

**Avaliação de diferentes parâmetros para
potencializar a produção massal in vivo
de baculovírus ChinNPV na lagarta falsa-
medideira da soja (*Chrysodeixis includens*)**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
362**

**Avaliação de diferentes parâmetros
para potencializar a produção massal
in vivo de baculovírus ChinNPV
na lagarta falsa-medideira da
soja (*Chrysodeixis includens*)**

Márcio Martinello Sanches
Cláudia Efigênia Pereira Silva
Ana Lis Rangel dos Santos
Norton Polo Benito
William Sihler
Marlinda Lobo de Souza

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2020

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717 , Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br

fale-conosco@sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente

Wagner Alexandre Lucena

Secretaria-Executiva

Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros

Bruno Machado Teles Walter; Daniela Aguiar de Souza; Eudes de Arruda Carvalho; Luiz Joaquim Castelo Branco Carvalho; Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho Barrios Roveri Jose; Márcio Martinello Sanches; Sérgio Eustáquio de Noronha

Supervisão editorial

Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto

Márcio Martinello Sanches

Normalização bibliográfica

Rosamares Rocha Galvão - CRB-1-2122

Tratamento das ilustrações

Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Adilson Werneck

Foto da capa

Rogerio Biaggioni

1^a edição

1^a impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Avaliação de diferentes parâmetros para potencializar a produção massal
in vivo de baculovírus ChinNPV na lagarta falsa-medideira da soja
(*Chrysodeixis includens*) / Márcio Martinello Sanches... [et al.]. –
Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

27 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia, 362).

1. Baculovírus 2. *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovírus* 3. Controle
biológico I. Sanches, M. M. II. Série

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão.....	12
Conclusões.....	20
Agradecimentos.....	21
Referência Bibliográfica.....	21

Avaliação de diferentes parâmetros para potencializar a produção massal in vivo de baculovírus ChinNPV na lagarta falsa-medideira da soja (*Chrysodeixis includens*)

Márcio Martinello Sanches¹

Cláudia Efigênia Pereira Silva²

Ana Lis Rangel dos Santos³

Norton Polo Benito⁴

William Sihler⁵

Marlinda Lobo de Souza⁶

Resumo – O *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV), gênero *Alphabaculovirus*, família *Baculoviridae* é patogênico a larvas de *C. includens*, conhecida como lagarta falsa-medideira, a qual é uma importante praga em soja e feijão. O isolado ChinNPV-Buritis proveniente do cerrado brasileiro demonstrou potencial para controle biológico desta praga. No entanto, existem fatores limitantes para a produção em larga escala de ChinNPV, como o rompimento do tegumento da larva e restrições para a criação em massa da lagarta falsa-medideira devido à endogamia e, consequentemente, decaimento da colônia. Com o objetivo de aumentar a produção in vivo de ChinNPV, alguns parâmetros foram avaliados. No primeiro experimento, foram comparadas diferentes combinações de instares larvais (terceiro e quarto instares), temperatura de incubação das larvas (23°C, 26°C e 29°C) e concentrações virais para inoculação (5×10^6 e 5×10^7 poliedros -OBs/ml) na produção de OBs por larva e peso das larvas. O experimento foi realizado com 30 larvas para cada tratamento, incluindo o controle sem vírus. As larvas foram mantidas individualmente em copos plásticos de 30 ml com dieta artificial. As avaliações foram efetuadas do 3º ao 7º dia pós inoculação (d.p.i.). Em um segundo experimento comparou-se a produção de OBs e

¹ Biólogo, doutor em Agronomia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Graduanda em biologia, Universidade Paulista-Unip.

³ Graduanda em biologia, Centro Universitário de Brasília - UniCEUB.

