



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAURÍCIO LARA MOSCARDI

**PASSAGENS SEQUENCIAIS DO MÚLTIPLO
NUCLEOPOLIEDROVIRUS DE *ANAGRAPHA FALCIFERA*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE):
MORTALIDADE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO
INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE *SPODOPTERA*
COSMIOIDES (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

MAURÍCIO LARA MOSCARDI

**PASSAGENS SEQUENCIAIS DO MÚLTIPLO
NUCLEOPOLIEDROVIRUS DE *ANAGRAPHA FALCIFERA*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE):
MORTALIDADE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO
INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE *SPODOPTERA*
COSMIOIDES (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Ferreira Falleiros.

Co- Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Fabiane Cunha.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M894p Moscardi, Mauricio Lara.
Passagens sequenciais do múltiplo nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) : mortalidade e aspectos morfológicos do intestino médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) / Mauricio Lara Moscardi. – Londrina, 2014.
47 f. : il.

Orientador: Angela Maria Ferreira Falleiros.
Coorientador: Fabiane Cunha.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Lagarta da soja – Morfologia – Teses. 2. Lagarta da soja – Controle biológico – Teses. 3. Histologia – Teses. 4. Entomologia – Teses. I. Falleiros, Angela Maria Ferreira . II. Cunha, Fabiane. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 595.78

MAURÍCIO LARA MOSCARDI

**PASSAGENS SEQUENCIAIS DO MÚLTIPLO
NUCLEOPOLIEDROVIRUS DE *ANAGRAPHA FALCIFERA*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): MORTALIDADE E ASPECTOS
MORFOLÓGICOS DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE
SPODOPTERA COSMIOIDES (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Ferreira Falleiros
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Sheila Michele Levy
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Clara Beatriz Hoffmann-Campo
EMBRAPA Soja – Londrina – PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2014

DEDICO

*A Deus pela saúde e disposição para superar todos os obstáculos e desafios.
Aos meus pais Flávio (in memoriam) e Rosa Maria, que sempre me apoiaram e me deram forças nos momentos difíceis, e aos meus irmãos Gustavo e Rodolfo, pelos conselhos e amizade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por possibilitar um novo aprendizado a cada dia de minha vida.

Aos meus pais, Flávio (*im memoriam*) e Rosa Maria, e irmãos, Gustavo e Rodolfo, pelo apoio, compreensão e ajuda nos momentos de dificuldade.

À minha orientadora, professora Dra. Ângela Maria Ferreira Falleiros, não só pela orientação neste trabalho, mas, sobretudo, por acreditar em mim, pela amizade construída, compreensão e paciência.

À minha noiva, Viviane Dutra, que esteve ao meu lado durante os momentos bons e ruins, me auxiliando com os experimentos, me dando apoio e confiança, me fazendo rir, e até mesmo dando bronca quando precisei.

À Professora Dra. Fabiane Cunha, minha co-orientadora, pelas sugestões e conselhos durante o curso, pela paciência e amizade.

À Professora Dra. Sheila Michele Levy, pelas sugestões e conselhos durante o curso, pela paciência e amizade.

Aos orientados da Dra. Ângela, Norberto Cruz e Denise Magri, e também ao Pablo Kruger, por toda a ajuda durante o curso.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Agronomia e à CAPES, por financiarem este estudo.

Às técnicas do laboratório de histotécnica, Andreia Carla Eugenio Pupim e Renata Baldo, por toda a ajuda durante o curso.

Aos meus amigos de todas as horas Diogo Braga, Leonardo Carneiro, Rafael Hatadani, Ricardo Bechelli, Leonardo Piva e Uanhenga Corrêa, pela amizade e companheirismo; com certeza a ajuda de vocês foi imprescindível para a conclusão deste trabalho e essencial nas horas de descontração, descanso e alegria.

Aos funcionários do Departamento e da Pós-graduação de Agronomia. À Universidade Estadual de Londrina, pela minha formação.

MOSCARDI, Maurício Lara. **Passagens sequenciais do múltiplo nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae): mortalidade e aspectos morfológicos do intestino médio de lagartas de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) 2014. 47 f. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2014**

RESUMO

A ocorrência de *Spodoptera cosmioides* de forma expressiva, em lavouras de algodão, é constatada desde 2002. Na cultura da soja, em algumas regiões, esta espécie é considerada praga importante, pois ataca as folhas e as vagens, na fase reprodutiva da cultura. Dentre os métodos alternativos para controle dessa praga está a utilização de baculovirus, que pode substituir ou associar-se ao uso de produtos fitossanitários de origem sintética. O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações na biologia e na morfologia do intestino médio (IM) de lagartas *Spodoptera cosmioides*, sob efeito das passagens do múltiplo nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV), em diferentes tempos de infecção, buscando correlacionar os efeitos histopatológicos com a efetividade deste vírus como potencial controle biológico desta praga. Comparou-se a morfologia do IM entre lagartas infectadas e não infectadas. As lagartas foram infectadas com sete dias de desenvolvimento, utilizando-se três diferentes passagens do vírus AfMNPV em *S. cosmioides* (T1, T2 e T3, correspondendo a primeira, quarta e sétima passagens, respectivamente), além da testemunha. Os tubos digestivos foram coletados com 24, 72 e 144 horas de infecção, em número de 20 por tratamento, por tempo de infecção. Os tubos, fixados em Karnovsky, foram processados, corados com Hematoxilina-Eosina e analisados ao microscópio de luz. Concomitantemente foram realizados ensaios de biologia comparada, com os mesmos tratamentos, para análises de comportamento e mortalidade. Para os resultados de biologia, os tratamentos T2 e T3 apresentaram drástica redução de locomoção e alimentação a partir do quarto dia após infecção (DAI), além de maior taxa de mortalidade acumulada em relação à testemunha e o T1. Morfologicamente todos os tratamentos (T1, T2 e T3) causaram alteração no IM de *S. cosmioides* nos três tempos de infecção, sendo que as maiores alterações ocorreram no epitélio. Conclui-se, portanto, que o AfMNPV, nas três passagens testadas em *S. cosmioides*, causa alterações comportamentais e alterações morfológicas no IM desta espécie, sendo que a quarta e a sétima passagem foram as mais efetivas, indicando ser este um agente de controle promissor para esta praga.

Palavras-chave: Histologia. Controle biológico. Tubo digestivo. Microscopia de luz.

MOSCARDI, Maurício Lara. **Sequential passages of multiple nucleopolyhedrovirus of *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae): mortality and morphology of the midgut of *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae)** 2014. 47 p. (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2014

ABSTRACT

The expressively occurrence of *Spodoptera cosmioides* in cotton fields is observed since 2002. In soybean, in some regions, this species is an important pest, as it attacks the leaves and pods during the reproductive stage of the crop. Among the alternative methods for control of this pest is the use of baculovirus, which can replace or be associated with the use of phytosanitary products of synthetic origin. The aim of this work is to evaluate changes in *S. cosmioides* caterpillars' biology and morphology of the midgut (IM), under effect of passages of *Anagrapha falcifera* multiple nucleopolyhedrovirus (A \mathcal{M} NPV), at different times of infection, to correlate histopathological effects with the effectiveness of this virus as a potential biological control of this pest. We compared the morphology of IM between infected and non-infected larvae. Larvae were infected with seven days of development, by using three different passages of A \mathcal{M} NPV in *S. cosmioides* (T1, T2 and T3, which is the first, fourth and seventh passages, respectively) and the control treatment. The digestive tubes were collected at 24, 72 and 144 hours of infection of 20 structures per treatment, per time of infection. The digestive tubes, fixed in Karnovsky, were processed, stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope. Compared biology assays with the same treatments for analyzing behavior and mortality were performed concomitantly. The biology results of T2 and T3 treatments showed dramatic reduction in locomotion and feeding from the fourth day after infection (DAI) and higher cumulative mortality rate compared to the control and T1. Morphologically, all treatments (T1, T2 and T3) caused changes in the IM of *S. cosmioides*, in the three times of infection, with the greatest changes occurring at the epithelium. Therefore, it is possible to conclude that the A \mathcal{M} NPV, in the three passages tested in *S. cosmioides*, cause behavioral and morphological changes in the IM of this species, indicating that it can be a promising control agent to this pest.

Key words: Histology. Biological control. Digestive tube. Light microscope

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Mortalidade acumulada ($\% \pm$ Erro Padrão) de lagartas *S. cosmioides* infectadas com diferentes passagens do baculovirus AfMNPV27
- Tabela 3.2** – Número de poliedros virais (OB . mL⁻¹) após extração em lagartas *S. cosmioides* infectadas com diferentes passagens do baculovirus AfMNPV28

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1** – Desenvolvimento de lagartas *S. cosmioides*, infectadas com diferentes passagens do baculovirus AfMNPV, com 10 dias após infecção. Test. – Testemunha; T1 – Primeira passagem do vírus; T2 – Quarta passagem to vírus e; T3 – Sétima passagem do vírus.....28
- Figura 3.2** – Fotografia do tubo digestivo de *S. cosmioides*. IA – Intestino anterior; IM – Intestino médio; IP – Intestino posterior; Tr – Traqueia e; CG – Corpo gorduroso.....29
- Figura 3.3** – Fotomicrografia do IM de larvas de 4^o instar de *S. cosmioides*. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular; TM – Túbulo de Malpighi. HE. Barra: 10 μ m.....30
- Figura 3.4** – Fotomicrografia do IM de larvas de *S. cosmioides* infectadas com a primeira passagem do AfMNPV. A: Testemunha; B: 24 horas; C: 72 horas e; D: 144 horas de infecção. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular. HE. Barra: 10 μ m31
- Figura 3.5** – Fotomicrografia do IM de larvas de *S. cosmioides* infectadas com a quarta passagem do AfMNPV. A: Testemunha; B: 24 horas; C: 72 horas e; D: 144 horas de infecção. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular; Traquéia (Tr). HE. Barra: 10 μ m.....33
- Figura 3.6** – Fotomicrografia do IM de larvas de *S. cosmioides* infectadas com a sétima passagem do AfMNPV. A: Testemunha; B: 24 horas; C: 72 horas e; D: 144 horas de infecção. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular. HE. Barra: 10 μ m34

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 | <i>SPODOPTERA COSMIOIDES</i> | 12 |
| 2.2 | BACULOVÍRUS..... | 14 |
| 2.3 | INTESTINO MÉDIO DOS INSETOS | 17 |
| 3 | ARTIGO: PASSAGENS SEQUENCIAIS DO MÚLTIPLO NUCLEOPOLIEDROVIRUS DE ANAGRAPHA FALCIFERA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): MORTALIDADE E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE <i>SPODOPTERA COSMIOIDES</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) | 20 |
| 3.1 | RESUMO..... | 20 |
| 3.2 | ABSTRACT | 21 |
| 3.3 | INTRODUÇÃO | 21 |
| 3.4 | MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 3.4.1 | Insetos | 23 |
| 3.4.2 | Obtenção das Passagens Sequeciais do Baculovírus de <i>Anagrapha falcifera</i> (AfMNPV) | 24 |
| 3.4.3 | Aspectos Biológicos de <i>S. cosmioides</i> Infectada com AfMNPV | 24 |
| 3.4.4 | Morfologia do Intestino Médio de <i>S. cosmioides</i> Infectada com AfMNPV | 25 |
| 3.5 | RESULTADOS..... | 27 |
| 3.5.1 | Mortalidade e Tempo de Desenvolvimento de <i>S. cosmioides</i> Infectada com AfMNPV | 27 |
| 3.5.2 | Morfologia..... | 28 |
| 3.5.2.1 | Morfologia do IM de lagartas de <i>S. cosmioides</i> não infectadas com AfMNPV (Testemunha)..... | 28 |
| 3.5.2.2 | T1 - primeira passagem..... | 30 |
| 3.5.2.3 | T2 - quarta passagem..... | 32 |
| 3.5.2.4 | T3 - sétima passagem | 33 |
| 3.6 | DISCUSSÃO | 34 |
| 3.7 | CONCLUSÕES | 39 |
| | REFERÊNCIAS | 40 |

1 INTRODUÇÃO

O ataque de pragas, como as lagartas, é um dos fatores que mais limita a produtividade de “commodities” como soja, milho e algodão. Nesses biomas há sempre uma oferta contínua de alimento a insetos-pragas polípagos, como é o caso de espécies do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) (SANTOS, 2007).

Segundo Santos (2007), constata-se desde 2002, a ocorrência de *Spodoptera cosmioides* de forma expressiva em lavouras de algodão. Em algumas regiões, essas lagartas são encontradas na cultura da soja, onde são consideradas pragas importantes, pois atacam as folhas e as vagens, a partir do início da fase reprodutiva da cultura (GAZZONI; YORINORI, 1995; REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 2000). O crescimento na importância atribuída a este inseto-praga pode ter ocorrido pela utilização indiscriminada de produtos químicos sintéticos. Isto pode ocasionar o fenômeno conhecido como erupção de pragas, que implica no aumento da população de uma praga de menor importância, tornando-a praga principal (SOSA-GOMEZ, 2005).

