturas e idades de inoculação afetaram a taxa de mortalidade, o número de poliedros por lagartas (OB/lag), o número de poliedros por 100 lagartas inoculadas com o vírus (OB/100lag), o parâmetro lagarta equivalente e o peso equivalente.

Ao analisar a temperatura dentro de cada nível de idade, observa-se que, não houve diferença na mortalidade quando lagartas com 4 dias de idade são inoculadas com o vírus, em todas as temperaturas. Em lagartas inoculadas aos 6, 7 e 8 dias de idade, as maiores mortalidades foram obtidas a partir de lagartas criadas nas temperaturas de 19, 22 e 25 °C. Paiva (2013), verificou que, em lagartas de 6 dias de idade, a mortalidade foi maior na temperatura de 28 °C, entretanto, em seu trabalho, as lagartas foram criadas a 25 °C e permaneceram na temperatura de 28 °C apenas a partir do período de inoculação. Em lagartas inoculadas aos 10 dias de idade, as maiores mortalidades foram observadas a 19 e 22 °C, enquanto que, lagartas dessa idade, criadas a 28°C não morreram, todas empuparam, bem como nas idades de 7, 8 e 10 dias, na temperatura de 31 °C.

Quando considerado o parâmetro OB lag, analisando a temperatura dentro de cada nível de idade, verifica-se que, em lagartas de 4 e 6 dias de idade, as temperaturas que apresentaram maior produção viral por lagarta foram 28 e 31 °C, Lagartas de 7 dias apresentaram os melhores resultados em temperaturas de 25 e 28 °C. Temperaturas de 22, 25 e 28 °C foram melhores para lagartas de 8 dias e para lagartas de 10 dias, observa-se que, os melhores resultados foram para as temperaturas de 22 e 25 °C. O número de OB lag aumenta à medida que há um aumento da temperatura, resultado este, que pode ser observado de forma mais evidente entre as temperaturas de 19, 22 e 25 °C (Figura 2). Estes resultados diferem daqueles encontrados por Sporleder et al. (2008) que verificaram um aumento no número de partículas virais por lagarta à medida que a temperatura decresce.

Ao analisar a temperatura dentro de cada nível de idade, observa-se que, no parâmetro OB/100lag, tem-se que, para lagartas de 4 dias os melhores resultados foram temperaturas de 28 e 31 °C. Já em lagartas de 6 dias de idade, os melhores resultados foram para 25, 28 e 31 °C. Lagartas de 7 dias de idade, a única temperatura que diferiu significativamente das demais foi 25 °C.

Lagartas de 8 dias apresentaram maior produção de vírus nas temperaturas de 22 e 25 °C. A única temperatura que diferiu significativamente das demais em lagartas de 10 dias foi a de 22 °C (Figura 3).

Ao analisar a mortalidade baseando-se na idade de inoculação dos insetos, verifica-se uma virulência de até 100%, sendo que a 19, 22 e 25 °C não houve diferença, com exceção da combinação entre as lagartas com 10 dias de idade e inoculadas com SfMNPV a 25 °C. Essa redução da mortalidade também é observada nas temperaturas de 28 e 31 °C, logo, quanto maior a idade de inoculação, menor será a mortalidade (Figura 1).

Vários estudos demonstram que a progressão da doença por baculovírus é fortemente afetada pela temperatura (VAN BEEK et al., 2000; SPORLEDER et al., 2008), pois, esta pode controlar a cinética da replicação do patógeno e determinar a atividade de alimentação do estágio larval, afetando portanto, a dosagem do inóculo viral ingerido (SPORLEDER et al., 2008).

Observa-se em todos os tratamentos uma redução da susceptibilidade em lagartas inoculadas com baculovírus com o aumento de sua idade. Segundo Engelhard & Volkman (1995), lagartas de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), são capazes de se livrarem da infecção por *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* por descamação das células epiteliais do intestino infectadas durante a muda, a partir do quarto para o quinto instar, logo as células são descartadas sem que ocorra a infecção viral. Os fatores que envolvem o desenvolvimento da resistência começam a agir durante a infecção primária do tecido alvo, no intestino médio larval, e não durante a infecção sistêmica subsequente.

Por outro lado, essa pode ser a explicação da redução da infectividade ou suscetibilidade com o aumento dos estádios de desenvolvimento. Em temperaturas de desenvolvimento mais baixas, como é o caso dos insetos criados a 19 °C, isto talvez não fique tão evidente porque o ciclo está mais atrasado, prolongando conseqüentemente a passagem de instar para o outro, o contrário ocorre nas temperaturas mais altas, como 28 e 31 °C (Tabela 2). Segundo van Beek et al. (2000), muitas espécies de insetos continuam a se desenvolver em temperaturas menores de incubação, porém, a progressão da doença viral se torna lenta, resultando em longos ínstares larvais.

Segundo Mascarin (2009), o aumento da concentração viral resulta diretamente no incremento da taxa de mortalidade larval em todas as temperaturas estudadas, assim, nos tratamentos de 28 °C, lagartas de 10 dias e 31 °C, 7, 8 e 10, que não houve mortalidade e conseqüentemente não houve produção de OB, talvez haja a necessidade de testar doses maiores de concentrações para que haja mortalidade.

Os resultados encontrados sugerem que a temperatura pode interferir mais que a idade, pois quando ocorre um aumento da temperatura, o ciclo da lagarta é mais rápido, o contrário ocorre quando se utiliza temperaturas inferiores. Vários autores relatam que a temperatura afeta o ciclo de replicação dos baculovírus e o desenvolvimento do hospedeiro (JOHNSON et al., 1982; RIBEIRO & PAVAN, 1994, VAN BEEK, et al., 2000).

Com base nos resultados de produção de poliedros virais por lagarta (OB lag), observa-se o oposto do que ocorre nos resultados de mortalidade, ou seja, quanto maior a mortalidade, menor a produção de vírus. Na temperatura de 19 °C, não houve diferença significativa em relação às idades. As médias de 8 e 10 dias de idade foram as que apresentaram os melhores resultados na temperatura de 22 °C, resultado este explicado pelo fato de que, a mortalidade neste tratamento foi menor que nos demais. O mesmo ocorre na temperatura de 25 °C, as melhores médias de produção viral foram nas idades em que a mortalidade foi menor, logo, 7, 8 e 10 dias de idade. Na temperatura de 28 °C os melhores resultados foram obtidos em lagartas de 6, 7 e 8 dias, não havendo diferença estatística. A melhor média para produzir OB/lag na temperatura 31 °C foi para lagartas 6 dias de idade. Assim, pode-se observar que, ambiente com maior produção viral diferiu daquele com maior mortalidade de *S. frugiperda*.

Subramanian et al. (2006), ao estudarem a produção de poliedros por lagartas de quinto ínstar de *Spodoptera litura nucleopolyedrovirus* (SpltNPV) infectadas a 25, 30, 35 °C e temperatura não controlada, relataram que o melhor resultado foi obtido na temperatura de 25 °C.