⁴ Entomologista, doutor em Agronomia, pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Bióloga, mestrado em Biologia Molecular, analista Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Bióloga, doutora em Microbiologia, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

peso das larvas de terceiro instar incubadas individualmente ou em grupos de 10 larvas em recipientes plásticos de 300ml, submetidos a duas temperaturas de incubação (23°C e 26°C). Cada tratamento foi efetuado com 30 larvas inoculadas com 5×10^6 OBs/ml, incluindo o controle sem vírus. A avaliação do número de OBs por larvas e do peso larval foi realizada aos 6 d.p.i. Não foi observada diferença significativa na produção de OBs por larva ($P > 0,05$) para o parâmetro de concentração de inóculo viral, bem como entre a incubação de larvas individualmente ou em grupos no terceiro instar. Ao contrário, verificou-se maior produção de OBs com larvas de quarto instar incubadas a 23° ou 26°C. Diferenças no peso das larvas ($P < 0,05$) foram observadas para algumas interações de instares larvais, temperaturas e concentrações do vírus. Deste modo, temperaturas de 23°C e 26°C para incubação das larvas são recomendadas para produção in vivo de ChinNPV, evitando-se o rompimento precoce do tegumento das larvas observado quando incubadas na temperatura de 29°C. A incubação de larvas em grupos e a concentração menor de vírus no inóculo são indicadas para potencializar a produção massal in vivo de ChinNPV e reduzir os custos da produção.

Termos para indexação: baculovírus, produção in vivo, *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus*, controle biológico.

Evaluation of different parameters to enhance in vivo mass production of baculovirus ChinNPV in soybean looper (*Chrysodeixis includens*)

Abstract – The *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV), genus *Alphabaculovirus*, family *Baculoviridae* is pathogenic to *C. includens* larvae, known as soybean looper, which is an important soybean and bean pest. The ChinNPV-Buritis isolated from the Brazilian savanna has shown great potential for the biocontrol of this pest. However, there are limiting factors for the large-scale in vivo production of ChinNPV, such as disruption of larval integument and restraints on soybean looper mass rearing due to endogamy and, therefore, colony depletion. In this study, some parameters were tested in order to improve the in vivo production of ChinNPV. In the first assay, it was compared different combinations of larval instars (3rd and 4th instars), larval incubation temperatures (23°C, 26°C and 29°C) and viral inoculum concentrations (5×10^6 e 5×10^7 occlusion bodies-OBs/ml) in the OBs production and larval weight. The experiment was performed with 30 larvae/treatment including the control without virus. Larvae were kept individually in 30ml plastic cups with artificial diet. The evaluations were performed at 3 to 7 d.p.i. In the second assay it was compared the production of OBs and larval weight for 3rd instar larvae kept individually or in groups of 10 individuals in

300ml plastic containers, under two different incubation temperatures (23°C and 26°C). Each treatment was performed with 30 larvae inoculated with 5x10⁶ OBs/ml including the control without the virus. The evaluation of OBs production and larval weight occurred at 6 d.p.i. No significant differences in OBs production ($p>0,05$) were observed for inoculum concentration parameter, as well as among larvae kept in groups or individually. However, the greatest OBs production occurred in fourth instar larvae incubated at 23°C or 26°C. Differences in larval weight ($p<0,05$) were observed for some interactions of larval instars, temperatures and inoculum concentrations. Thus, temperatures of 23°C and 26°C for larval incubation are recommended for *in vivo* production of ChinNPV to avoid the disruption of the larval integument observed when larvae were incubated at 29°C. The incubation of larvae in groups and lower concentration of virus as inoculum are indicated to potentialize the mass production and to reduce the production costs.

Index terms: baculovirus, *in vivo* production, *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus*, biological control.

Introdução

Conhecida como lagarta-falsa-medideira, a *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) pertence à subfamília Plusiinae e sua distribuição é restrita a Região Neotropical, desde o norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul. São consideradas como hospedeiras deste inseto 174 plantas, pertencentes a 39 famílias botânicas (Specht et al., 2015). Há registros de ataques em culturas de importância econômica, destacando-se soja, feijoeiro, algodoeiro, fumo, girassol e diversas hortaliças causando prejuízos consideráveis (Benassi et al., 2012; Specht et al., 2015). Em soja, os danos ocorrem devido ao consumo foliar, sendo que os relatos apontam consumo de 64 a 200cm² de folha por lagarta dependendo do cultivar e da condição ambiental e fenológica (Moscardi et al., 2012). Na cultura do maracujá-azedo foram relatados surtos da praga causando até 80% de folhas danificadas (Benassi et al., 2012).