O combate de pragas, buscando a redução na utilização dos agrotóxicos em decorrência de seus efeitos colaterais, pode ser associado e/ou substituído por métodos alternativos de controle para solução do problema a médio e longo prazo. Esses métodos que visam interferir o mínimo possível no agroecossistema, compõem o que se conhece como Manejo Integrado de Pragas (MIP) (GAZZONI et al., 1988; PANIZZI, 1990). Desta forma, o número de pesquisas envolvendo microrganismos como fungos, bactérias e vírus para promover o controle biológico ou fazer parte de um manejo integrado de pragas tem aumentado (DESTÉFANO, 2003, PISSINATI et al., 2009).

Seguindo o conceito da utilização de entomopatógenos para controle de insetos-praga, em estudos prévios foi observado que o múltiplo nucleopoliedrovírus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) tem causado mortalidade nas lagartas de *S. cosmioides* (CUNHA, informação pessoal), mostrando-se uma alternativa promissora para o controle a praga.

Sabe-se que a infecção das lagartas ocorre por meio da ingestão dos poliedros virais, através do tubo digestivo. Nos insetos, este tubo é formado por três regiões morfofuncionais distintas, sendo que o principal local de digestão, absorção do alimento e a principal via de acesso dos inseticidas químicos e

biológicos é o intestino médio (IM) (MOSCARDI; CARVALHO, 1993). Segundo Terra e Ferreira (2005), a capacidade de adaptação a diferentes dietas e habitats torna os insetos excelentes modelos de estudo do sistema digestivo, principalmente por ser uma das principais interfaces entre o inseto e o meio ambiente em que vivem.

Alterações na região do IM podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos os eventos fisiológicos (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993, MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). Várias pesquisas foram realizadas com a descrição morfológica e ultraestrutural do IM em insetos da ordem lepidoptera (PINHEIRO et al., 2003; LEVY et al., 2004; ROST-ROSZKOWSKA et al., 2008). Entretanto, em relação à *S. cosmioides*, apesar de pertencer à mesma ordem, poucas informações sobre a histologia de seu IM estão disponíveis.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das passagens do múltiplo nucleopoliedrovírus de *Anagrapha falcifera* (A \mathbb{M} NPV) na biologia e histologia do IM de lagartas *Spodoptera cosmioides*, em diferentes tempos de infecção, buscando correlacionar os efeitos histopatológicos com a efetividade deste vírus como potencial controle biológico desta praga.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *SPODOPTERA COSMIOIDES*

Segundo Tood e Poole (1980), o gênero *Spodoptera* apresenta distribuição principalmente tropical e subtropical. Entretanto, algumas espécies que ocorrem nos dois hemisférios, ocorrem também em regiões temperadas, sendo registrada a ocorrência de 16 espécies na região neotropical.

O gênero *Spodoptera* inclui a maioria das espécies pragas com importância econômica para diferentes culturas (BIANCO, 1991), como algodão, milho, soja, feijão, tomate, sorgo, hortaliças e frutíferas, danificando, pela alimentação, diversas estruturas das plantas, podendo, assim, ocasionar prejuízos significativos (KING; SAUNDERS, 1984). Nora, Reis Filho e Stuker (1989) relataram a presença de *S. cosmioides* em pomares de maçã, com porcentagens de 35,4 e 24,7% de frutos danificados. Bavaresco et al. (2003) relataram a ocorrência da espécie, além das plantas já citadas, também em mamona, feijão caupi, eucalipto e arroz.

S. cosmioides era, até pouco tempo, considerada sinonímia de *Spodoptera latifascia* (Walk.). Entretanto, diferenças moleculares, morfológicas, fisiológicas e comportamentais fazem com que devam ser consideradas espécies distintas. Ambas são membros de um complexo de espécies neotropicais, sendo *S. latifascia* estabelecida na América Central, Antilhas e Sul dos Estados Unidos, enquanto *S. cosmioides* é encontrada na América do Sul. (SILVAIN; LALANNE-CASSOU, 1997, LALANNE-CASSOU et al., 1999).

De acordo com Santos, Santos e Santos (2003), os ovos de *S. cosmioides* são inicialmente esverdeados, tornando-se marrons antes da eclosão e, ao eclodirem, as lagartas tendem ao marrom, possuindo cabeça preta. Nos primeiros estádios de desenvolvimento, as lagartas apresentam um tom pardonegro-acinzentado, com três listras longitudinais alaranjadas, uma dorsal e duas laterais, com pontos brancos. Acima dos pontos brancos há triângulos pretos apontando para o dorso do inseto. Lagartas completamente desenvolvidas são pardas e apresentam uma faixa mais escura entre o 3º par de pernas torácicas e 1º par de falsas-pernas abdominais. Zenker, Specht e Corseuil (2007) relatam que lagartas de último instar medem em torno de 48 mm.

De acordo com Peres Filho, Dorval e Berti Filho (2006), os adultos desta espécie podem chegar a 40 mm de envergadura das asas e, segundo Santos, Santos e Santos (2003), apresentam as asas anteriores cinza-claro, mosqueadas longitudinalmente e margeadas por uma franja, enquanto que as asas posteriores são de cor branca-pérola com franja. Ainda, segundo os mesmos autores, pode-se diferenciar macho e fêmea através das asas, possuindo as fêmeas asas desenhadas como mosaico de tonalidade preta e bege. A faixa de temperatura mais adequada para o desenvolvimento de *S. cosmioides* situa-se entre 25°C e 28°C. Nessa faixa, podem ser obtidas de 9,6 a 11,7 gerações anuais do inseto, em condições de laboratório (BAVARESCO et al., 2002).

Silva et al. (2011), avaliando o desempenho de *S. cosmioides* em diferentes plantas hospedeiras, concluíram que as culturas da soja e algodão estão entre os melhores alimentos para o desenvolvimento da espécie. Na cultura da soja, Gazzoni e Yorinori (1995) relatam que *S. cosmioides*, juntamente com *Spodoptera eridania* (Cram.), além de atacarem folhas, formam o principal grupo de lagartas que atacam vagens.

Em estudos realizados com lagartas de *S. cosmioides* em folhas de soja, cultivar Embrapa 48, Bavaresco et al. (2003) registraram período de incubação de 4,11 dias e duração larval de 28,0 dias, sendo que 86% da população passou por sete e, apenas 14% por oito ínstar. O período pré-pupal foi de 2,4 dias e pupal de 12,5 dias a temperatura variando de 22,3 a 30,4°C, completando o ciclo em 46 dias.

Na cultura do algodoeiro, Santos, Santos e Santos (2003) relataram que as lagartas de *S. cosmioides* ocorrem a partir da fase inicial da emissão dos botões florais e durante o pleno florescimento. Segundo Santos et al. (2010), as lagartas ocasionam injúrias nas folhas, botões florais e maçãs, podendo consumir até 153,7 cm² de área foliar. Este consumo é superior ao de *Alabama argillacea* (Hübner), praga desfolhadora mais importante do algodoeiro no Brasil, que consome até 71,2 cm² (CARVALHO, 1981; RAMALHO, 1994). Após eclodirem, permanecem agrupadas, raspam o parênquima das folhas, deixando-as necrosadas e translúcidas, a seguir se distribuem nas plantas. As lagartas, em último instar, se dirigem ao solo, onde passam o período de pupa (SANTOS; SANTOS; SANTOS, 2003).

2.2 BACULOVÍRUS

Dentre os vírus entomopatogênicos utilizados como bioinseticidas, a família baculoviridae é a mais estudada devido a sua grande especificidade vírus/inseto e ao seu potencial como agente de controle biológico contra muitas espécies de insetos-praga. Essas viroses, por serem específicas para hospedeiros invertebrados e não apresentarem grupos de vírus homólogos para plantas e vertebrados, são consideradas inócuos para o homem, outros animais e plantas (MOSCARDI, 1986, 1999).

O uso de baculovírus como agente de controle biológico é facilitada pela característica desses vírus de serem encapsulados em uma oclusão cristalina de natureza proteica. Isso proporciona proteção aos vírions no meio ambiente, permitindo também, a formulação de bioinseticidas com fácil tecnologia de aplicação, representando economia e biossegurança em relação aos inseticidas químicos sintéticos (CASTRO et al., 1999).

A família baculoviridae é caracterizada morfolologicamente por apresentar o nucleocapsídeo em forma de bastão (30-60 nm x 250-300 nm) envolto por uma membrana ou envelope viral, constituindo dois fenótipos virais distintos que se alternam no ciclo de replicação. Atualmente a subdivisão dessa família em quatro gêneros está baseada, além da composição genômica e de suas características patológicas e morfológicas, em evidências filogenéticas: Alphabaculovirus – nucleopolyhedrovirus (NPV) e Betabaculovirus – granulovirus (GV) específicos de lepidopteros, Gammabaculovirus – NPV específicos de himenópteros e Deltabaculovirus – NPV específicos de dípteros (JEHLE et al., 2006; HERNIOU; JEHLE, 2007).

Os baculovírus associados a lepidopteros têm um modo de ação que se inicia pela ingestão de poliedros (NPV) ou grânulos virais (GV) pelo inseto hospedeiro. A infecção, segundo Moscardi, Cunha e Moscardi (2011) ocorre através das seguintes etapas: (1) após a ingestão dos poliedros ou grânulos virais, os corpos de oclusão (poliédricos ou granulares) se dissolvem no IM da larva hospedeira, devido ao elevado pH (acima de 11), liberando os virions; (2) estes se fundem às microvilosidades das células epiteliais do IM, liberando os nucleocapsídeos virais, constituídos basicamente de ácido nucleico (DNA) e “envelope”; (3) os nucleocapsídeos penetram através dessas microvilosidades,

liberando DNA viral através dos poros nucleares, onde há a replicação viral, sem a formação de poliedros ou grânulos, constituindo numa infecção primária, mas com a produção de grande quantidade de nucleocapsídeos; (4) estes migram para a membrana basal ou através da traqueia, assumindo a forma de “budded virus”, ou vírus extracelulares, que será responsável pela infecção secundária (ou sistêmica) em diferentes tecidos, após atingir a hemolinfa do inseto hospedeiro. Ou seja, os “budded virus” são responsáveis pela transmissão viral em diferentes tecidos do inseto, enquanto os poliedros ou grânulos são responsáveis pela transmissão de inseto para inseto em campo. Segundo esses autores, as lagartas infectadas perdem sua capacidade motora e de alimentação em cerca de quatro dias após a alimentação, morrendo de seis a dez dias após a infecção.

Os GVs infectam somente insetos da ordem Lepidoptera, e sua principal característica é a presença de um único nucleocapsídeo localizado em uma cápsula ou grânulo, constituída por uma matriz protéica composta principalmente de granulina. Já os NPVs apresentam numerosos nucleocapsídeos no interior do corpo de oclusão ou poliedro viral, o qual consiste principalmente da proteína poliedrina (HAJÓS, 2000; INCEOGLU; KAMITA; HINTON, 2001). Essa cápsula protéica permite que os vírions sobrevivam fora do hospedeiro, conferindo proteção contra sua desativação em ambientes desfavoráveis, principalmente de temperatura e radiação solar (FUNK; BRAUNAGEL; ROHRMANN, 1997; RIBEIRO; SOUZA; KITAJIMA, 1998).

Uma das principais características dos NPVs é a presença de dois fenótipos virais durante o ciclo de infecção. O fenótipo presente no meio ambiente são os corpos de oclusão (OB, do inglês, occlusion bodies, também chamados de poliedros) ou os vírus ocluídos (OV, do inglês, occluded viruses), responsáveis pela transmissão horizontal da infecção, ou seja, de inseto para inseto. Nesses, um ou vários nucleocapsídeos envoltos por membrana estão imersos em uma matriz protéica. O outro fenótipo, responsável pelo estabelecimento da infecção sistêmica dentro do inseto, é constituído por vírus extracelulares (BV, do inglês, budded viruses); nestes, um ou mais nucleocapsídeos são envolvidos por um envelope viral derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (VOLKMAN; KEDDIE, 1990; BLISSARD; BLACK; CROOK, 2000).

Mais de 700 baculovirus têm sido isolados a partir de invertebrados e relatados na literatura (MOSCARDI, 1999; HERNIOU; JEHLE, 2007). Estes vírus

ocorrem naturalmente em populações de insetos e são normalmente nomeados pelo hospedeiro inicial do qual foram isolados. Devido à alta virulência, especificidade para os insetos e a estabilidade do ambiente, certo número destes vírus têm sido utilizados para controlar os insetos como alternativas biológicas aos pesticidas químicos (MOSCARDI, 1999; SZEWCZYK et al., 2009).

Como exemplo de sucesso do uso de baculovirus como agente de controle biológico, pode-se citar o AgMNPV. Os resultados físicos obtidos no período de 1981 a 1997, com o uso de baculovirus no controle biológico da lagarta-da-soja no Rio Grande do Sul, representaram acumulativamente 109.988 produtores assistidos para uma área tratada de 1.943.253 ha (SECCHI, 2002). Segundo Moscardi (2007), as aplicações com esse vírus na cultura da soja no Brasil atingiram cerca de dois milhões de hectares na safra 2003/2004. O vírus também é utilizado em outros países, como Argentina, Bolívia Colômbia, Paraguai e Uruguai (MOSCARDI; MORALES; SANTOS, 2002).