Uma característica relacionada à produção de poliedros virais é o peso das lagartas, pois as mais pesadas produzem mais OB por grama de lagarta (MASCARIN, 2009). Isso explica o fato de que, lagartas na idade de 8 dias, criadas na temperatura de 25 °C, a produção de OB/lag esteve entre as

melhores (Figura 2), pois este tratamento foi o que apresentou lagartas mais pesadas, seguido do tratamento 22 °C, lagartas de 10 dias (Tabela 3). Como consequência, um menor número de lagartas seria necessário para se produzir uma dose de produto formulado a ser aplicado por hectare. Ao utilizar lagartas inoculadas com o vírus, aos 4 dias de idade, criadas na temperaturas de 19 °C, seriam necessárias 9803 lagartas, enquanto que, lagartas de mesma idade, porém criadas na temperatura de 31 °C, seriam necessárias apenas 209 lagartas para obter uma dose de baculovirus formulado (Tabela 1). Dentre os tratamentos estudados, temperatura de 22 °C e lagartas de 10 dias é aquele em que são necessárias um menor número de lagartas para obter uma dose de baculovirus formulado (99 lagartas) (Tabela 1).

Em relação ao peso equivalente, ao avaliar a idade de 4 e 6 dias, observa-se que não houve diferença entre as temperaturas, com exceção da combinação entre as lagartas com 6 dias de idade e inoculadas com SfMNPV a 19 °C. Resultado este que pode ser explicado pelo fato de que lagartas criadas nessa temperatura apresentam uma menor massa quando comparadas a outros tratamentos. Nas temperaturas de 19, 22 e 25 °C, as idades não apresentaram diferença quanto ao parâmetro PE e lagartas de 7 dias foi a única idade que diferiu das demais na temperatura de 28 °C. À 31°C, as duas idades em que houve morte pelo vírus (4 e 6 dias), foram iguais quanto ao parâmetro avaliado (Figura 4).

Ao avaliar o parâmetro OB/100lag, na temperatura 19 °C todas as médias de idades foram significativamente iguais, já na temperatura de 22 °C, lagartas com de 8 e 10 dias de idade foram as que apresentaram as melhores médias. Na temperatura de 25 °C, lagartas de 7 e 8 dias de idade foram os que apresentaram os melhores resultados de produção viral e lagartas de 6 dias de idade foram as que apresentaram os melhores resultados quando inoculadas com SfMNPV a 28 °C. Lagartas criadas na temperatura de 31° C, as melhores médias foram para as idades de 4 e 6 dias, sendo que, nas idade de 7, 8 e 10 dias, não houve mortalidade, logo, não há resultados de produção viral (Figura 3). Visto que, o foco do trabalho é produção em larga escala de um produto formulado a base baculovirus, este parâmetro é muito importante, pois, além de levar em consideração a mortalidade ocasionada pelo vírus, considera também

a produção de OB lag. Utilizando como base a metodologia descrita por Subramanian et al. (2006), a fórmula utilizada foi:

$$\text{OB/larva} = \text{OB (ml)} \times \text{Volume da suspensão} / \text{Mortalidade}$$

$$\text{Rendimento OB / 100 larvas inoculadas} = \text{OB/larva} \times \text{Número de larvas mortas por 100 larvas inoculadas}$$

Na temperatura de 19 °C a mortalidade foi alta, porém, os resultados de OB lag foram baixos, isso explica o valor baixo de OB/100lag, enquanto que, em 22 °C, lagartas de 10 dias, em 25 °C, lagartas de 7 e 8 dias e 28 °C, lagartas de 6 dias os parâmetros mortalidade e OB/lag foram elevados, promovendo ótimos resultados de OB/100lag nesses tratamentos (Figura 3).

Na menor temperatura avaliada (19 °C), lagartas de 4 dias demoraram em média 16 dias para morrer, enquanto que, lagartas da mesma idade, criadas na maior temperatura estudada (31 °C), morreram com uma média de apenas 6 dias, sendo estes, os maiores e menores tempo de avaliação de mortalidade de acordo com os tratamentos estudados nesse trabalho. De acordo com os resultados encontrados, lagartas em instares mais avançados demoraram mais para morrer (Tabela 2). Isso pode ser explicado pelo mesmo fato já citado anteriormente, que as lagartas, quando atingem instar mais velhos, descamam as células epiteliais do intestino, fazendo com que o vírus seja descartado junto com essas células (ENGELHARD & VOLKMAN, 1995). Essa característica além de reduzir a mortalidade, provoca o alongamento do ciclo das lagartas. Quanto maior a temperatura, menor foi o tempo de avaliação até a morte ou até que as lagartas chegassem à fase pupa. Dessa forma, pode-se perceber o quanto a temperatura afeta no desenvolvimento da praga.

Para maximizar a produção viral, OB/100lag foi o parâmetro utilizado na escolha dos melhores tratamentos, pois é o resultado do percentual de mortalidade e da produção de OB/lag. Portanto, o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) pode ser multiplicado nas temperaturas de 22°C com lagartas inoculadas com idades de 8 e 10 dias, à 25 °C e lagartas inoculadas com 6, 7 e 8 dias, à 28 °C e lagartas de 4 e 6 dias e à 31 °C e lagartas de 4 e 6 dias para uma maior produção de OB/100lag inoculadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), pelas bolsas e auxílios concedidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEL-SATTAR, M. M., et al. Pyrethroids and biocides resistance in field strains of the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) during 2006-2008 cotton seasons. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n.6, p.305-308, 2012.

BARRERA, G., et al. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. **Biological Control**, v. 58, p113-120, 2011.

BEAS-CATENA, A. et al. Baculovirus biopesticides: an overview. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 24, n2, p362-373, 2014.

DUAN, L.; OTVOS, I. S. Influence of Larval Age and Virus Concentration on Mortality and Sublethal Effects of a Nucleopolyhedrovirus on the Western Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Environmental Entomology**, v. 30, n. 1, p.136 – 146, 2001.

ENGELHARD, E.K., VOLKMAN, L.E. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M Nuclear Polyhedrosis Virus. **Virology** **209**, p. 384-389, 1995.

GÓMEZ, J., et al. Aislamiento, Identificación y Caracterización de Nucleopoliedrovirus Nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. **Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín**. v. 63, p. 5511-5520, 2010.

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

HATEM, A. E. S.; ALDEBIS, H. K.; VARGAS-OSUNA, E. Effects of the *Spodoptera littoralis* granulovirus on the development and reproduction of cotton leafworm *S. littoralis*. **Biological Control**, v. 59, p.192-199, 2011.

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

INCEOGLU, A.B.; KAMITA, S. G.; HAMMOCK, B. D. Genetically Modified Baculoviruses: A Historical Overview and Future Outlook. **Advances in Virus Research**, v.68, p.323-360, 2006.

