

CARLOS EDUARDO COSTA PAIVA

MULTIPLICAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*
(SfMNPV) EM LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Paiva, Carlos Eduardo Costa, 1984-
P149m Multiplicação de *Spodoptera frugiperda multiple*
2013 *nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *Spodoptera*
frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) / Carlos Eduardo Costa
Paiva. – Viçosa, MG, 2013.
xi, 63f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanúncio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Spodoptera frugiperda* - Controle biológico.
 2. Baculovirus. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia.
- II. Título.

CDD 22 ed. 632.78

CARLOS EDUARDO COSTA PAIVA

MULTIPLICAÇÃO DE *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*
(SfMNPV) EM LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2013.

Carlos Siqueyuki Sedyama

Eugênio Eduardo de Oliveira

Fernando Hercos Valicente
(Co-orientador)

José Cola Zanuncio
(Orientador)

Dedico

às pessoas mais importantes da minha vida e que mais amo: meus pais Zezinho e Lucy;
meus irmãos Toninho, Paulo e Maria Cristina; minha esposa Carla; e, meus sobrinhos
Juninho, Camila e Júlia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde para concluir mais esta etapa e capacidade para lutar por meus objetivos.

Ao meu pai Zezinho e à minha mãe Lucy, pelo amor incondicional, por sempre estarem ao meu lado, incentivando, torcendo pelo meu sucesso e por terem se esforçado ao máximo para proporcionar aos filhos a oportunidade de estudar.

À minha amada esposa Carla, pelo amor, carinho, paciência, incentivo e companheirismo, mesmo nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos e melhores amigos, Toninho, Paulo e Maria Cristina que sempre estiveram e sempre estarão ao meu lado.

Aos meus sobrinhos Juninho, Camila e Júlia, pelo carinho e pela capacidade de me alegrar por meio de um simples sorriso espontâneo e inocente.

Aos meus avós paternos Vicente (*in memoriam*) e Clara e aos avós maternos Artêmio (*in memoriam*) e Hilda (*in memoriam*), pelo amor e pelas orações.

Ao meu “irmão” Cadu, pela amizade e apoio. Aos seus pais José Manoel e Carmem, pessoas maravilhosas, que me tratam como um filho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitotecnia pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao meu orientador José Cola Zanuncio, pela oportunidade concedida, ainda na graduação, pelas sugestões, auxílio e por ter acreditado no meu trabalho.

Ao meu co-orientador Fernando Hercos Valicente, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com baculovírus e acreditado em meu trabalho. Uma pessoa a quem no início eu admirava pelo extenso currículo como pesquisador e a quem hoje admiro pela humildade, simplicidade, amizade, competência, dedicação à família e ao trabalho.

Aos co-orientadores José Eduardo Serrão e Teresinha Vinha Zanuncio pelas sugestões e apoio na elaboração da dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFV, em especial ao José Milton, Rosenilson, Isabel, Marcus, Fabrício e Sr. Moacir, pela disponibilidade, boa vontade, ajuda e pelos ótimos conselhos.

Aos amigos de Viçosa, especialmente os “companheiros de longa data”, Tianinho, Gilmar, Aleron, Ricardo, Nem Capelão (*in memoriam*), Luizinho Capelão e Tiaguinho.

Aos meus tios, primos e cunhadas, sempre presentes em minha vida.

Ao meu tio Chico Araújo, por ser um grande amigo, uma pessoa exemplar e um ótimo conselheiro. Agradeço, também, minha tia Rita pelo carinho e apoio.

Aos amigos do Mato Grosso do Sul e da Acadepol, especialmente o Cairis (e a sua família), o Délcio e o Junior (e a sua família), pela amizade, por serem pessoas maravilhosas e acolhedoras.

Aos amigos da Embrapa Milho e Sorgo, Celsinho, Nate, Dedé, Alan, Raquel, Amanda, Isabele, Edgar e Rosane, com quem convivi em um ambiente de trabalho agradável e prazeroso. Especialmente ao Edmar, pela amizade sincera e ajuda durante todas as etapas deste trabalho, comportando-se como um “orientador” em vários momentos.

Aos amigos do Laboratório de Análises de Sementes do CCA/UFES, pelo incentivo, amizade e pela convivência agradável e divertida no ambiente de trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma na elaboração e execução deste trabalho e a todos os que torcem pelo meu sucesso.

BIOGRAFIA

CARLOS EDUARDO COSTA PAIVA, filho de José das Graças Silva Paiva e Lucy de Souza Costa Paiva, nasceu em Viçosa, estado de Minas Gerais, Brasil, no dia 16 de março de 1984. Em 2002 ingressou no curso de graduação em Agronomia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em março de 2007. De agosto de 2005 a fevereiro de 2007 foi estagiário e bolsista no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da UFV e de setembro de 2007 a dezembro de 2008 foi estagiário e bolsista no Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo. No início de 2009 foi aprovado no concurso público da Polícia Civil do Estado de Mato Grosso do Sul (MS) e no mesmo ano iniciou o treinamento na Academia de Polícia de MS. Trabalhou como escrivão de polícia de outubro de 2009 até junho de 2011. Em agosto do mesmo ano ingressou no Programa de Mestrado em Fitotecnia na Universidade Federal de Viçosa defendendo a dissertação em julho de 2013. Em outubro de 2012 foi aprovado no concurso público da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), para o cargo de engenheiro agrônomo, e desde então trabalha no Laboratório de Análises de Sementes, no Centro de Ciências Agrárias da UFES em Alegre, Espírito Santo.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
Introdução Geral.....	1
Objetivos	4
Referências.....	5
CAPÍTULO 1. O período de inoculação e as temperaturas de inoculação e incubação de <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV) interferem na mortalidade de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> e na produção viral	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
Introdução	10
Material e Métodos	12
Resultados e Discussão	14
Agradecimentos.....	16
Referências.....	16
CAPÍTULO 2. Multiplicação de <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV) em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) de diferentes idades.....	21
RESUMO	22
ABSTRACT	22
Introdução	23
Material e Métodos	25
Resultados	29
Discussão	32
Agradecimentos.....	36
Referências.....	36

CAPÍTULO 3. Peso de lagartas mortas e produção de poliedros de <i>Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus</i> (SfMNPV) são influenciados pela idade de inoculação e concentração da solução viral	46
RESUMO	47
ABSTRACT	47
Introdução	48
Material e Métodos	50
Resultados e Discussão	52
Agradecimentos.....	54
Referências.....	55
Conclusões Gerais.....	63

RESUMO

PAIVA, Carlos Eduardo Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Multiplicação de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** Orientador: José Cola Zanuncio. Co-orientadores: Fernando Hercos Valicente, José Eduardo Serrão e Teresinha Vinha Zanuncio.

A utilização de bioinseticida a base de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) tem potencial para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), porém seu uso em larga escala depende de se maximizar sua produção a partir de larvas infectadas. A temperatura adequada, o tempo de exposição ao patógeno, a idade na qual as lagartas são inoculadas com o vírus, a concentração da suspensão viral e o isolado são importantes para a replicação viral. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Insetos do Centro Nacional de Pesquisas com Milho e Sorgo (CNPMS) da Embrapa em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. O primeiro estudo objetivou verificar o efeito das temperaturas de inoculação e incubação (multiplicação) na produção viral e do tempo de inoculação. O canibalismo entre as lagartas de *S. frugiperda* foi semelhante (em torno de 4%) nos diferentes tempos e temperaturas de inoculação do baculovírus. O tempo de inoculação não influenciou a mortalidade e a produção viral. A mortalidade de lagartas foi maior a 28 °C, porém, a produção de corpos poliédricos de inclusão (PIB) por lagarta foi maior a 25 °C, o que reduz o número de lagartas para a produção de uma dose de baculovírus formulado (dose para um hectare). A produção total de poliedros, nas diferentes temperaturas de inoculação, foi semelhante, mas a incubação a 25 °C produziu uma maior quantidade de vírus (24,56 x 10⁹ PIB a 25 °C e 20,81 x 10⁹ PIB a 28 °C). No segundo estudo as concentrações letais de SfMNPV foram determinadas para lagartas de seis, sete e oito dias e a melhor idade para se realizar a inoculação de SfMNPV visando a maximização de sua produção. As concentrações letais médias (CL₅₀) variaram de 1,89 x 10⁵ a 5,01 x 10⁶ PIB/mL. A CL₅₀ do isolado 6 (I6) foi maior que a do isolado 19 (I19) para lagartas de seis dias de idade, semelhante para lagartas de sete dias e menor para aquelas de oito dias. A produção total de poliedros foi maior com lagartas inoculadas aos oito dias de idade com o I6. As maiores produções virais foram obtidas nas concentrações acima de 1,00 x 10⁷ PIB/mL. A produção de PIB/lagarta foi maior com o I6 em lagartas de oito dias, o que reduz o número de lagartas para a produção de uma dose de baculovírus formulado (dose para um hectare). O terceiro

estudo objetivou verificar o parâmetro de produção mais correlacionado com a produção viral, a massa, ou o número de lagartas mortas por SfMNPV e determinar os parâmetros peso equivalente por hectare (massa estimada de lagartas necessárias para obtenção de uma dose de baculovírus formulado, tendo como base a aplicação de $2,00 \times 10^{11}$ PIB/ha) e peso por lagarta morta devido à infecção pelo I6 de SfMNPV. Todas as correlações foram positivas e altamente significativas para o peso total ($r= 0,958$, $n= 60$ e $P < 0,0001$), mesmo quando consideradas dentro de cada idade ou concentração, separadamente. A correlação para o número de lagartas foi, também, significativa considerando-se o total de tratamentos ($r= 0,723$, $n= 60$ e $P < 0,0001$) e por idade. Por concentração, foi significativa apenas nas concentrações de $1,00 \times 10^6$ PIB/mL ($r= 0,643$, $n= 12$, $P < 0,0242$) e $1,00 \times 10^8$ PIB/mL ($r= 0,657$, $n= 12$, $P < 0,0202$), porém, as correlações foram menos fortes. Lagartas de *S. frugiperda*, mortas por SfMNPV, inoculadas aos oito dias de idade apresentaram a maior massa média. O peso equivalente de SfMNPV a ser utilizado por hectare não diferiu entre as concentrações de suspensões virais. A produção viral de baculovírus, para o controle de *S. frugiperda*, deve ser feita com o isolado I6 em lagartas de oito dias na temperatura de 25 °C. O peso de lagartas mortas por baculovírus pode ser considerado um parâmetro mais confiável que o número de lagartas para a produção de um produto comercial a base de SfMNPV, devido a correlação mais forte e significativa com a produção total de poliedros.

ABSTRACT

PAIVA, Carlos Eduardo Costa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Multiplication of *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae).** Adviser: José Cola Zanuncio. Co-advisers: Fernando Hercos Valicente, José Eduardo Serrão and Teresinha Vinha Zanuncio.

The use of *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) based biopesticide has the potential to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), but large scale production depends on maximizing virus production from infected larvae. The suitable temperature, time of exposure to the pathogen, the age at which the larvae are inoculated with the virus, the viral solution concentration and isolate used are important for viral replication. The experiments were performed in the Biological Control Laboratory of Insects at Embrapa Maize and Sorghum Research Center (CNPMS), located in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil. The first study aimed to verify the effect of inoculation and incubation (multiplication) temperatures in viral production and the inoculation period. Cannibalism among the larvae of *S. frugiperda* was similar (around 4%) in different periods and temperatures baculovirus inoculation. The inoculation period didn't influence mortality and viral production. The higher mortalities of larvae were achieved at 28 °C, however, the production of polyhedral inclusion bodies (PIB) per larvae were higher at 25 °C, reducing the number of larvae needed for the production of a dose of baculovirus expressed larval equivalent (LE/ha). The total production of polyhedral inoculation at the different temperatures was similar, but the incubation at 25 °C produced a larger amount of virus (24.56 x 10⁹ PIB at 25 °C and 20.81 x 10⁹ PIB at 28 °C). In the second study, the lethal concentrations were determined for larvae SfMNPV six, seven and eight days and the best age to perform the inoculation of SfMNPV order to maximize viral production. The lethal concentration (LC₅₀) ranged from 1.89 x 10⁵ to 5.01 x 10⁶ PIB/mL. The LC₅₀ I6 was higher than the I19 to six days old larvae of similar for seven days and for those less than eight days. Total polyhedra production was higher with eight days old larvae for the isolate I6. The highest yields were obtained in viral concentrations above 1.00 x 10⁷ PIB/mL. The production of PIB/larvae increased when I6 was used in eight days old larvae, which reduces the number of larvae needed to achieve dose of baculovirus (LE/ha). The third study aimed to verify the production parameter which is more correlated with viral production, mass, or the number of dead larvae by SfMNPV and

also determine the parameters weight equivalent per hectare (estimated larval weight necessary to achieve a dose of baculovirus, based on the application of 2.00×10^{11} PIB/ha) and larvae dead weight due to SfMNPV infection caused by I6. All correlations were positive and significant for the total weight ($r= 0.958$, $n= 60$, $P < 0.0001$) even when considered in each age or concentration separately. For the number of tracks the correlation was also significant when considering the amount of treatment ($r= 0.723$, $n= 60$, $P < 0.0001$) within each age group and in each concentration was significant only at concentrations of 1.00×10^6 PIB/mL ($r= 0.643$, $n= 12$, $P < 0.0242$) and 1.00×10^8 ($r= 0.657$, $n= 12$, $P < 0.0202$), but the correlations are less strong. Larvae of *S. frugiperda*, killed by SfMNPV inoculated at eight days old had the highest average mass. The equivalent weight per hectare didn't differ among different viral concentrations of solutions used. The maximization of viral production baculovirus for control of *S. frugiperda* should be made with the isolated I6 in larvae eight days old maintained at a temperature of 25 °C and the weight of dead larvae by baculoviruses can be considered a more reliable parameter than the number of larvae to produce a commercial product based SfMNPV in view that shows strong and significant correlation with the total polyhedra production.

1. Introdução Geral

A relevância da cultura do milho se deve às suas diversas formas de aproveitamento, desde a fabricação de ração para animais, até as indústrias, alimentícia e de tecnologia, como a utilização do amido de milho para a confecção de plástico biodegradável. O Brasil apresenta condições climáticas favoráveis para duas safras por ano dessa cultura. As estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) para a área semeada com milho na primeira safra (2011/2012) foi de 7,56 milhões de hectares com produtividade de 4.481 kg/ha e produção na primeira safra de 33,87 milhões de toneladas. A Conab estimou que em 2012 a produção foi de 72,98 milhões de toneladas nas duas safras (Conab, 2013). A produção dos Estados Unidos no mesmo período foi estimada em 375,00 milhões de toneladas (Conab, 2012), evidenciando a importância da cultura do milho no contexto mundial.

O ataque de pragas é uma ameaça à produção mundial de alimentos. Os insetos, que representam o maior grupo de organismos da Terra, destacam-se entre as pragas agrícolas. O número estimado de espécies de insetos no mundo é de 4 a 10 milhões, com mais de 400 mil espécies fitófagas, incluindo cerca de 9000 espécies que atacam culturas agrícolas, mas apenas cerca de 5% são consideradas pragas (Schoonhoven et al., 2005). Perdas na colheita provocadas por herbivoria chegam a 13% nos EUA e a cerca de 15%, ou mais, no mundo apesar do uso intensivo de inseticidas sintéticos (Schoonhoven et al., 2005).

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a principal praga do milho no Brasil. Essa praga pode reduzir a produção de grãos de 18,4 a 57,6%, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, época de cultivo e genótipo (Cruz et al., 1999; Cruz e Turpin, 1982).

O controle da lagarta-do-cartucho e de outras pragas é feito, principalmente, com produtos químicos sintéticos, o que aumenta os custos de produção. A sociedade questiona os problemas do mau uso dos inseticidas químicos, como a segurança do aplicador, do ambiente e da saúde humana, cobrando a redução no uso destes produtos. Inseticidas biológicos para o controle de pragas têm sido mais usados em diferentes culturas. A bactéria *Bacillus thuringiensis* e o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV), conhecido como baculovírus *spodoptera* (Barreto et

al., 2005; Valicente e Costa, 1995), se destacam na cultura do milho para o controle desse inseto.

Pertencentes à família Baculoviridae, os baculovírus contêm DNA circular de fita dupla como material genético e são caracterizados pelos nucleocapsídeos de vírus infeccioso existentes dentro de uma matriz protéica ajudando-o a sobreviver fora de seu hospedeiro (King e Possee, 1992).

A família Baculoviridae era dividida em dois gêneros: os *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) e os *Granulovirus* (GVs), baseado no tamanho das partículas virais e natureza da proteína do corpo de oclusão (King e Possee, 1992). Uma alteração na classificação dos gêneros NPV e GV, baseada na especificidade do hospedeiro, foi proposta e através de evidências filogenéticas, a família Baculoviridae foi dividida em quatro gêneros, *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* (Jehle et al. 2006). Esta divisão foi aceita pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus e, desde então, SfMNPV passou a integrar o gênero *Alphabaculovirus*, que inclui todos os NPVs de lepidópteros formadores dos fenótipos virais BV (*budded virus*) e ODV (*occlusion-derived virus*).

O processo de infecção por baculovírus apresenta uma sequência de etapas desde a ingestão do vírus até a morte: o progresso da infecção debilita o inseto, comprometendo sua capacidade motora e de alimentação; lagartas infectadas se deslocam para as partes superiores da planta hospedeira e morrem após determinado tempo; o inseto apresenta corpo com aspecto opaco (branco-leitoso) em relação à lagarta sadia; e, após alguns dias, dependendo da espécie hospedeira e do vírus, ocorre o rompimento do corpo do inseto liberando grande quantidade de vírus no ambiente (Moscardi, 1999). Lagartas infectadas por SfMNPV apresentam coloração rosada, em vez da coloração branco-leitosa. Além disso, o crescimento das lagartas infectadas pode diminuir pela redução da alimentação (Federici, 1997, 1999).

O maior programa mundial de uso de vírus de insetos foi iniciado na década de 1980 com *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Ao final da década de 1990, mais de dois milhões de hectares de soja haviam sido tratados com esse bioinseticida no Brasil e, para cada 1 milhão de hectares tratados com o vírus, cerca de 1,6 milhões de litros de inseticidas sintéticos convencionais deixaram de ser aplicados anualmente (Moscardi, 1999; Ribeiro et al., 1998).

Um vírus de granulose tem sido testado para o controle do mandarová na cultura da mandioca e da seringueira e outros vírus com potencial de uso foram isolados de pragas de importantes culturas como a cana-de-açúcar, algodão, trigo, arroz, frutíferas, hortaliças, pastagens e florestais, conforme revisado por Ribeiro et al. (1998).