O banco de baculovirus da Embrapa Milho e Sorgo conta com 22 isolados de baculovirus que infectam a *Spodoptera frugiperda*, amostrados em diversas regiões do Brasil (BARRETO et al., 2005), buscando o desenvolvimento de um sistema de produção que possibilite a obtenção de um bioinseticida à base do baculovirus que infecta esta espécie (SfMNPV), ou Baculovirus spodoptera. Vários avanços foram obtidos durante a evolução da pesquisa, mostrando a possibilidade de produção em larga escala deste bioinseticida (VALICENTE; TUELHER, 2009).

Hostetter e Puttler (1991) relataram, pela primeira vez, o potencial do vírus de poliedrose múltipla nuclear isolada de *Anagrapha falcifera* (Kirby) (AfMNPV). Os autores afirmaram que mais de 31 espécies de Lepidoptera, de 10 famílias, demonstraram suscetibilidade ao AfMNPV, sendo que este vírus foi mais virulento para larvas de *Helicoverpa zea* (Boddie), em relação ao vírus de *Autographa californica* (AcMNPV), um baculovirus conhecido por controlar esta espécie.

O AfMNPV também infecta outras pragas de grande importância, como *Heliothis virescens* (Fabricius), *Spodoptera exigua* (Hübner), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) e *Trichoplusia ni* (Hübner) (HOSTETTER; PUTTLER, 1991).

2.3 INTESTINO MÉDIO DOS INSETOS

Nos insetos, o mecanismo de alimentação e a química-digestiva se processam no sistema digestivo. Modificações estruturais, morfológicas e biológicas desenvolveram-se diferentemente nas várias ordens destes artrópodes, ao longo da evolução, envolvendo adaptações desde mandíbulas diferenciadas, que permitem a tomada de alimentos estruturalmente variados; tubos digestivos mais ou menos complexos; presença ou ausência de glândulas acessórias; tipos celulares associados a química digestiva com diversos níveis de organização e complexidade, além de organismos simbiotes presentes em algumas ordens de insetos (TERRA; FERREIRA, 1994).

O IM tem como função a produção e secreção de enzimas digestivas, absorção de água, nutrientes e manutenção da homeostase. Possui origem endodérmica, sendo um tubo de diâmetro variável formado por um epitélio simples ou pseudoestratificado, apoiado sobre uma membrana basal, em torno da qual dispõem uma camada mais interna de fibras musculares estriadas circulares e outra mais externa de fibras longitudinais (WIGGLESWORTH, 1965; SNODGRASS, 1993; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998; HAKIM; BALDWIN; SMAGGHE, 2010).

O principal sítio de digestão e absorção em insetos na maior parte das espécies é o IM. Este se constitui num tubo simples (ventrículo) de onde podem se expandir divertículos (cecos gástricos) usualmente na sua extremidade proximal. Na maior parte dos insetos, o IM contém no seu lúmen uma membrana acelular, quitino protéica, chamada de matriz ou membrana peritrófica, que envolve o alimento ingerido, e que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico (no interior da membrana) e o espaço ectoperitrófico (entre a membrana e o epitélio) (SILVA et al., 2012). A membrana peritrófica auxilia nos processos digestivos e protege a superfície do epitélio da abrasão mecânica e da ação de toxinas e patógenos (TELLAM, 1996; CHAPMAN, 1998).

O IM dos insetos é formado histologicamente por uma camada epitelial, constituída principalmente por células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996). Em Lepidoptera ocorrem estes quatro tipos celulares como já descrito em *Diatraea saccharalis* (PINHEIRO et al., 2003),

Anticarsia gemmatalis (LEVY et al., 2004) e *Spodoptera exigua* (ROST-ROSKOWSKA et al., 2008).

As células colunares são as mais numerosas e apresentam funções de síntese e secreção de enzimas digestivas, absorção de água e de nutrientes (RICHARDS; DAVIES, 1994; TERRA; FERREIRA, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996). Podem apresentar diferenças estruturais de acordo com o estado fisiológico do inseto. Assim, células ativas apresentam núcleo volumoso e com polaridade determinada pela distribuição das estruturas celulares no seu citoplasma. Dessa forma, na região basal ocorrem dobras associadas a mitocôndrias, na região mediana encontram-se o núcleo, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, além das vesículas de secreção. Já a região apical apresenta as microvilosidades, microfilamentos e mitocôndrias (TERRA, 1990; CHAPMAN, 1998). Estas células normalmente apresentam núcleo alongado, superfície apical com inúmeras microvilosidades e projeções citoplasmáticas (TERRA; COSTA; FERREIRA, 2006).

As células caliciformes recebem esta denominação por possuírem invaginação da membrana plasmática apical formando uma cavidade semelhante a um cálice, sendo esta cavidade margeada internamente por projeções citoplasmáticas semelhantes à microvilosidades, contendo mitocôndrias, que são responsáveis pelo transporte ativo de íons potássio da hemolinfa para o lúmen intestinal, homeostasia iônica e absorção de metabólitos, auxiliando as células colunares nesta função (HARVEY; CIOFFI; WOLFERSBERGER, 1983; KLEIN; LÖFFELMANN; WIECZOREK, 1991; WIECZOREK, 1992; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; CHAPMAN, 1998).

As células regenerativas podem ser observadas sozinhas, em pares ou formando grupos (ninhos) na base do epitélio e apresentam características de células indiferenciadas, cuja função principal é promover a substituição das células epiteliais em descarte, promovendo a manutenção da integridade do epitélio do IM (CRUZ-LANDIM; SILVA DE MORAES; SERRÃO, 1996; CHAPMAN, 1998; NEVES; GITIRANA; SERRÃO, 2003; MARTINS et al., 2006).

Segundo Ohlstein e Spradling (2007) o epitélio do IM de *Drosophila* contém células regenerativas que se distribuem de maneira esparsa ao longo da membrana basal que podem gerar tanto células colunares quanto células endócrinas, sendo que no interior dessas células observou-se a presença de vesículas ricas em proteínas responsáveis pela diferenciação celular.

Em estudos com *Locusta migratoria*, Illa-Bochaca e Montuenga (2006) concluíram que existem três tipos de células regenerativas, diferenciadas pelo tamanho do núcleo, posição em relação ao ninho e pelo tempo gasto no ciclo de proliferação e diferenciação, podendo originar todos os tipos de células formadoras do epitélio do IM.

Pode haver ainda células endócrinas, observáveis apenas ao microscópio eletrônico e que estão localizadas na base do epitélio (LEVY et al., 2004). Essas são caracterizadas por apresentarem grande quantidade de grânulos citoplasmáticos. Algumas de suas funções estariam relacionadas com o controle hormonal dos movimentos peristálticos, regulação da síntese enzimática e secreção, controle da proliferação e diferenciação das células regenerativas. Existem dois tipos de células endócrinas: as abertas, nas quais a membrana apical forma várias microvilosidades que estão em contato com o lúmen do IM e as células fechadas, as quais a membrana apical não forma microvilosidades, não estando em contato com o lúmen do IM (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; SEHNAL; ZETNAN, 1996; GÜL et al., 2001; ROST-ROSZKOWSKA et al., 2008).

De acordo com Endo e Nishiitsutsuji-Uwo (1981), as células endócrinas observadas em insetos como baratas e várias espécies de lepidópteros, correspondem, ultra-estruturalmente e imunohistoquimicamente, às células endócrinas do sistema digestório de vertebrados.

3 ARTIGO A – EFEITOS DE PASSAGENS DO MÚLTIPLO NUCLEOPOLIÉDROVÍRUS DE *Anagrapha falcifera* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) (AfMNPV) NO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS *Spodoptera cosmioides*, EM DIFERENTES TEMPOS DE INFECÇÃO

3.1 RESUMO

Spodoptera cosmioides é conhecida como uma das principais pragas que atacam vagens na cultura da soja. Com ocorrência expressiva nas lavouras de algodão, a partir de 2002, deixou de ser considerada praga secundária e vem ganhando um maior destaque entre as pragas chave em várias culturas. O aumento na população desse inseto, atribui-se o uso indiscriminado de produtos químicos sintéticos, portanto, o uso de métodos alternativos para o seu controle da praga vem ganhando destaque. O uso de agentes entomopatogênicos sobre *S. cosmioides*, passou a ser estudado, como o múltiplopoliédrovírus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) que tem causado mortalidade nas lagartas, mostrando-se uma alternativa promissora para o controle desta praga. O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações na biologia e na morfologia do IM (IM) de lagartas *Spodoptera cosmioides*, sob efeito das passagens do múltiplo nucleopoliédrovírus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV), em diferentes tempos de infecção, buscando correlacionar os efeitos histopatológicos com a efetividade deste vírus como potencial controle biológico desta praga. Comparou-se a morfologia do IM entre lagartas infectadas e não infectadas. As lagartas foram infectadas aos sete dias de desenvolvimento, utilizando-se três diferentes passagens do vírus AfMNPV em *S. cosmioides* (T1, T2 e T3, correspondendo a primeira, quarta e sétima passagens, respectivamente), além da testemunha. Os tubos foram coletados com 24, 72 e 144 horas de infecção, em número de 20 por tratamento, por tempo de infecção. Os tubos digestivos, fixados em Karnovsky, foram processados, corados com Hematoxilina-Eosina e analisados ao microscópio de luz. Concomitantemente, foram realizados ensaios de biologia comparada, com os mesmos tratamentos, para análises de comportamento e mortalidade. Para os resultados de biologia, os tratamentos T2 e T3 apresentaram drástica redução de locomoção e alimentação a partir do quarto dia após infecção (DAI), além de maior taxa de mortalidade acumulada em relação à testemunha e o T1. Morfológicamente todos os tratamentos (T1, T2 e T3) causaram alteração no IM de *S. cosmioides* nos três tempos de infecção, sendo que as maiores alterações ocorreram no epitélio. Conclui-se, portanto, que o AfMNPV, nas três passagens testadas em *S. cosmioides*, causa alterações comportamentais e alterações morfológicas no IM desta espécie, indicando ser este um agente de controle promissor para esta praga.

Palavras-chave: Histologia. Controle biológico. Tubo digestivo. Microscopia de luz.

3.2 ABSTRACT

Spodoptera cosmioides is known as one of the major pests of soybean pods. With remarkable occurrence in cotton, from 2002, this insect is no longer considered a minor pest and it is gaining greater attention among the key pests in various crops. The increase of its population is a result of indiscriminate use of synthetic chemicals. So, the use of alternative methods for pest control is gaining prominence. Studies aiming the use of *Anagrapha falcifera* multiple nucleopolyhedrovirus (A \mathcal{M} NPV) as an entomopathogenic agent of *S. cosmioides* were carried out. Such virus caused mortality in other species of caterpillars, showing a promising alternative to control this pest. The aim of this work is to evaluate changes in biology and morphology of the midgut (IM) *Spodoptera cosmioides* caterpillars, under effect of passages of A \mathcal{M} NPV, at different times of infection, to correlate histopathological effects with the effectiveness of the virus. We also compared the morphology of IM between infected and non-infected larvae. Larvae were infected at seven days of development, by using three different passages of A \mathcal{M} NPV in *S. cosmioides* (T1, T2 and T3, which is the first, fourth and seventh passages, respectively) and the control treatment. The digestive tubes were collected at 24, 72 and 144 hours of infection in 20 structures per treatment, per time of infection. The digestive tubes, fixed in Karnovsky, were processed, stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope. Compared biology assays with the same treatments for analyzing insect behavior and mortality were performed concomitantly. For the biology results, T2 and T3 treatments showed dramatic reduction in locomotion and feeding, from the fourth day after infection (DAI) and higher cumulative mortality rate compared to the control and T1. Morphologically, all treatments (T1, T2 and T3) caused changes in the IM of *S. cosmioides*, on the three times of infection. The greatest changes occurred in the epithelium. Therefore it is concluded that the A \mathcal{M} NPV, in the three passages tested in *S. cosmioides*, cause behavioral changes and morphological changes in the IM of this species, indicating that this is a promising control agent of the insect-pest.

Key words: Histology. Biological control. Digestive tube. Light microscope.

3.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Spodoptera*, encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais (TOOD; POOLE, 1980), inclui a maioria das espécies pragas com importância econômica para as diferentes culturas (BIANCO, 1991). Segundo Santos (2007), constata-se desde 2002 a ocorrência de *Spodoptera cosmioides* de forma expressiva em lavouras de algodão. Silva et al. (2011), analisando *S. cosmioides* em diferentes plantas hospedeiras, concluíram que as culturas da soja e algodão estão entre os melhores alimentos para o desenvolvimento da espécie. Na cultura da soja, Gazzoni e Yorinori (1995) afirmam que *S. cosmioides*, juntamente

com *Spodoptera eridania* (Cram.), formam o principal grupo de lagartas que atacam vagens.