JOHNSON, D.W., et al. A temperature-dependent developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 40, p. 292-298, 1982.

LYNN, D. E. Effects of temperature on the susceptibility of insect cells to infection by baculoviruses. **Methods in Cell Science**, v. 23, p.221–225, 2002.

MASCARIN, G.M. **Controle microbiano da traça-da-batata *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae)**, com granulovirus. Dissertação de mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

MICHALSKY, R., et al. Effects of temperature and shear force on infectivity of the baculovirus *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*. **Journal of Virological Methods**, v. 153, p. 90-96, 2008.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. **Annual Review Entomology**, v. 44, p. 257-28, 1999.

PAIVA, C. E. C. **Multiplicação de *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, julho de 2013.

PLYMALE, R.; et al. Plant-mediated alteration of the peritrophic matrix and baculovirus infection in lepidopteran larvae. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 54, p. 737-749, 2008.

RAMOS, P. S.; FERREIRA, D. F. Agrupamento de médias via bootstrap de populações normais e não normais. **Revista Ceres**, v. 56, n. 2, p. 140-149, 2009.

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

SHAO-HUA, C., HONG-LIANG, S., ZUO-HU, L. Effect of temperature oscillation on insect cell growth and baculovirus replication. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2237-2239, 1998.

SPORLEDER, M., et al. Effects of temperature on the activity and kinetics of the granulovirus infecting the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). **Biological Control**, p.286-295, 2008.

SUBRAMANIAN, S., et al. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v. 37, p. 367-374, 2006.

VALICENTE, F. H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. **Circular Técnico 105**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, Dezembro, 2008.

VALICENTE, F.H., BARRETO, M.R. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:

Noctuidae), na região de Cascavel, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 2, p. 333- 33, 1999.

VAN BEEK, N., HUGHES, P.R., WOOD, H.A. Effects of incubation temperature on the dose survival time relationship of *Trichoplusia ni* larvae infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, p.185-190, 2000.

VILLAMIZAR, L. F. Virus entomopatógenos y cambio climático. 127-143p. En: Ed: Sociedad Colombiana De Entomologia Socolen. **Memorias Cambio Climático: Retos Y Oportunidades Para La Entomologia**. 38 Congreso Socolen. Colombia, 2011.

WILLIAMS, T., et al. Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. **Biological Control**, v. 14, p. 67-75, 1999.

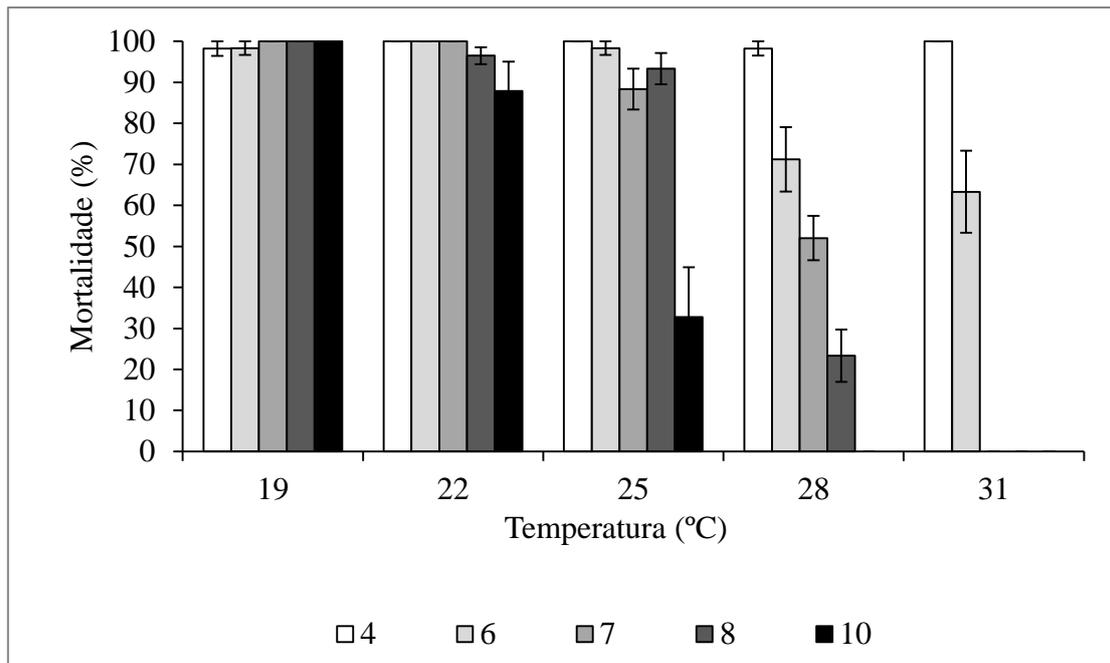


Figura 1: Mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), na concentração de $1,00 \times 10^8$ OB/mL em cinco idades (4, 6, 7, 8 e 10 dias) e cinco temperaturas de inoculação (19, 22, 25, 28 e 31°C).

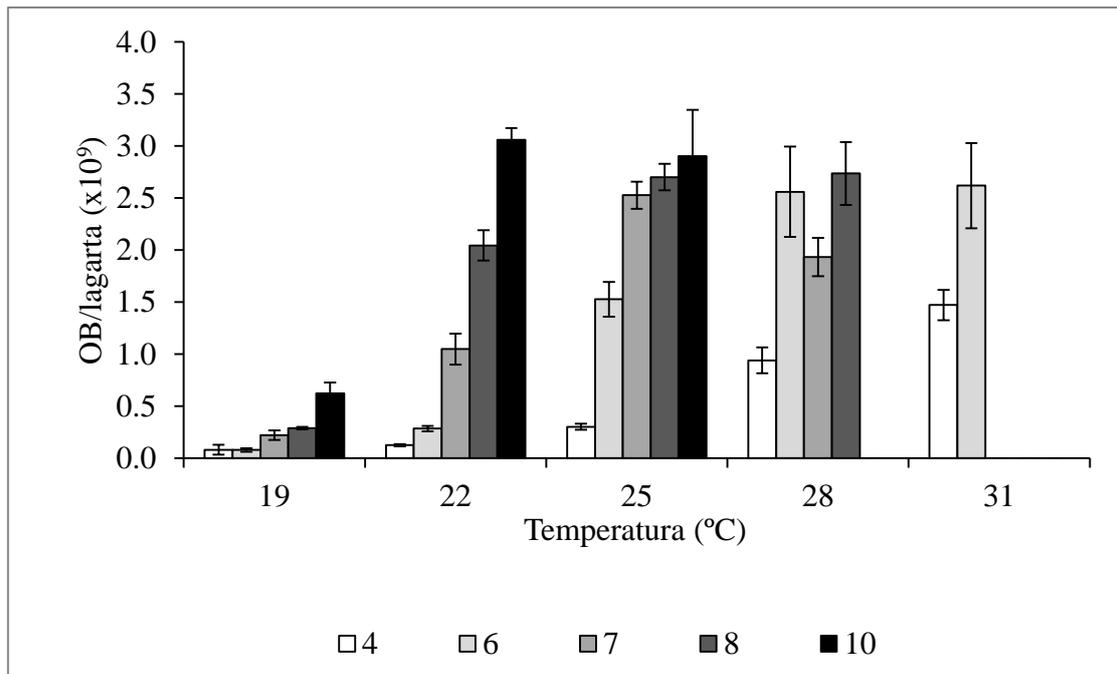


Figura 2: Total de poliedros/lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), na concentração de $1,00 \times 10^8$ OB/mL em cinco idades (4, 6, 7, 8 e 10 dias) e cinco temperaturas de inoculação (19, 22, 25, 28 e 31°C).