Na cultura da soja, os mais importantes desfolhadores no Brasil são *C. includens* e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). No entanto, outras espécies como *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805)

(Lepidoptera: Noctuidae) e o complexo *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) *S. cosmioides* (Walker, 1858), *S. eridania* (Cramer, 1782) e *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797) têm sido também reportadas, embora com prevalência muito menor e em áreas restritas (Conte et al., 2014). *C. includens* era considerada uma praga secundária da soja, controlada por seus inimigos naturais, ou seja, parasitóides e fungos entomopatogênicos. No entanto, a utilização de áreas extensivas de cultivo em sucessão e o intenso uso de fungicidas para controle da ferrugem-asiática ocasionaram o aumento na população da lagarta nos últimos anos (Sosa-Gomez, 2017).

Diante desse cenário, houve aumento na demanda por produtos biológicos que possam ser incluídos no Manejo Integrado de Pragas (MIP) em cultivos de soja. Os biopesticidas a base de baculovírus são importantes agentes de controle de lepidópteros e específicos aos seus hospedeiros. No Brasil, vem sendo empregado com sucesso para controle de *A. gemmatalis* na cultura da soja desde o início da década de 80. Este foi considerado o maior programa de controle biológico do mundo com vírus, com aplicação de biopesticida viral atingindo 2.000.000 ha de área tratada/ano na safra 2003/2004 (Moscardi et al., 2011). Além desse, outros programas de biopesticidas virais têm sido desenvolvidos com sucesso para controle de pragas como *S. frugiperda* em milho (Valicente et al., 2010) e do mandaróva da mandioca (*Erinnyis ello*) Linneaus, 1758 (Lepidoptera: Sphingidae) (Costa et al., 2005).

Os vírus da família *Baculoviridae* fazem parte de um grupo diverso de vírus encontrados em insetos (King et al., 2012). Possuem como principais características o envelopamento de seu capsídeo e um DNA circular, de dupla fita, contendo entre 80-200Kb. O nome baculovírus é derivado do formato em bastão de seu capsídeo (do latim *baculum*) que mede 40–50 nm de diâmetro e 200–400 nm de comprimento. Durante o ciclo de vida do vírus, alguns dos nucleocapsídeos são incluídos em massas proteicas dentro do núcleo celular do hospedeiro, formando os corpos de oclusão (OBs), também chamados de poliedros (O' Reilly et al., 1992).

Baculovírus que infectam *C. includens* foram descritos ocorrendo naturalmente no Brasil (Alexandre et al., 2010; Souza et al., 2016; Craveiro et al., 2016). Esses isolados de baculovírus pertencem à espécie denominada

de *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV). Um isolado de ChinNPV coletado na região de Buritis-MG em 2014 vem se mostrando promissor para o desenvolvimento de um biopesticida contra a lagarta falsamedideira. Epizootias naturais em áreas de soja promoveram mortalidade em torno de 30% das larvas (Souza et al., 2016). O isolado foi caracterizado e apresentou satisfatória patogenicidade e potencial de produção em células *in vitro* (Sanches et al., 2019). No entanto, devido a restrições ainda existentes em relação à produção de baculovírus em cultivo celular, tais como a perda da estabilidade genética e custo de produção (Reid et al., 2014), faz-se necessário a utilização do sistema *in vivo*, com inoculação massal de lagartas para multiplicação do vírus.

Embora a produção comercial de baculovírus seja feita atualmente a partir da multiplicação do vírus no inseto hospedeiro, existem dificuldades para escalonamento nesse sistema (Moscandi et al., 2011). Comparado com outros sistemas de produção massal, como por exemplo do baculovírus *Anticarsia* utilizado para controle de *A. gemmatalis*, o ChinNPV apresenta limitações como de causar o rompimento do tegumento da larva e de apresentar menor patogenicidade, além de problemas na criação laboratorial em grande escala das larvas de *C. includens* (Sosa-Gómez, 2017).