Anteriormente, considerada praga secundária, este inseto vem apresentando aumento em importância, destacando-se ultimamente como praga-chave em algumas culturas. Uma das causas deste aumento considerável na população de *S. cosmíoides* pode ser devido à utilização indiscriminada de produtos químicos sintéticos. Assim, métodos de controle alternativos passam a ter maior importância para a contenção dessa praga.

Seguindo o conceito da utilização de métodos alternativos para o controle de insetos-praga, o uso de agentes entomopatógenos para o controle de *S. cosmíoides* passou a ser estudado, sendo o múltiplopoliedrovírus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) considerado uma alternativa promissora para o controle desta praga, já que tem causado mortalidade neste inseto (CUNHA, informação pessoal).

Dentre os vírus entomopatogênicos como bioinseticidas, a família baculoviridae, a qual pertence o AfMNPV, é a mais estudada devido a sua grande especificidade vírus/inseto e ao seu potencial como agente de controle biológico, podendo ser utilizados como alternativas biológicas aos pesticidas químicos (MOSCARDI, 1986, 1999; SZEWCZYK et al., 2009).

Os baculovírus associados a lepidópteros têm um modo de ação que se inicia pela ingestão de poliedros virais (NPV) pelo inseto hospedeiro. Após sua ingestão, os corpos de oclusão se dissolvem no lúmen do IM, liberando os virions, constituindo a infecção. As lagartas infectadas perdem sua capacidade motora e de alimentação, em cerca de quatro dias após a alimentação e morrem de seis a dez dias após a infecção (MOSCARDI; CUNHA; MOSCARDI, 2011).

O principal sítio de digestão e absorção dos alimentos nos insetos é o IM, sendo também considerado a principal via de acesso a inseticidas químicos e biológicos. O IM dos insetos é formado por uma camada epitelial, constituída principalmente por células colunares, caliciformes, regenerativas e endócrinas (BILLINGSLEY; LEHANE, 1996; PINHEIRO et al., 2003; LEVY et al., 2004; ROST-ROSKOWSKA et al., 2008).

As células colunares são as mais numerosas e apresentam funções de síntese e secreção de enzimas digestivas, absorção de água e de nutrientes (RICHARDS; DAVIES, 1994; TERRA; FERREIRA, 1994; BILLINGSLEY; LEHANE, 1996). As células caliciformes recebem esta denominação por possuírem

invaginação da membrana plasmática apical formando uma cavidade semelhante a um cálice. Já as células regenerativas têm por função principal promover a substituição das células epiteliais em descarte, promovendo a manutenção da integridade do epitélio (CRUZ-LANDIM; SILVA DE MORAES; SERRÃO, 1996; CHAPMAM, 1998; NEVES; GITIRANA; SERRÃO, 2003; MARTINS et al., 2006).

Alterações no IM podem afetar o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, bem como todos os eventos fisiológicos (MORDUE (LUNTZ); BLACKWELL, 1993, MORDUE (LUNTZ); NISBET, 2000). Vários trabalhos já descreveram a estrutura do IM de lepidópteros, entretanto, sobre *S. cosmíodes*, apesar de pertencer à mesma ordem, poucas informações sobre a histologia de seu IM são conhecidas.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos das passagens do múltiplo nucleopoliedrovírus de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) na biologia e histologia do IM de lagartas *S. cosmíodes*, em diferentes tempos de infecção, buscando correlacionar os efeitos histopatológicos com a efetividade deste vírus como potencial controle biológico desta praga.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Insetos

Os insetos/ovos de *Spodoptera cosmíodes* foram provenientes do laboratório de criação massal de insetos da Embrapa Soja. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Insetos do Departamento de Histologia, na Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, utilizando-se câmara climatizada tipo B.O.D. com temperatura de 26°C (± 2 °C), umidade relativa de 70% ($\pm 10\%$) e fotofase de 12 h.

Após eclosão, as lagartas foram transferidas para caixas gerbox contendo cinco larvas, para evitar canibalismo e estresse. As lagartas foram alimentadas durante todo o período de avaliação com dieta artificial, fornecida pela Embrapa Soja. Diariamente foi realizada a limpeza das fezes para evitar a proliferação de fungos e/ou bactérias. As lagartas foram monitoradas até o 7º dia após a eclosão, quando se procedeu à infecção com o vírus.

3.4.2 Obtenção das Passagens Sequenciais do Baculovírus de *Anagrapha falcifera* (A/MNPV)

Para o estudo, foram realizadas passagens sequenciais do vírus A/MNPV em *S. cosmioides*, a fim estudar a efetividade do controle nesta espécie. A obtenção das passagens se deu a partir da infecção de lagartas com a suspensão viral pura de A/MNPV. Para a infecção, cubos de dieta foram mergulhados por cinco segundos na suspensão viral e oferecidos às lagartas durante 48 horas. Após este período, utilizou-se dieta isenta do vírus. Estas lagartas foram monitoradas diariamente e quando apresentaram sintomas de infecção ou até mesmo morte, foram coletadas e armazenadas em freezer a -20°C para posterior extração do vírus.

Para a extração do vírus, as lagartas foram maceradas em cadinho. Este macerado foi transferido para um funil recoberto com algodão e gaze, onde foi adicionado água destilada autoclavada para filtração. Após a extração, o material foi centrifugado em ultracentrífuga a 10000 rpm, para retirada das impurezas, como gordura, restos de membrana e a água da filtração, deixando assim o vírus purificado.

Este vírus, obtido do macerado de lagartas infectadas, após sua purificação, foi considerado uma passagem (1ª passagem), ou seja, passou por um processo de infecção dentro dos organismos alvo e foi isolado, possibilitando um novo processo de infecção em novos indivíduos, dando origem a uma nova passagem.

Foram realizadas oito passagens do vírus e para os estudos de biologia e morfologia do IM, apresentados neste trabalho, utilizou-se a primeira (T1), quarta (T2) e sétima (T3) passagens, que em protocolos experimentais prévios mostraram-se compatíveis com o foco deste trabalho.

3.4.3 Aspectos Biológicos de *S. Cosmioides* Infectada com A/MNPV

Foram utilizados três tratamentos, T1, T2 e T3 com concentração de $6,5 \times 10^5$, $8,28 \times 10^7$ e $5,575 \times 10^8$ OB mL^{-1} , respectivamente. Atestemunha (Te) era composta somente por água destilada. Para a infecção, cubos de dieta foram mergulhados por cinco segundos na suspensão viral e oferecidos às lagartas durante 48 horas. Para o tratamento testemunha, os cubos de dieta foram imersos

em água destilada. Após este período, as dietas foram substituídas por dietas sem vírus/água.

Utilizou-se 60 lagartas/tratamento, estas foram individualizadas em recipientes plásticos com dieta. O comportamento das lagartas foi observado após 24 horas de infecção até a emergência dos adultos. Outros parâmetros como mudança de instar através da observação da expulsão da cápsula cefálica, deformação após a muda e/ou emergência dos adultos e a mortalidade de indivíduos foram avaliados diariamente.

Foram realizados os testes de normalidade e homocedasticidade e, como não houve normalidade e/ou homocedasticidade, foi aplicado o teste não-paramétrico. Desse modo, realizou-se análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis e comparação das médias pelo teste de Student-Newman-Keuls, com $p < 0,05$.

Também foi realizada a contagem dos poliedros virais aos cinco e dez dias após a infecção. Para a contagem viral utilizou-se cinco lagartas/tratamento, onde as lagartas foram submetidas ao processo de extração de vírus já descrito. Para filtragem foi utilizado 50 mL de água destilada e as amostras obtidas não passaram pelo processo de purificação. Utilizando micropipeta, uma alíquota da amostra foi colocada em Câmara de Neubauer, esta foi levada ao microscópio, para a contagem de cinco quadrantes no campo central, sendo os quatro das extremidades e o quadrante central. A estimativa da concentração viral, em OB. mL⁻¹, de cada um dos tratamentos, foi obtida pela somatória da contagem dos cinco quadrantes multiplicados por 50.000.

3.4.4 Morfologia do Intestino Médio de *S. Cosmioides* Infectada com *AfMNPV*

Foram utilizados mesmos três tratamentos do experimento de biologia, ou seja, a primeira passagem do vírus *AfMNPV* em *S. cosmioides* (T1), quarta (T2) e sétima (T3), nas concentrações $6,5 \times 10^5$, $8,28 \times 10^7$ e $5,575 \times 10^8$ OB . mL⁻¹, respectivamente, além da testemunha (Te).

Os tubos digestivos foram coletados com 24, 72 e 144 horas após infecção, sendo utilizado no estudo 20 tubos por tratamento, para cada tempo de infecção (LEVY, 2005).

Para a coleta, as larvas de *S. cosmioides* foram anestesiadas por resfriamento a -4°C (5 minutos) e dissecadas sob microscópio estereoscópio, com

solução salina para insetos (1,80 g de NaCl; 1,88g de KCl; 0,16 de CaCl; 0,004g de NaHCO₃ e água destilada-q.s.p 100 mL). As lagartas foram presas pelas extremidades, por alfinetes entomológicos, em placa de Petri preenchida com parplast. Utilizando tesoura oftalmológica, foi realizada uma incisão longitudinal na região ventral do inseto, do primeiro segmento torácico ao penúltimo segmento abdominal, com rebatimento lateral da cutícula.

Os tubos foram fixados em solução fixadora de Karnovsky (glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4,0% em tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) por seis horas. Após a fixação, o material foi lavado em solução de álcool etílico 70%, por três vezes (cinco minutos cada); desidratado em série crescente de álcool etílico (70, 90 e 100% por 20 minutos cada); pré-infiltrado em solução de resina pura (hidroxetilmetacrilato + ativador) + álcool etílico 100% (1:1) por 4 horas em temperatura ambiente; infiltrado em resina pura (kit de embebição Historesin® Leica) em temperatura ambiente por 24 horas; incluído em moldes apropriados de polietileno contendo solução de resina básica (hidroxetilmetacrilato) + ativador (dibenzoilperóxido) + endurecedor (dimetilsulfóxido) e mantido em temperatura ambiente até a polimerização da resina.

O material emblocado foi cortado com 5 µm de espessura, com navalha de tungstênio, em micrótomo rotativo e colocado em lâminas de vidro previamente limpas com álcool etílico-éter.

Os cortes foram hidratados (5 minutos) em água destilada; corados pela Hematoxilina de Harris (25 minutos); lavados em água corrente (10 minutos); corados com Eosina aquosa (30 minutos); lavados em água destilada (5 minutos); desidratados em álcool etílico 95% (5 minutos) e 100% (10 minutos); diafanizados em xilol (30 minutos); montados em bálsamo do Canadá. Após secagem, foram analisados em fotomicroscópio de luz do Departamento de Histologia da UEL.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Mortalidade e Tempo de Desenvolvimento de *S. cosmioides* Infectada com *AfMNPV*

Os resultados de mortalidade podem ser observados na Tabela 3.1. As lagartas começaram a morrer a partir do oitavo dia após infecção (DAI), porém, a

partir do quarto DAI, a maioria das lagartas dos tratamentos T2 e T3 diminuíram sua alimentação. A partir do sétimo DAI, essas lagartas deixaram de se alimentar ou apresentaram redução drástica no consumo da dieta. Juntamente com a redução da alimentação, o desenvolvimento dessas lagartas foi bastante afetado, como mostra a Figura 3.1. As lagartas do tratamento T1, ainda que não tenham mostrado diferença estatística de mortalidade em relação à testemunha, apresentaram taxa de deformação de adultos de 30%, contra nenhuma na testemunha. Os resultados da contagem de vírus estão expressos na Tabela 3.2.

Tabela 3.1 – Mortalidade acumulada (% \pm Erro Padrão) de lagartas *S. cosmioides* infectadas com diferentes passagens do baculovirus *AfMNPV*.

| Tratamentos | Mortalidade Acumulada (%) | | | | | |
|-------------|---------------------------|---|---------------------|---|---------------------|---|
| | 8DAI | | 10DAI | | 12DAI | |
| Testemunha | 0 (\pm 0,00) | a | 0 (\pm 0,00) | b | 0 (\pm 0,00) | b |
| T1 | 3,33 (\pm 0,18) | a | 8,33 (\pm 0,28) | b | 11,67 (\pm 0,32) | b |
| T2 | 6,67 (\pm 0,25) | a | 61,67 (\pm 0,49) | a | 93,33 (\pm 0,25) | a |
| T3 | 11,67 (\pm 0,32) | a | 50 (\pm 0,50) | a | 93,33 (\pm 0,25) | a |

* Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Student-Newman-Keuls a 5% de probabilidade de erro.

**T1 – Primeira passagem do vírus; T2 – Quarta passagem do vírus; T3 – Sétima passagem do vírus.

***DAI – Dias após infecção.

Figura 3.1 – Desenvolvimento de lagartas *S. cosmioides*, infectadas com diferentes passagens do baculovirus *AfMNPV*, com 10 dias após infecção. Test. – Testemunha; T1 – Primeira passagem do vírus; T2 – Quarta passagem do vírus e; T3 – Sétima passagem do vírus.

