

VIRULÊNCIA PARA LAGARTAS DE *Chrysodeixis includens* (WALKER) E
Rachiplusia nu (GUENÉE) DO VÍRUS DE *Autographa californica*
(SPEYER) APÓS PASSAGEM SERIADA EM *C. includens*
(LEP.: NOCTUIDAE)¹

Lauro Morales ² e Flavio Moscardi ³

ABSTRACT

Virulence of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus to *Chrysodeixis includens* (Walker) and *Rachiplusia nu* (Guenée), after its sequential passage through *C. includens* (Lep.: Noctuidae).

The virulence of isolates of an *A. californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), obtained through five sequential passage by *C. includens*, was evaluated on *C. includens* and *R. nu* under laboratory conditions. The results showed that the AcNPV was as infective to *C. includens* as the NPV of this species, when passed once through the insect. This isolate was also highly virulent to *R. nu*, indicating that its utilization as a viral insecticide could result in the control of both pest species, which occur simultaneously in soybean in Southern Brazil. The lethal median concentration (LC₅₀) of the *C. includens* NPV to this species was 1,124 polyhedron inclusion bodies (PIB)/ml of diet compared to a LC₅₀ of 1,120 PIB/ ml of diet for the AcNPV isolate resulted from one passage through *C. includens*. To *R. nu* this AcNPV isolate resulted in a LC₅₀ of 1,198 PIB/ ml of diet. The serial passage of the AcNPV through *C. includens* selected variants with increased virulence to this species; however, the isolates obtained in the third and fifth passages through *C. includens* became less infective to *R. nu*. KEYWORDS: NPV, sequential passages, *A. californica*, *C. includens*, *R. nu*.

Recebido em 10/12/91

¹ Excerto da dissertação de Mestrado do primeiro autor. (Entomologia Agrícola) - UNESP - JABOTICABAL.

² EMATER - PR, Caixa Postal 2312, 86001-970 Londrina PR

³ EMBRAPA - CNPSo, Caixa Postal 1061, 86001-970 Londrina PR

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar, em laboratório, a virulência em *C. includens* e *R. nu* (Guenée) de isolados do vírus de poliedrose nuclear (VPN) de *A. californica*, obtidos através de cinco passagens seriadas por *C. includens*. Os resultados demonstraram que o vírus de poliedrose nuclear de *A. californica* (VPNac), quando passado apenas uma vez por *C. includens*, foi tão infectivo a este inseto quando o VPN da própria espécie. Os dados demonstraram, ainda, que esse isolado foi igualmente virulento a *R. nu*, o que possibilitaria sua utilização como inseticida biológico para o controle das duas espécies. A concentração letal média (CL₅₀) do VPN de *C. includens*, para esta espécie, foi de 1124 corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml de dieta e a CL₅₀ do VPN de *A. californica* passado uma vez por *C. includens*, para esta mesma espécie, foi de 1120 CPI/ml de dieta. Para *R. nu*, o isolado obtido na primeira passagem por *C. includens* apresentou uma CL₅₀ de 1198 CPI/ml de dieta. A passagem seriada do VPNac por *C. includens* selecionou variantes mais virulentos a esta espécie; entretanto, os isolados obtidos na terceira e quinta passagem tornaram-se menos infectivos a *R. nu*. PALAVRAS-CHAVE: VPN, passagem seriada, *A. californica*, *C. includens*, *R. nu*.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja, especialmente no sul do Brasil, é atacada por *Pseudoplusia includens* [*C. includens*] (Walker, 1857) e *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae), dois desfolhadores da Subfamília Plusiinae (LINK & COSTA, 1986 e MORAES et al., 1989), controlados principalmente por inseticidas químicos de largo espectro. Estas duas espécies, além da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818, (Lep.: Noctuidae), vem se constituindo nos principais insetos desfolhadores da cultura.

A utilização de entomopatógenos como a alternativa de controle de insetos se constitui numa tática importante de programas Manejo Integrado de Pragas (MIP) (MOSCARDI, 1983). Dentre os patógenos, os vírus são aqueles que têm apresentado maior potencial de utilização, apresentando eficiência, especificidade e segurança no seu manuseio (SMITH, 1976; ALVES 1986; YOUNG, 1989).