Os trabalhos com o baculovírus para o controle da lagarta-do-cartucho na Embrapa Milho e Sorgo foram iniciados em 1984 (Valicente e Tuelher, 2009). Um levantamento dos principais inimigos naturais de *S. frugiperda* em diversas regiões produtoras de milho do estado de Minas Gerais, dentre as quais o Sul de Minas, o Vale do Rio Doce e o Alto Paranaíba (Valicente, 1989). Entre 1984 e 1989, foram coletadas mais de 14.000 lagartas, muitas com parasitóides das ordens Diptera e Hymenoptera, além daquelas que morreram com sintoma típico de vírus. Um levantamento semelhante no estado do Paraná mostrou um alto índice de lagartas parasitadas e mortas por vírus (Valicente e Barreto, 1999).

O banco de baculovírus do Centro Nacional de Pesquisas com Milho e Sorgo (CNPMS) da Embrapa em Sete Lagoas, Minas Gerais, conta com 22 isolados de diversas regiões do Brasil. Estes isolados foram estudados, caracterizados e sua eficiência avaliada em relação à lagarta-do-cartucho (Barreto et al., 2005). O isolado 19, com seu genoma sequenciado (Wolff et al., 2008) e o isolado 6, que não provoca o rompimento imediato das lagartas de *S. frugiperda* logo após causar sua morte (Valicente et al., 2008) são aqueles mais estudados e eficientes para o controle da lagarta-do-cartucho.

O SfMNPV é um vírus de poliedrose eficiente contra a lagarta-do-cartucho (Barreto et al., 2005; Valicente e Costa, 1995) e, por sua alta especificidade e ocorrência natural, como outros baculovírus, é um ótimo candidato para programas de manejo integrado de pragas (Moscardi, 1999; Tanada e Kaya, 1993).

O controle biológico com vírus entomopatogênicos como estratégia no manejo integrado de pragas, pode ser uma solução duradoura e efetiva protegendo o meio ambiente sem impacto sobre insetos benéficos e vertebrados, incluindo o homem. O reconhecimento de que os baculovírus são ambientalmente seguros aumentou o potencial dos mesmos como alternativa aos inseticidas químicos (Barreto et al., 2005). A segurança de vírus entomopatogênicos para o homem e outros animais vertebrados tem sido, bastante, estudada. Diversas espécies de vertebrados, incluindo o homem, foram expostas a várias espécies de baculovírus, em testes toxicológicos, os quais

demonstraram a segurança ambiental dos inseticidas microbianos à base de vírus, conforme revisado por Lapointe et al. (2012).

O esforço para tornar corriqueiro o uso de produtos comerciais à base de baculovírus uma realidade para os produtores rurais, tem sido muito grande. No entanto, a produção de baculovírus precisa de insetos hospedeiros criados em laboratório alimentados com dieta artificial, geralmente resultando em um produto final de custo elevado, muitas vezes não competitivo com produtos químicos disponíveis (Moscardi, 1999; Moscardi e Souza, 2002). Por isso, a importância de se estudar os fatores que afetam a multiplicação do vírus nos hospedeiros, como o tempo de exposição ao patógeno, a temperatura de inoculação, a temperatura de multiplicação e a idade ideal de inoculação do vírus. Também é importante determinar se a utilização de um isolado que não provoca o rompimento imediato da lagarta após sua morte, reduziria as perdas de poliedros virais durante a coleta das lagartas que precede a formulação do bioinseticida.

A maximização da obtenção de vírus a partir de lagartas infectadas é necessária para viabilizar a produção em larga escala de um bioinseticida a base de baculovírus.

Esta dissertação foi escrita de acordo com normas da revista *Journal of Invertebrate Pathology* com adaptações para as normas da Universidade Federal de Viçosa.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Melhorar o processo de multiplicação de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em lagartas para produção em larga escala através da melhoria de fatores que influenciam o processo de infecção e a produção de vírus: a temperatura, o período de exposição ao patógeno, a idade do hospedeiro e o isolado viral. O número e peso de lagartas foram, também, estudados visando padronizar a produção desse vírus para se obter lotes homogêneos do produto formulado.

2.2. Objetivos específicos

Determinar o melhor período de inoculação, a melhor temperatura de inoculação e a de incubação para maximizar a produção viral em larga escala com o isolado 6.

Determinar a concentração letal dos isolados 6 e 19 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) infectando lagartas *S. frugiperda* com seis, sete e oito dias de idade.

Comparar a produção total de poliedros (PIB total), de poliedros por lagarta morta por baculovírus (PIB/lag) e lagarta equivalente por hectare (LE) dos isolados 6 e 19.

Verificar o parâmetro de produção mais correlacionado com a produção viral, a massa, ou o número de lagartas mortas por SfMNPV.

Determinar o peso equivalente (PE) e o peso por lagarta morta (peso/lag) infectada pelo isolado 6 de SfMNPV.

Referências

- Barreto, M.R., Guimarães, C.T., Teixeira, F.F., Paiva, E., Valicente, F.H., 2005. Effect of Baculovirus *spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. *Neotrop. Entomol.* 34 (1), 67-75.
- Companhia Nacional de Abastecimento, 2012. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, primeiro levantamento, outubro 2012. Brasília: Conab, pp. 22-26.
- Companhia Nacional de Abastecimento, 2013. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quinto levantamento, fevereiro 2013. Brasília: Conab, pp. 19-22.
- Cruz, I., Figueiredo, M.L.C., Oliveira, A.C., Vasconcelos, C.A., 1999. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. *Int. J. Pest Manag.* 45 (4), 293-296.
- Cruz, I., Turpin, F.T., 1982. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura do milho. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 17 (3), 355-359.
- Federici, B.A., 1997. Baculovirus pathogenesis. In: Miller, L.K. (Ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press. New York, pp. 33-59.
- Federici, B.A., 1999. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.), *Methods in biotechnology: Biopesticides, use and delivery*. Humana Press, Totowa, 5, pp. 301-320.
- Jehle, J.A., Blissard, G.W., Bonning, B.C., Cory, J.S., Herniou, E.A., Rohrmann, G.F., Theilmann, D.A., Theim, S.M., Vlak, J.M., 2006. On the classification and

- nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. Arch. Virol. 151, 1257-1266.
- King, L.A., Possee, R.D., 1992. The baculovirus expression system: a laboratory guide. Chapman & Hall, London, p 229.
- Lapointe, R. Thumbi, D., Lucarotti, C.J., 2012. Recent advances in our knowledge of baculovirus molecular biology and its relevance for the registration of baculovirus-based products for insect pest population control. In: Larramendy, M.L. e Soloneski, S. (Eds.), Integrated pest management and pest control – Current and future tactics. Rijeka: InTech, 1, cap. 21, pp. 495-536.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44, 257-289.
- Moscardi, F., Souza, M.L., 2002. Baculovírus para o controle de pragas: Panacéia ou realidade? Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 24, 22-29.
- Ribeiro, B.M., Souza, M.L., Kitajima, E.W., 1998. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: Alves, S.B. Controle microbiano de insetos. FEALQ, Piracicaba, pp. 481-508.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A, Dicke, M., 2005. Insect – Plant Biology. University Press, Oxford, 2, p. 421.
- Tanada, Y., Kaya, H.K., 1993. Insect pathology. Academic, New York, p. 666.
- Valicente, F.H., 1989. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. An. Soc. Entomol. Brasil 18 (1), 119-127.
- Valicente, F.H., Barreto, M.R., 1999. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. An. Soc. Entomol. Brasil 28 (2), 333-337.
- Valicente, F.H., Costa, E.F., 1995. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovirus *spodoptera* via água de irrigação. An. Soc. Entomol. Brasil 24, 61- 67.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., 2009. Controle Biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovírus. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA Milho e Sorgo. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Circular Técnica nº 114, p. 14.

Wolff, J.L.C., Valicente, F.H., Martins, R., Oliveira, J.V.C., Zanotto, P.M.A., 2008. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. J. Gen. Virol. 89 (5), 1202-1211.

CAPÍTULO 1

O período de inoculação e as temperaturas de inoculação e de incubação de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) interferem na mortalidade de larvas de *Spodoptera frugiperda* e na produção viral

RESUMO – Bioinseticidas a base de baculovírus tem potencial para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), porém a produção em larga escala depende de se maximizar a obtenção desse vírus a partir de larvas infectadas desse Lepidoptera. A temperatura adequada e o tempo de exposição ao patógeno são importantes para a replicação viral. O objetivo foi verificar o efeito das temperaturas de inoculação e incubação (multiplicação) na produção viral e do tempo de inoculação. Lagartas de *S. frugiperda* de seis dias de idade foram alimentadas com folhas de milho pulverizadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) na concentração de $1,38 \times 10^7$ PIB/mL (corpos poliédricos de inclusão/mL) e em recipientes plásticos retangulares com 30 lagartas em BOD. Os tratamentos foram constituídos pela combinação de dois períodos de inoculação (24 e 48 horas) e temperaturas de inoculação e incubação de 25 e 28 °C em arranjo fatorial 2 x 2 x 2 disposto no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Ao final do período de inoculação, 24 lagartas por tratamento foram individualizadas em copos plásticos com dieta artificial em BOD nas temperaturas de 25 ou 28 °C até a morte ou o estágio de pupa. As médias de mortalidade e os parâmetros de produção (produção total de poliedros, produção de poliedros por lagarta e lagarta equivalente por hectare) foram comparados pelo teste F em nível de 5% probabilidade. Os dados de canibalismo foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis em nível de 5% de probabilidade. O canibalismo entre as lagartas de *S. frugiperda* foi semelhante (em torno de 4%) nos diferentes tempos e temperaturas de inoculação do baculovírus. O tempo de inoculação não influenciou a mortalidade e a produção viral. A produção total de poliedros, nas diferentes temperaturas de inoculação, foi semelhante, mas a incubação a 25 °C produziu uma maior quantidade de vírus. A mortalidade de lagartas foi maior a 28 °C, porém a produção de PIB/lagarta foi maior a 25 °C, o que reduz o número de lagartas para a produção de uma dose de baculovírus formulado (dose para um hectare). O vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) deve ser multiplicado a 25 °C para uma maior produção total de poliedros e de PIB/lagarta morta.

Palavras-chave: Baculovírus, *Spodoptera frugiperda*, controle biológico, temperatura de incubação

ABSTRACT – The use of baculovirus bioinsecticide based has the potential to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), but large scale production depends on maximizing virus production from infected larvae. The appropriate temperature and time of exposure of the pathogen are important for viral replication. The objective was to determine the effect of inoculation and incubation temperatures (multiplication) in viral production and the inoculation period. Larvae of *S. frugiperda* six days old were fed on maize leaves sprayed with isolated 6 (I6) of the *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) at a concentration of 1.38×10^7 polyhedral inclusion bodies/mL (PIB/mL) and rectangular in plastic containers with 30 larvae in BOD. The treatments were a combination of two inoculation periods (24 and 48 hours) and inoculation and incubation temperatures of 25 and 28 °C in a 2 x 2 x 2 factorial arrangement, provisions of completely randomized design (DIC), with four replications. At the end of the inoculation period, 24 larvae per treatment were individually placed in plastic cups with artificial diet in BOD at 25 or 28 °C until the death or pupal stage. Means for mortalities and production parameters (total polyhedra production, polyhedra production per larvae and larvae equivalent per hectare), were compared by F test at 5% probability. For the cannibalism was applied to the nonparametric Kruskal-Wallis test at 5% probability. Cannibalism among the larvae of *S. frugiperda* was similar (around 4%) in different periods and temperatures baculovirus inoculation. The inoculation period didn't influence mortality and viral production. The total polyhedra production at the different inoculation temperatures was similar, but the incubation at 25 °C produced a larger amount of virus. The higher mortalities of larvae were achieved at 28 °C, however, the production of PIB/larvae were higher at 25 °C, reducing the number of larvae for the production of a dose of baculovirus expressed (dose to one hectare). The multiplication of the virus at 25 °C is most suitable due to increased total polyhedra production and PIB/larvae dead.

Keywords: Baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, biological control, incubation temperature

1. Introdução

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), é a principal praga da cultura do milho no Brasil e o uso de inseticidas químicos afeta os custos de produção dessa cultura (Cruz et al., 1996). A necessidade de se reduzir o uso de

inseticidas químicos torna necessário se desenvolver métodos de controle fáceis, econômicos e efetivos com microrganismos, insetos ou nematóides com alta qualidade e em quantidades suficientes para sua aplicação massiva em zonas cultivadas (Ferrer, 2001). O controle biológico, com vírus entomopatogênicos, pode ser uma solução duradoura e efetiva devido à sua alta especificidade, ocorrência natural (Moscardi, 1999) e sem impacto para insetos benéficos e vertebrados, incluindo o homem (Barreto et al., 2005; Lapointe et al., 2012).

Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) é um vírus eficiente para controlar a lagarta-do-cartucho (Barreto et al., 2005; Valicente e Costa, 1995). Isolados nativos de vírus da poliedrose com alta atividade contra *S. frugiperda* foram selecionados e padronizado um sistema de produção em pequena escala (Valicente e Costa, 1995). Este vírus é multiplicado em condições controladas, em lagartas saudáveis, em laboratório. O aprimoramento das condições de desenvolvimento das lagartas e de reprodução do vírus são fatores-chaves para aumentar a produção desse vírus.

A temperatura afeta o ciclo de replicação dos baculovírus e o desenvolvimento do hospedeiro (Johnson et al., 1982; Ribeiro e Pavan, 1994, Van Beek, et al., 2000). O desenvolvimento larval e a progressão da infecção viral no inseto são complexos (Kobayashi e Choi, 1990) e devem ser sincronizados, pois ambos são sensíveis a temperatura (Sporleder et al., 2008). O efeito da temperatura no desenvolvimento viral depende do hospedeiro e da espécie de baculovírus. O período da infecção, aparecimento dos primeiros sintomas até a ocorrência da morte larval varia com a temperatura de criação do hospedeiro e, quanto menor a temperatura da criação do hospedeiro, maior o tempo até a morte por infecção viral (Balch e Bird, 1944). Altas temperaturas do hospedeiro podem inibir a expressão do vírus e a alternância de temperaturas afeta a expressão do patógeno (Bird, 1955). Oscilações de temperatura aumentam a viabilidade do baculovírus em cultura de células (Shao-Hua et al., 1998), mas os efeitos da temperatura sobre a produção de nucleopoliedrovírus são variáveis (Cherry et al., 1997; Mehrvar et al., 2007; Subramanian et al., 2006).

O objetivo foi identificar a melhor temperatura de inoculação e incubação para maximizar a produção do vírus em larga escala por bioensaio com duas temperaturas de inoculação e incubação de SfMNPV e dois períodos de inoculação do vírus em larvas de *S. frugiperda*.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPMS/Embrapa) no município de Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais, Brasil. As lagartas de *S. frugiperda* foram provenientes da criação massal do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da CNPMS/Embrapa em sala com temperatura de 25 °C, umidade relativa de 60% e fotofase de oito horas.

Adultos de *S. frugiperda* foram mantidos em gaiola de PVC e alimentados com uma solução de sacarose a 2,5% e ácido ascórbico a 0,1% embebida em algodão. Folhas de papel foram suspensas no interior das gaiolas como locais de oviposição e retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas que foram mantidas em sacos plásticos transparentes até a eclosão das larvas. Essas larvas foram transferidas com um pincel de cerdas finas para copos plásticos de 50 mL com dieta artificial, como a descrita por Valicente e Barreto (2003), e utilizadas para a manutenção da criação (neste caso, foram individualizadas até a emergência dos adultos que foram transferidos para as gaiolas de criação) e para o experimento.

As lagartas de *S. frugiperda* foram inoculadas com o isolado 6 do nucleopoliedrovírus (SfMNPV) na concentração de $1,38 \times 10^7$ PIB/mL, pois esse isolado causa alta mortalidade e alta produção viral por lagarta dessa espécie. Além disso, este isolado não rompe o tegumento da lagarta logo após a morte da mesma (Valicente et al., 2008; Vieira et al., 2012).

2.1. Montagem do Bioensaio

Lagartas de *S. frugiperda*, com seis dias de idade, foram inoculadas com o vírus SfMNPV pulverizado em folhas de milho, totalizando 240 cm² de área foliar, com um pulverizador manual, enquanto o tratamento testemunha foi pulverizado, apenas, com água destilada. O surfactante não-iônico Tween 20[®] (Merck Schuchardt, Germany) (polioxietileno-sorbitol, como dispersante) foi adicionado em todas as suspensões virais e na testemunha. As folhas de milho foram colocadas em recipientes de plástico de 24 x 10 x 3 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente) com 30 lagartas cada um e levados para BOD por 24 ou 48 horas de acordo com o tratamento. Os tratamentos foram constituídos pela combinação entre dois períodos de inoculação (24 e 48 horas), duas temperaturas de inoculação (25 e 28 °C) e duas temperaturas de incubação ou o

período em que há a multiplicação do vírus em lagartas (25 e 28 °C). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC).

As lagartas de *S. frugiperda* foram contadas ao final do período de inoculação para se quantificar o canibalismo e individualizadas em copos de plástico (50 mL) com dieta artificial em BOD na temperatura correspondente ao respectivo tratamento (temperatura de incubação/multiplicação). A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente, até a fase pupal com a fórmula: porcentagem de mortalidade= número de lagartas mortas com sintomas/(número de lagartas mortas com sintomas + número de pupas).

As lagartas mortas com sintomas típicos de infecção por SfMNPV foram recolhidas diariamente e acondicionadas em freezer a -20 °C, descartando-se aqueles sem sintomas ou contaminadas por fungos. Lagartas mortas por vírus foram maceradas em água destilada e uma alíquota da suspensão resultante levada para câmara de Neubauer para se determinar a quantidade de poliedros por unidade experimental. Os parâmetros avaliados foram poliedros totais (PIB total), poliedros por lagarta (PIB/lag) e lagarta equivalente por hectare (LE: número estimado de lagartas para se obter uma dose do bioinseticida para um hectare).

Os testes de Shapiro-Wilk e Cochran comprovaram a distribuição normal dos resíduos e a homocedasticidade de variâncias, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o tempo de inoculação (T), a temperatura de inoculação (I) e a temperatura de incubação, ou multiplicação (M), como variáveis independentes, e as médias comparadas pelo teste F ($\alpha= 5\%$). No entanto, os dados de mortalidade foram transformados pelo método de Box-Cox com a fórmula $(x^\lambda - 1)/\lambda$, onde $\lambda= 5,75$ para que os pressupostos de submissão à ANOVA fossem atendidos (distribuição normal dos resíduos e homogeneidade de variâncias). Os valores reais de mortalidade foram apresentados nas tabelas.

O canibalismo foi comparado, apenas, entre as duas temperaturas de inoculação e os dois tempos de inoculação, pois após este período, as lagartas foram individualizadas impossibilitando sua ocorrência no período de multiplicação do vírus. As médias das porcentagens de canibalismo foram comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis em nível de 5% de probabilidade por não satisfazerem os pré-requisitos da ANOVA. As análises estatísticas foram feitas com o software R (pacote ExpDes).