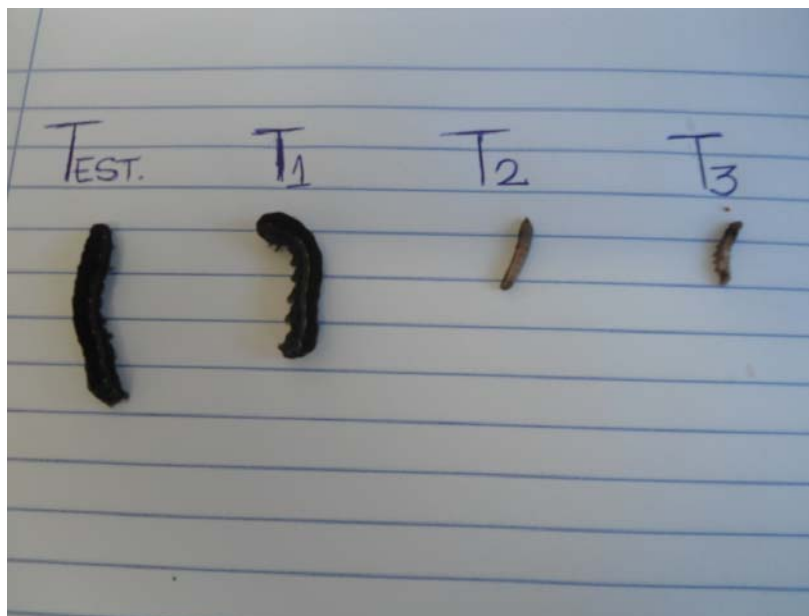


Tabela 3.2 – Número de poliedros virais (OB . mL⁻¹) após extração em lagartas *S. cosmioides* infectadas com diferentes passagens do baculovirus AfMNPV.

| DAI | Poliedros virais (OB . mL ⁻¹) | | |
|-----|---|------------------------|------------------------|
| | T1 | T2 | T3 |
| 5 | 2,50 x 10 ⁵ | 7,75 x 10 ⁶ | 7,00 x 10 ⁵ |
| 10 | 4,85 x 10 ⁶ | 3,14 x 10 ⁷ | 1,64 x 10 ⁷ |

*T1 – Primeira passagem do vírus; T2 – Quarta passagem do vírus; T3 – Sétima passagem do vírus.

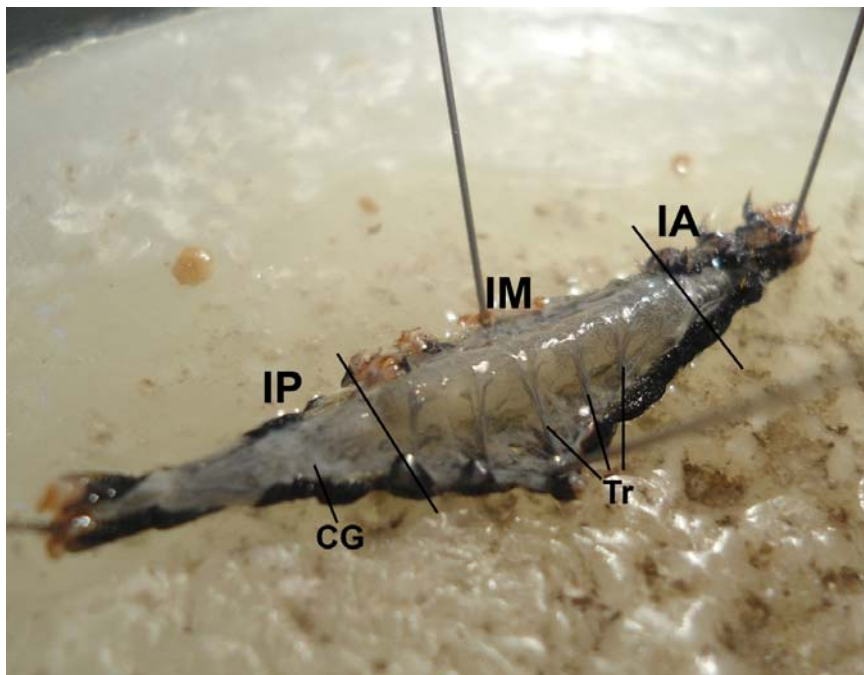
**DAI – Dias após infecção.

3.5.2 Morfologia

3.5.2.1 Morfologia do IM de lagartas de *S. cosmioides* não infectadas com AfMNPV (testemunha)

O tubo digestivo de *S. cosmioides* é longo, retilíneo, constituído por três regiões: intestino anterior (IA) ou estomodeu, intestino médio (IM) ou mesêntero e intestino posterior (IP) ou proctodeu (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Fotografia do tubo digestivo de *S. cosmioides*. IA – Intestino anterior; IM – Intestino médio; IP – Intestino posterior; Tr – Traqueia e; CG – Corpo gorduroso.



O IA tem início na boca e vai até a região posterior do tórax, ligando-se ao IM. O IM, maior porção do tubo digestivo, tanto em comprimento como em diâmetro, inicia-se na região posterior do tórax e vai até a região posterior do abdômen, onde se inicia o IP. O IP inicia-se na região posterior do abdômen e termina no reto. Nessa porção nota-se a inserção de túbulos de Malpighi bastante espessos. (Figura 3.2).

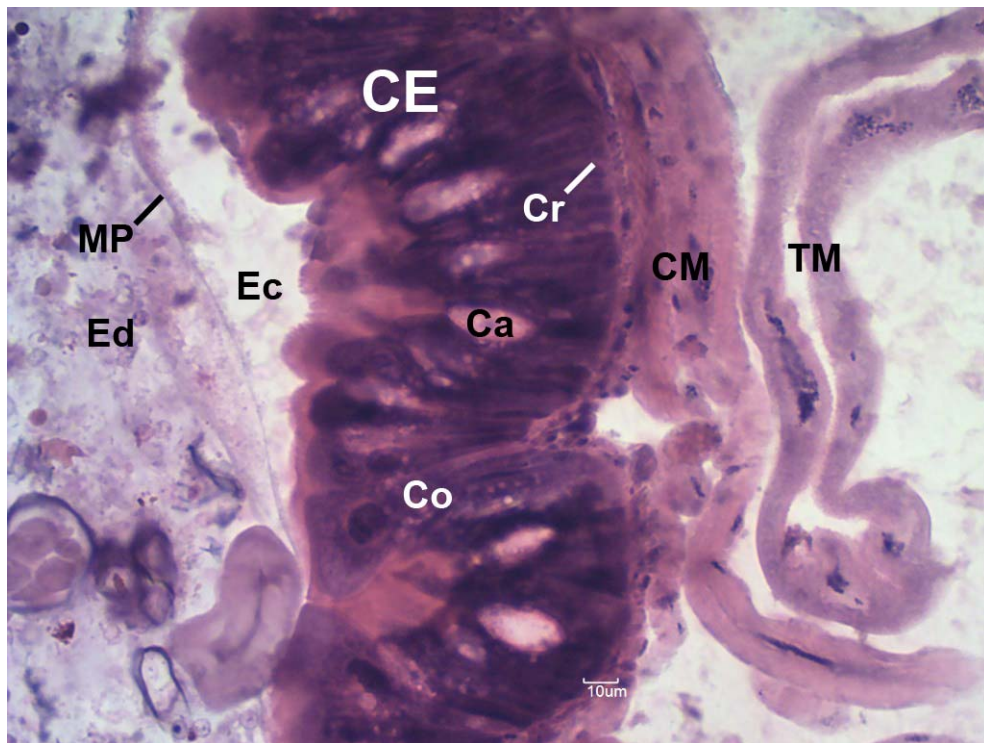
O IM, foco deste trabalho, histologicamente é constituído, da luz para a periferia, de membrana peritrófica (MP), camada epitelial (CE) e camada muscular (CM) (Figuras 3.3, 3.4A, 3.5A, 3.6A).

A MP é uma camada acelular logo acima do epitélio, que divide a luz do tubo digestivo em dois ambientes, o espaço endo (Ed) e ectoperitrófico (Ec). O Ed está em contato com o alimento e o separa do restante do IM, enquanto o Ec separa o epitélio da MP (Figura 3.3).

Abaixo da MP está a CE, que é formada por um epitélio pseudoestratificado, cilíndrico, com bordadura estriada, constituído de três tipos celulares: as células colunares (Co), caliciformes (Ca) e regenerativas (Cr). As Co, mais abundantes, são alongadas, com algumas protusões, bordadura estriada bastante desenvolvida, núcleo na região mediana a apical; citoplasma basófilo e pouco vacuolizado. As Ca são acidófilas, com cavidade em forma de cálice e núcleo basal. As Cr são células pequenas, basófilas, com núcleo central, encontradas em pouca quantidade, principalmente na região basal do epitélio (Figura 3.3).

A CM está constituída por feixes de fibras transversais (músculo circular), mais próximas da base da CE, que acompanham as dobras desta, e por feixes de fibras longitudinais (músculo longitudinal), que acompanham a CE em toda sua extensão (Figura 3.3).

Figura 3.3 – Fotomicrografia do IM de larvas de 4º instar de *S. cosmioides*. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular; TM – Túbulo de Malpighi. HE. Barra: 10 µm.



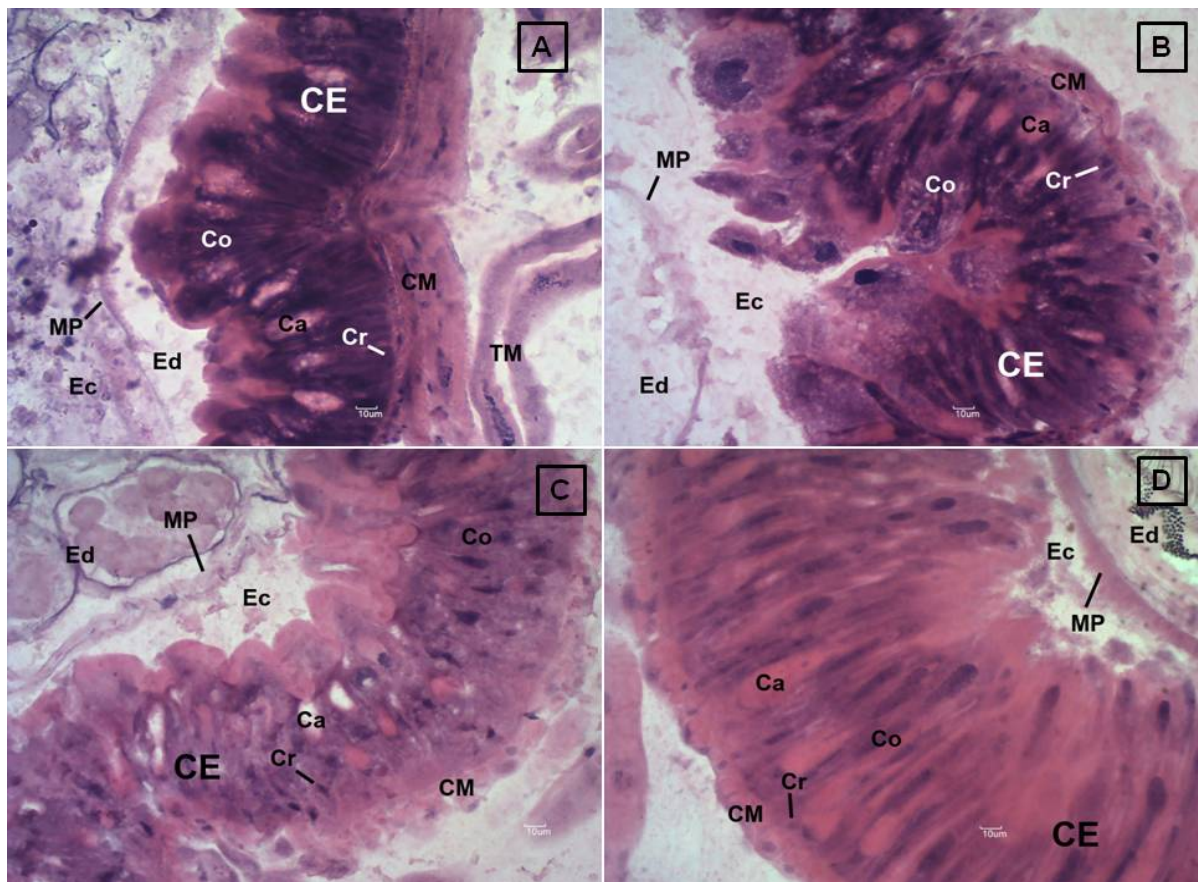
3.5.2.2 T1 - primeira passagem

Após 24 horas de infecção, comparando com a testemunha (Figura 3.4A), é possível observar a MP fragmentada e distante do epitélio. No epitélio observam-se células colunares mais alongadas, aparentemente em maior quantidade e com maior número de protusões. Também são observados diferentes estágios de maturação destas células, o citoplasma com mais vacuolização e bordadura estriada desorganizada. Ainda no epitélio, observa-se aumento no número de células regenerativas. A CM longitudinal apresenta-se fragmentada (Figura 3.4B).

Com 72 horas, o IM apresenta MP fragmentada. Nota-se o epitélio baixo, com células colunares apresentando bordadura estriada desorganizada, poucas protusões, citoplasma bastante vacuolizado e núcleo na região mediana. Também se observa aumento no número das células regenerativas. A CM está fragmentada (Figura 3.4C).