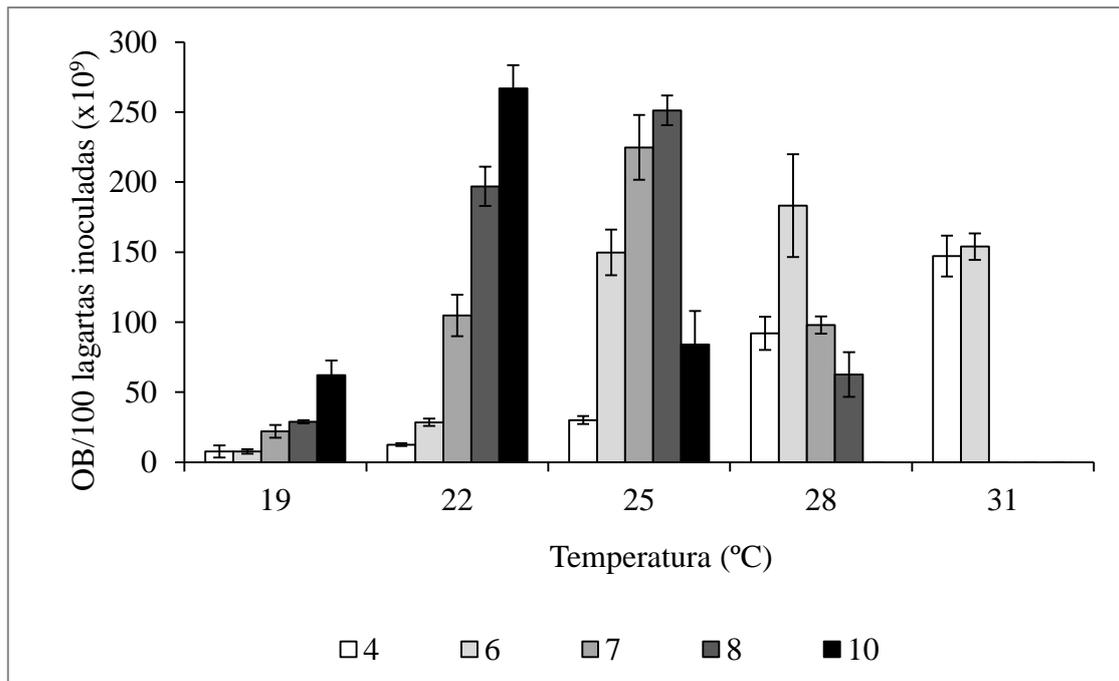


Figura 3: Total de poliedros/100lagartas inoculadas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), na concentração de $1,00 \times 10^8$ OB/mL em cinco idades (4, 6, 7, 8 e 10 dias) e cinco temperaturas de inoculação (19, 22, 25, 28 e 31°C).

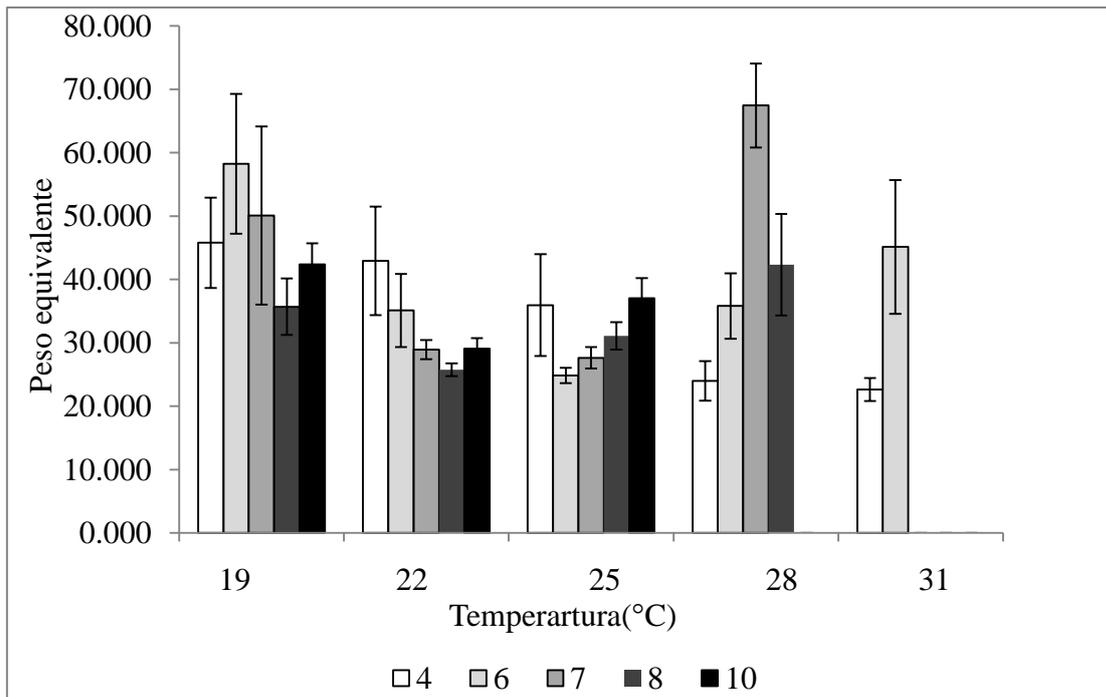


Figura 4: Peso equivalente* de lagartas de *Spodoptera frugiperda* infectadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), na concentração de $1,00 \times 10^8$ OB/mL em cinco idades (4, 6, 7, 8 e 10 dias) e cinco temperaturas de inoculação (19, 22, 25, 28 e 31°C).

*Peso equivalente é a massa de lagartas necessárias para obtenção de uma dose de baculovirus formulado, sendo que, cada dose corresponde a 50 g, na concentração de 3×10^{11} OB/dose.