3. Resultados e Discussão

O canibalismo entre as lagartas de *S. frugiperda* foi semelhante (em torno de 4%) nos diferentes tempos e temperaturas de inoculação do baculovírus. O tempo de inoculação não influenciou o canibalismo porque as lagartas foram mantidas juntas por um curto período, no máximo 48 horas. Neste experimento as lagartas foram individualizadas após, no máximo, 48 horas, para se tentar minimizar os efeitos do canibalismo. Este fator é limitante à produção de baculovírus e foi significativo com lagartas de sete dias de idade, inoculadas com SfMNPV em folhas de milho, após um período de inoculação de 72 horas (Valicente et al., 2013).

As temperaturas de inoculação e de incubação afetaram a taxa de mortalidade, número de poliedros PIB/lagarta e o parâmetro lagarta equivalente (LE: número estimado de lagartas para se obter uma dose do bioinseticida para um hectare). A quantidade total de poliedros foi influenciada, somente, pela temperatura de incubação (Tabela 1). Os fatores temperatura de inoculação, temperatura de incubação e tempo de inoculação não apresentaram interação e, por isto, foram analisados isoladamente (Tabela 2).

O efeito isolado do período de inoculação não afetou a mortalidade de *S. frugiperda* e as demais características avaliadas (PIB total, PIB/lagarta e LE) (Tabela 2), devido a ter sido de, no máximo, 48 horas. O tempo de alimentação afetou, apenas, o canibalismo, e não afetou a mortalidade, produção total de vírus, PIB/lagarta e lagarta equivalente para um período de até 72 horas de alimentação com folhas de milho pulverizadas com baculovírus (Valicente et al., 2013).

A mortalidade de *S. frugiperda* foi maior a 28 °C (Tabela 2). Os resultados de PIB/lagarta e LE foram melhores com a temperatura de inoculação de 25 °C. Isto sugere que, apesar da menor mortalidade larval com a inoculação do SfMNPV a 25 °C, as lagartas morreram maiores, explicando o maior número de poliedros por lagarta. Como consequência, um menor número de lagartas é necessário para se produzir uma dose de produto formulado a ser aplicado por hectare. Isto pode explicar a inexistência de diferença no parâmetro PIB total entre as temperaturas de inoculação. O maior número de lagartas mortas com a inoculação a 28 °C compensaria o fato daquelas inoculadas nessa temperatura terem morrido com menor tamanho. Desta forma, a temperatura de inoculação pode ser de 25 °C ou 28 °C, com produção total semelhante de vírus. O decréscimo da temperatura alongou o ciclo de *S. frugiperda*, o peso de pupas e a

viabilidade dessa praga foram maiores a 25 °C e reduziram com o aumento da temperatura (Busato et al., 2005; Pinheiro et al., 2008). A duração do ciclo de *S. frugiperda* foi maior a 25 °C que a 28 °C e o inverso ocorreu para a viabilidade dessa praga. A temperatura de 25 °C foi considerada a mais adequada para o desenvolvimento de *S. frugiperda* (Busato et al., 2005).

A temperatura de incubação (multiplicação) do vírus que proporcionou a maior produção viral, foi a de 25 °C, quando todos os parâmetros de produção viral, PIB total e PIB/lagarta, foram maiores e LE menor. No entanto, a mortalidade foi menor nessa temperatura que a 28 °C (Tabela 2). Sporleder et al. (2008) verificaram que as taxas de mortalidade por vírus não foram afetadas pela temperatura, mas o peso corporal e o número de partículas virais por lagarta aumentaram à medida que a temperatura diminuiu. O benefício de se obter maiores pesos larvais em temperaturas abaixo da faixa ótima de desenvolvimento da praga é pouco provável que seja compensatório para a produção viral, devido ao aumento na mortalidade natural e no prolongamento do desenvolvimento larval (Sporleder et al., 2008).

A temperatura de incubação de 25 °C deve ser utilizada em sistemas de produção em larga escala para maximizar a produção viral, pois independente da temperatura e do tempo de inoculação, apresentou maiores produções totais de vírus.

O ambiente com maior produção viral diferiu daquele com maior mortalidade de *S. frugiperda*. A mortalidade é um parâmetro importante para a produção viral, mas as lagartas maiores forneceram maiores quantidades de poliedros. Isto ocorreu quando a temperatura de multiplicação foi de 25 °C, na qual as lagartas morriam com maior tamanho, como confirmado pelos maiores valores de PIB/lagarta. A produção massal de baculovírus por métodos *in vivo* é influenciada por fatores, como a idade em que as lagartas são inoculadas com o vírus, a concentração de vírus e a temperatura de incubação (Subramanian et al., 2006). A idade das larvas na inoculação e a concentração de vírus devem ser sincronizadas para resultar na morte de insetos na fase larval totalmente crescida (e ainda suscetível) para maximizar a produtividade. A produção de poliedros por lagartas de quinto instar de *Spodoptera litura* nucleopoliedrovírus (SpltNPV) infectadas a 25, 30, 35 °C e temperatura ambiente, com inoculação em superfície da dieta, foi maior a 25 °C. O progresso da doença foi lento a 25 °C com TL₅₀ de 208 h comparado a 136 h a 35 °C. Apesar da morte mais lenta em relação às demais temperaturas, que acarreta em ciclos de produção mais baixos/ano, a

produtividade/ano a 25 °C foi maior que as das demais temperaturas (Subramanian et al., 2006).

A produção de poliedros não foi afetada pelos tempos de inoculação avaliados. A maior produção de poliedros por lagarta a 25 °C e a menor mortalidade a 28 °C, indicam que ambas as temperaturas de inoculação podem ser usadas para a produção de poliedros do nucleopoliedrovírus (SfMNPV) com lagartas de *S. frugiperda*. No entanto, a produção total de poliedros aumentou na temperatura de multiplicação de 25 °C, indicando que esta é temperatura deve ser usada para a produção de baculovírus em larga escala.

Agradecimentos

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

Referências

- Barreto, M.R., Guimarães, C.T., Teixeira, F.F., Paiva, E., Valicente, F.H., 2005. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. *Neotrop. Entomol.* 34, 67-75.
- Balch, R.E., Bird, F.T., 1944. Virus diseases of the European spruce sawfly, *Gilpinia hercyniae* (Htg.), and its place in natural control. *Scientific Agriculture* 25, 65-80.
- Bird, F.T., 1955. Virus diseases of sawflies. *The Canadian Entomologist* 87, 124-127.
- Busato, G.R., Grützmacher, A.D., Garcia, M.S., Giolo, F.P., Zotti, M.J., Bandeira, J.M., 2005. Exigências térmicas e estimativas do número de gerações dos biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda*. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 40(4), 329-335.
- Cherry, A.J., Parnell, M.A., Grywacz, D., Jones, K.A., 1997. The optimization of vivo nuclear polyhedrosis virus production of *Spodoptera exempta* and *S. exigua*. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 50-58.

- Cruz, I., Oliveira, L.J., Vasconcelos, C.A., 1996. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. An. Soc. Entomol. Brasil 25, 293-297.
- Ferrer, F., 2001. Biological control of agricultural insect pests in Venezuela; Advances, achievements, and future perspectives. Biocontrol News Inf. 22, 67-74.
- Johnson, D.W., Boucias, D.B., Barfield, C.S., Allen, G.E., 1982. A temperature-dependent developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 40, 292-298.
- Kobayashi, M., Choi, H.K., 1990. Inhibition of the accumulation of viral polypeptides in the denonucleosis virus-infected midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, reared at a supraoptimal temperature. J. Invertebr. Pathol. 56, 117-122.
- Lapointe, R. Thumbi, D., Lucarotti, C.J., 2012. Recent advances in our knowledge of baculovirus molecular biology and its relevance for the registration of baculovirus-based products for insect pest population control. In: Larramendy, M.L. e Soloneski, S. (Eds.), Integrated pest management and pest control – Current and future tactics. Rijeka: InTech, 1, cap. 21, pp. 495-536.
- Mehrvar, A., Rabindra, R.J., Veenakumari, K., Narabanchi, G.B., 2007. Standardization of mass production in three isolates of nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* (Hubner). Pak. J. Biol. Sci. 10, 3992-3999.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44, 257-289.
- Pinheiro, J.C.A., Pádua, L.E.M, Portela, G.L.F, Branco, R.T.P.C., Reis, A.S., Silva, P.R.R., 2008. Biologia comparada de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado do Piauí. Rev. Caatinga 21 (2), 197-203.
- R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ribeiro, H.C.T., Pavan, O.H.O., 1994. Baculovirus thermal stability. J. Theor. Biol. 19, 21-24.
- Shao-Hua, C., Hong-Liang, S., Zuo-Hu, L., 1998. Effect of temperature oscillation on insect cell growth and baculovirus replication. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2237-2239.

- Sporleder, M., Zegarra, O., Cauti, E.M.R., Kroschel, J., 2008. Effects of temperature on the activity and kinetics of the granulovirus infecting the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biol. Control* 44, 286-295.
- Subramanian, S., Santhram, G., Sathiah, N., Kennedy, J.S., Rabindra, R.J., 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* 37, 367-374.
- Valicente, F.H., Barreto, M.R., 2003. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 32, 639-644.
- Valicente, F.H., Costa, E.F., 1995. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus spodoptera* via água de irrigação. *An. Soc. Entomol. Brasil* 24, 61-67.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Paiva, C.E.C., Guimarães, M.R.F., Macedo, C.V., Wolff, L.C., 2008. A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae. *Rev. Bras. Milho Sorgo* 7, 77-82.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Pena, R.C., Andreazza, R., Guimarães, M.R.F., 2013. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with *Baculovirus spodoptera*. *Neotrop. Entomol.* 42, 191-199.
- Van Beek, N., Hughes, P.R., Wood, H.A., 2000. Effects of incubation temperature on the dose-survival time relationship of *Trichoplusia ni* larvae infected with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 185-190.

Tabela 1. Análise de variância para os efeitos da temperatura de inoculação, temperatura de incubação (multiplicação) e do tempo de inoculação sobre a mortalidade e a produção de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) na lagarta-do-cartucho do milho

Fonte de Variação	GL	Mortalidade		PIB/lagarta		PIB total		LE	
		F	P	F	P	F	P	F	P
Inoculação (I)	1	12,94	0,001	9,49	0,005	2,04	0,166	6,51	0,018
Multiplicação (M)	1	4,47	0,045	10,47	0,004	5,41	0,029	10,41	0,004
Tempo (T)	1	2,07	0,164	1,04	0,318	2,07	0,164	0,46	0,506
I x M	1	0,62	0,439	0,80	0,379	0,03	0,861	0,43	0,519
I x T	1	0,45	0,509	1,10	0,305	0,80	0,380	0,34	0,563
M x T	1	0,20	0,661	0,02	0,886	0,22	0,646	0,01	0,915
I x M x T	1	1,34	0,259	0,04	0,834	1,38	0,251	0,10	0,757

Tabela 2. Mortalidade da lagarta-do-cartucho e produção do baculovírus: número de poliedros por lagarta, total de poliedros por tratamento e lagarta equivalente por hectare, após inoculação de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em dois períodos e duas temperaturas de inoculação e de incubação (multiplicação)

		Mortalidade (%)	PIB/lag (x10 ⁹)	PIB total (x10 ⁹)	LE (Unidades)
Tempo de inoculação (horas)	24	87,80 ± 2,70 ^{ns}	1,06 ± 0,05 ^{ns}	21,53 ± 0,91 ^{ns}	196 ± 10,00 ^{ns}
	48	91,46 ± 2,01	1,13 ± 0,07	23,85 ± 1,45	188 ± 11,27
Temperatura de inoculação (°C)	25	84,96 ± 2,78 *	1,20 ± 0,07 *	23,84 ± 1,51 ^{ns}	176 ± 10,78 *
	28	94,30 ± 1,07	0,98 ± 0,04	21,54 ± 0,81	208 ± 8,84
Temperatura de multiplicação (°C)	25	86,58 ± 2,90 *	1,20 ± 0,05 *	24,56 ± 1,23 *	171 ± 8,33 *
	28	92,67 ± 1,48	0,98 ± 0,06	20,81 ± 1,06	213 ± 10,18

^{ns}, * Não significativo e significativo, em nível de 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

CAPÍTULO 2

Multiplicação de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) de diferentes idades

RESUMO – As concentrações letais de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) foram determinadas em lagartas de *S. frugiperda* com seis, sete e oito dias, para se inocular esse vírus visando maximizar sua produção viral. O delineamento foi inteiramente casualizado. Os isolados 6 (I6), que não rompe o tegumento da lagarta imediatamente após a morte da mesma, e o 19 (I19), que provoca o rompimento imediato do tegumento do inseto após a morte da lagarta, foram utilizados. Lagartas de seis, sete e oito dias de idade foram alimentadas por 48 horas com folhas de milho pulverizadas com os isolados 6 e 19 em concentrações de $1,00 \times 10^2$ a $1,00 \times 10^8$ PIB/mL (corpos poliédricos de inclusão/mL). Avaliações diárias foram feitas até a morte ou o estágio de pupa de *S. frugiperda*. As lagartas mortas, por tratamento, foram recolhidas, maceradas e a produção total de poliedros determinada. Quatro repetições, compostas por 24 lagartas cada uma, foram realizadas. As concentrações letais desse vírus foram determinadas por análise de Probit. Os dados de produção viral foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. As concentrações letais médias (CL_{50}) de SfMNPV variaram de $1,89 \times 10^5$ a $5,01 \times 10^6$ PIB/mL. A CL_{50} do I6 foi maior que a do I19 para lagartas de seis dias de idade, semelhante para lagartas de sete dias e menor para aquelas de oito dias. A produção total de poliedros foi maior com lagartas inoculadas aos oito dias de idade com o I6. As maiores produções virais foram obtidas nas concentrações acima de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL. A produção de PIB/lagarta foi maior com o I6 em lagartas de oito dias, o que reduz o número de lagartas para a produção de uma dose de baculovírus formulado (dose para um hectare). A maximização da produção viral de baculovírus para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) deve ser feita com o isolado I6 em lagartas de oito dias.

Palavras-chave: Baculovírus, *Spodoptera frugiperda*, idade larval, concentração letal

ABSTRACT – Lethal concentrations of *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) were determined for larvae of six, seven and eight days old and the best age to perform the inoculation SfMNPV to maximize viral production. Completely randomized design was used. Isolates 6 (I6), which doesn't cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae, and isolated 19 (I19) that causes disruption of the integument of the insect immediately after his death, were used. Larvae of the six, seven and eight days old were fed for 48 h with

corn leaves sprayed with isolated 6 and 19 in concentrations from 1.00×10^2 to 1.00×10^8 PIB/mL (polyhedral inclusion bodies/ml). Daily evaluations were done to death or pupal stage. The dead larvae per treatment were collected, macerated and total production of polyhedra determined. Four replications composed of 24 larvae each, were performed. Probit analysis was performed to determine the lethal concentration. The viral production data were subjected to analysis of variance and Tukey test at 5% probability. The lethal concentration (LC_{50}) ranged from 1.89×10^5 to 5.01×10^6 PIB/mL. The LC_{50} of the I6 was higher than the I19 for six days old larvae, similar for seven days larvae and for those less than eight days. Total polyhedra production was higher with larvae inoculated at eight days old and the I6. The highest yields were obtained in viral concentrations above 1.00×10^7 PIB/mL. The production of PIB/larvae of I6 and eight days old larvae was higher than I19. This factor is important because reduces the number of larvae needed to be sprayed in one hectare. Maximizing the baculovirus virus production for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) should be made with the isolated I6 and eight days old larvae.

Keywords: Baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, larval age, lethal concentration

1. Introdução

Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) apresenta potencial para o controle biológico da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), devido a alta mortalidade desse hospedeiro (Barreto et al., 2005; Rios-Velasco et al., 2002; Valicente e Costa, et al., 1995), mas bioinseticidas à base deste vírus não estão, ainda, disponíveis no mercado. Um dos principais fatores que inviabilizam a produção comercial desse vírus é a liquefação imediata do tegumento do hospedeiro, que dificulta a coleta de partículas virais, aumentando a necessidade de mão-de-obra e, conseqüentemente, o custo final do produto (Valicente et al., 2013). Esta dificuldade se deve à mistura dos tecidos larvais contendo partículas virais com a dieta artificial após o rompimento do tegumento larval (Vieira et al., 2012). O congelamento das lagartas mortas e rompidas pode amenizar tais perdas e facilitar a manipulação das lagartas, mas isto é inviável economicamente (Valicente et al., 2013). Outra opção seria recolher as lagartas infectadas antes do início do processo de degradação do tegumento larval (Vieira et al., 2012). No entanto, o

momento mais apropriado para se realizar a coleta antes da liquefação e evitar perdas na produção de vírus deve ser melhor estudado.

A eficiência de 22 isolados geográficos de baculovírus foi avaliada, destacando-se o isolado 19 (I19) por sua alta virulência, com menor CL_{50} (Barreto et al., 2005), e que está completamente sequenciado (Wolff et al., 2008). Um isolado de SfMNPV (isolado 6 ou I6) que não rompe, imediatamente, lagartas de *S. frugiperda* foi relatado (Valicente et al., 2008) e esta característica deve-se a deleção de uma adenina na posição 297 do gene que codifica a expressão da catepsina (V-CATH) e produziu um gene de paragem após a posição 309 (Vieira et al., 2012). A catepsina, juntamente com a quitinase, são as enzimas envolvidas no processo de liquefação do tegumento da lagarta hospedeira (Hawtin et al., 1997).

Os isolados 6 e 19 foram igualmente eficientes em termos de concentrações letais, mas o I6 foi mais lento para causar a morte das lagartas. No entanto, lagartas recém nascidas e de segundo instar (lagartas com três dias de idade) foram utilizadas sem se determinar a produção de poliedros a partir de lagartas infectadas com cada um dos dois isolados (isolado 6 e 19) (Vieira et al., 2012). Esta característica do I6 facilita o manuseio, por não provocar o rompimento imediato das lagartas de *S. frugiperda* após causar sua morte (o que reduziria o tempo de trabalho e a mão-de-obra necessária para multiplicação em larga escala de SfMNPV) (Valicente et al., 2013), e a produção de poliedros virais. Contudo, não se sabe se as perdas de vírus ocorridas devido ao rompimento do tegumento larval são significativas ou não.

O consumidor necessita de inseticidas eficientes, baratos e práticos. A quantidade de produto a ser fabricado em um sistema de produção em larga escala é determinada pelo número de corpos poliédricos de inclusão (PIB – polyhedral inclusion bodies) produzidos. Desta maneira, é preciso maximizar a produção viral para tornar um bioinseticida à base de SfMNPV economicamente viável. Para tanto, o ideal é trabalhar com lagartas em estádios mais avançados, para aumentar a produção viral sem perder a suscetibilidade ao vírus, pois quanto mais avançado o instar, menor a susceptibilidade das lagartas ao vírus (Escribano et al., 1999, Rios-Velasco et al., 2002).