Após 144 horas, o IM assemelha-se muito à testemunha, com epitélio alto, porém, aparentemente, com mais células regenerativas (Figura 3.4D).

Figura 3.4 – Fotomicrografia do IM de larvas de *S. cosmioides* infectadas com a primeira passagem do AfMNPV. A: Testemunha; B: 24 horas; C: 72 horas e; D: 144 horas de infecção. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular. HE. Barra: 10 µm.



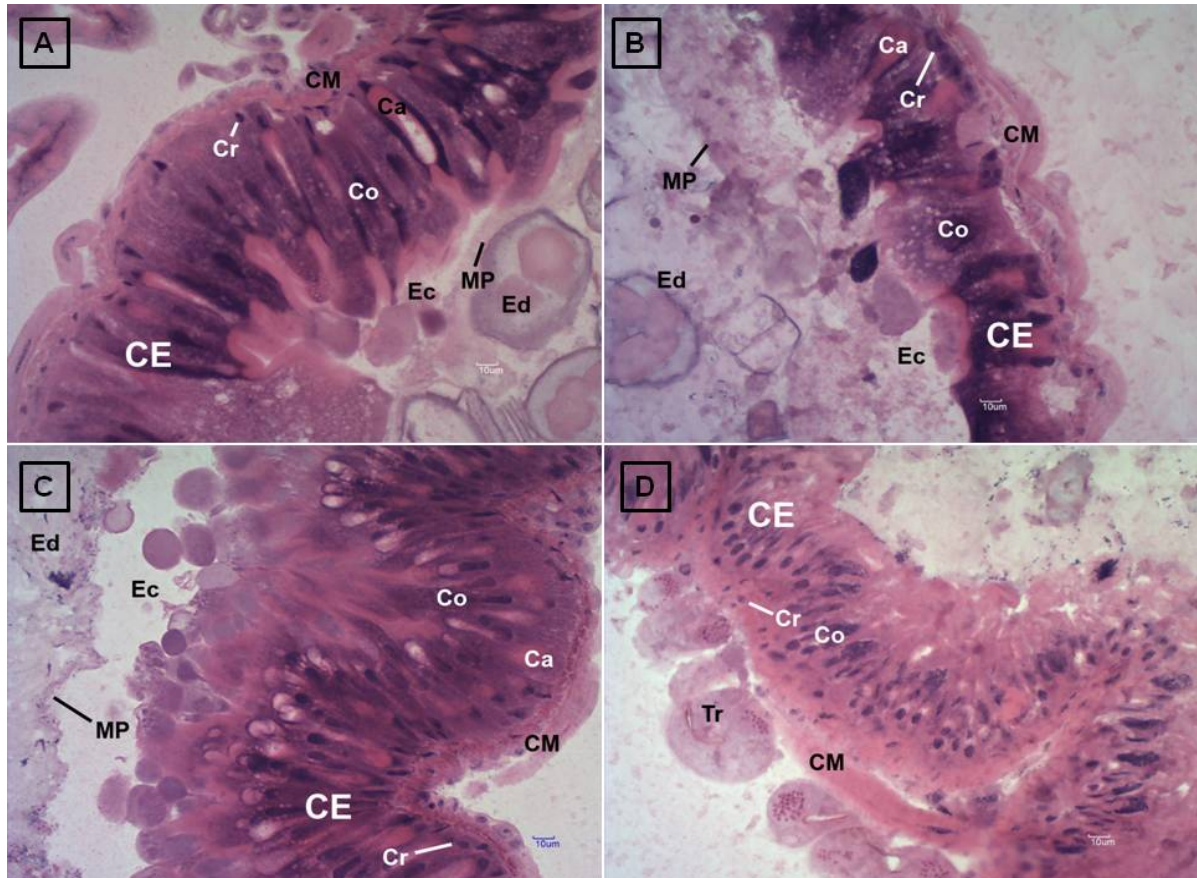
3.5.2.3 T2 - quarta passagem

Com 24 horas de infecção, observa-se a MP bastante fragmentada. O epitélio, aparentemente mais baixo em relação à testemunha e aos outros tempos de infecção, apresenta células colunares bastante alteradas, que são observadas aparentemente em número reduzido, com grandes vacúolos e praticamente não apresentam bordadura estriada. Também é possível observar células regenerativas em maior quantidade, em ninhos e hipertróficas. Apresenta CM mais espessa e distante, em relação à testemunha e com células hipertróficas (Figura 3.5B).

Em 72 horas, observa-se a MP fragmentada e distante do epitélio. As células colunares aparentemente estão em maior número que no tratamento anterior (com 24h de infecção), com bordadura estriada, muitas protusões, núcleo na região mediana a apical e citoplasma com vacúolos. Observa-se também visualmente aumento na quantidade de células regenerativas. A CM apresenta-se fragmentada (Figura 3.5C).

Em 144 horas, a MP está bastante fragmentada. O epitélio apresenta-se com grande desorganização celular e de difícil visualização das células. As células colunares apresenta-se com bordadura estriada desorganizada, citoplasma pouco vacuolizado e com núcleo na região mediana a apical. Observa-se visualmente um aumento muito grande no número de células regenerativas. A CM apresenta-se fragmentada. É possível observar, ainda, algumas traqueias com provável infecção (Figura 3.5D).

Figura 3.4 – Fotomicrografia do IM de larvas de *S. cosmioides* infectadas com a quarta passagem do AfMNPV. A: Testemunha; B: 24 horas; C: 72 horas e; D: 144 horas de infecção. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular; Traquéia (Tr). HE. Barra: 10 μ m.



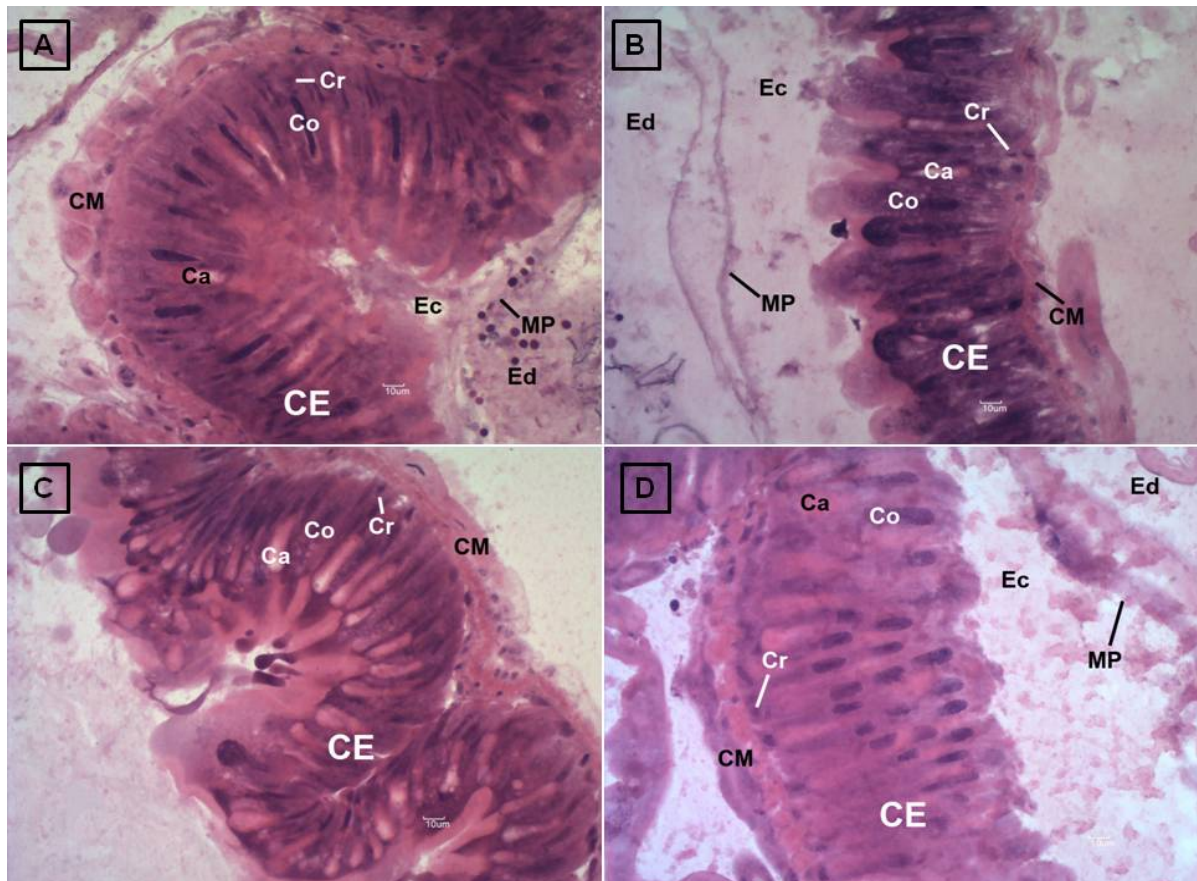
3.5.2.4 T3 - sétima passagem

Com 24 horas de infecção, é possível observar a MP distante do epitélio e pouco fragmentada. O epitélio é baixo, sendo que as Co apresentam citoplasma bastante vacuolizado, com bordadura estriada bastante visível e espessa, e núcleo na região mediana. Observa-se aparente aumento no número de células regenerativas. A CM apresenta-se fragmentada (Figura 3.6B).

Após 72 horas, observa-se a MP fragmentada e bastante distante do epitélio. O epitélio baixo, com células colunares com pouca bordadura estriada e desorganizada, muitas protusões, núcleo na região mediana a apical e citoplasma vacuolizado. Ainda observa-se aumento no número das células regenerativas. A CM longitudinal apresenta-se fragmentada (Figura 3.6C).

Com 144 horas, observa-se a MP pouco fragmentada e bastante distante do epitélio. No epitélio, ainda baixo, é possível observar células colunares em diferentes estágios de maturação, com pouca bordadura estriada e desorganizada, com núcleo, em sua maioria, na região apical e citoplasma com pouca vacuolização. Também se observa aumento no número das células regenerativas. A CM apresenta-se pouco fragmentada (Figura 3.6D).

Figura 3.6 – Fotomicrografia do IM de larvas de *S. cosmioides* infectadas com a sétima passagem do *A/MNPV*. A: Testemunha; B: 24 horas; C: 72 horas e; D: 144 horas de infecção. MP – Membrana peritrófica; Ed – Espaço endoperitrófico; Ec – Espaço ectoperitrófico; CE – Camada epitelial; Co – Célula colunar; Ca – Célula caliciforme; Cr – Célula regenerativa; CM – Camada muscular. HE. Barra: 10 µm.



3.6 DISCUSSÃO

Nos resultados de mortalidade e aspectos comportamentais, em relação ao desenvolvimento da testemunha e do tratamento T1, observamos que o período larval, juntamente com o período de pré-pupa, foi de 32 a 33 dias e 25 a 26

dias, respectivamente. Nossos resultados para a testemunha foram muito próximos aos encontrados por Bavaresco et al. (2003) que, em estudos laboratoriais com *S. cosmioides* observaram que o desenvolvimento larval, juntamente com o período de pré-pupa, somam 30,4 dias. Esta pequena variação temporal pode ser explicada pelo fato de que os autores trabalharam com folhas de soja “in natura” como fonte de alimentação, e neste trabalho nós utilizamos a dieta de *Anticarsia gemmatalis*, adaptada para a *S. cosmioides* (BAVARESCO, 2004), o que pode ter implicado em uma diferença na velocidade de desenvolvimento do inseto. Na ausência de uma dieta padronizada para essa espécie nós utilizamos da informação de Salvadori e Parra (1990), que propõem que uma das alternativas para definir um método de criação para uma determinada espécie consiste em trabalhar com dietas artificiais utilizadas para outros insetos, procurando ajustá-la para a espécie em questão.

Em relação à capacidade de locomoção e de alimentação das lagartas infectadas pelos tratamentos T2 e T3, nossos resultados são corroborados por Moscardi, Cunha e Moscardi (2011). Esses autores relataram que, em geral, lagartas infectadas por vírus perdem sua capacidade motora e de alimentação em cerca de quatro dias após a inoculação. No entanto, os resultados de mortalidade, para estes mesmos tratamentos, diferiram destes mesmos autores, que relataram que as lagartas, em geral, morrem de seis a dez dias após a infecção. No presente trabalho, com 10 dias após infecção, foi observada uma taxa de 61,67% de mortalidade. Esta diferença pode estar associada, provavelmente, ao AfMNPV, que se trata de um vírus não específico, onde há pouco conhecimento sobre a sua infecção em *S. cosmioides*. Este resultados ressalta a necessidade de mais estudos sobre a interação AfMNPV e *S. cosmioides*.

De modo geral, em conformidade com os resultados apresentados neste trabalho, podemos inferir que apesar da mortalidade iniciar-se mais tardiamente nos tratamentos T2 e T3 e no T1 as lagartas não apresentarem mortalidade expressiva, o fato das lagartas e mariposas apresentarem um retardo e/ou deformação durante o desenvolvimento, já demonstra um efeito positivo do vírus no combate a *S. cosmioides*.