A infecção cruzada pode aumentar a possibilidade do uso de vírus como inseticida biológico (VAIL et al., 1973), tendo sido confirmada para o vírus de poliedrose nuclear (VPN) de *Autographa californica* (Speyer) (Lep.: Noctuidae) (VAIL et al., 1971). GRÖNER (1986) reporta esse VPN como capaz de infectar 34 espécies da Ordem Lepidoptera, o que poderia permitir sua utilização para o controle de mais de uma espécie. Por outro lado, a passagem seriada de um vírus por um determinado hospedeiro alternativo pode conduzir a isolados com maior virulência a

este hospedeiro (SMIRNOFF, 1963 e TOMPKINS et al., 1988).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, em laboratório, a virulência de isolados do vírus de poliedrose nuclear de *A. californica* (VPNac), obtidos por passagem seriada em *C. includens*, para *C. includens* e *R. nu*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho, efetuado nos laboratório de patologia de insetos do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo) - EMBRAPA, Londrina, PR, utilizou insetos obtidos de colônias ali estabelecidas. Os VPNS de *C. includens* e *A. californica* utilizados são originariamente oriundos, respectivamente, da Universidade da Flórida e da Universidade do Texas, mantidos na coleção de entomopatógenos do CNPSo.

A suspensão original do vírus de *C. includens* foi inicialmente diluída em água esterilizada, obtendo-se uma concentração de $2,5 \times 10^6$ corpos poliédricos de inclusão (CPI) por ml, que foi pipetada sobre pequenos pedaços de dieta de GREENE et al. (1976), omitindo-se o formal (VAIL et al., 1968). A dieta contaminada foi colocada em placas de petri com papel-filtro no fundo e, após a secagem da superfície, foram colocadas 10 lagartas de 3ª e 4ª instares de *C. includens* por placa, sendo mantidas em estufas incubadoras a 25°C, umidade relativa de 70% e fotofase de 14 horas. Após o sexto dia, as lagartas com sintomas de doença foram separadas e mantidas à temperatura ambiente até a morte, sendo então maceradas em água estéril. A mistura resultante foi coada e centrifugada a 1.000 rpm (rotor modelo ss-34) durante dois minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 8.000 rpm, por 20 minutos, sendo o "pellet" diluído em água estéril, homogenizado e armazenado em congelador, obtendo-se, assim a suspensão estoque. Para o VPN de *A. californica*, provocou-se a infecção em lagartas do 2ª instar de *C. includens* com uma concentração de 1×10^7 CPI/ml, seguindo-se os mesmos procedimentos descritos para o VPN de *C. includens*.

O VPN de *A. californica*, multiplicado apenas uma vez em *C. includens*, foi denominado de *A. californica* F₁C. A passagem posterior de F₁C em lagartas de *C. includens* resultou no isolado F₂C e, assim, sucessivamente.

Os bioensaios foram realizados utilizando-se método de incorporação do vírus à dieta (VAIL et al., 1984 e TOMPKINS et al., 1988). Para a incorporação, 180 ml de dieta foram resfriados até 50°C, procedendo-se, em seguida, a mistura de 20 ml da suspensão viral, previamente calculada para se obter a concentração desejada. As concentrações utilizadas se encontram no Quadro 1. Após homogeneização, 10ml do alimento contaminados foram colocados em copos plásticos de 45 ml, sendo esta quantidade de dieta suficiente para alimentar as lagartas-testemunha até o estágio de prepupa. Em cada recipiente foram colocadas duas lagartas em final de 2ª instar, que foram manti-

das nas condições de temperatura, umidade e fotofase já descritas anteriormente. As avaliações foram feitas diariamente, a partir do quinto dia, até a fase de prepupa observada nas lagartas-testemunha. A determinação da concentração letal média (CL₅₀), para cada isolado, foi feita através de análise de Probits, sendo a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mortalidade de *C. includens*, provocada pelo seu VPN, ficou entre 12,5% e 92,8% para concentrações respectivas de 10² e 10⁶ corpos poliédricos de inclusão (CPI) por ml de dieta, enquanto o VPN de *A. californica*, passado apenas uma vez por esta espécie, provocou mortalidade entre 48,4% e 95,3% para concentrações de 10³ a 10⁷ CPI/ml de dieta (Quadro 2).

A concentração letal média (CL₅₀) do VPN de *C. includens* para esta espécie, calculada pelo método de Probits, foi de 1124 CPI/ml de dieta de CL₅₀ do VPN de *A. californica* F₁C foi de 1120 CPI/ml de dieta, portanto, similar àquela obtida com o VPN da própria espécie (quadro 3). VAIL *et al.* (1971) confirmaram a infecção cruzada do VPN de *A. californica* e do VPN de *Trichoplusia ni* (Lep.: Noctuidae), sendo ambos os vírus reciprocamente infectivos ao hospedeiro original e alternativo. No presente trabalho, a passagem seriada, conduziu a isolados do VPN de *A. californica* com maior virulência a *C. includens* sendo a CL₅₀ do isolado *A. californica* F₅C de 295 CPI/ml de dieta. Resultados de aumento da virulência, provocada por passagem seriada, foram relatados por SMIRNOFF (1963). Da mesma forma, TOMPKINS *et al.* (1988) relataram aumento da virulência do VPN de *A. californica* passado por *T. ni* e *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae).