Os isolados 6 e 19 foram comparados quanto aos seguintes parâmetros de produção: produção total de poliedros (PIB total), de poliedros por lagarta (PIB/lag) e lagarta equivalente por hectare (LE), este último se refere ao número de lagartas necessárias por hectare para reduzir a população de insetos praga abaixo do nível de dano econômico (Federici, 1999).

Objetivou-se neste trabalho determinar a concentração letal de dois isolados (isolados 6 e 19) de SfMNPV, infectando lagartas de *S. frugiperda* de diferentes idades (6, 7 e 8 dias de idade), e comparar os mesmos quanto aos seguintes parâmetros de produção: total de poliedros produzidos (PIB total), número médio de poliedros obtidos por lagarta morta pelo SfMNPV (PIB/lag) e lagarta equivalente por hectare (LE).

2. Material e Métodos

2.1. Criação de Insetos

As lagartas de *S. frugiperda* foram provenientes da criação massal do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Embrapa Milho e Sorgo. A criação foi mantida numa sala com temperatura de 25 °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 8 horas.

Os adultos de *S. frugiperda* foram mantidos em gaiola de PVC e alimentados com uma solução de sacarose a 2,5% e ácido ascórbico a 0,1% embebida em algodão. Folhas de papel foram suspensas no interior das gaiolas como local de oviposição e retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas, as quais foram mantidas em sacos plásticos transparentes até a eclosão das lagartas. As lagartas foram transferidas com um pincel de cerdas finas para copos plásticos de 50 mL com dieta artificial, como a descrita por Valicente e Barreto (2003), posteriormente, utilizadas nos experimentos e para a manutenção da criação (neste caso, foram individualizadas até a emergência dos adultos, que foram transferidos para as gaiolas de criação).

2.2. Multiplicação do Vírus

Cada isolado viral foi multiplicado para a obtenção de material suficiente para os experimentos. Neste processo, uma suspensão viral altamente concentrada, contendo corpos poliédricos de inclusão (PIB) de SfMNPV, foi pulverizada em folhas de milho oferecidas a lagartas sadias de *S. frugiperda* (Figura 1). Estas folhas foram transferidas para recipientes plásticos com as lagartas que, após 48 horas, foram individualizadas em copos de polietileno de 50 mL contendo dieta artificial e lacrados com tampa de acrílico. As lagartas mortas com sintomas típicos de infecção por baculovírus foram recolhidas e congeladas para purificação do vírus.

2.3. *Purificação do Vírus*

O vírus foi purificado, conforme a metodologia descrita por Valicente et al. (2013), procedendo-se da seguinte maneira: aproximadamente duas gramas de lagartas mortas infectadas com SfMNPV foram maceradas para auxiliar a liberação dos corpos poliédricos de inclusão do interior das mesmas; uma solução tampão foi adicionada ao líquido resultante das lagartas maceradas; o líquido foi filtrado em tecido de voil para separar as partes mais grosseiras da lagarta; o material mais grosseiro foi novamente macerado com solução tampão para se retirar o máximo de partículas virais e realizada nova filtração; a suspensão com as partículas virais foi colocada em tubos de centrifuga e os mesmos completados com solução tampão; o material foi centrifugado em rotor SS34 durante 15 minutos a 10.000 rpm e temperatura de 4° C; após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os lipídios aderidos aos tubos retirados com pinça e algodão (as partículas virais precipitadas pelo processo de centrifugação formaram um pellet no fundo do tubo); uma solução tampão foi adicionada a esse pellet, seguido por homogeneização da suspensão e nova centrifugação em rotor SS34 durante 15 minutos a 10.000 rpm e temperatura de 4° C; o sobrenadante foi descartado e 6 mL de solução tampão foi adicionada ao pellet, seguido de homogeneização e transferência da suspensão para tubos com um gradiente de sacarose (Figura 2); a suspensão de cada tubo de centrifuga foi dividida em três tubos com gradiente de sacarose; o gradiente de sacarose foi feito separadamente em tubos com 15 mL com quatro concentrações de sacarose (1,18 g/mL, 1,20 g/mL, 1,25 g/mL e 1,30 g/mL), em ordem decrescente, com volume unitário de 3 mL por concentração; um total de 2 mL da suspensão viral descrita acima foi depositado sobre este gradiente (Figura 2); o tubo contendo o gradiente de sacarose com a suspensão viral foi centrifugado em rotor AH 627 durante 40 minutos a 24.000 rpm e temperatura de 4° C; a banda formada contendo as partículas virais em suspensão (Figura 3) foi coletada com pipeta, diluída em solução tampão TE e centrifugada em rotor SS34 durante 15 minutos a 10.000 rpm e temperatura de 4° C; o material sobrenadante foi descartado e 1,5 mL de água bidestilada adicionada ao pellet formado pelas partículas virais e homogeneizado; o vírus purificado foi colocado em microtubos e armazenado a -20 °C.

Soluções estoque dos isolados de SfMNPV com concentrações conhecidas foram obtidas a partir do material purificado. Estas concentrações foram determinadas por contagem dos PIB em câmara de Neubauer com microscópio óptico e aumento de

400 vezes. As soluções estoque foram armazenadas a -20 °C e utilizadas para a obtenção de concentrações correspondentes às utilizadas para multiplicação do material viral e, também, nos experimentos.

2.4. Determinação das Concentrações Letais

O experimento foi montado com lagartas de *S. frugiperda* de três idades (6, 7 e 8 dias), inoculadas com oito concentrações de suspensão viral, preparadas com o isolado 6, que não causa o rompimento imediato do tegumento da lagarta (I6), e com o isolado 19 (I19), que rompe imediatamente o seu tegumento após a morte da mesma.

As concentrações utilizadas foram: $1,00 \times 10^3$; $1,00 \times 10^4$; $1,00 \times 10^5$; $1,00 \times 10^6$; $1,00 \times 10^7$; $5,00 \times 10^7$; e, $1,00 \times 10^8$ corpos poliédricos de inclusão/mL (PIB/mL) e, para o I6 foi usada, também, a concentração de $1,00 \times 10^2$ PIB/mL. Todas as concentrações foram escolhidas baseadas em um teste preliminar. O tratamento testemunha teve pedaços de folhas de milho pulverizados com uma solução contendo, apenas, água destilada e uma gota ($12,74 \pm 1,1$ mg) do surfactante não-iônico Tween 20[®] (Merck Schuchardt, Germany) (polioxietileno-sorbitol como dispersante). Cada tratamento e a testemunha tiveram quatro repetições, com 24 lagartas de *S. frugiperda* por repetição.

Lagartas de *S. frugiperda*, com seis, sete e oito dias de idade, da criação massal do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo e alimentadas com dieta artificial desde a emergência, foram inoculadas com SfMNPV nas concentrações descritas anteriormente. A inoculação foi feita por pulverização das suspensões virais em pedaços de folha de milho, separados por tratamento e repetição e colocados em recipientes plásticos de 24 x 10 x 3 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente). Trinta lagartas foram colocadas por pote, onde receberam pedaços de folha de milho por 48 horas a 28 °C. Decorrido este tempo, 24 lagartas/repetição foram individualizadas em copos plásticos de 50 mL com um pedaço de dieta artificial. Esse procedimento foi realizado com os isolados 6 e 19. A mortalidade das lagartas foi avaliada diariamente até a fase pupal com a fórmula: porcentagem de mortalidade = número de lagartas mortas com sintomas / (número de lagartas mortas com sintomas + número de pupas).

As lagartas mortas com sintomas típicos de infecção por baculovírus foram recolhidas, diariamente e colocadas em copos de plástico de 50 mL em freezer a -20°C,

identificando-se os tratamentos e repetições. Lagartas que morreram sem sintomas foram descartadas e não computadas para o cálculo da mortalidade.

A quantificação das lagartas mortas permitiu se determinar a concentração letal dos dois isolados infectando lagartas de três idades diferentes. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit com o software estatístico SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) para se determinar a concentração letal do vírus.

2.5. Determinação dos Parâmetros de Produção (PIB/total, PIB/lag e LE)

As lagartas mortas, separadas por tratamento e repetição, e congeladas a -20°C , foram pesadas em balança de precisão, para se determinar a massa total de lagartas mortas, descongeladas em temperatura ambiente e maceradas num almofariz de porcelana para auxiliar a liberação dos corpos poliédricos de inclusão (PIB) do interior das lagartas. O líquido resultante foi filtrado com tecido voil para se separar as partes mais grosseiras da lagarta. Em seguida, o material mais grosseiro foi, novamente, macerado com água destilada para extrair o máximo de partículas virais do material, o qual também foi submetido à filtração em tecido de voil. A suspensão com as partículas virais foram colocadas em tubos tipo Falcon e os seus volumes completados com água destilada até o volume final de 40 mL. Em seguida, os poliedros foram contados em câmara de Neubauer com microscópio óptico e aumento de 400 vezes em alíquotas de 20 μL de cada uma das amostras, com 10 μL em cada um dos dois campos de contagem da câmara de Neubauer. Quatro contagens foram realizadas por cada uma das quatro repetições e a média das quatro contagens, por unidade experimental, utilizada para o cálculo do PIB total.

O número total de poliedros (PIB total) foi obtido com as contagens de poliedros e o volume total de suspensão viral presente em cada tubo Falcon, e o número médio de poliedros por lagarta morta (PIB/lag) dividindo-se o valor de PIB total pelo número de lagartas mortas por tratamento e repetição. O parâmetro lagarta equivalente por hectare (LE) foi estimado baseado na aplicação de $2,00 \times 10^{11}$ PIB por hectare (Valicente et al., 2013) e calculado dividindo-se $2,00 \times 10^{11}$ pelo valor de PIB/lag por repetição e tratamento.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, de homogeneidade de variâncias de Cochran e, sempre que necessário, transformados, para se obter distribuição normal dos resíduos e variâncias homogêneas para atender às

pressuposições de submissão à ANOVA. Os dados do parâmetro LE, de lagartas inoculadas com a concentração de $1,00 \times 10^8$, $1,00 \times 10^7$ e $1,00 \times 10^6$ PIB/mL, foram transformados para $\log(x)$. Os dados de PIB total para lagartas inoculadas com as concentrações de $5,00 \times 10^7$ e de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL foram transformados para \sqrt{x} . O parâmetro PIB/lag foi transformado em \sqrt{x} e $(1/x)$, para lagartas inoculadas com as concentrações de $5,00 \times 10^7$ e de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL, respectivamente. Os valores reais de PIB total, PIB/lag e LE foram apresentados nas tabelas e gráficos.

Os dados referentes a cada um dos parâmetros foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, as médias do fator idade comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. As médias do fator isolado não foram submetidas a esse teste, pois o resultado do teste F (5%) foi conclusivo, devido ao fato do número de graus de liberdade (GL) para o fator isolado ter sido um. Porém, o teste de Tukey foi aplicado em nível de 5% de significância quando houve interação entre os dois fatores. As análises estatísticas foram feitas com o software R (pacote ExpDes).

3. Resultados

3.1. Concentrações Letais

A susceptibilidade das lagartas de *S. frugiperda* para os dois isolados de SfMNPV diminuiu com o aumento da idade em que foram infectadas (Tabela 1). As CL_{50} estimadas do isolado 19 para as diferentes idades diferiram entre si pela análise da sobreposição dos intervalos de confiança, de $1,89 \times 10^5$ PIB/mL a $5,01 \times 10^6$ PIB/mL, para lagartas de seis e oito dias, respectivamente. A CL_{50} do isolado 6 para lagartas de seis dias diferiu apenas da CL_{50} para aquelas com oito dias, enquanto as CL_{50} estimadas para lagartas infectadas aos sete e oito dias de idade foram semelhantes, pela análise da sobreposição dos intervalos de confiança. As CL_{50} estimadas variaram de $9,58 \times 10^5$ PIB/mL a $2,23 \times 10^6$ PIB/mL para lagartas de seis e oito dias, respectivamente.

As CL_{50} de lagartas infectadas em uma mesma idade mostraram que aquelas infectadas aos seis dias foram mais susceptíveis ao isolado 19 que ao isolado 6. Lagartas infectadas aos sete dias apresentaram CL_{50} semelhantes para os isolados. Lagartas infectadas aos oito dias de idade mostraram maior eficiência do isolado 6 com CL_{50} estimada inferior à do isolado 19 (Tabela 1).

3.2. Parâmetros de Produção (PIB/total, PIB/lag e LE)

3.2.1. Concentração: $1,00 \times 10^8$ PIB/mL

As maiores mortalidades de *S. frugiperda* foram atingidas com concentração de SfMNPV de $1,00 \times 10^8$ PIB/mL, independente do isolado ou da idade do hospedeiro. Nesta concentração, a produção total de poliedros diferiu entre os isolados e entre as idades. Os fatores isolado e idade não mostraram interação e, por isto, foram analisados separadamente para o parâmetro PIB total. O PIB total do I6 foi maior que o do I19, $24,32 \times 10^9$ PIB e $13,61 \times 10^9$ PIB, respectivamente (Figura 4A). Lagartas inoculadas aos oito dias apresentaram maior produção total de poliedros que as lagartas inoculadas nas demais idades, estas com valores semelhantes entre si. Os valores estimados para o PIB total foram de $12,64 \times 10^9$, $16,35 \times 10^9$ e $27,91 \times 10^9$ PIB/mL para lagartas inoculadas aos seis, sete e oito dias, respectivamente (Figura 4B).

A produção de poliedros por lagarta (PIB/lag) diferiu entre os isolados e entre as idades, mas estes fatores não mostraram interação e, por isto, foram analisados separadamente. A quantidade de PIB/lag do I6 foi maior que a do I19, $1,10 \times 10^9$ PIB/lag e $6,08 \times 10^8$ PIB/lag, respectivamente (Figura 4C). Lagartas infectadas aos oito dias produziram $1,25 \times 10^9$ PIB/lag, valor maior que aquelas com idades de seis ($5,89 \times 10^8$ PIB/lag) e sete dias ($7,20 \times 10^8$ PIB/lag) (Figura 4D).

A diferença entre as médias dos valores de LE e a interação entre os fatores isolado e idade foram significativas. Dentro dos níveis do fator I6 o melhor desempenho foi obtido com lagartas infectadas aos oito dias de idade, mostrando que a obtenção de uma dose de bioinseticida deste isolado precisa de um menor número de lagartas inoculadas aos oito dias de idade que de seis e sete dias. Nos níveis do fator I19 com lagartas inoculadas aos oito dias obteve-se o menor valor de LE. Considerando-se os níveis do fator idade dentro dos níveis do fator isolado, para todas as idades testadas, o I6 apresentou desempenho superior ao I19. Isso mostra que o I6 pode ser multiplicado com um menor número de lagartas para a obtenção de uma dose do bioinseticida formulado, proporcionando ganho na produção, altamente desejado em sistema de produção em larga escala (Tabela 2).

A concentração de $1,00 \times 10^8$ PIB/mL mostrou ser desaconselhável a utilização de lagartas de seis dias de idade, em relação àquelas de sete ou oito, para a produção do

baculovírus. O aumento em dois dias na idade de inoculação das lagartas mais que duplicou a produção total de poliedros.

3.2.2. Concentração: $5,00 \times 10^7$ PIB/mL

O parâmetro PIB total mostrou interação entre os fatores isolado e idade, com o I6 proporcionando maior produção de poliedros em lagartas de oito dias e com o I19 proporcionando produção de poliedros semelhante com as diferentes idades avaliadas. Os níveis do fator idade por nível do fator isolado mostrou maior desempenho do I6 que o I19 em todas as idades testadas (Tabela 3).

O parâmetro PIB/lag mostrou diferenças para ambos os fatores testados, porém sem interação entre eles, com o I6 apresentado desempenho superior ao I19 (Figura 5A), a idade de oito dias com melhores resultados e seis dias apresentando o pior desempenho (Figura 5B).

Os dados do parâmetro LE mostraram diferenças significativas para os fatores isolado e idade, mas sem interação entre eles. O I6 apresentou menor valor de LE que o I19 (Figura 5C). Lagartas infectadas aos sete ou oito dias apresentaram LE menor que o daquelas infectadas aos seis dias (Figura 5D).

3.2.3. Concentração: $1,00 \times 10^7$ PIB/mL

A análise de variância mostrou interação significativa entre os fatores isolado e idade, para os parâmetros de produção PIB total, PIB/lag e LE. O desdobramento da interação mostrou que, dentro dos níveis do I6, a idade de oito dias proporcionou maior PIB total, maior PIB/lag e menor LE, enquanto para o I19 as três idades apresentaram desempenhos diferentes e com oito dias superando as demais idades, para os parâmetros PIB/lag e LE, porém com maior PIB total na idade de oito dias que a de seis dias e médias semelhantes de produção total de vírus para lagartas inoculadas aos sete e oito dias. Os níveis do fator idade dentro dos níveis do fator isolado mostraram que o I6 superou o I19 em todas as idades de inoculação das lagartas de *S. frugiperda*, para os parâmetros PIB total, PIB/lag e LE (Tabela 4). Isto reforça o fato de que o isolado 6 é mais recomendado para multiplicação em larga escala de poliedros virais em lagartas de *S. frugiperda* e que estas devem ser inoculadas com o vírus aos oito dias de vida.

3.2.4. Concentração: $1,00 \times 10^6$ PIB/mL

O teste F (5%) não mostrou diferenças entre a produção total de poliedros nas três idades (Figura 6B). No entanto, a produção viral a partir de lagartas infectadas com o I6 superou a daquelas infectadas pelo I19 (Figura 6A), sem interação entre os fatores isolado e idade.

A produção semelhante de poliedros nas diferentes idades, provavelmente, se deve à menor diferença entre a mortalidade de lagartas inoculadas aos oito dias, comparada à daquelas inoculadas aos seis dias de idades, 28,50 e 74,77%, respectivamente, infectadas com o I19. A produção de poliedros na idade de seis dias foi semelhante à daquela aos oito dias, porque o número de lagartas do qual foram extraídos os poliedros, para lagartas inoculadas aos 6 dias foi maior (superior ao dobro) que o de lagartas inoculadas aos 8 dias de idade. Isso torna evidente que a produção de poliedros virais por lagarta morta (PIB/lag) foi maior para aquelas inoculadas aos oito dias de idade, comparado àquelas inoculadas aos seis dias de idade (Figura 6D).

Lagartas mortas pelo isolado 6 de SfMNPV apresentaram maior valor de PIB/lag que aquelas infectadas pelo isolado 19 (Figura 6C), conseqüentemente, o valor de LE do I6 foi inferior ao do I19, na concentração de $1,00 \times 10^6$ PIB/mL (Figura 6E). A produção de corpos poliédricos de inclusão por lagartas inoculadas aos oito dias de idade foi maior que aquelas inoculadas aos seis dias de idade. Por isto, o número de lagartas necessárias à fabricação de uma dose do bioinseticida formulado à base de SfMNPV foi menor com lagartas inoculadas aos oito dias de idade que com aquelas inoculadas aos seis dias (Figura 6F).