Anatomicamente o tubo digestivo desta praga apresentou-se constituído por três regiões, o intestino anterior, intestino médio (IM – maior das regiões e foco deste trabalho) e intestino posterior, similarmente ao relatado em outras espécies de Lepidoptera por outros autores, como descrito em *A. gemmatalis*,

(LEVY, 2000; LEVY et al., 2008), *Diatraea saccharalis* (PINHEIRO; QUAGIO-GRASSIOTTO; GREGÓRIO, 2008), *Manduca sexta* e *Heliothis virescens* (HAKIM; BALDWIN; LOEB, 2001) e *Alabama argilacea* (SOUSA et al., 2010). Além destes autores, segundo Maranhão (1978) e Chapman (1998), o canal digestivo dos insetos, de modo geral, é formado por um tubo contínuo entre a boca e o ânus e que compreendem estas três regiões acima citadas.

Histologicamente o IM de larvas de *S. cosmioides* também foi a mesma descrita por outros autores em lepidopteros, como em *A. gemmatalis* (LEVY et al, 2004); *Manduca sexta* e *Heliothis virescens* (HAKIM; BALDWIN; LOEB, 2001), *Alabama argilaceae* (SOUSA et al., 2010). Além disso, parece ser muito semelhante ao de outras ordens de insetos, como em alguns dípteros, *Culex quinquefasciatus* (OKUDA et al., 2007) e *Dermatobia hominis* (EVANGELISTA; LEITE, 2003); em Hemiptera Heteroptera, *Brontocoris tabidus* (FIALHO et al., 2009); em Orthoptera, *Tropidacris collaris* (WANDERLEY-TEIXEIRA et al., 2006); em Hymenoptera, *Melipona quadrifasciata anthidioides* (MARTINS et al., 2006) entre outros.

A MP é uma estrutura acelular que separa o epitélio do conteúdo intestinal, protegendo-o contra abrasão e atuando como barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão (EISEMANN; BINNINGTON, 1994; TERRA, 2001). Wang e Granados (2001) citaram ainda que esta estrutura também funciona como uma barreira que dificulta ou impede a entrada de micro-organismos no epitélio. Toda essa funcionalidade da MP foi observada por nós neste trabalho, sendo que esta última fica bem caracterizada, uma vez que a MP fragmentada, observada nos tratamentos T1, T2 e T3, é um indício do início da infecção pelo vírus. Segundo Tellam (1996), Chapman (1998) e Terra (2001), a MP estimula os processos digestivos e protege a superfície do epitélio da abrasão mecânica e da ação de toxinas e patógenos. Uma vez rompida, os vírus passam a ter livre acesso para continuar a infecção e completar seu ciclo nas células do epitélio.

Na camada epitelial do IM, assim como descrito em outros lepidopteros, por Levy et al. (2004) e Pinheiro, Quagio-Grassiotto e Gregório (2008), é possível observar três tipos celulares, as células colunares, caliciformes e as regenerativas. Esses autores relataram também a existência ainda de um quarto tipo celular, as células endócrinas, porém pouco visíveis à microscopia de luz.

As células colunares são descritas como células digestivas ou principais e apresentam características morfológicas de células absorptivas, sendo

formadas por extensões citoplasmáticas, as microvilosidades (bordadura estriada), na sua região apical. São consideradas as mais numerosas no epitélio, facilmente identificáveis ao microscópio de luz, com citoplasma basófilo e bordadura estriada acidófila (LEVY et al., 2004; OKUDA et al., 2007; FIALHO et al., 2009;; SOUSA et al., 2009). Além disso, segundo Levy et al., (2004), porções citoplasmáticas podem ser liberadas em direção ao espaço ectoperitrófico. Estas também foram as características observadas em *S. comioides* neste trabalho. As células colunares apresentaram citoplasma basófilo, e neste aspecto qualitativo diferiram dos resultados observados por Correia et al. (2009) em *S. frugiperda*, que descreveram células colunares com citoplasma acidófilo no IM desta espécie.

As células caliciformes, também são semelhantes às de outros lepidópteros descritos na literatura (SANTOS et al, 1984; LEVY et al., 2004; PINHEIRO, QUAGIO-GRASSIOTTO e GREGÓRIO, 2008), apresentando cavidade em forma de cálice, chamada de câmara globosa e têm como função principal realizar o transporte de potássio da hemolinfa para o lúmen, mantendo a homeostase iônica e cooperando com as células colunares na absorção de metabólitos (CAVALCANTE e CRUZ-LANDIM 1999; KLOWDEN, 2002). Levy et al. (2004) relataram que, em *A. gemmatalis*, assim como observações aqui feitas em *S. cosmioides*, as células caliciformes apresentam uma grande região basal, citoplasma acidófilo e núcleo basal. Este tipo de célula apresenta uma grande cavidade em forma de cálice, delimitada por projeções citoplasmáticas. O ápice mostra projeções menores e mais finas, que são organizados na forma de um tipo de válvula que quase fecha a cavidade.

As células regenerativas se assemelham aos resultados encontrados por Levy et al. (2004) e Pinheiro, Quagio-Grassiotto e Gregório (2008). Esses autores relatam que, na camada epitelial de *A. gemmatalis* e *Diatraea saccharalis*, respectivamente, estas células foram encontradas isoladamente, emparelhadas ou em grupos na região basal do epitélio e são redondas ou ovais, com citoplasma fortemente basófilo.

Quando comparamos os IM das larvas infectadas com o AfMNPV, nos diferentes tratamentos com o IM das larvas testemunhas, nossos resultados mostram que as maiores alterações são observadas na camada epitelial do IM e se dá nas células colunares. Keddie, Aponte e Volkman (1989), estudando a infecção de AcMNPV em *Trichoplusia ni*, relataram que a infecção inicial deste vírus se dá

nas células colunares e regenerativas da camada epitelial do IM. Segundo Moscardi, Cunha e Moscardi (2011), a infecção primária inicia-se após a ingestão dos poliedros, os quais se dissolvem no IM da larva hospedeira, devido ao elevado pH, liberando os virions. Então estes se fundem às microvilosidades das células epiteliais do IM, liberando os nucleocapsídeos virais, que irão penetrar através dessas microvilosidades, liberando DNA viral através dos poros nucleares para a replicação viral. Esses autores ainda citam que estes nucleocapsídeos migram para a membrana basal ou também através da traqueia, assumindo a forma de vírus extracelulares, que serão responsáveis pela infecção secundária. Esta infecção pôde ser observada pela alteração de algumas traqueias do tratamento T2 com 144 horas de infecção.

As células regenerativas, observadas em maior quantidade nos três tratamentos e em todos os tempos de infecção, em relação à testemunha, segundo Lehane e Billingsley (1996), Chapman (1998) e Cavalcante e Cruz-Landim (1999), estão relacionadas principalmente com o processo de renovação epitelial, onde as células eliminadas são substituídas por células regenerativas. Engelhard e Volkman (1995) e Hoover et al. (2000) relataram que a capacidade de reposição celular conferida ao epitélio poderia diminuir a suscetibilidade ao vírus. Loeb et al. (2001) explicaram que a renovação do epitélio intestinal promove o descarte de células que possam estar infectadas pelo vírus, dificultando, desta forma, a replicação do vírus e o estabelecimento de uma infecção secundária no organismo. Neste contexto, o tratamento T1, em 144 horas após a infecção, como observado, parece ter combatido o vírus, sendo que as células regenerativas podem ter desempenhado um papel fundamental neste processo. Talvez pela alta virulência do vírus observada nos tratamentos T2 e T3, não foi possível observar este mesmo retrocesso da infecção nestes tratamentos.

A camada muscular, que reveste externamente o tubo digestivo, foi observada fragmentada em todos nos tratamentos T1, T2 e T3. Mesmo com pouco grau de fragmentação, indica forte alteração, pois mesmo que pontuais, essas camadas estavam desorganizadas, o que afeta, portanto, toda a arquitetura e funcionalidade do tubo digestivo. Estas alterações podem prejudicar o processo de digestão, as trocas metabólicas com a hemolinfa e os outros órgãos, como corpo gorduroso, alterando a integridade funcional do IM das larvas testadas, levando-as provavelmente não ter sucesso para completar seu desenvolvimento.

3.7 CONCLUSÕES

O múltiplo nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera*, AfMNPV, causa alterações comportamentais e alta mortalidade em larvas *S. cosmioides* na quarta e sétima passagens testadas, enquanto que a primeira passagem promove deformação em adultos de *S. cosmioides*, podendo inviabilizar a próxima geração.

Das três passagens do vírus AfMNPV testadas, a quarta e a sétima passagens são as mais eficazes para o controle de *S. cosmioides*, já que causam grandes alterações morfológicas no epitélio do IM, responsável pela digestão e absorção do alimento.

Assim, o uso do vírus AfMNPV como agente de controle biológico para esta praga apresenta-se promissor, entretanto estudos em campo e maior conhecimento sobre a relação vírus-inseto se fazem necessários para validar este fato.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, M. R.; GUIMARÃES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**. Londrina, v. 34, n. 1, p. 67-75, 2005.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biologia e exigências térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. 31: p.49-54. 2002.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRUTZMACHER, A. D.; RINGENBERG, R.; FORESTI, J. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 993-998, nov-dez, 2003.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; RINGENBERG, R.; FORESTI, J. Adequação de Uma Dieta Artificial Para a Criação de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em Laboratório. **Neotropical Entomology**. v. 33, n. 2, p. 155-161. 2004.
- BIANCO, R. **A cultura do milho no Paraná**. Londrina, IAPAR, Circular Técnica, 68. 1991. 290p.
- BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: LEHANE, M. J., BILLINGSLEY, P. F. (Eds). **Biology of the Insect Midgut**. London: Chapman & Hall, 1996.
- BLISSARD, G. W.; BLACK, B; CROOK, N. et al. Family baculoviridae. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L. et al. (Eds). **Virus taxonomy: seventh report of International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press. p.195-202, 2000.
- CARVALHO, S. M. Quantificação de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) em três cultivares de algodoeiro. **Dissertação de Mestrado**, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1981. 97p.
- CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.34, p. 1733-1761, 1999.
- CAVALCANTE, V. M.; CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. **Naturalia**. v. 24, p. 19-39. 1999.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: Structure and function**. 4ed. Cambridge: Havard United Press, 1998.
- CORREIA, A. A.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; OLIVEIRA, J. V. de. Morfologia do canal alimentar de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas tratadas com nim. **Neotropical entomology**. v. 38, n. 1, p. 83-91. 2009

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA DE MORAES, R. L. M; SERRÃO, J. E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adults worker bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Computational Biology**. v1, p. 29-40, 1996.

DESTÉFANO, R. H. R. Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos. 2003. Tese de doutorado. ESALQ/USP Piracicaba, 2003. 72p.

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

ENDO, Y.; NISHITSUTSUJI-UWO, J. Gut endocrine cells in insects: the ultrastructure of the gut endocrine cells of lepidopterous species. **Biomedical Research**. v.2, p. 270-280, 1981.

ENGELHARD, E. K.; VOLKMAN, L. E. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology**. v. 209, n. 2, p. 384–389. 1995.

EVANGELISTA, L. G.; LEITE, A. C. R. Midgut ultrastructure of the third instar of *Dermatobia hominis* (diptera: cuterebridae) based on transmission electron microscopy. **Journal of Medical Entomology**. v. 40, n. 2, p. 133-140. 2003.

FIALHO, M. do C. Q.; ZANUNCIO, J. C.; NEVES, C. A.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure of the digestive cells in the midgut of the predator *Brontocoris tabidus* (heteroptera: pentatomidae) after different feeding periods on prey and plants. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 102, p. 119-127. 2009.

FILHO, O. P.; DORVAL, A.; FILHO, B. E. **A entomofauna associada à Teca, *Tectona grandis* L. f. (Verbenaceae), no Estado de Mato Grosso**. Piracicaba: IPEF, 2006. 58p.

FLIPSEN, J. T. M.; MARTENS, J. W. M.; VAN OERS, M. M. et al. Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. **Virology**, v.208, p.328-335, 1995.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. (Ed). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, p.7-32. 1997.

GARCIA, J. J.; WANG, P.; ZHONG, J.; GRANADOS, R. R. Primary and continuous midgut cell cultures from *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cell Development Biology – Animal**. v.37, p. 353-359, 2001.

GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B.; CORSO, I. C.; FERREIRA, B. S. C.; VILLAS BOAS, G. L.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo. 1988. 44p.

GAZZONI, D. L.; YORINORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: EMBRAPA - SPI. 1995. 128p. (Manuais de Identificação de Pragas e Doenças, 1).

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. In situ localization of the heat-shock and histone proteins in honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with *Paenibacillus larvae*. **Cell Biology International**. v.23, p. 211-218, 1999.

GREGORC, A.; ELLIS, J. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.99, p. 200-207, 2011.

GÜL, N.; SAYAR, H.; ÖZSOY, N.; AYVALI, C. A study on endocrine cells in the midgut of *Agrotis segetum* (Denn. And Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Turkish Journal Zoology**. v.25, p. 193-197, 2001.