Tabela 1. Lagarta equivalente* por hectare, infectadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), na concentração de $1,00 \times 10^8$ OB/mL, em cinco idades (dias) e cinco temperaturas de inoculação (°C)

| Idade (Dias) | Temperatura (°C) | | | | |
|--------------|------------------|------|------|-----|-----|
| | 19 | 22 | 25 | 28 | 31 |
| 4 | 9804 | 2455 | 1027 | 338 | 209 |
| 6 | 4345 | 1081 | 206 | 128 | 127 |
| 7 | 1691 | 311 | 120 | 160 | 0 |
| 8 | 1043 | 149 | 112 | 114 | 0 |
| 10 | 523 | 99 | 110 | 0 | 0 |

*Lagarta equivalente corresponde ao número de lagartas de *Spodoptera frugiperda* necessárias para obtenção de uma dose de baculovirus formulado, sendo que, sendo que, cada dose corresponde à 50 g, na concentração de 3×10^{11} OB/dose.

Tabela 2. Tempo necessário (dias) para que ocorra a morte de lagartas de *Spodoptera frugiperda* após inoculação do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), na concentração de $1,00 \times 10^8$ OB/mL, em cinco idades (dias) e cinco temperaturas de inoculação (°C)

| Idade (Dias) | Temperatura (°C) | | | | |
|--------------|------------------|----------|----------|---------|---------|
| | 19 | 22 | 25 | 28 | 31 |
| 4 | 12.5 aB | 9.75 bB | 7.75 Cc | 6.25 cA | 6.25 cB |
| 6 | 11.25 aB | 9.75 Ab | 11.25 Ab | 8.75 aA | 9.25 aA |
| 7 | 15.5 aA | 10.75 bB | 11.5 Bb | 8.5 cA | 0 dC |
| 8 | 13.75 aA | 14 Aa | 10.5 bB | 8 Ba | 0 cC |
| 10 | 16 aA | 14 Aa | 13.5 Aa | 0 Bb | 0 bC |

Letras maiúsculas: Comparação da mesma idade dentro de cada nível de temperatura.

Letras minúsculas: Comparação das idades dentro de uma mesma temperatura.

*Médias seguidas por uma mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Peso médio (g) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* após inoculação do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), na concentração de $1,00 \times 10^8$ OB/mL, em cinco idades (dias) e cinco temperaturas de inoculação (°C)

| Temperatura (°C) | Idade (Dias) | | | | |
|------------------|--------------|------|------|------|------|
| | 4 | 6 | 7 | 8 | 10 |
| 19 | 0.12 | 0.23 | 0.47 | 0.51 | 1.25 |
| 22 | 0.27 | 0.48 | 1.5 | 2.49 | 3.82 |
| 25 | 0.51 | 1.87 | 3.08 | 3.86 | 1.52 |
| 28 | 1.06 | 3.17 | 3.15 | 1.19 | |
| 31 | 1.64 | 3.11 | | | |

Tabela 4. Tamanho médio (cm) de lagartas *Spodoptera frugiperda* sadias criadas em cinco idades (dias) e cinco temperaturas (°C)

| Temperatura (°C) | Idade (Dias) | | | | |
|------------------|--------------|------|------|------|------|
| | 4 | 6 | 7 | 8 | 10 |
| 19 | 0.3 | 0.44 | 0.55 | 0.55 | 0.8 |
| 22 | 0.41 | 0.59 | 0.8 | 0.97 | 1.15 |
| 25 | 0.54 | 0.91 | 1.02 | 1.39 | 1.48 |
| 28 | 0.7 | 1 | 1.32 | 1.93 | 2.22 |
| 31 | 0.96 | 1.72 | 2.03 | 2.2 | 2.68 |

CAPITULO III

Como minimizar o efeito do comportamento canibal de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) no processo de multiplicação *in vivo* de SfMNPV?

RESUMO– O canibalismo que ocorre em lagartas de *Spodoptera frugiperda* dificulta a produção em larga escala de *Baculovirus spodoptera*. O objetivo foi avaliar o comportamento canibal de *S. frugiperda* no processo de multiplicação do vírus. Lagartas com 4, 8 e 10 dias de idade, criadas nas temperaturas de 31, 25 e 28°C, respectivamente, foram inoculadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), por meio da alimentação de folhas de mamona previamente pulverizadas com uma suspensão viral ($1,00 \times 10^8$ OB/mL). Os pedaços de folha de mamona foram colocados em recipientes plásticos (tipo “gerbox”), juntamente com 5, 10, 25 e 50 lagartas, por recipiente, com 4 repetições cada. Após o período de incubação (48 horas) foi contabilizado o canibalismo e, em seguida, as lagartas foram transferidas para recipientes contendo pedaços de dieta artificial. As avaliações foram feitas de cinco em cinco dias, até a morte das lagartas ou se tornarem pupa. Os parâmetros avaliados foram mortalidade e canibalismo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias à análise de regressão. O canibalismo aumentou linearmente com o aumento da densidade populacional, porém, a densidade populacional não afetou o comportamento canibal quando as lagartas foram criadas a 31°C e inoculadas aos 4 dias de idade. Portanto, a condição de criação ideal que minimizaria o efeito do canibalismo em lagartas de *S. frugiperda* é a de 31 °C e lagartas de 4 dias.

Palavras-chave: Ecologia comportamental, comportamento, densidade populacional

ABSTRACT- The cannibalism that occurs in *Spodoptera frugiperda* armyworms is a factor that hampers the large-scale *baculoviruses spodoptera* production. The objective of this project was evaluate the cannibalistic behavior of *S. frugiperda* in order to produce *baculoviruses spodoptera*. *S. frugiperda* armyworms being 4, 8 and 10 days old, reared at the temperatures 31, 25 and 28 °C, respectively, were inoculated with SfMNPV isolate 6 by means of feeding from previously sprayed castor leaves with a viral suspension containing approximately 1×10^8 OB/ml, which were offered *ad libitum*. The castor leaves pieces containing the viral suspension was placed in plastic containers (such as "gerbox") containing in each contained those population densities: 5, 10, 25 and 50 armyworms, depending on the treatment, with 4 repeats each, feeding from the leaves for 48 hours. After this time cannibalism was recorded, and then, for each treatment and repetition, the armyworms were transferred to containers with the same dimensions as the previous containers, containing chunks of artificial diet. The evaluations were made every five, until death or until the armyworms become pupae. The parameteres evaluated were mortality and cannibalism. The data for each of the parameters set will be submitted to variance analysis (ANOVA) and if required, the average will be submitted to regression analysis. The lowest cannibalism occurred with 5 armyworms, being statistically equal in all treatments, whereas the highest was with 50 armyworms in treatments at 22 and 25 °C, the latter being statistically similar (63.5 and 62, 5%, respectively), whereas this same density, cannibalism at 31°C temperature was only 23%, statistically differing from the others. This demonstrates that it is feasible, at this temperature, create a lot of armyworms in a single container (50 armyworms), and reduce required manpower required to individualize those, there will be less need for physical space for a biofactory. Therefore, the ideal condition for breeding that would minimize the effect of cannibalism in *S. frugiperda* armyworms is at 31°C with worms being 4 days old.