4. Discussão

4.1. Concentrações Letais

A menor CL_{50} estimada para lagartas de seis dias em relação à CL_{50} estimada para lagartas de oito dias concorda com a diminuição da susceptibilidade em lagartas inoculadas com baculovírus com o aumento de sua idade (Bianchi et al., 2000a, 2000b; Escribano et al., 1999; Smits e Vlask, 1988). Os fatores que envolvem o desenvolvimento da resistência começam a agir durante a infecção primária do tecido alvo, no intestino médio larval, e não durante a infecção sistêmica subsequente, como em lagartas de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), capazes de se livrarem

da infecção por *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* por descamação das células intestinais infectadas durante a muda a partir do quarto para o quinto instar (Engelhard e Volkman, 1995). Isto explica porque a infectividade diminui com os estádios de desenvolvimento.

Isolados de regiões geográficas diferentes apresentam infectividades distintas (Barrera et al., 2011), isso porque, grandes diferenças na infectividade do vírus podem ser associadas com pequenas alterações em sua estrutura (Crook, 1981). Quatro isolados geográficos de SfMNPV (dois dos Estados Unidos, um da Nicarágua e um da Argentina), também, mostraram concentrações letais (CL_{50}) diferentes para cada um infectando lagartas de *S. frugiperda* de uma mesma população (criação massal) (Escribano et al., 1999). O isolado 6 foi proveniente do município de Cascavel e o 19 obtido de lagartas coletadas no município de Sertaneja, ambos no Estado do Paraná, Brasil (Barreto et al., 2005).

3.2. Parâmetros de Produção (PIB/total, PIB/lag e LE)

A multiplicação do baculovírus, em todas as concentrações testadas, foi maior utilizando-se o isolado 6 que o 19. O isolado 6 apresentou melhor desempenho para todos os parâmetros avaliados (PIB total, PIB/lag e LE).

Todos os resultados obtidos para os parâmetros de produção viral (PIB total, PIB/lag e LE), para todas as concentrações, idades e isolados foram apresentados (Figuras 7A, 7B e 7C, respectivamente).

Os isolados 6 e 19 foram eficientes para controlar lagartas de *S. frugiperda* com até oito dias de idade. O isolado 6 não provoca o rompimento imediato do tegumento das lagartas após a morte das mesmas, enquanto o I19 sim, o que causa o extravasamento do conteúdo celular das lagartas e, conseqüentemente, das partículas virais presentes. Por isto, a perda de poliedros é menor com o I6.

O processo de infecção causado pelo isolado 6 pode não ter, necessariamente, produzido maior número de poliedros que o I19, mas as perdas de material viral, provocadas pelo rompimento das lagartas após a sua morte, foram significativas, podendo ser um fator limitante à produção em larga escala de bioinseticida a base de SfMNPV. A produção total de poliedros virais é positivamente correlacionada com o tempo letal, ou seja, quanto maior a TL_{50} de um determinado isolado viral, maior a produção total de poliedros a partir deste isolado (Murillo et al., 2006, Simón et al.,

2008). Isto provavelmente explica, em parte, a diferença entre a produção de poliedros dos isolados 6 e 19 de SfMNPV com as lagartas morrendo mais rápido com o I19 que com o I6. Por exemplo, lagartas infectadas aos 6 dias de idade tiveram mortalidade de 100% com a concentração de $1,00 \times 10^8$ PIB/mL para os dois isolados, mas com o I19, todas as lagartas morreram até o sexto dia, enquanto isto ocorreu após 11 dias de avaliação com o isolado I6. Essa diferença foi menor para lagartas inoculadas aos oito dias de idade entre os isolados e o tempo para causar a mortalidade máxima foi maior, com o I19 atingindo mortalidade máxima (91,75%) após nove dias, enquanto o I6 atingiu mortalidade máxima (94,74%) após 11 dias de avaliação. A deleção do gene da *egt*, que codifica para a produção da enzima UDP-glicosiltransferase, responsável pela inativação dos ecdisteróides do hospedeiro, envolvidos na regulação do desenvolvimento larval e na ecdise, causa a morte acelerada da lagarta hospedeira (O'Reilly et al., 1991; Simón et al., 2012). O mapeamento do genoma do I19 de SfMNPV mostrou que o gene da *egt* sofreu algum tipo de alteração e que este gene sofre pressão seletiva negativa (Wolff et al., 2008), tendo sido sugerido que a deleção da *egt* do I6 aumentaria o seu potencial de utilização em larga escala (Vieira et al., 2012). A diferença observada na produção de poliedros entre os isolados 6 e 19 se deve, em grande parte à característica do isolado 6 de não romper o tegumento da lagarta imediatamente após causar sua morte. No entanto, a correlação entre a produção de poliedros e o tempo letal para isolados de *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus* sugerem que esta pode não ser a única explicação para o maior rendimento em multiplicação viral do I6 (Murillo et al., 2006, Simón et al., 2008). O tempo letal de SfMNPV com lagartas de *S. frugiperda*, também, aumentou com o avanço dos estádios de desenvolvimento larval (Escribano et al., 1999). A velocidade relativamente lenta de morte tem sido uma limitação para a utilização de baculovírus, mas esta não seria uma desvantagem séria em plantas de milho que podem suportar desfolhamento moderado, sem perdas significativas no rendimento econômico (Williams et al. 1999).

O rompimento do tegumento das lagartas de *S. frugiperda* pelo baculovírus, é economicamente prejudicial, também, pelo aumento da necessidade de mão-de-obra e tempo de trabalho para se coletar as lagartas mortas rompidas em relação às não rompidas, o que oneraria o custo de produção de um bioinseticida. Além disso, as lagartas necessitam estar congeladas no momento da coleta, para minimizar as perdas do rompimento provocado pelo I19, sendo este um fator desfavorável à utilização do

isolado. Isto aumenta o consumo energético da utilização de freezers para o congelamento das lagartas mortas e a necessidade de maior espaço físico em uma biofábrica (Valicente et al., 2013).

A idade larval mais recomendada para a inoculação do baculovírus é o oitavo dia, para os isolados 6 e 19, pois todos os parâmetros de produção estimados mostraram que a inoculação no oitavo dia de vida das lagartas não reduziu a produção viral em relação às demais idades. O aumento do número de células para serem infectadas à medida que as lagartas crescem e se desenvolvem, explica a maior quantidade de vírus multiplicado. A produção de PIB/lagarta infectada por SfMNPV aumentou e foi diretamente proporcional ao estágio de desenvolvimento larval em que a inoculação do vírus foi feita (Rios-Velasco et al., 2012). Contudo, a concentração de PIB/mm² de dieta artificial para matar lagartas de quinto e sexto instares foi maior.

A idade mais apropriada para a inoculação viral é aos oito dias e, dentre as concentrações testadas, para o I6, como indicado pela sobreposição dos erros padrão da média, a produção total de poliedros virais foi semelhante a partir da concentração de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL e foram as concentrações mais indicadas para se inocular o isolado 6 de SfMNPV (Figura 7A). As concentrações de $1,00 \times 10^7$ e $1,00 \times 10^8$ PIB/mL foram mais eficientes para aumentar a produção viral com o isolado 19 (Figura 7A). O parâmetro lagarta equivalente por hectare (LE) é importante para se determinar a eficiência de um método de multiplicação em larga escala de baculovírus. No entanto, o PIB total é o parâmetro que mostra a maximização da multiplicação viral e, conseqüentemente, a melhor idade larval, o melhor isolado e a melhor concentração a ser utilizada. A produção em massa de baculovírus por métodos *in vivo* é influenciada por fatores como a idade em que as lagartas são inoculadas com o vírus, a concentração de vírus e a temperatura de incubação. A idade das lagartas na inoculação e a concentração de vírus devem ser sincronizadas para resultar em morte de insetos, numa fase larval totalmente crescida (e ainda suscetível) para maximizar a produtividade (Subramanian et al., 2006).

Os dois isolados foram eficientes para causar a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*, mas o I6 é o mais indicado para maximizar a produção viral. A melhor idade para se inocular o vírus é no oitavo dia de vida das lagartas. A produção viral foi maior com o isolado 6 e utilizando-se concentrações de suspensão viral a partir de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL.

Agradecimentos

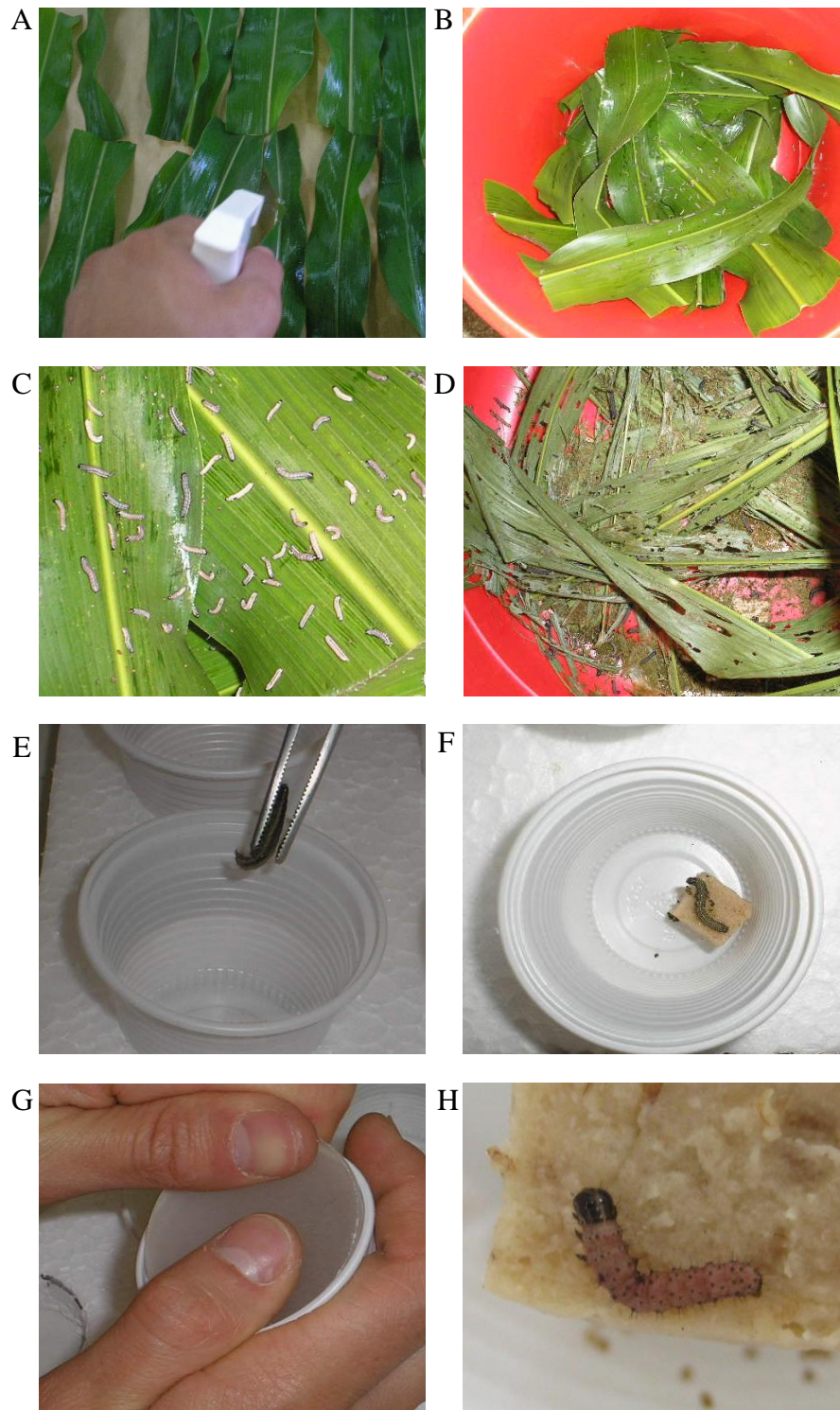
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelas bolsas e auxílios concedidos.

Referências

- Barrera, G., Simón, O., Villamizar, L., Williams, T., Cabalero, P., 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biol. Control* 58, 113-120.
- Barreto, M.R., Guimarães, C.T., Teixeira, F.F., Paiva, E., Valicente, F.H., 2005. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. *Neotrop. Entomol.* 34, 67-75.
- Bianchi, F.J.J.A., Joosten, N.N., Vlak, J.M., Van der Werf, W., 2000a. Greenhouse evaluation of dose- and time-mortality relationships of two nucleopolyhedroviruses for the control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, on Chrysanthemum. *Biol. Control* 19, 252-258.
- Bianchi, F.J.J.A., Snoeijs, I., Van der Werf, W., Mans, R.M.W., Smits, P.H., Vlak, J.M., 2000b. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 75, 28-35.
- Crook, N.E., 1981. A comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae*. *Virology* 115, 173-181.
- Engelhard, E.K., Volkman, L.E., 1995. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus. *Virology* 209, 384-389.
- Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R.D., Chapman, J.W., Caballero, P., 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J. Econ. Entomol.* 92 (5), 1079-1085.

- Federici, B.A., 1999. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.), *Methods in biotechnology: biopesticides, use and delivery*. Humana Press, Totowa, 5, pp. 301-320.
- Hawtin, R.E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C.J., Gooday, G.E., King, L.A., Kuzio, J.A., Possee, R.D., 1997. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238 (2), 243-253.
- Murillo, R., Elvira, S., Muñoz, D., Williams, T., Caballero, P., 2006. Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain. *Biol. Control* 38, 157-165.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the EGT gene. *Nature Biotechnology* 9, 1086-1089.
- R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rios-Velasco, C., Gallegos-Morales, G., Berlanga-Reyes, D., Cambero-Campos, J., Romo-Chacón, A., 2012. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. *Florida Entomol.* 95 (3), 752-757.
- SAS Institute Inc., 2009. SAS/STAT® 9.2. User's guide, Second Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Taulemesse, J., Caballero, P., 2008. Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*. *Biol. Control* 44, 321-330.
- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2012. Deletion of *egt* is responsible for the fast-killing phenotype of natural deletion genotypes in a *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* population. *J. Invertebr. Pathol.* 111, 260-263.
- Smits, P.H., Vlak, J.M., 1988. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 51, 107-114.
- Subramanian, S., Santharam, G., Sathiah, N., Kennedy, J.S., Rabindra, R.J., 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* 37, 367-374.

- Valicente, F.H., Barreto, M.R., 2003. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 32, 639-644.
- Valicente, F.H., Costa, E.F., 1995. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus spodoptera* via água de irrigação. An. Soc. Entomol. Brasil 24, 61-67.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Paiva, C.E.C., Guimarães, M.R.F., Macedo, C.V., Wolff, L.C., 2008. A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae. Rev. Bras. Milho Sorgo 7, 77-82.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Pena, R.C., Andreazza, R., Guimarães, M.R.F., 2013. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with *Baculovirus spodoptera*. Neotrop. Entomol. 42, 191-199.
- Vieira, C.M., Tuelher, E.S., Valicente, F.H., Wolff, J.L.C., 2012. Characterization of a *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. J. Invertebr. Pathol. 111 (2), 189-192.
- Williams, T., Goulson, D., Caballero, P., Cisneros, J., Martínez, A.M., Chapman, J.W., Romans, D.X., Cave, R.D., 1999. Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. Biol. Control 14, 67-75.
- Wolff, J.L.C., Valicente, F.H., Martins, R., Oliveira, J.V.C., Zanotto, P.M.A., 2008. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. J. Gen. Virol. 89 (5), 1202-1211.



Fotos: Edmar de Souza Tuelher

Figura 1. Processo de multiplicação de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) utilizando folhas de milho como substrato para a inoculação do vírus: pulverização da suspensão viral (A); disposição das folhas pulverizadas com vírus em recipiente de plástico (B); lagartas saudáveis sobre as folhas pulverizadas com o vírus (C); folhas após 48 horas de alimentação das lagartas (D); individualização da lagarta (E); copo de polietileno contendo dieta artificial e a lagarta infectada (ainda sem sintomas aparentes) (F); copo de polietileno sendo lacrado com tampa de acrílico (G); lagarta com sintoma de infecção pelo vírus (H).

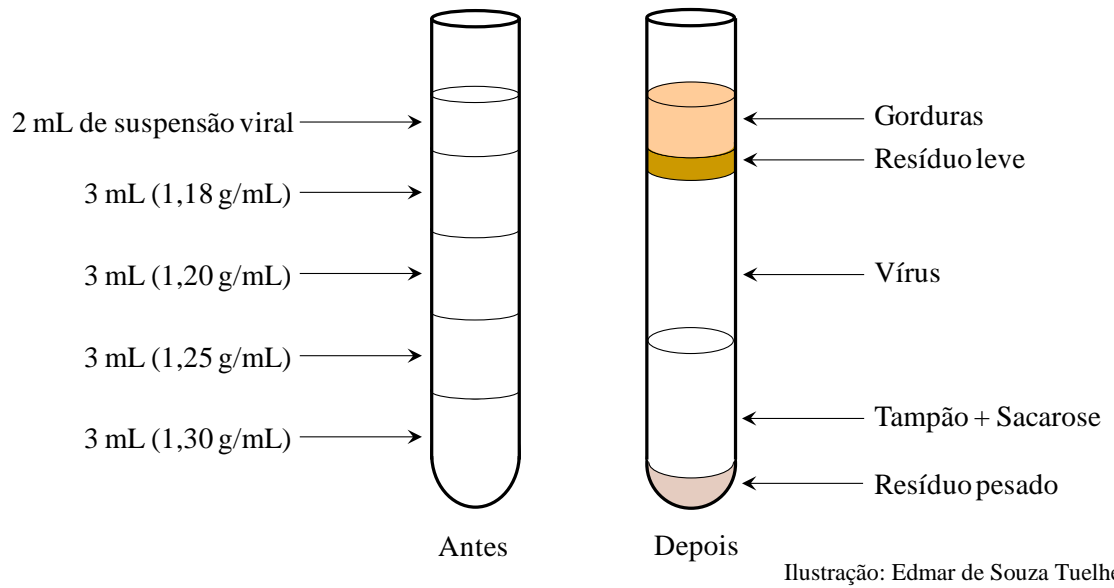


Figura 2. Disposição do gradiente de sacarose e da suspensão viral nos tubos antes e após a centrifugação.