HAJÓS, J. P. Frequency of baculovirus recombination and baculovirus-mediated gene silencing in insects. Budapest, Hungary, 2000. **Doctoral Dissertation** – Structural biochemistry doctoral program- Eötvös Loránd University. 2000.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K. M.; LOEB, M. The role of stem cells in midgut growth and regeneration. **In vitro cellular & developmental biology – Animal**. v. 37, n. 6, p. 338-342. 2001.

HAKIM, R. S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Review of Entomology**. n. 55, p. 593-608, 2010.

HARVEY, W. R.; CIOFFI, M.; WOLFERSBERGER, M. G. Chemiosmotic potassium ion pump of insect epithelia. **American journal of Physiology**. 244, 163-175. 1983.

HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A. Baculovirus phylogeny and evolution. **Current Drug Targets**. n. 8, p. 1043–1050. 2007.

HOOVER, K.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. **Journal of Insect Physiology**. v. 46, n. 6, p. 999–1007. 2000.

HOSTETTER, D. L.; PUTTLER, B. A new broad host spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby), (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**. 20, p. 1480–1488. 1991.

ILLA-BOCHACA, I.; MONTUENGA, L. M. The regenerative nidi of the locust midgut as a model to study epithelial cell differentiation from stem cells. **Journal of Experimental Biology**. v. 209, p. 2215-2223, 2006.

INCEOGLU, A. B.; KAMITA, S. G.; HINTON, A. C. et al. Recombinant baculoviruses for insects control. **Pest Management Science**, v.57, p.981-987, 2001.

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

- KEDDIE, B. A.; APONTE, G. W.; VOLKMAN, L. E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. **Science**. v. 243, n. 4899, p. 1728-1730. 1989.
- KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. **The invertebrate pests of annual food crops in Central America**. London: Overseas Development Administration, 1984. 166p.
- KLEIN, U.; LÖFFELMANN, G.; WIECZOREC, H. The midgut as a model system for insect K⁺ transporting epithelia: immunocytochemical localization of a vacuolar-type H⁺ pump. **Journal of Experimental Biology**. v.161, p. 61-75, 1991.
- KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. New York, Academic Press, 2002. 415p.
- LALANNE-CASSOU, B.; SILVAIN, J. F.; MONTI, L.; MALOSSE, C. Mecanismos d'isolement reproducteur chez les especes du complexe neotropical *Spodoptera latifascia* – *S. cosmioides* – *S. descoinsi* (Lepidoptera: Noctuidae). Actes de la IV Conference Internationale Francophone d'Entomologie. Saint-Malo, France. **Anais da Sociedade Entomológica Francesa**. N. 35. P. 109-116. 1999.
- LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486p.
- LEVY, S. M. Morfologia do tubo digestivo de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) durante o desenvolvimento larval. 2000. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Campus de Botucatu, Botucatu.
- LEVY, S. M.; FALLEIROS, A. M. F.; GREGÓRIO, E. A.; ARREBOLA, N. R.; TOLEDO, L. A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. **Journal of Biology**. v.64, n.3, p. 1-6, 2004.
- LEVY, S. M. Susceptibilidade/Resistência de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) à infecção por nucleopoliedrovirus (AgMNPV): estudo morfológico e detecção de aglutininas no intestino médio. 2005. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista-UNESP. Campus de Botucatu, Botucatu.
- LOEB, M. J.; MARTIN, P. A. W.; NARANG, N.; HAKIM, R. S.; GOTO, S.; TAKEDA, M. Control of life, death, and differentiation in cultured midgut cells of the lepidopteran, *Heliothis virescens*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. v. 37, n. 6, p 348-352. 2001.
- MARANHÃO, Z. C. **Morfologia geral dos insetos**. São Paulo: Nobel. 1978. 514p.
- MARTINS, G. F.; NEVES, C. A.; CAMPOS, L. A. O.; SERRÃO, J. E. The regenerative cell during the metamorphosis in the midgut of bess. **Micron**. v. 37, p. 161-168, 2006.
- MORDUE (LUNTZ), A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: An update. **Journal of Insect Physiology**. n. 39: p. 903-924. 1993.

- MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. n. 29: p. 615-632. 2000.
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus para controle da lagarta da soja. In: ALVES, S. B., (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, p.188-202. 1986.
- MOSCARDI, F. Assessment of the applications of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual review of entomology**. 44: p. 257-289, 1999.
- MOSCARDI, F. A Nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian Soybeans. In: VINCENT, C.; GOETHEL, M. S.; LAZAROVITS, G. **Biological Control: A Global Perspective**. Oxfordshire, UK and Cambridge, USA: CAB International. p. 344–352. 2007.
- MOSCARDI, F.; CARVALHO, R. C. Z. Consumo e utilização de soja por *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) infectada, em diferentes estádios larvais, por seu vírus de poliedrose nuclear. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.22, n.2, p.267-280, jun.1993.
- MOSCARDI, F.; CUNHA, F.; MOSCARDI, M. L. Vírus entomopatogênicos como componentes de programas de manejo integrado de pragas. **Ciência & Ambiente**. n. 43. 2011.
- MOSCARDI, F.; MORALES, L.; SANTOS, B. The successful use of AgMNPV for the control of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL, 8.; INTERNATIONAL CONFERENCE ON BACILLUS THURINGIENSIS, 6.; ANNUAL MEETING OF THE SIP, 35.; **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: UEL: SIP, 2002. p. 86-91.
- NEVES, C. A.; GITIRANA, L. B.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure of the midgut endocrine cells *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **Brazilian Journal of Biology**. v. 63, p. 683-690, 2003.
- NORA, I.; REIS FILHO, W.; STUKER, H. Danos de lagartas em frutos e folhas de macieira: mudanças no agroecossistema ocasionam o surgimento de insetos indesejados nos pomares. **Agropecuária Catarinense**, v 2, p. 54-55, 1989.
- OHLSTEIN, B.; SPRADLING, A. Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. **Science**, v.315, p. 988-992, 2007.
- OKUDA, K.; ALMEIDA, F. de; MORTARA, R. A.; KRIEGER, H.; MARINOTTI, O.; BIJOVSKY, A. T. Cell death and regeneration in the midgut of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Journal of insect physiology**. v. 53, n. 12, p. 1307–1315. 2007.
- PALLI, S. R.; SOHI, S. S.; COOK, B. J.; BROWNRIGHT, A. J.; CAPUTO, G. F.; RETNAKARAN, A. RNA and protein-synthesis inhibitors induced apoptosis in a midgut cell line from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Journal of Insect Physiology**, n.42, p. 1061-1069, 1996.

- PANIZZI, A. R. Manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: CROCOMO, W.B. (Ed.). **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: UNESP-FUNEP, p. 293-321. 1990.
- PINHEIRO, D. O.; SILVA, R. J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GREGÓRIO, E. A. Morphometric study of the midgut epithelium in larvae of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, v.32, n.3, p. 453-459, 2003.
- PINHEIRO, D. O.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; GREGÓRIO, E. A. Morphological regional differences of epithelial cells along the midgut in *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Neotropical entomology**. v. 37, n. 4, p. 413-419. 2008.
- PISSINATI, A.; MIKAMI, A. Y.; FAGOTTI, D.; VENTURA, M. U. Ocorrência do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. em população de *Aracanthus* sp. (Coleoptera: Curculionidae) em feijoeiro. **Biotemas**. v. 22, n. 4, p.219-223. 2009.
- RAMALHO, F. S. Cotton pest management. Part 4. A Brazilian perspective. **Annual Review of Entomology**. 39: p.563-578. 1994.
- REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL. **Recomendações técnicas para a cultura de soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2000/2001**. Santa Maria, UFSM/CCR/Departamento de Defesa Fitossanitária. 2000. 148p.
- RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 481-507, 1998.
- RICHARDS, O. W.; DAVIES, R. G. **IMMS' General Textbook of Entomology**. 10th ed. London: Chapman & Hall, v.1, 1994. 418p.
- ROST-ROSZKOWSKA, M. M.; CHECHELSKA, A.; FRADCZAK, M.; SALITRA, K. Ultrastructure of two types of endocrine cells in the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* Hübner, 1808 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). **Zoologica Poloniae**, v.53, n. 1- 4, p. 27-35, 2008.
- SALVADORI, J. R.; PARRA, J. R. P. Seleção de dietas artificiais para *Pseudaletia sequax* (Lep.: Noctuidae). **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 25, p. 1701-1713. 1990.
- SANTOS, C. D., RIBEIRO, A. F., FERREIRA, C. & TERRA, W. R. The larval midgut of cassava hornworm (*Erinnyis ello*): ultrastructure, fluid flux and the secretory activity in relation to the organization of digestion. **Cell and tissue research**. v. 237, p. 565-574. 1984.
- SANTOS, W. J.; SANTOS, K. B.; SANTOS, R. B. Ocorrência, descrição e hábitos de *Spodoptera* spp. em algodoeiro no Brasil. **Anais do 4º Congresso brasileiro do algodão**. Goiânia. Campina Grande: Embrapa CNPA, 2003.
- SANTOS, W. J. Manejo de pragas do algodão com destaque para o Cerrado Brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.), Algodão no cerrado do Brasil. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. p. 403-452, 2007.

- SANTOS, K. B. dos; MENEGUIM, A. M.; SANTOS, W. J. dos; PEDRO M O J NEVES, P. M. O. J.; SANTOS, R. B. dos. Caracterização dos Danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a Estruturas de Algodoeiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, p. 626-631, 2010.
- SECCHI, V. A. Baculovírus, mais do que uma grande descoberta: uma revolucionária alternativa aos agrotóxicos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**. Porto Alegre, v.3, n.3, p. 49–54. 2002.
- SEHNAL, F.; ZITNAN, D. Midgut endocrine cells. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 55-85.
- SILVA, C. P.; LEMOS, F. J. A.; SILVA, J. R. da. Digestão em insetos. In: Tópicos avançados em entomologia molecular. 2012. Disponível em <<http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arhrolivro-1/capitulo-6-digestao-em-insetos/view>>, acesso em 22 de junho de 2012.
- SILVA, D. M.; ZIMMERMANN, A. O.; BUENO, A. F. MOSCARDI, F. Aspectos biológicos de *Spodoptera cosmioides* Walk. (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes plantas hospedeiras. **Resumos expandidos da VI Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**. Londrina: Embrapa Soja. n.328. p. 42-45, 2011.
- SILVAIN, J. F.; LALANNE-CASSOU, B. Distinction entre *Spodoptera latifascia* (Walker) et *Spodoptera cosmioides* (Walker), bona species (Lepidoptera: Noctuidae). **Revue française d'entomologie**. 19: p. 95-97. 1997.
- SNODGRASS, R. E. **Principles of insect morphology**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1993. 573p.
- SOSA-GOMEZ, D. R. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2005. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf>. Acesso em 15 de junho de 2012.
- SOUSA, M. E. C.; SANTOS, F. A. B.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; SIQUEIRA, H. A. A. de; ALVES, L. C.; TORRES, J. B. Histopathology and ultrastructure of midgut of *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) fed Bt-cotton. **Journal of insect physiology**. v. 56, n. 12, p. 1913–1919. 2010.
- SZEWCZYK, B.; RABALSKI, L.; KROL, E.; SIHLER, W.; SOUZA, M. L. Baculovirus biopesticides – a safe alternative to chemical protection of plants. **Journal of Biopesticides**. n. 2, p. 209–216. 2009.
- TELLAM, R. L. The peritrophic matrix. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (eds). **Biology of the Insect Midgut**, Chapman & Hall, London, 1996. p. 86-114.
- TERRA, W. R. Evolution of digestive system of insects. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.181-200, 1990.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative biochemistry and physiology**. 109, p. 1-62. 1994.

TERRA, W. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 47, p. 47–61. 2001.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. **Comprehensive molecular insect science**, Elsevier Oxford, v.4, p. 171-224, 2005.

TERRA, W. R.; COSTA, R. H.; FERREIRA, C. Plasma membranes from insect midgut cells. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.78, n.2, p. 255-269, 2006.

TODD, E. L.; POOLE, R.W. Keys and illustrations for the armyworm moths of the Noctuid Genus *Spodoptera* Guenée from the Western Hemisphere. **Annals of the Entomological Society of America**. n. 73, p. 722-738. 1980.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovírus. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 14p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 114).

VOLKMAN, L.E.; KEDDIE, B.A. Nuclear polyedrosis virus pathogenesis. **Seminars in Virology**, v.1, p. 249-256, 1990.

WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; CUNHA, F. M.; COSTA, M. K. C. M.; VEIGA, A. F. S. L.; OLIVEIRA, J. V. Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Brazilian Journal of Biology**. v. 66, n. 4, p. 1045-1049. 2006.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 47, n. 2, p. 110–118, 2001.

WIECZOREK, H. The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. **Journal of Experimental Biology**. v.172, p. 335-343, 1992.

WIGGLESWORTH, V. B. **The principles of insect physiology**. 6.ed. London: Methuen, 1965. 741p.

ZENKER, M. M.; SPECHT, A.; CORSEUIL, E. Estágios imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, vol. 24, n. 1, p.99-107. 2007.