Keywords: Behavioral ecology , behavior, population density

INTRODUÇÃO

O canibalismo que ocorre em lagartas de *Spodoptera frugiperda* é um fator que dificulta a produção em larga escala de *Baculovirus spodoptera* (ANDREAZZA et al., 2007). Como decorrência desse comportamento é necessário individualizar os insetos para produção de SfMNPV, que é um trabalho intensivo, aumenta o risco de contaminação e os custos do bioinseticida (VALICENTE et al., 2013).

Canibalismo é bastante comum entre larvas de lepidópteros (PIERCE 1995; REED, et al., 1996) e podem provocar impactos na dinâmica das populações (ELGAR & CRESPI 1992). Mesmo quando o alimento alternativo não é limitado, a mortalidade pode chegar à 60%, situação frequentemente observada sob criação em laboratório. (CHAPMAN et al., 1999), além disso, pode reduzir o número larvas infectadas por vírus, bem como a quantidade de vírus produzido (MOSCARDI et al., 1997).

Algumas pesquisas relacionam a suscetibilidade de alguns lepidópteros a SfMNPV com a planta hospedeira e também mediante a transmissão horizontal do vírus por canibalismo (CHAPMAN et al., 1999; ALI et al., 2002). Lagartas da espécie *S. frugiperda* alimentadas com folhas de mamona e utilizadas como substrato alimentar para a inoculação de SfMNPV apresentaram menor taxa de canibalismo em relação a lagartas que se alimentaram de folhas de milho utilizadas para a mesma finalidade (ANDREAZZA et al., 2007). De acordo com Nalim (1991), ao estudar populações de *S. frugiperda* em duas dietas artificiais concluiu que ocorre canibalismo em lagartas criadas em dietas naturais e artificiais e o comportamento é inversamente correlacionado com a qualidade nutricional do alimento.

A densidade de lagartas, idade, temperatura de criação, substrato, entre outros, são fatores que favorecem o canibalismo (NALIM, 1991; ANDREAZZA et al., 2007). ELVIRA et al. (2010) , observaram que, o comportamento canibal de lagartas de *S. frugiperda* aumenta com o aumento da densidade. A fonte de alimentação também interfere no canibalismo. Valicente et al., (2013), verificaram que, o canibalismo foi maior quando as lagartas foram alimentadas com folha de milho em comparação com folha de mamona.

Assim, é necessário entender os fatores associados ao canibalismo, durante o processo produtivo de SfMNPV, tais como: o efeito da temperatura de criação do hospedeiro na produção de poliedros virais; a idade do hospedeiro para inoculação viral e a densidade ideal do hospedeiro visando à otimização na produção do *Baculovirus spodoptera*.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo determinar a densidade ideal para criação de *S. frugiperda* submetidas a três condições de multiplicação do vírus (três temperaturas de criação do hospedeiro e três idades larvais para inoculação de SfMNPV), baseando-se nos aspectos relacionados ao comportamento de canibalismo e mortalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES) em Alegre, Espírito Santo, Brasil.

Obtenção e multiplicação dos insetos. A criação massal de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de pupas provenientes do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). Logo, para o estabelecimento da criação massal no Setor de Entomologia do NUDEMAFI, as pupas foram mantidas em sala climatizada (Temperatura: 26 ± 1 °C; Umidade relativa: 60% e; Fotofase: 12 horas) até a emergência dos adultos. Posteriormente, os adultos foram transferidos para gaiolas de criação (20 cm de diâmetro x 25 cm de altura) revestidas internamente com folha de papel branco, com as extremidades fechadas com tecido do tipo “voile”, sendo oferecida diariamente uma solução de mel a 10% como substrato alimentar. Os ovos foram coletados a cada dois dias e acondicionados em recipientes plásticos e, após a eclosão, as lagartas foram transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas finas para copos de acrílico (40 mL) contendo dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja, de acordo Valicente e Barreto (2003).

Obtenção e produção de SfMNPV. O isolado utilizado neste ensaio é proveniente do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle

Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG), o qual foi selecionado previamente por não provocar o rompimento imediato do tegumento do inseto após a morte (VALICENTE & BARRETO, 1999). O isolado viral foi multiplicado para a obtenção de material a ser utilizado nos experimentos.

Densidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e sua relação com o canibalismo na produção in vivo de SfMNPV. Lagartas de *S. frugiperda*, com 4, 8 e 10 dias de idade, criadas nas temperaturas de 31, 25 e 22°C, respectivamente, foram inoculadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), por meio da alimentação de folhas de mamona previamente pulverizadas com uma suspensão viral contendo aproximadamente $1,00 \times 10^8$ OB/mL, que foram ofertadas *ad libitum*. Os pedaços de folha de mamona contendo a suspensão viral foram colocados em recipientes plásticos (gerbox quadrado, volume de 250 ml, medida: 11 x 11 x 3,5 cm), onde foram colocadas 5, 10, 25 e 50 lagartas, por recipiente, fazendo-se 4 repetições para cada tratamento. Em todas as suspensões virais, além da testemunha, que recebeu apenas água destilada esterelizada, foi adicionado o surfactante não-iônico Tween 80[®] (Merck Schuchardt, Germany) (polioxietileno-sorbitol, tendo a função de agir como dispersante). A seleção das idades de inoculação do vírus e das temperaturas de criação do hospedeiro foram baseadas nos resultados obtidos previamente (Capítulo 2). Foi permitido a alimentação das lagartas por 48 horas. Decorrido este tempo foi contabilizado o canibalismo e, em seguida, para cada tratamento e repetição, as lagartas foram transferidas para recipientes com as mesmas dimensões dos recipientes anteriores, contendo pedaços de dieta artificial, tendo sido preservadas as respectivas densidades populacionais.

A partir daí as avaliações foram feitas a cada cinco dias até a morte das lagartas ou até se tornarem pupa e os parâmetros avaliados foram mortalidade (%) e taxa de canibalismo (%). A mortalidade devido à ingestão do vírus foi quantificada pela fórmula: Mortalidade (%) = número de lagartas mortas com sintomas / (número de lagartas mortas com sintomas + número de pupas). Somente foram computadas para efeito do cálculo da mortalidade as lagartas que morreram com sintomas típicos de infecção por vírus.