Para *R. nu* foram utilizados os isolados *A. californica* F₁C, F₃C e F₅C. A mortalidade provocada pelo F₁C variou de 14,3%, para a concentração de 1 x 10² CPI/ml de dieta, até 100% com 1 x 10⁵ CPI/ml de dieta (quadro 4). Os resultados com este isolado foram semelhantes aos obtidos quando o inseto testado foi *C. includens*. A CL₅₀ do isolado F₁C para *R. nu* foi de 1198 CPI/ml de dieta, enquanto a CL₅₀ para o isolado de F₃C e F₅C foi de 4143 e 10⁹ CPI/ml de dieta respectivamente (quadro 5), demonstrando que o VPN de *A. californica* sofreu perda gradativa na virulência à *R. nu*, quando passado seqüencialmente por *C. includens*. A CL₅₀ do VPN de *A. californica* F₁C, entretanto, foi semelhante para as espécies *C. includens* e *R. nu*, demonstrando que o VPN de *A. californica*, quando passado apenas uma vez por *C. includens*, foi igualmente infectivo às duas espécies. Isso demonstra que o VPN de *A. californica* pode ser desenvolvido como inseticida biológico para o controle destes dois Plusiinae, que ocorrem simultaneamente em lavouras de soja no Sul do País.

CONCLUSÕES

1. O VPN de *C. includens* é menos virulento à própria espécie do que o VPN de *A. californica*, quando este último é passado sucessivamente por *C. includens*;

2. O vírus de *A. californica*, multiplicando apenas uma vez em *C. includens*, é tão virulento à essa espécie quanto a *R. nu*, o que poderia permitir sua utilização em programas de MIP, em regiões de ocorrência simultânea desses dois Plusiinae; e

3. O VPN de *A. Californica* perde virulência a *R. nu*, com a passagem sucessiva por *C. includens*.

QUADRO 1. Concentrações utilizadas para diferentes isolados de VPNs, testados em lagartas de *C. includens* e *R. nu*.

Isolado (VPN)	Concentrações (CPI/ml de dieta)					
	Insetos			Teste		
	<i>C. includens</i>			<i>R. nu</i>		
<i>C. includens</i>	10 ²	a	10 ⁶			NT ^{1/}
<i>A. californica</i>	10 ³	a	10 ⁷	10 ²	a	10 ⁵
<i>A. californica</i>	10 ³	a	10 ⁷			NT
<i>A. californica</i>	10 ²	a	10 ⁶	10 ³	a	10 ⁶
<i>A. californica</i>	10 ²	a	10 ⁶			NT
<i>A. californica</i>	10 ²	a	10 ⁶	10 ³	a	10 ⁶

1/ NT = Não Testado

2/ F_{1,2,3,4,5} = Número de passagens do VPN por *C. includens*.

QUADRO 2. Mortalidade (%) de lagartas de *C. includens* (final do 2º ínstar) provocada pelo VPN de *C. includens* e pelo VPN de *A. californica*, passado por *C. includens*.

Concentração em CPI/ml de dieta	Isolados					
	C. inc.	F ₁ ¹ /	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
T	0	0	0	0	2,27	0
10 ²	12,50	00,00	00,00	14,63	22,92	28,95
10 ³	51,22	48,84	55,88	63,64	35,42	70,17
10 ⁴	75,61	67,44	78,79	91,30	75,00	87,50
10 ⁵	91,11	95,55	91,18	90,70	79,49	92,59
10 ⁶	92,86	92,50	91,67	90,70	88,09	94,44
10 ⁷	-	95,35	91,18	-	-	-

^{1/} F_{1,2,3,4,5} = Número de passagens do VPN por *C. includens*.

QUADRO 3. Concentração letal média (CL₅₀), calculada pelo método de Probits, do VPN de *C. includens* e do VPN de *A. californica*, passado por *C. includens* para lagartas (final do 2º ínstar) de *C. includens*.

Isolado (VPN)	Nº de pol. por ml de dieta (CL ₅₀)	Intervalo de Confiança (95%)	Equação
<i>C. inc.</i>	1124	742 - 1667	$Y^{1/} = 2,22 + 5,73 \log x^{2/}$
<i>A. cal.</i> F ₁ C ^{3/}	1120	535 - 2010	$Y = 2,46 + 5,24 \log x$
<i>A. cal.</i> F ₂ C	364	107 - 876	$Y = 3,48 + 3,70 \log x$
<i>A. cal.</i> F ₃ C	590	384 - 878	$Y = 2,59 + 5,43 \log x$
<i>A. cal.</i> F ₄ C	1464	864 - 2413	$Y = 2,84 + 4,31 \log x$
<i>A. cal.</i> F ₅ C	295	180 - 455	$Y = 3,10 + 4,81 \log x$

^{1/}Y = Mortalidade expressa em Probits

^{2/}x = Log. da concentração

^{3/}F_{1,2,3,4,5} = Número de passagens do VPN por *C. includens*.