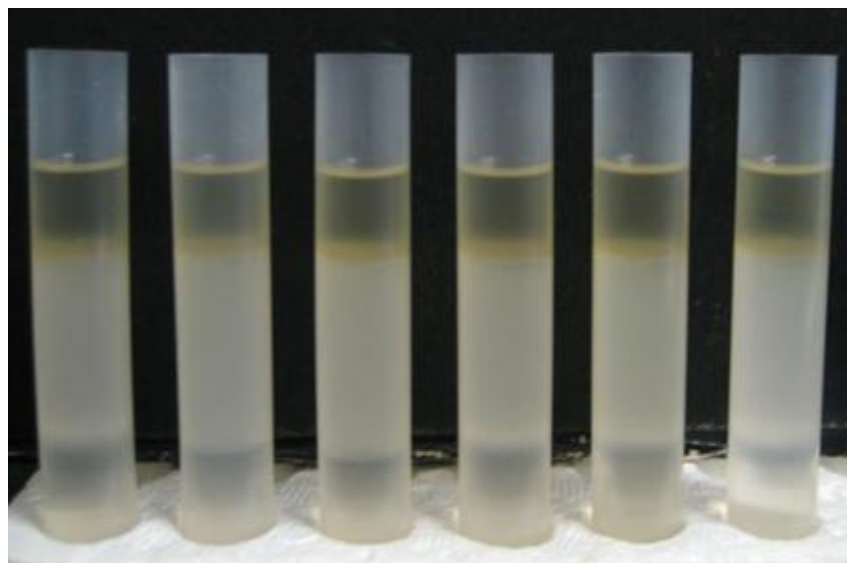


Ilustração: Edmar de Souza Tuelher

Figura 3. Material originário do isolado 6 após o processo de purificação em gradiente de sacarose. As duas bandas superiores de cor amarronzada e a inferior de cor clara são descartadas. A banda central, de aspecto leitoso, é o vírus purificado.

Tabela 1. Concentração letal de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas aos seis, sete e oito dias de idade, com um isolado viral que causa (isolado 19) e outro que não causa (isolado 6) o rompimento imediato do tegumento larval após a morte das lagartas

Idade (dias)	Inclinação \pm EP	CL ₅₀ (PIB/mL) (IC a 95%)	CL ₉₅ (PIB/mL) (IC a 95%)	χ^2	p	GL
Isolado 19						
6	0,217 \pm 0,012	1,89 x 10 ⁵ (1,0 x 10 ⁵ - 3,4 x 10 ⁵)	1,35 x 10 ⁷ (5,7 x 10 ⁶ - 4,4 x 10 ⁷)	4,17	0,52	5
7	0,229 \pm 0,011	9,27 x 10 ⁵ (6,6 x 10 ⁵ - 1,3 x 10 ⁶)	3,53 x 10 ⁷ (2,2 x 10 ⁷ - 6,3 x 10 ⁷)	1,48	0,92	5
8	0,195 \pm 0,015	5,01 x 10 ⁶ (3,6 x 10 ⁶ - 7,0 x 10 ⁶)	3,38 x 10 ⁸ (1,9 x 10 ⁸ - 7,0 x 10 ⁸)	1,54	0,91	5
Isolado 6						
6	0,191 \pm 0,011	9,58 x 10 ⁵ (6,5 x 10 ⁵ - 1,4 x 10 ⁶)	3,92 x 10 ⁷ (2,4 x 10 ⁷ - 7,5 x 10 ⁷)	2,79	0,83	6
7	0,212 \pm 0,012	1,01 x 10 ⁶ (5,9 x 10 ⁵ - 1,7 x 10 ⁶)	1,02 x 10 ⁸ (4,8 x 10 ⁷ - 2,8 x 10 ⁸)	1,46	0,92	5
8	0,206 \pm 0,012	2,23 x 10 ⁶ (1,5 x 10 ⁶ - 3,2 x 10 ⁶)	1,92 x 10 ⁸ (1,1 x 10 ⁸ - 4,1 x 10 ⁸)	3,44	0,63	5

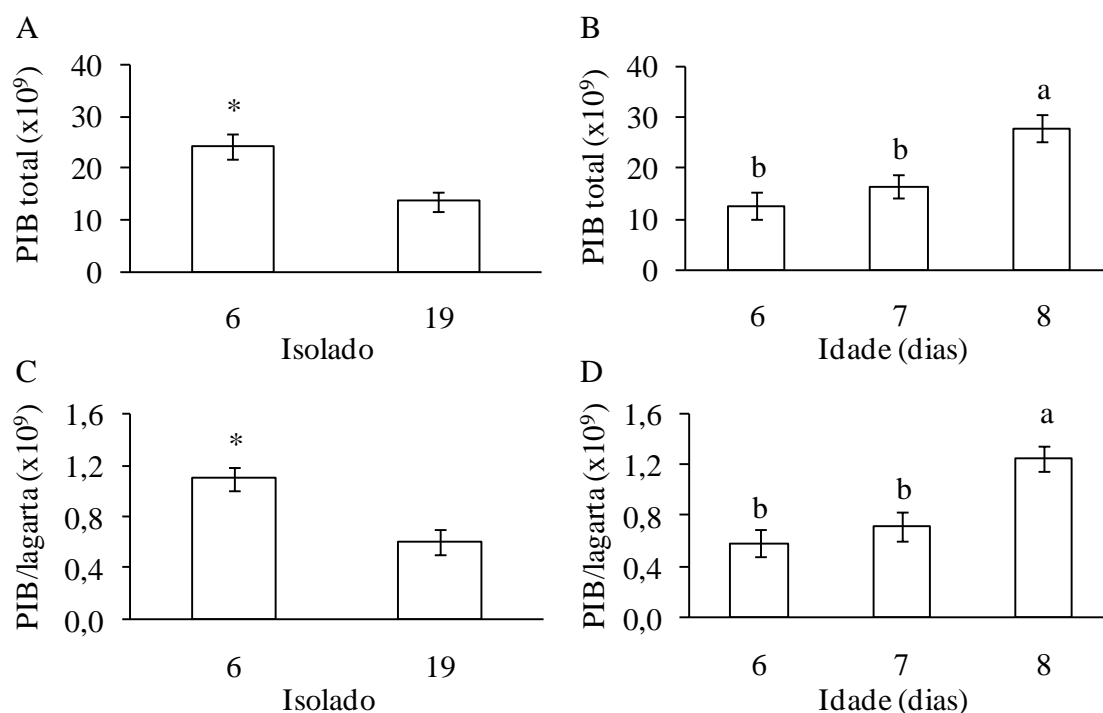


Figura 4. Total de poliedros (A, B) e número médio de poliedros por lagarta (C, D) extraídos de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), infectadas com dois diferentes isolados de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* e em três idades distintas, na concentração de $1,00 \times 10^8$ PIB/mL. * Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Lagarta equivalente de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), infectadas com seis, sete e oito dias de idades, com dois diferentes isolados de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* na concentração de $1,00 \times 10^8$ PIB/mL

Isolado	6 dias	7 dias	8 dias
6	251 ± 30 bA	206 ± 17 bA	136 ± 06 bB
19	588 ± 67 aA	455 ± 42 aA	199 ± 15 aB

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

Tabela 3. Total de poliedros (x10⁹) extraídos de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas com seis, sete e oito dias de idades, com dois diferentes isolados de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* na concentração de $5,00 \times 10^7$ PIB/mL

Isolado	6 dias	7 dias	8 dias
6	15,58 ± 0,96 aB	20,74 ± 1,87 aB	30,72 ± 1,86 aA
19	10,57 ± 0,77 bA	14,88 ± 1,12 bA	14,40 ± 1,56 bA

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

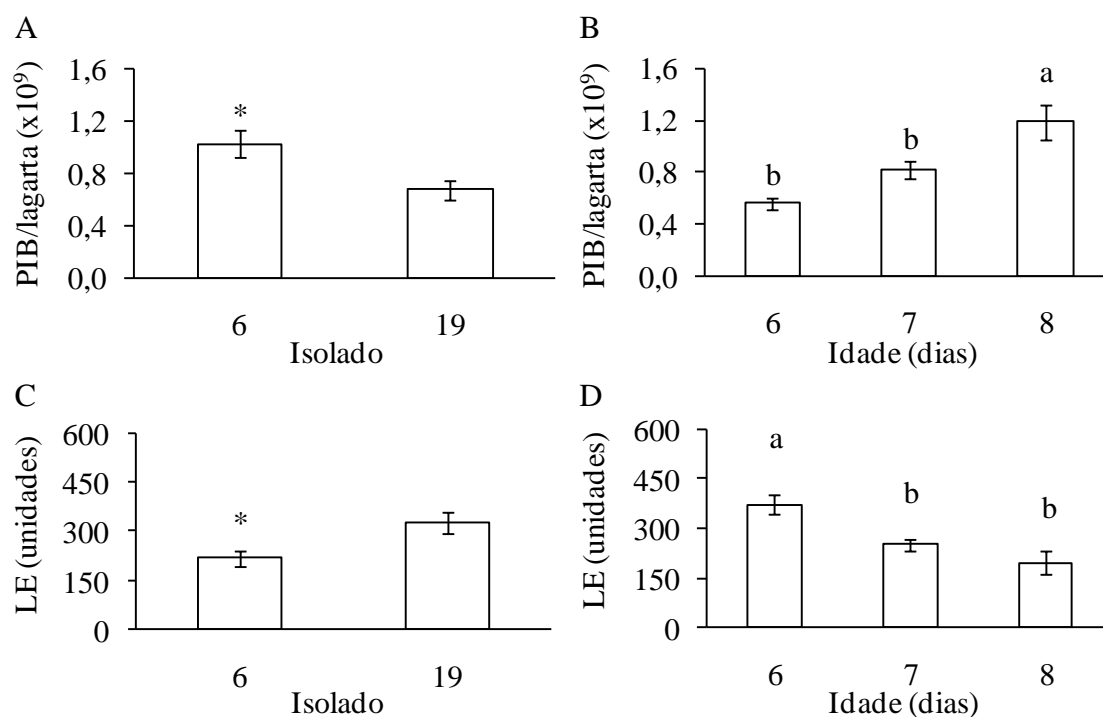


Figura 5. Número médio de poliedros (A, B) extraídos por lagarta e lagarta equivalente (C, D) de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), infectadas com dois diferentes isolados de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* e em três idades distintas, na concentração de $5,00 \times 10^7$ PIB/mL. * Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste F. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Total de poliedros, número médio de poliedros extraídos por lagarta e lagarta equivalente de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas com seis, sete e oito dias de idades, com dois diferentes isolados de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* na concentração de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL

Isolado	6 dias	7 dias	8 dias
	PIB total (x10 ⁹)		
6	20,20 ± 0,41 aB	19,33 ± 0,98 aB	35,37 ± 3,74 aA
19	11,69 ± 0,67 bB	14,27 ± 0,43 bAB	17,94 ± 2,76 bA
	PIB/lagarta (x10 ⁹)		
6	0,93 ± 0,04 aB	0,98 ± 0,05 aB	1,90 ± 0,15 aA
19	0,51 ± 0,03 bC	0,73 ± 0,03 bB	1,14 ± 0,18 bA
	LE (unidades)		
6	216 ± 10 bA	206 ± 09 bA	107 ± 09 bB
19	398 ± 24 aA	274 ± 10 aB	185 ± 22 aC

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

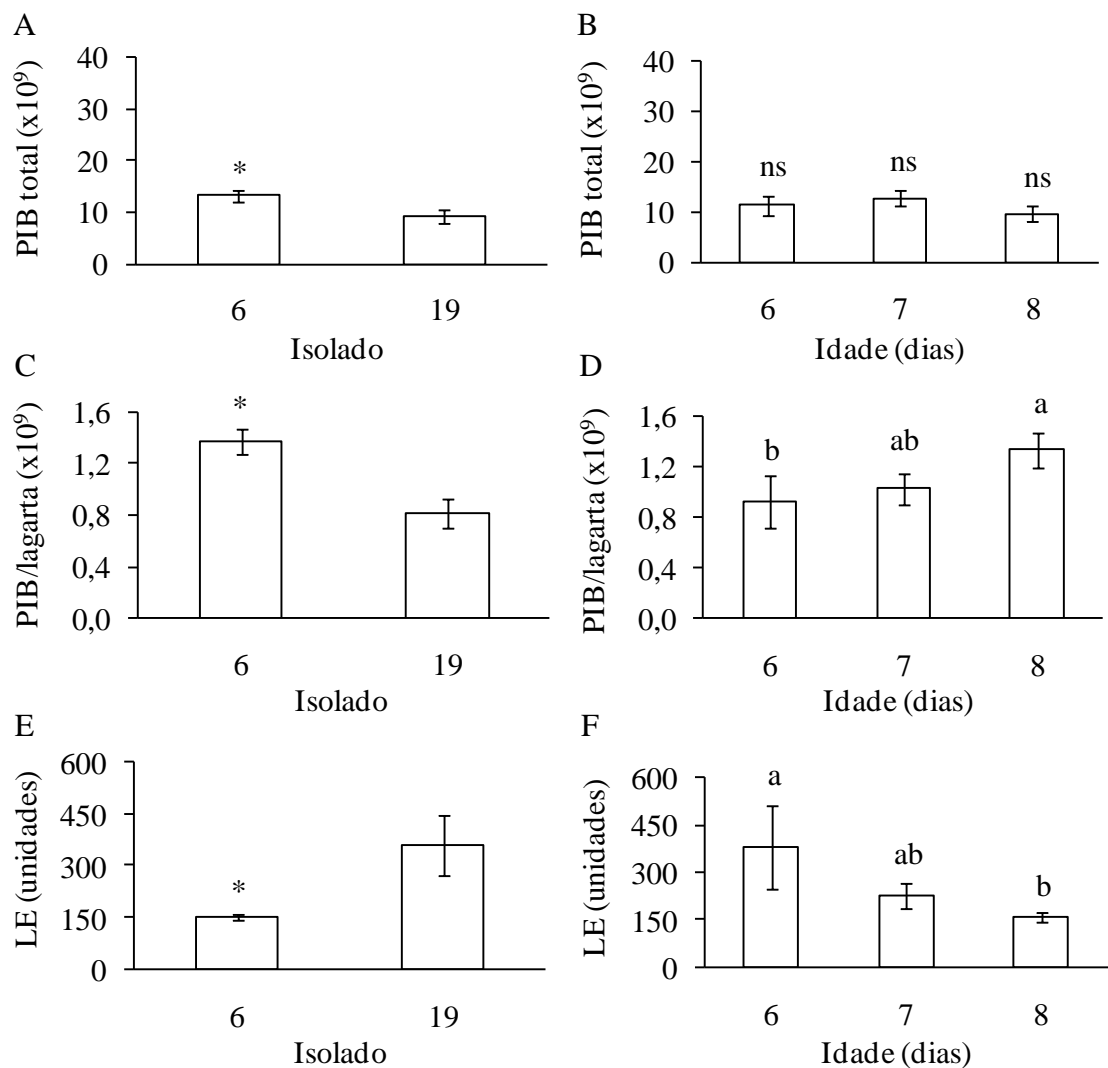


Figura 6. Total de poliedros (A, B), número médio de poliedros extraídos por lagarta (C, D) e lagarta equivalente (E, F) de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), infectadas com dois diferentes isolados de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* e em três idades distintas, na concentração de $1,00 \times 10^6$ PIB/mL. ^{ns}, * Não significativo e significativo, em nível de 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

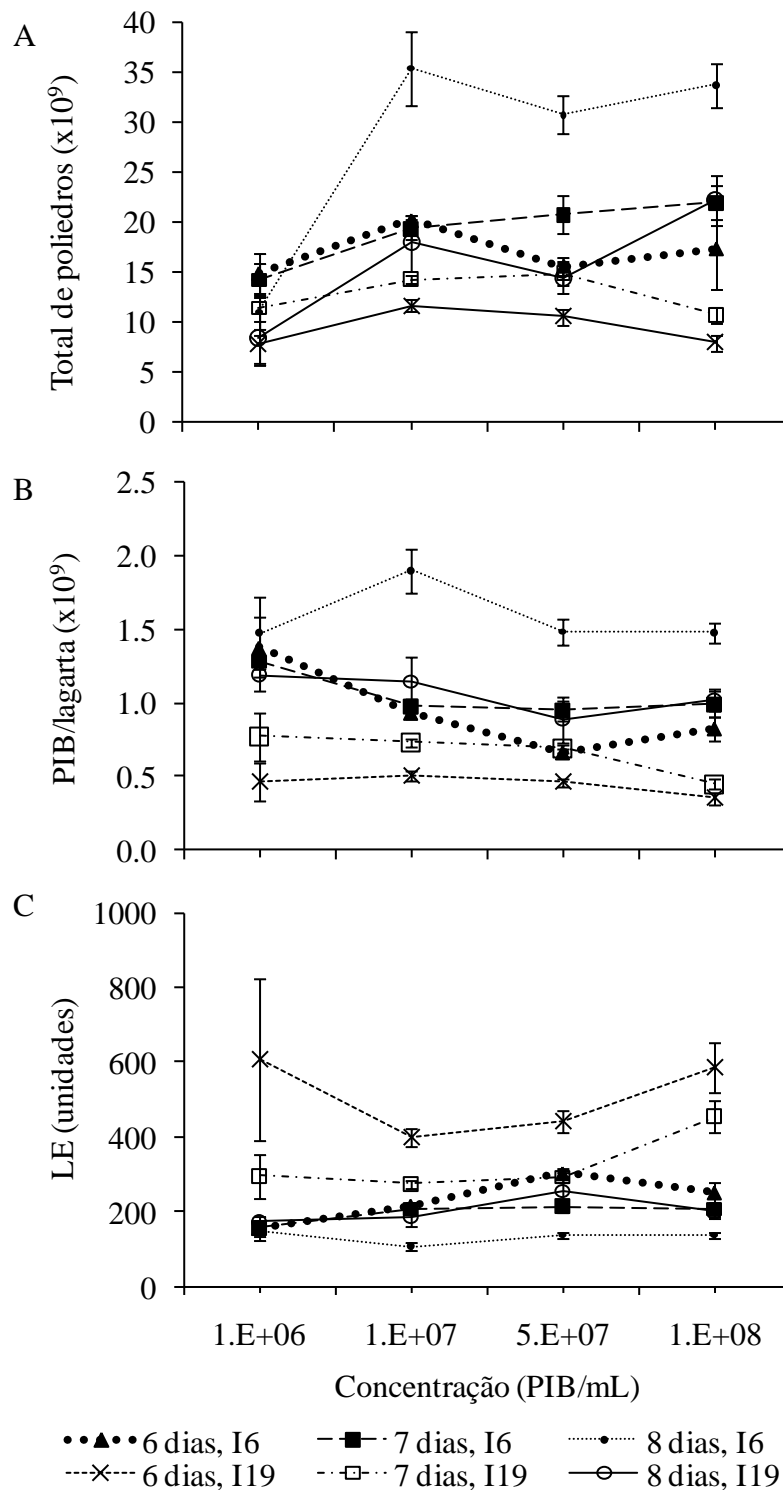


Figura 7. Produção total (A), número médio de poliedros extraídos por lagarta (B) e lagarta equivalente (C) de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), inoculadas em três diferentes idades, com dois isolados distintos e com diferentes concentrações de suspensão viral. As barras verticais sobre cada ponto representam o erro padrão da média.