Análise dos dados. O modelo experimental adotado foi o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3 x 4), 3 condições de

criação/inoculação (que consistiu em 3 idades de inoculação do vírus em lagartas criadas em 3 respectivas temperaturas), e 4 densidades populacionais, perfazendo assim 12 (doze) tratamentos com 4 (quatro) repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram submetidas à análise de regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento canibal foi mais evidente na densidade de 50 lagartas, nas seguintes condições de criação: temperaturas de 22 e 25 °C, lagartas de 10 e 8 dias de idade, respectivamente, não havendo diferença significativa entre eles, com percentual de 63,5 e 62,5% de canibalismo, respectivamente. Por outro lado, nesta mesma densidade, o canibalismo na temperatura de 31 °C foi de apenas 23%, diferindo-se dos demais. Isso demonstra que é viável, nesta temperatura criar uma grande quantidade de lagartas em um único recipiente (gerbox) além de diminuir a mão-de-obra necessária para individualizar, haverá a necessidade de menor espaço físico para uma biofábrica e otimização do trabalho. O menor canibalismo ocorreu na densidade de 5 lagartas, sendo significativamente igual em todos os tratamentos estudados. Para a densidade de 10 lagartas, não houve diferença significativa nos tratamentos das temperaturas de 22 e 25 °C, diferindo-se os tratamentos 22 e 31 °C (Tabela 1).

Não houve diferença significativa no canibalismo na densidade de 25 lagartas (Tabela 1), porém, ocorreu muita contaminação nessa densidade bem como na de 50 lagartas. Esse fato pode estar associado ao metabolismo das lagartas nessa temperatura, onde as mesmas se alimentam mais e conseqüentemente a quantidade de excrementos também é maior. Na temperatura de 31 °C, as avaliações se encerraram mais cedo, pois o tempo até que ocorra a mortalidade das lagartas foi muito menor (cerca de 7 dias após a inoculação), logo o progresso da infecção se dá de uma forma mais acelerada, debilitando a lagarta mais rápido. Conseqüentemente a lagarta se alimenta menos, o que reduz a quantidade de excrementos. Além disso, esse período mais curto de avaliação faz com que não haja tempo de ocorrer contaminação.

Ao comparar a incidência de canibalismo em *S. exigua*, do primeiro e sexto instares, criadas em duas densidade (2 e 10 lagartas), ELVIRA et al. (2010), observaram que, este comportamento é maior nos primeiros instares e aumenta com o aumento da densidade, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, visto que, na maior densidade (50 lagartas), em duas das temperaturas (22 e 25°C) foi onde ocorreu o maior canibalismo.

Diversos estudos demonstraram a relação entre a incidência de canibalismo e o grau de aglomeração (GOULSON & CORY, 1995; CHAPMAN et al., 1999; VALICENTE et al., 2013). Segundo Vasconcelos (1996), a maior incidência de canibalismo ocorre quando os hospedeiros estão expostos a estresse por altas densidades (aglomeração) ou nutricional e este comportamento pode ter um efeito sobre a transmissão de patógenos (ELVIRA et al., 2010).

O aumento da taxa de canibalismo foi diretamente proporcional ao aumento da densidade populacional de lagartas por recipiente, quando as lagartas foram criadas a 22 °C e inoculadas com o vírus aos 10 dias de idade e criadas a 25°C e inoculadas aos oito dias e atingiram 63,5 e 62,5%, respectivamente, na densidade populacional de 50 lagartas, valores estes, equivalentes entre si. A taxa de canibalismo permaneceu constante quando as lagartas foram criadas a 31 °C e inoculadas aos 4 dias, média de 23%, que foi inferior às médias dos outros dois tratamentos submetidos à densidade populacional de 50 lagartas (Figura 1).

A mortalidade das lagartas provocadas por vírus mostrou-se inversamente proporcional ao aumento da densidade de lagartas. Nas densidades populacionais de 5, 10, 25 e 50, as mortalidades foram: 81,6; 63,1; 55 e 49,5%, respectivamente (Figura 2).

A mortalidade por vírus foi maior quando a inoculação do vírus foi feita em lagartas com 4 dias de idade e a 31°C (75,25%), em relação a quando foi feita aos 10 e 8 dias de idade das e a 22 °C (51%) e 25 °C (60,75%), respectivamente (Figura 3).

Pode-se aumentar a densidade populacional de lagartas de *S. frugiperda* infectadas com SfMNPV inoculando-se o vírus em lagartas criadas a 31 °C e com idade de 4 dias.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), pelas bolsas e auxílios concedidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M.I. et al. Influence of the host plant on occluded virus production and lethal infectivity of a baculovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, p.158–165, 2002.

ANDREAZZA, R.; et al. O substrato de inoculação de *Baculovirus spodoptera* diminui o canibalismo em *Spodoptera frugiperda*? **X Simpósio de Controle Biológico** - 30 de junho a 04 de julho de 2007, Brasília – DF.

CHAPMAN, J.W. et al. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. **Ecological Entomology**, v. 24, p. 268–275, 1999.

ELGAR, M. A.; CRESPI, B. J. Cannibalism Ecology and evolution among diverse taxa. **Oxford University Press**, Oxford, v. 361 p., ISBN: 9-854-4650-4, 1992.

ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: Effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) *nucleopolyhedrovirus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 3), p. 577-582, 2010.

GOULSON, D.; CORY, J.S. Responses of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) to crowding: interactions with disease resistance, color phase and growth. **Oecol**, v.104, p. 416–423, 1995.

MOSCARDI, F., LEITE, L.G.; ZAMATARO, C.E. Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): effect of virus dosage, host density and age. **Anais da Sociedade de Entomologia Brasileira**, v. 26, p. 121–132, 1997.

NALIM, D. M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, Bras., 1991.

PIERCE, N. E. Predatory and parasitic Lepidoptera: carnivores living on plants. **The Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 49, p. 412–453, 1995.

REED, D. J.; BEGON, M.; THOMPSON, D. J. Differential cannibalism and population-dynamics in a host-parasitoid system. **Oecol**, v. 105, p. 189– 193, 1996.

VALICENTE, F. H. Cannibalism and Virus Production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Fed with Two Leaf Substrates Inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**. v. 42, p. 191–199, 2013.

VALICENTE, F.H., BARRETO, M.R. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 2, p. 333- 33, 1999.

Tabela 1- Taxa de canibalismo (%) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* inoculadas com SfMNPV (Isolado 6), na concentração 1×10^8 , submetidos em temperaturas (°C) e densidades diferentes (número de lagartas)

| Condições de criação | Densidades | | | |
|-----------------------------|-------------------|--------|------|--------|
| | 5 | 10 | 25 | 50 |
| 22 °C- 10 DIAS | 15 a | 52,5 a | 51 a | 63,5 a |
| 25 °C- 8 DIAS | 5 a | 30 ab | 45 a | 62,5 a |
| 31 °C- 4 DIAS | 25 a | 20 b | 28 a | 23 b |

*Médias seguidas por uma mesma letra na coluna, não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