QUADRO 4. Mortalidade (%) de lagartas de *R. nu* (final do 2º ínstar) provocada pelo VPN de *A. californica*, passado por *C. includens*.

Concentração em CPI/ml de dieta	Isolados		
	F ₁ ^{1/}	F ₃	F ₅
T	0	0	0
10 ²	14,29	0	-
10 ³	35,48	16,13	6,06
10 ⁴	79,41	69,70	3,33
10 ⁵	100,00	100,00	12,12
10 ⁶	-	100,00	15,81

^{1/}F_{1,3,5} = Número de passagens no VPN por *C. includens*.

QUADRO 5. Concentração letal média (CL₅₀), calculada pelo método de Probits, do VPN de *A. californica* passado por *C. Includens*, para lagartas (final do 2º ínstar) de *R. nu*.

Isolado (VPN)	Nº de pol. por ml de dieta (CL ₅₀)	Intervalo de Confiança (95%)	Equação
<i>A. cal.</i> F ₁ C ^{1/}	1198	851 - 1676	$Y^2/ = 1,20 + 7,52 \log x^3/$
<i>A. cal.</i> F ₃ C	4143	3209 - 5327	$Y = 3,41 + 15,06 \log x$
<i>A. cal.</i> F ₅ C	10 ⁹	10 ⁷ - 10 ¹⁴	$Y = 0,48 + 4,74 \log x$

^{1/}F_{1,3,5} = Número de passagens no VPN por *C. includens*.

^{2/} Y = Mortalidade expressa em Probits

^{3/} x = Log. da concentração

LITERATURA CITADA

- ALVES, S. B. 1986. Vírus entomopatogênicos, p. 171 - 187. In S. B. ALVES (ed.) *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Ed. Manole Ltda. 407 p.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. econ. Ent.* 69(4): 487 - 488.
- GRÖNER, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses, p. 177-200. In R. R. GRANADOS & B. A. FEDERICI (eds.) *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Boca Raton, CRC, v. 1, 272 p.
- LINK, D. & COSTA, E. C. 1986. Eficácia de diferentes inseticidas no controle de lagartas falsas - medeiras (Plusiinae) na cultura da soja. In REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA NA REGIÃO SUL, 14 Chapecó. Florianópolis, EMPASC/EMBRAPA - CNPSo, p. 209. *Ata*.
- MORAES, R. R.; LOECK, A. E.; BELARMINO, L. C. 1989. Flutuação populacional de Plusiinae e *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. In SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 5, Campo Grande. Londrina, EMBRAPA-PESQUISA DE SOJA, 5, Campo Grande. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, P. 33. *Resumos*.
- MOSCARDI, F. 1983. Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis*. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 21 p. (Comun. Téc., 23).
- SMIRNOFF, W. A. 1963. Adaptation of a nuclear-polyhedrosis virus of *Trichiocampus viminalis* (Fallén) to larvae of *Trichiocampus irregularis* (Dyar). *J. Insect Pathol.* 5 : 104-110.
- SMITH, K. M. 1976. *Virus-insect relationship*. New York, Longman Inc., 291 p.
- TOMPKINS, G. J. ; DOUGHERTY, E. M. ; ADAMS, J. R.; DIGGS, D. 1988. Changes in the virulence of nuclear polyhedrosis viruses when propagated in alternate noctuid (Lepidoptera: Noctuidae) cell lines and hosts. *J. econ. Ent.* 81 (4): 1027 - 1032.
- VAIL, P. V.; HENNEBERRY, T. J.; KISHABA, A. N.; ARAKAWA, K. Y. 1968. Sodium Hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.* 10 (1) : 84-93.
- VAIL, P. V. ; JAY, D. L. ; HUNTER, D. K. 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper, *Autographa californica*, after passage through alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 21 : 16-20.
- VAIL, P. V. ; SUTTER, G. ; JAY, D. L. ; GOUGH, D. 1971. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. *J. Invertebr. Pathol.* 17:383 -388.

- VAIL, P. V. ; VAIL, S. S.; SUMMERS; M. D. 1984. Response of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera : Phycitidae) to the nuclear polyhedrosis virus isolated from *Autographa californica* (Lepidoptera : Noctuidae). *Environ. Ent.* 13 (5): 1241-1244.
- YOUNG, S. Y. 1989. Problems associated with the production and use of viral pesticides. *Mems Inst. Oswaldo Cruz* 84 : 67-73.