CAPÍTULO 3

Peso de lagartas mortas e produção de poliedros de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) são influenciados pela idade de inoculação e concentração da suspensão viral

RESUMO – *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) possui potencial para programas de manejo integrado de pragas (MIP) da principal praga do milho, *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), mas não existem produtos comerciais à base de SfMNPV no mercado. A quantidade de produto a ser fabricado em sistemas de produção em larga escala é determinada pelo número de corpos poliédricos (PIB) produzidos, a qual está relacionada com o número de lagartas mortas com sintomas típicos de infecção por baculovírus. Lagartas mortas pelo baculovírus têm tamanhos diferentes e o número de poliedros de cada uma pode estar relacionado ao tamanho das mesmas. Isto indica que o número de poliedros de lagartas mortas poderia estar correlacionado com o peso das mesmas. Um experimento com lagartas de *S. frugiperda* de três idades (seis, sete e oito dias), inoculadas com cinco concentrações virais ($1,00 \times 10^5$, $1,00 \times 10^6$, $1,00 \times 10^7$, $5,00 \times 10^7$ e $1,00 \times 10^8$ PIB/mL) em quatro repetições foi desenvolvido com 24 lagartas por repetição. Todas as correlações foram positivas e significativas para o peso total ($r= 0,958$, $n= 60$ e $p< 0,0001$), mesmo dentro de cada idade ou concentração, separadamente. O número de lagartas apresentou correlação com o total de tratamentos ($r= 0,723$, $n= 60$ e $p< 0,0001$) e por idade. Por concentração, apresentou correlação, apenas, nas concentrações de $1,00 \times 10^6$ ($r= 0,643$, $n= 12$, $p< 0,0242$) e, $1,00 \times 10^8$ ($r= 0,657$, $n= 12$, $p< 0,0202$), no entanto, a correlação não foi muito forte. O peso de lagartas mortas por baculovírus pode ser um parâmetro mais confiável que o número de lagartas para a produção de um produto comercial a base de SfMNPV, em razão da correlação com a produção total de poliedros. A massa de lagartas de *S. frugiperda*, mortas por SfMNPV, inoculadas aos oito dias de idade foi maior. O peso equivalente por dose foi semelhante com as diferentes concentrações de suspensões virais utilizadas na inoculação de SfMNPV.

Palavras-chave: Baculovírus, *Spodoptera frugiperda*, idade larval, peso equivalente

ABSTRACT – *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) has a great potential for programs of Integrated Pest Management (IPM) to control the main maize pest, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). However, no commercial products based on SfMNPV available. In a system for large scale production, the amount of product to be manufactured is determined by the number of polyhedral bodies (PIB) produced. In various publications the amount of virus produced is related to the number of dead larvae with typical symptoms of infection with baculovirus.

However, it was observed that the larvae killed by baculoviruses don't have a uniform size and it was suggested that the number of polyhedra obtained from them could be related to their size, which leads us to assume that the number of polyhedra obtained from of dead larvae be more correlated with the weight of dead larvae, rather than the number of larvae. To test this hypothesis, an experiment was done with larvae of *S. frugiperda* in three ages (6, 7 and 8 days old) were inoculated with five viral concentrations (1.00×10^5 , 1.00×10^6 , 1.00×10^7 , 5.00×10^7 and 1.00×10^8 PIB/mL) and 4 replicates per treatment, each replicate consisted of 24 larvae. All correlations were positive and significant for the total weight ($r= 0.958$, $n= 60$, $p< 0.0001$) even when considered in each age or concentration separately. For the number of larvae, the correlation was significant when considering the amount of treatment ($r= 0.723$, $n= 60$, $p< 0.0001$) in each age and within each concentration was significant only at concentrations of 1.00×10^6 ($r= 0.643$, $n= 12$, $p< 0.0242$) and 1.00×10^8 ($r= 0.657$, $n= 12$, $p< 0.0202$), where, however, the correlation wasn't very strong. Therefore, the weight of dead larvae by baculoviruses can be considered a more reliable parameter than the number of larvae to produce a commercial product based SfMNPV in order that stronger and correlates significantly with the total output of polyhedra. Eight days old larvae of *S. frugiperda*, killed by SfMNPV had the highest average mass. The equivalent weight per dose doesn't change between concentrations of the different solutions used in the viral inoculation SfMNPV.

Keywords: Baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, age larval, equivalent weight

1. Introdução

Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV ou, baculovirus *spodoptera*) possui potencial para programas de manejo integrado de pragas, devido a elevada capacidade de mortalidade da principal praga da cultura do milho no país, a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Valicente e Costa, 1995; Barreto et al., 2005; Moscardi, 1999; Rios-Velasco et al., 2012). O uso desse bioinseticida pode ser iniciado com a aplicação deste vírus desde a fase de ovo da praga (Rios-Velasco et al., 2012), mas não existem produtos comerciais à base de SfMNPV no mercado.

Isolados nativos de SfMNPV com alta atividade contra *S. frugiperda* foram selecionados e padronizado um sistema de produção em pequena escala com lagartas

criadas em laboratório e sua eficiência avaliada no campo, com mortalidade da lagarta-do-cartucho entre 89% e 90% (Valicente e Costa, 1995).

A quantidade de bioinseticida produzido é determinada pelo número de corpos poliédricos de inclusão (PIB – polyhedral inclusion bodies) obtidos de lagartas mortas pelo vírus e, por isto, a padronização de um sistema de produção em larga escala é necessária.

O uso de baculovírus tem sido estudado baseado na produção de corpos poliédricos de inclusão em relação ao número de lagartas mortas (PIB/lag) (Barrera et al., 2011, Cabodevilla et al., 2011, Serrano et al., 2013 e Simón et al., 2008a, 2008b). No entanto, lagartas mortas de mesma idade e isolado de SfMNPV na mesma temperatura para multiplicação do vírus em laboratório apresentaram tamanhos diferentes (Figura 1). Por isto, o número de poliedros obtido pode estar correlacionado com o tamanho das mesmas, contudo, padronizar o sistema de produção de baculovírus em relação ao tamanho da lagarta morta seria inviável, devido ao tempo despendido para medir o tamanho das mesmas. Como alternativa, foi sugerido que o número de poliedros pode estar correlacionado à massa de lagartas mortas.

A maioria dos isolados de SfMNPV rompe o tegumento larval de *S. frugiperda* imediatamente após causar sua morte. Por isto, as lagartas mortas não podiam ser usadas para estimar a produção de bioinseticida, por causa do extravasamento do conteúdo celular das lagartas mortas devido seu rompimento. Isto causava a mistura das partículas virais com a dieta artificial e às fezes no interior do copo de criação (Figura 2A) e impossibilitava a pesagem do material recolhido para produção do bioinseticida. Um isolado de SfMNPV (denominado isolado 6 ou I6) que não rompe imediatamente as lagartas de *S. frugiperda*, foi relatado (Valicente et al., 2008; Vieira et al., 2012) e a utilização deste isolado para infectar as lagartas permite se determinar a massa total das lagartas mortas (Figura 2B). Isto permitiu se determinar o parâmetro mais correlacionado com a produção viral: o número de lagartas mortas por SfMNPV ou a massa total de lagartas.

A avaliação de eficiência dos 22 isolados do Centro Nacional de Pesquisas com Milho e Sorgo (CNPMS) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) destacou o isolado 19 (I19) com alta virulência (Barreto et al., 2005). O isolado 6 é tão virulento quanto o 19 e não causa o rompimento imediato das lagartas após a morte das mesmas (Vieira et al., 2012). Além de eficiente o I6 pode ser facilmente coletado. O que reduz o custo final do bioinseticida em um sistema de produção (Valicente et al., 2013).

O efeito desses isolados virais foi estudado em lagartas de até três dias idade, mas a multiplicação do vírus torna necessário se trabalhar com lagartas em estádios mais avançados para aumentar a produção viral, sem reduzir a mortalidade (Vieira et al., 2012), pois a concentração de vírus para matar a praga aumenta com os estádios de desenvolvimento (Escribano et al., 1999).

A padronização da produção em larga escala de um bioinseticida à base de SfMNPV necessita da avaliação se a produção total de poliedros é mais correlacionada com o número ou com a massa total de lagartas mortas. Isto tornaria possível se estimar o número de doses de produto formulado obtidas a partir de um número conhecido, ou de uma massa conhecida, de lagartas mortas.

O objetivo foi verificar qual o parâmetro de produção é mais correlacionado com a produção viral, a massa, ou o número de lagartas mortas por SfMNPV. Além disso, determinar os parâmetros peso equivalente (PE) e peso por lagarta morta (peso/lag) por infecção pelo I6 de SfMNPV.

2. Material e Métodos

Lagartas da espécie *S. frugiperda*, com seis, sete e oito dias de idade foram provenientes da criação massal do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo em sala com temperatura de 25 °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 8 horas. As lagartas foram alimentadas com dieta artificial, como a descrita por Valicente e Barreto (2003), desde sua emergência e inoculadas com SfMNPV nas concentrações de $1,00 \times 10^5$, $1,00 \times 10^6$, $1,00 \times 10^7$, $5,00 \times 10^7$ e $1,00 \times 10^8$ poliedros/mL. As suspensões virais foram preparadas com o isolado 6 que não rompe imediatamente o tegumento larval após a morte das lagartas.

As lagartas foram inoculadas por pulverização das suspensões virais em pedaços de folha de milho, por tratamento e repetição, colocados em recipientes de plástico de 24 x 10 x 3 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente) com 30 lagartas cada um. As folhas de milho foram ofertadas *ad libitum* com, aproximadamente, 240 cm², de área foliar por recipiente. As lagartas alimentaram-se dos pedaços de folha por 48 horas a 28 °C. Após esse tempo, 24 lagartas por repetição foram individualizadas em copos plásticos de 50 mL com um pedaço de dieta artificial.

A testemunha teve pedaços de folhas de milho pulverizados com uma solução com água destilada e uma gota ($12,74 \pm 1,1$ mg) do dispersante Tween 20[®] (Merck

Schuchardt, Germany). Uma gota deste dispersante foi colocada em todas as suspensões virais. Cada tratamento teve quatro repetições com 24 lagartas cada uma.

A mortalidade foi avaliada diariamente até a morte ou o estágio de pupa. As lagartas mortas com sintomas de infecção por baculovírus foram recolhidas, diariamente, colocadas em copos plásticos de 50 mL e acondicionadas em freezer a -20°C, por tratamento e repetição. Aquelas que morreram sem sintomas foram descartadas.

A massa das lagartas mortas foi determinada em balança analítica e as lagartas mortas foram maceradas em almofariz de porcelana para auxiliar na liberação dos corpos poliédricos de inclusão (PIB). O líquido resultante foi filtrado em tecido de voil para a separação das partes mais grosseiras da lagarta e, novamente, macerado com água destilada para extrair o máximo de partículas virais e, novamente, filtrado em tecido de voil. A suspensão com as partículas virais foram colocadas em tubos tipo Falcon e os volumes completados com água destilada até um volume final de 40 mL.

O número de poliedros foi determinado por contagem em câmara de Neubauer com microscópio óptico e aumento de 400 vezes. Alíquotas de 10 µL de cada uma das amostras foram colocadas em cada um dos dois campos de contagem na câmara de Neubauer. Quatro contagens foram feitas por repetição. O número de poliedros da contagem foi utilizado para se determinar a quantidade total de poliedros (PIB total).

As variáveis massa total e quantidade total de poliedros (PIB total) e, número de lagartas mortas e o PIB total, foram submetidas à correlação de Pearson. Os valores destas correlações foram submetidos ao teste t em nível de 5% de probabilidade.

Lagartas equivalentes por hectare (LE) foram definidas como o número necessário para reduzir a população de insetos praga abaixo do nível de dano econômico (Federici, 1999). O peso equivalente (PE) foi definido como a massa média de lagartas mortas para se alcançar $2,00 \times 10^{11}$ PIB (para obtenção de uma dose de baculovírus formulado) a ser pulverizado por hectare e se obter um controle efetivo da praga (Valicente et al., 2008, 2013). O parâmetro peso equivalente (PE) foi obtido, por repetição e tratamento, multiplicando-se $2,00 \times 10^{11}$ pela massa total de lagartas mortas (g) e dividindo-se pelo valor de PIB total.

Os dados dos PE e peso/lag apresentaram distribuição normal dos resíduos de acordo com o teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias pelo teste de Cochran. Os dados de PE e peso/lagarta foram submetidos à ANOVA e, quando necessário, as médias submetidas ao teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

As médias dos fatores quantitativos foram submetidas à análise de regressão. As análises estatísticas foram feitas com o software R (pacote ExpDes).

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise de Correlação

O número e a massa total de lagartas mortas foram correlacionados com a produção total de poliedros (Figura 3). A correlação entre a produção viral e o número de lagartas mortas foi mais fraca (Figura 3A) que a entre a produção viral e a massa total de lagartas mortas (Figura 3B). As correlações, por idade, foram positivas, tanto para o número de lagartas mortas e a produção total de poliedros, quanto entre a massa total de lagartas mortas e a produção total de poliedros. Novamente, a correlação entre a produção viral e a massa total foi mais forte (Tabela 1). A produção de grânulos de vírus por larva de *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae), foi também, altamente correlacionada com a idade e o peso larval (Sporleder et al., 2008).

Todas as correlações, para uma mesma concentração viral, foram positivas para a massa total, mas o número de lagartas apresentou correlação, apenas, para a concentração de $1,00 \times 10^6$ e $1,00 \times 10^8$ PIB/mL (Tabela 1). Isto evidencia que a produção total de poliedros é mais correlacionada com a massa total de lagartas mortas, devido à desuniformidade no tamanho das lagartas mortas por SfMNPV. Portanto, este parâmetro pode ser utilizado para se padronizar sistemas de produção e estimar a produção de doses de produto formulado a partir de um determinado número de lagartas mortas, o que reduz o erro e homogeneiza a concentração de vírus por dose. A produção de poliedros em relação ao número de lagartas mortas (PIB/lag), e o número de corpos poliédricos de inclusão em função da massa de lagartas mortas (PIB/mg) foram estudados (Elvira et al., 2013, Rios-Velasco et al., 2012) e a massa de lagartas mortas de *S. frugiperda* e a produção viral apresentaram correlação positiva (Valicente et al., 2013).

3.2. Determinação do PE e Peso/lag

A concentração da suspensão viral não influenciou o PE, mas sim a idade, sem interação entre esses fatores (Tabela 2). Uma dose de bioinseticida formulado pode ser obtida a partir de uma menor massa de lagartas de *S. frugiperda* mortas por SfMNPV

inoculadas aos oito dias comparado àquelas inoculadas aos sete dias de idade (20,30 g), porém com valores semelhantes para lagartas inoculadas aos seis (19,13 g) e oito dias (17,89 g) de idade (Figura 4A). O PE foi semelhante entre as concentrações (Figura 4B), significando que a massa necessária para formular uma dose de bioinseticida não varia com a concentração de suspensão viral para se inocular as lagartas de *S. frugiperda*. Portanto, concentrações que causem uma maior mortalidade (maiores concentrações de suspensão viral) devem ser utilizadas para se inocular um determinado número de lagartas, aumentando o número de doses formuladas.

O peso/lag não mostrou interação entre os fatores idade e concentração, mas esses fatores isolados influenciaram o peso por lagarta morta (Tabela 2). A idade de inoculação de lagartas com SfMNPV que permitiu se obter aquelas com maior massa média foi oito dias (Figura 5A). O PE de lagartas inoculadas aos oito dias de idade foi semelhante ao daquelas inoculadas aos seis dias de idade, o que permite afirmar que esta é a melhor idade para se inocular lagartas de *S. frugiperda* com SfMNPV, pois como a massa média por lagarta inoculada aos oito dias é superior à daquelas inoculadas aos seis dias será preciso uma menor quantidade de lagartas mortas para a formulação de uma dose de bioinseticida. Por raciocínio semelhante constata-se que a inoculação aos oito dias é mais recomendada, também, que a realizada aos sete dias de idade. O aumento na produção de PIB/lag inoculada com SfMNPV é diretamente proporcional ao estágio de desenvolvimento larval no qual a inoculação com o vírus foi feita (Rios-Velasco et al., 2012). Contudo, a concentração de PIB/mm² na dieta artificial tem que ser aumentada para matar lagartas de quinto e sexto instares (Rios-Velasco et al., 2012), já que a susceptibilidade de lagartas inoculadas com baculovírus diminui com o aumento de sua idade (Bianchi et al., 2000a, 2000b; Escribano et al., 1999; Smits e Vlak, 1988), pois, para um determinado tamanho das lagartas parece existir uma dose limiar de baculovírus necessária para superar a resistência do hospedeiro de maneira que a infecção possa se espalhar para outros tecidos do corpo que são os locais onde ocorre maior replicação viral, fazendo com que a infecção seja bem sucedida (Grzywacz et al., 1998). Isto devido, provavelmente, à ocorrência de descamação das células intestinais infectadas durante a muda a partir do quarto para o quinto instar, proposta por Engelhard e Volkman (1995), para lagartas de *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), capazes de se livrarem da infecção por *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Outro mecanismo de resistência pode ser por uma resposta apoptótica celular à infecção, relatada em cultura de células de *Spodoptera*

littoralis Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas com AcMNPV (Chejanosky e Gershburg, 1995).

Como o PE se manteve constante nas diferentes concentrações e quanto menor a concentração da suspensão viral maior o peso por lagarta morta (Figura 5B), pode-se afirmar que quanto menor a concentração da suspensão viral menor o número de lagartas mortas necessárias para se formular uma dose de bioinseticida, mas deve-se considerar que quanto menor a concentração da suspensão viral menor a mortalidade larval (Tabela 3). Assim, mesmo sendo necessário um menor número de lagartas mortas com baixas concentrações virais, um número maior de lagartas deverão ser inoculadas para se obter uma única dose de bioinseticida. Além disso, quanto maior o número de lagartas a serem manipuladas maior o gasto com mão-de-obra. Um menor número de lagartas mortas com maior massa média ou um maior número de lagartas mortas com menor massa média devem ser utilizadas? Isto pode ser respondido pela maior produção viral à partir de lagartas inoculadas aos oito dias de idade e com concentrações acima de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL (portanto, as maiores concentrações são as melhores para se aumentar a produção viral) (Figura 6).

Para o produtor rural não basta que o baculovírus controle a lagarta-do-cartucho de modo eficiente. Deve, também, ser comercializado a um preço competitivo. Desta forma, quanto maior for a mortalidade larval e a produção de poliedros virais por lagarta morta, menor o preço final do produto, com maximização da produção viral para fabricação de bioinseticida à base de SfMNPV.

O peso de lagartas mortas por baculovírus apresenta correlação com a produção total de poliedros e deve ser um parâmetro utilizado para a produção de um produto comercial à base de SfMNPV. Lagartas de *S. frugiperda*, mortas por SfMNPV, inoculadas aos oito dias de idade apresentaram maior massa média. O peso equivalente por dose foi semelhante com as diferentes concentrações de suspensões virais utilizadas na inoculação de SfMNPV.