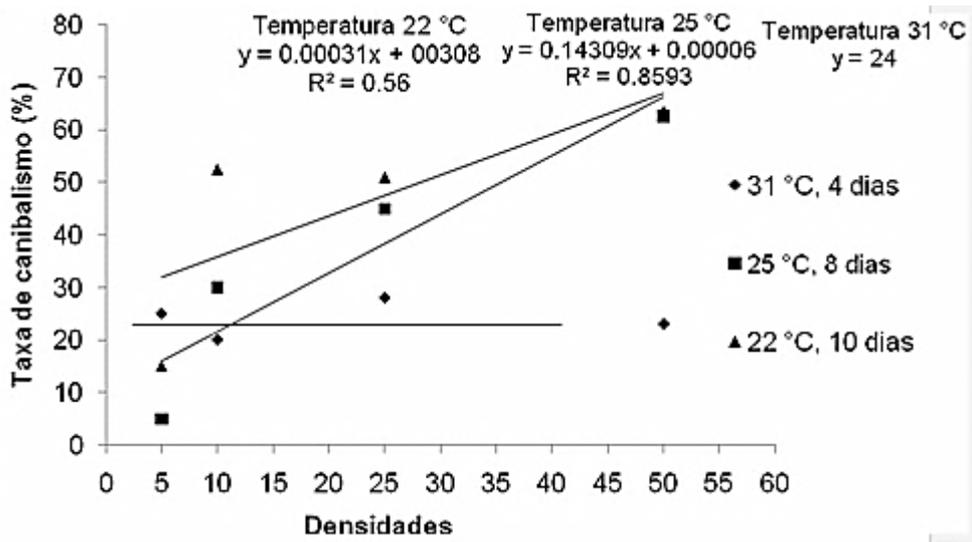


Figura 1: Taxa de canibalismo (%) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* inoculadas com SfMNPV (Isolado 6), na concentração 1×10^8 , submetidos em temperaturas (°C) e densidades diferentes (número de lagartas).

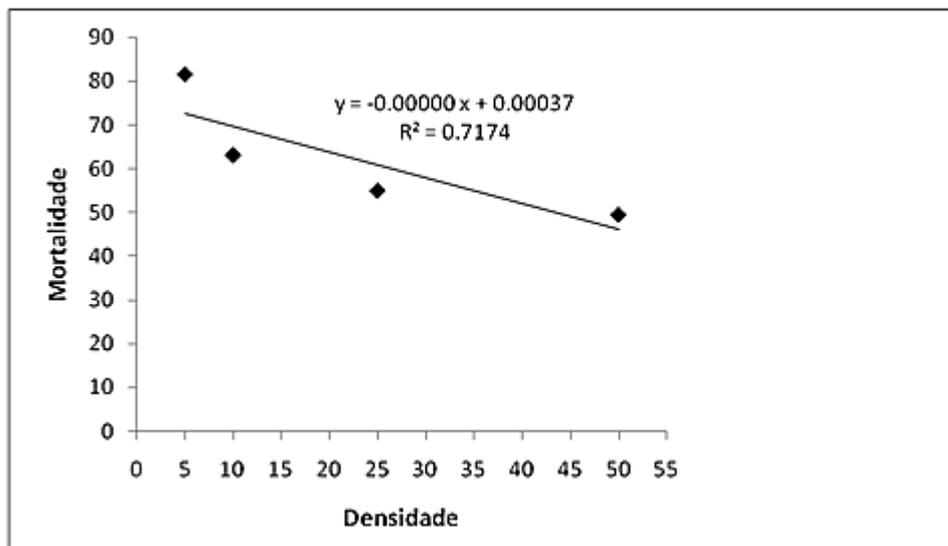


Figura 2: Mortalidade (%) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* inoculadas com SfMNPV (Isolado 6), na concentração 1×10^8 , em relação as densidades (5, 10, 25 e 50 lagartas/recipiente).

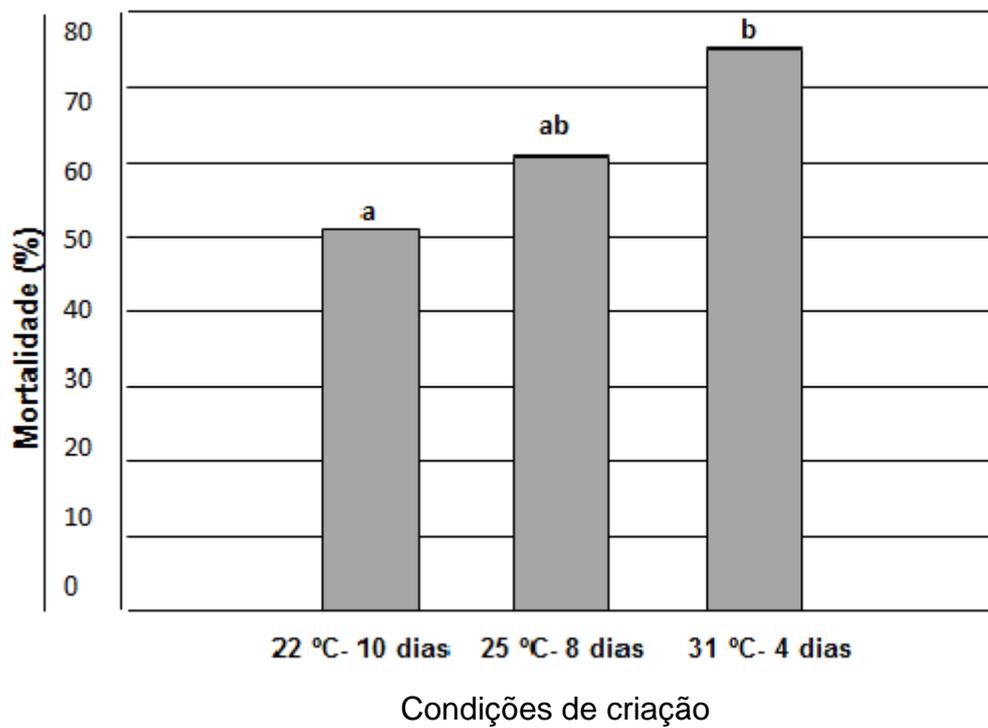


Figura 3: Mortalidade média de lagartas de *Spodoptera frugiperda* inoculadas com SfMNPV (Isolado 6), na concentração 1×10^8 , submetidos em temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) e densidades diferentes (número de lagartas).

CONCLUSÃO GERAL

A produção dos poliedros virais do isolado 6 de SfMNPV variou entre as diferentes combinações de temperatura e idade avaliadas. Dessa forma, a seleção de uma combinação deverá considerar as condições térmicas para a multiplicação dos insetos e, conseqüentemente, para a produção de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda*. Além dos parâmetros biológicos e comportamentais do hospedeiro, é pertinente avaliar os custos operacionais para determinar as condições ideais, seja para manter a temperatura em uma biofábrica, seja para escalonar a produção *in vivo* de SfMNPV.

Portanto é possível concluir, com base nos resultados de produção de poliedros/lagartas e na taxa de canibalismo, que o binômio adequado de idade e temperatura para inoculação das lagartas de *S. frugiperda* com SfMNPV é de 4 dias de idade a 31 °C.