Agradecimentos

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

Referências

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265-267.
- Barrera, G., Simón, O., Villamizar, L., Williams, T., Cabalero, P., 2011. *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biol. Control* 58, 113-120.
- Barreto, M.R., Guimarães, C.T., Teixeira, F.F., Paiva, E., Valicente, F.H., 2005. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. *Neotrop. Entomol.* 34, 67-75.
- Bianchi, F.J.J.A., Joosten, N.N., Vlak, J.M., Van der Werf, W., 2000a. Greenhouse evaluation of dose- and time-mortality relationships of two nucleopolyhedroviruses for the control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, on chrysanthemum. *Biol. Control* 19, 252-258.
- Bianchi, F.J.J.A., Snoeijs, I., Van der Werf, W., Mans, R.M.W., Smits, P.H., Vlak, J.M., 2000b. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 75, 28-35.
- Cabodevilla, O., Ibañez, I., Simón, O., Murillo, R., Caballero, P., Williams, T., 2011. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* 56, 184-192.
- Chejanosky, N., Gershburg, E., 1995. The wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induced apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells. *Virology* 209 (2), 519-525.
- Elvira, S., Ibarretxe, M.A., Gorria, N., Muñoz, D., Caballero, P., Williams, T., 2013. Insecticidal characteristics of two commercial *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus strains produced on different host colonies. *J. Econ. Entomol.* 106 (1), 50-56.
- Engelhard, E.K., Volkman, L.E., 1995. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology* 209, 384-389.

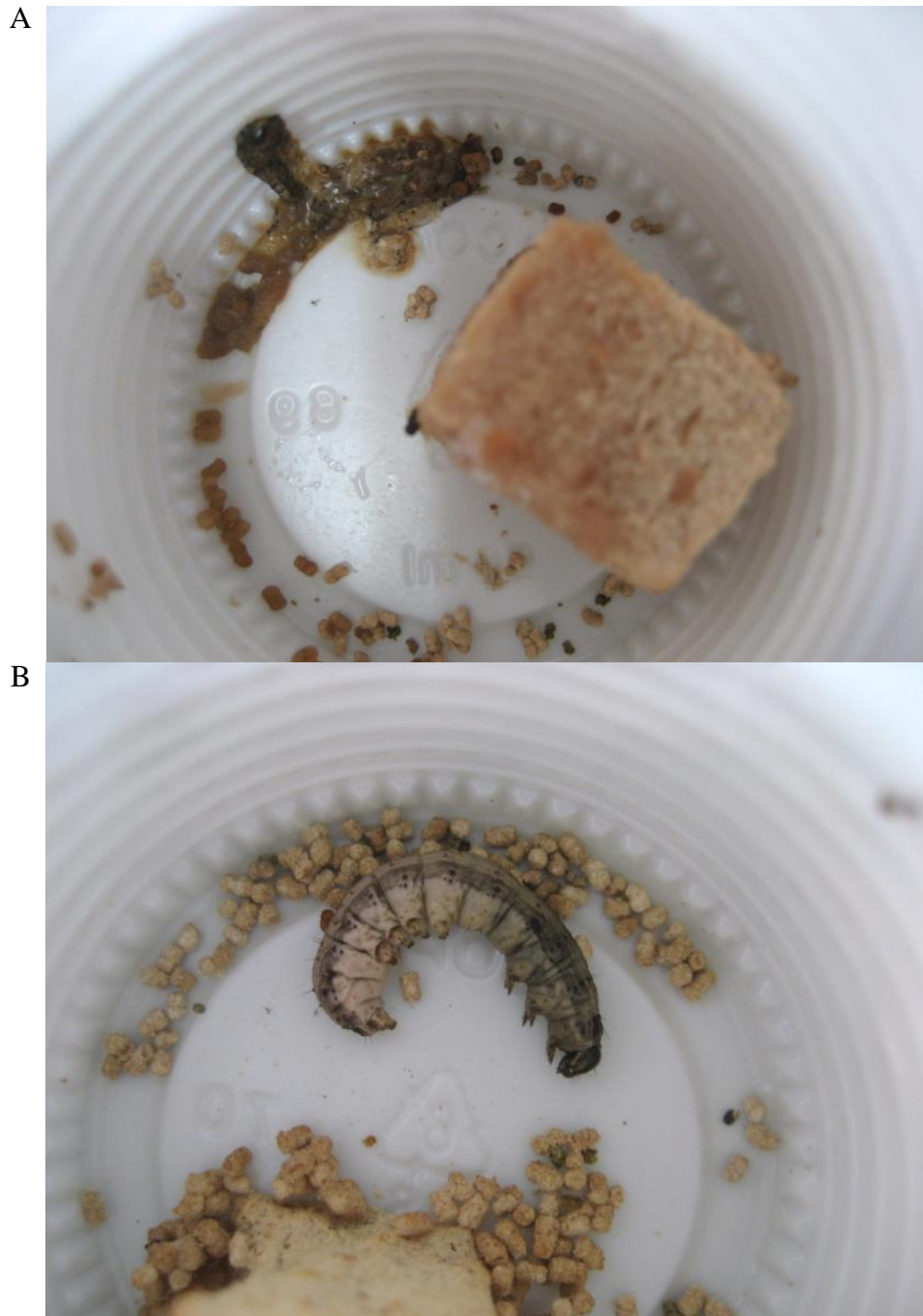
- Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R.D., Chapman, J.W., Caballero, P., 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J. Econ. Entomol.* 92 (5), 1079-1085.
- Federici, B.A., 1999. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (Eds.), *Methods in biotechnology: Biopesticides, use and delivery*. Humana Press, Totowa, 5, pp. 301-320.
- Grzywacz, D., Jones, K.A., Moawad, G., Cherry, A., 1998. The in vivo production of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol. Methods* 71, 115-122.
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 257-289.
- R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rios-Velasco, C., Gallegos-Morales, G., Berlanga-Reyes, D., Cambero-Campos, J., Romo-Chacón, A., 2012. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. *Florida Entomol.* 95 (3), 752-757.
- Serrano, A., Williams, T., Simón, O., López-Ferber, M., Caballero, P., Muñoz, D., 2013. Analogous population structures for two alphabaculoviruses highlight a functional role for deletion mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (4), 1118-1125.
- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Taulemesse, J., Caballero, P., 2008a. Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* 44, 321-330.
- Simón, O., Williams, T., Asensio, A.C., Ros, S., Gaya, A., Caballero, P., Possee, R.D., 2008b. *Sf29* gene of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus is a viral factor that determines the number of virions in occlusion bodies. *J. Virol.* 82 (16), 7897-7904.
- Sporleder, M., Zegarra, O., Cauti, E.M.R., Kroschel, J., 2008. Effects of temperature on the activity and kinetics of the granulovirus infecting the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Biol. Control* 44, 286-295.

- Valicente, F.H., Barreto, M.R., 2003. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 32, 639-644.
- Valicente, F.H., Costa, E.F., 1995. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus spodoptera* via água de irrigação. An. Soc. Entomol. Brasil 24, 61- 67.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Paiva, C.E.C., Guimarães, M.R.F., Macedo, C.V., Wolff, L.C., 2008. A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae. Rev. Bras. Milho Sorgo 7, 77-82.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Pena, R.C., Andreazza, R., Guimarães, M.R.F., 2013. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with *Baculovirus spodoptera*. Neotrop. Entomol. 42, 191-199.
- Vieira, C.M., Tuelher, E.S., Valicente, F.H., Wolff, J.L.C., 2012. Characterization of a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. J. Invertebr. Pathol. 111 (2), 189-192.



Fotos: Edmar de Souza Tuelher

Figura 1. Comprimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mortas por *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* após inoculação em uma mesma idade e concentração de suspensão viral (A), destaque da desuniformidade do tamanho entre lagartas mortas pelo baculovírus (B).



Fotos: Edmar de Souza Tuelher

Figura 2. Lagarta de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) morta por infecção causada por um isolado de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) que provoca a liquefação do tegumento larval (isolado 19) (A), evidenciando a mistura entre o conteúdo larval e as fezes da lagarta no fundo do copo de criação. Lagarta de *S. frugiperda* morta por infecção causada por um isolado de SfMNPV que preserva intacto o tegumento larval imediatamente após causar sua morte (isolado 6) (B).

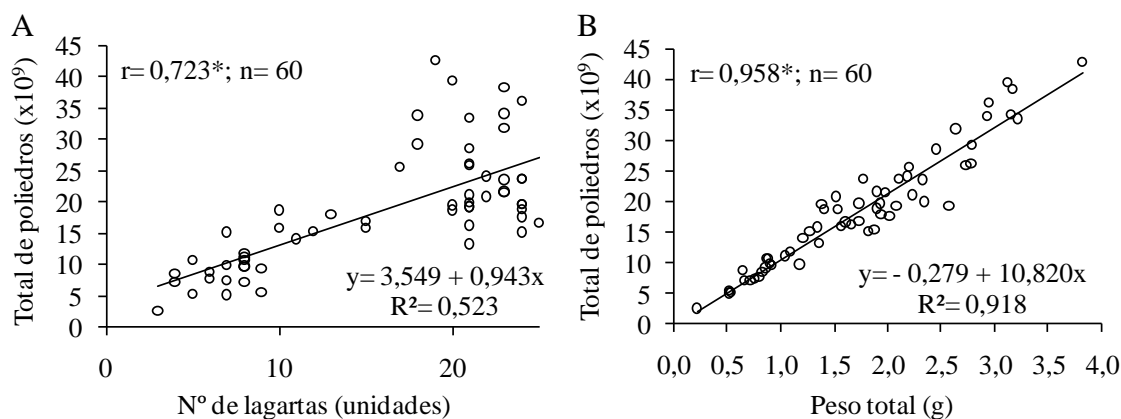


Figura 3. (A) Correlação de Pearson entre o número de lagartas e o de poliedros de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNVP) produzidos a partir de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mortas pelo vírus. (B) Correlação de Pearson entre peso e número de poliedros de SfMNVP produzidos a partir de lagartas de *S. frugiperda* mortas pelo vírus. * Significativo em nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

Tabela 1. Coeficientes de correlação de Pearson para lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas aos seis, sete e oito dias de idade (n= 20) e com cinco concentrações de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (n= 12)

		Poliedros totais e peso total	Poliedros totais e número de lagartas
Idade (dias)	6	r= 0,891 (P < 0,0001)	r= 0,805 (P < 0,0001)
	7	r= 0,926 (P < 0,0001)	r= 0,900 (P < 0,0001)
	8	r= 0,986 (P < 0,0001)	r= 0,932 (P < 0,0001)
Concentração (PIB/mL)	1,00 x 10 ⁵	r= 0,910 (P < 0,0001)	r= 0,501 (P= 0,0972)
	1,00 x 10 ⁶	r= 0,856 (P < 0,0001)	r= 0,643 (P= 0,0242)
	1,00 x 10 ⁷	r= 0,871 (P < 0,0001)	r= -0,212 (P= 0,5080)
	5,00 x 10 ⁷	r= 0,974 (P < 0,0001)	r= -0,348 (P= 0,2670)
	1,00 x 10 ⁸	r= 0,963 (P < 0,0001)	r= 0,657 (P= 0,0202)

Probabilidade do teste t entre parênteses.

Tabela 2. Quadro da análise de variância para os efeitos da concentração da suspensão viral e da idade de inoculação sobre os parâmetros peso equivalente (PE) e peso médio da lagarta (PM)

Fonte de Variação	GL	PE		PM	
		F	P	F	P
Concentração (C)	4	2,3159	0,0717	15,5558	<0,001
Idade (I)	2	5,4629	0,0075	3,5722	<0,001
C x I	8	1,5871	0,1557	1,4097	0,2187

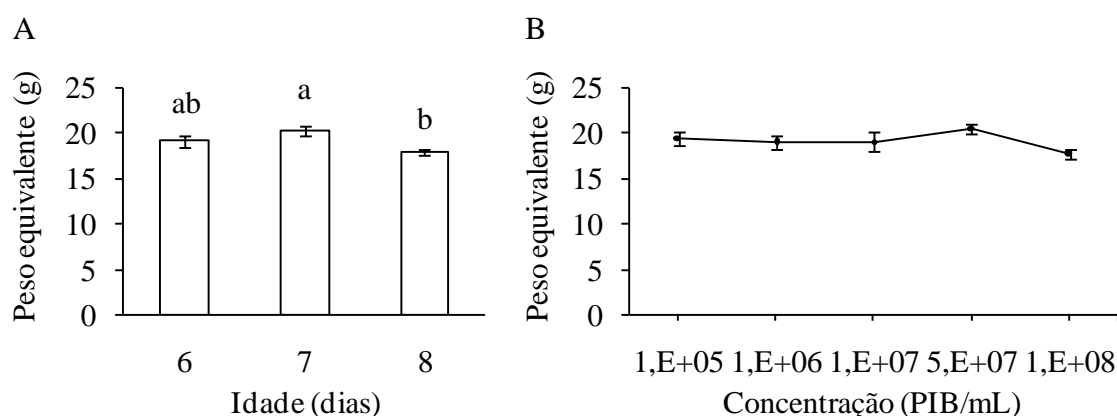


Figura 4. Peso equivalente de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas em diferentes idades (A) e com diferentes concentrações virais (B) do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. As linhas verticais sobre cada uma das barras (A) ou pontos (B) representam o erro padrão da média.

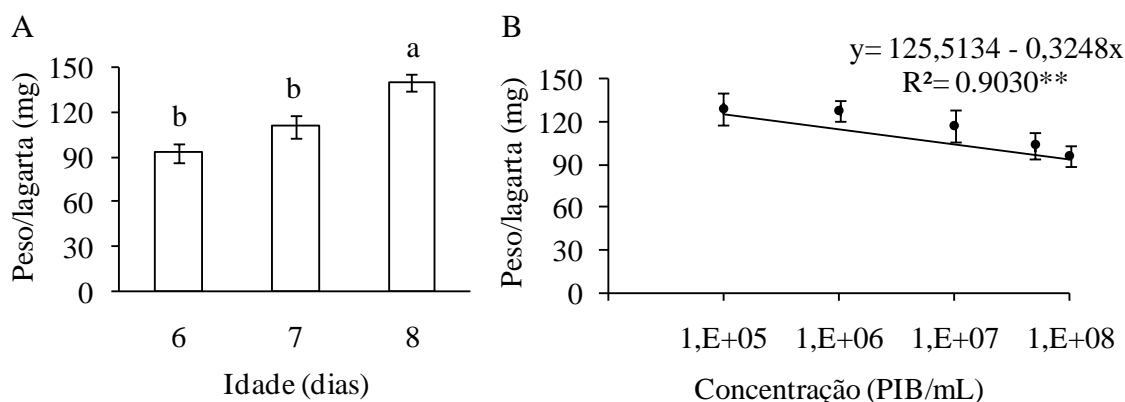


Figura 5. Massa média por lagarta de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas em diferentes idade (A) e com diferentes concentrações virais (B) do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* em diferentes idades. Médias seguidas por uma mesma letra não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. As linhas verticais sobre cada uma das barras (A) ou pontos (B) representam o erro padrão da média. ** Significativo em nível de 1% de probabilidade.

Tabela 3. Mortalidade corrigida (Abott, 1925) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas com diferentes concentrações do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* e em diferentes idades

Concentração (PIB/mL)	Idade (dias)		
	6	7	8
	Mortalidade (%)		
1,00 x 10 ⁵	23,08	29,30	23,16
1,00 x 10 ⁶	45,08	45,28	31,21
1,00 x 10 ⁷	91,39	85,17	77,62
5,00 x 10 ⁷	96,77	93,67	88,33
1,00 x 10 ⁸	100,00	95,73	94,74

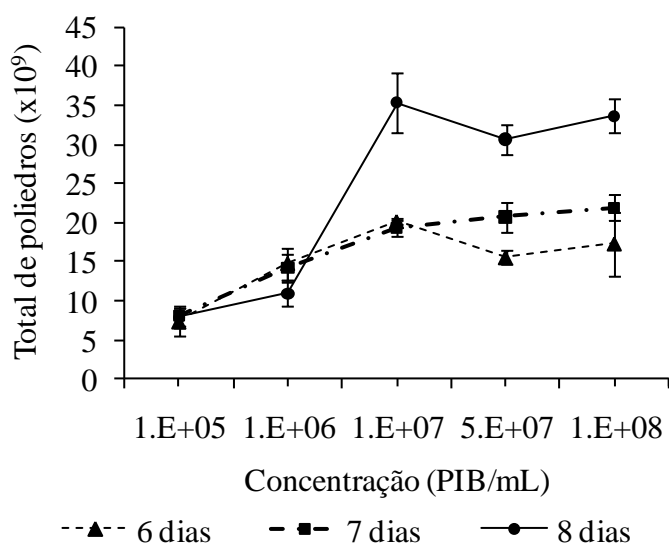


Figura 6. Total de poliedros obtidos de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) inoculadas com o isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*, em três diferentes idades e com diferentes concentrações de suspensão viral.

Conclusões Gerais

O canibalismo entre lagartas de *S. frugiperda* foi semelhante entre as temperaturas e tempo de inoculação do baculovírus durante as primeiras 48 horas.

O tempo de inoculação não afetou a mortalidade e a produção viral, mostrando que pode-se adotar um período de inoculação de 24 horas em sistemas de produção em larga escala, para garantir uma alta taxa de mortalidade larval e boa produção de vírus.

A produção total de poliedros, nas diferentes temperaturas de inoculação, foi semelhante, mas a multiplicação do vírus a 25 °C foi maior. As mortalidades de lagartas foram maiores a 28 °C, mas a produção de PIB/lagarta foi maior a 25 °C, o que reduz o número de lagartas para a produção de uma dose de baculovírus formulado (dose para um hectare). A multiplicação do vírus a 25 °C é mais adequada devido à maior produção total de poliedros e de PIB/lagarta morta.

Os isolados 19 e 6 foram eficientes contra lagartas de *S. frugiperda*, porém o isolado 6 é o mais indicado para maximizar a produção viral, por ter menor perda de poliedros devido a sua característica de não provocar o rompimento imediato das lagartas logo após causar sua morte. Além disso, a facilidade de coleta de vírus a partir de lagartas mortas pelo I6 é maior com menor consumo de energia elétrica e necessidade de menor espaço físico para uma biofábrica. O oitavo dia é a melhor idade para se inocular as lagartas com o vírus, por permitir a obtenção de lagartas de *S. frugiperda* com maior massa média e maior multiplicação viral. As concentrações a partir de $1,00 \times 10^7$ PIB/mL foram as mais eficientes para aumento da produção viral com o I6.

O peso equivalente por dose (dose para um hectare) foi semelhante com as diferentes concentrações de suspensões virais na inoculação de SfMNPV.

O peso equivalente deve ser utilizado como parâmetro de referência para a fabricação de uma dose na produção em larga escala de um produto comercial à base de SfMNPV, pois este parâmetro apresentou correlação com a produção total de poliedros.