Estudos sobre a produção de OBs de baculovírus específicos a outras espécies de lagartas como *A. gemmatalis*, *Agrotis ipsilon*, *Chrysodeixis chalcites*, *H. armigera* e *S. frugiperda* (Moscandi et al., 1997; Valicente et al., 2010; Rios-Velasco et al., 2012; Ruiz et al., 2015; Arrizubieta et al., 2016; Bernal et al., 2017; Behle, 2018) têm mostrado a influência de parâmetros como a temperatura de incubação das larvas, concentração de inóculo viral, instar larval submetido à inoculação viral e o número de larvas agrupadas na quantidade final de poliedros obtidos.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de comparar estes parâmetros na produção de OBs para o isolado ChinNPV-Buritis para posterior utilização em sistema de produção massal do vírus em larvas de *C. includens*.

Material e Métodos

1. Insetos e vírus

Para todos os experimentos foram utilizadas larvas de *C. includens* obtidas a partir de criação no Laboratório de Entomologia da Quarentena Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, conforme metodologia descrita por Sanches et al. (2019). O vírus utilizado foi o ChinNPV isolado Buritis (Código na Coleção de Vírus de Invertebrados BRM27775). Os poliedros (OBs) semi-purificados foram obtidos de acordo com Maruniak (1986).

2. Produção de OBs: influência da temperatura, estágios larvais, concentração viral em larvas individualizadas e dia de coleta pós-inoculação

Visando encontrar os melhores parâmetros para a produção de OBs em larvas de *C. includens*, inicialmente foram comparadas três temperaturas de incubação de larvas (23°C, 26°C e 29°C) após a inoculação viral. Foram também testadas duas concentrações virais (5×10^6 OBs/ml e 5×10^7 OBs/ml) para a inoculação e finalmente dois diferentes estágios larvais para a inoculação (3° e 4° instares). Os efeitos do vírus nas lagartas foram observados e comparados àqueles de lagartas não-inoculadas.

No total foram utilizadas 540 lagartas divididas em 12 tratamentos com baculovírus (2 concentrações de inóculo x 2 estágios larvais x 3 temperaturas) e seis tratamentos controle (2 estágios larvais x 3 temperaturas) com 30 repetições cada. Cada repetição consistiu de uma lagarta individualizada por copo de 30 ml.

As avaliações foram efetuadas dos 3 aos 7 dias após a inoculação (d.p.i.), para verificação dos melhores dias para coleta das larvas. Para a contagem de poliedros e aferição do peso, formaram-se grupos com 6 indivíduos. O peso foi aferido através de balança analítica BioPrecisa FA2104N. Após isso, as larvas foram congeladas a -20° C e posteriormente efetuou-se a contagem de poliedros através de câmara de Neubauer em microscópio ótico (400x) com contraste de fase Olympus CK2.

3. Produção de OBs: influência da temperatura em larvas incubadas em grupos ou individualmente

Com base nos resultados do ensaio anterior, um segundo ensaio foi executado. Foram fixados alguns parâmetros (dose do inóculo e idade das larvas), bem como a data de coleta dos dados (d.p.i.), para verificação da influência da temperatura e do agrupamento de larvas na produção de poliedros.

O ensaio foi realizado comparando a incubação de larvas de terceiro instar individualmente (uma larva por copo de 30 ml) ou em grupos de 10 larvas em recipientes plásticos de 300ml e duas temperaturas de incubação das larvas (23°C e 26°C). Cada tratamento foi efetuado com 30 larvas inoculadas com 5×10^6 OBs/ml e 30 larvas no controle sem vírus. No total foram utilizadas 240 larvas divididas em 4 tratamentos com baculovírus (2 densidades de larvas x 2 temperaturas) e em 4 tratamentos controle (2 densidades de larvas x 2 temperaturas). A avaliação do número de OBs por larva e do peso das larvas foi realizada como descrito no ensaio anterior aos 6 d.p.i.

4. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado. No primeiro experimento, para analisar se houve diferença no peso por larva (variável resposta), foi utilizada uma ANOVA fatorial. Enquanto que, para a variável resposta contagem de OBs por larva, foi utilizado um modelo linear generalizado (GLM) com distribuição de erro Poisson corrigido para quasi-Poisson. Enquanto que para os dados obtidos no segundo experimento foi utilizado teste de ANOVA bidirecional para os valores de massa e contagem de OBs por larva.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa R (R Development..., 2012). Inicialmente os dados foram submetidos ao Teste de normalidade dos resíduos Shapiro-Wilk e Teste de homocedasticidade de Levene. Foram utilizados os pacotes ‘car’ (Fox; Weisberg, 2019) e ‘mass’ (Venables; Ripley, 2002). Os dados foram submetidos a análises de regressão

para indicar interações entre os fatores usando modelo ‘stepwise’ para incluir apenas interações significativas ($P<0,05$). Os valores das médias foram separados estatisticamente através de teste Tukey HSD ($P<0,05$) através do pacote ‘multcomp’.

Resultados e Discussão

1. Produção de OBs: influência do dia de coleta pós-inoculação

As respostas de produção de OBs/larva e de peso/larva variaram de acordo com o dia de coleta pós-inoculação (d.p.i.) (Tabelas 1 e 2). A produção de OBs no 5º d.p.i. foi 17,79 vezes maior do que no 3º d.p.i. ($aRR\ 17,79;\ P=0,0003$). Também foi maior no 6º d.p.i. ($aRR\ 42,97;\ P= 9,49e^{-6}$) e no 7º d.p.i. ($aRR\ 12,94;\ P=0,001$) em comparação ao 3º d.p.i. A maior produção de OBs nestes dias está correlacionada com o maior desenvolvimento das larvas e, consequentemente, maior peso das larvas conforme verificado em estudo preliminar com análise de regressão (dados não apresentados).

Um dos fatores críticos na produção de vírus que rompem o tegumento da larva é o tempo de coleta do material. O rompimento da larva pode acarretar perda na produtividade do vírus e contaminação com outros microrganismos. Ruiz et al. (2015) estabeleceram o sétimo dia após inoculação como o ideal para coleta de larvas de *S. frugiperda* visando à produção de *Spodoptera frupigerda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em razão da menor incidência de contaminantes e facilidade na coleta dos OBs, comparado à coleta em dias posteriores.

Tabela 1. Modelos Lineares Generalizados completos para avaliar o efeito da temperatura, concentração de inóculo, instar larval e dia de coleta pós-inoculação (d.p.i.) sobre a produção de poliedros (OBs) por larva. A distribuição de erro é de Quasi-Poisson.

Variável Resposta	Variável Explicativa	g.l.	Deviance	Residual g.l.	Residual Deviance	p(>chi)
OBs/larva	Modelo nulo			59	1,1964e+10	
	Temperatura	2	895161347	57	1,1069e+10	0,06429
	Instar	1	1074420650	56	9,9949e+09	0,01027
	Concentração	1	4429413	55	9,9904e+09	0,86910
	d.p.i.	4	6399004548	52	3,5959e+09	<0,01
	Temperatura x Instar	2	507008324	53	9,4834e+09	0,21652
	Temperatura x Concentração	2	150139653	51	9,3333e+09	0,64663
	Instar x Concentração	1	114849991	50	9,2184e+09	0,40137
	Temperatura x Instar x Concentração	2	203950388	48	9,0145e+09	0,53511

Tabela 2. Análise de Variância para avaliar o efeito da temperatura, concentração de inóculo, instar larval e dia de coleta pós-inoculação (d.p.i.) sobre o peso por larva ao nível de confiança de 95%..

Variável Resposta	Variável Explicativa	SQ	g.l.	QM	Fcal	P_Valor
Peso por lava	d.p.i.	0,088	3	0,029	16,666	1,12e-17
	Instar	0,029	1	0,029	16,341	1,78e-4
	Temperatura	0,062	2	0,031	17,692	1,45e-6
	Concentração	0,010	2	0,005	2,756	7,3e-2
	Instar x temperatura	0,008	2	0,004	2,152	1,26e-1
	Instar x concentração	0,021	2	0,011	6,064	4,33e-3
	Temperatura x concentração	0,027	4	0,007	3,775	9,15e-3
	Instar x temperatura x concentração	0,023	4	0,006	3,290	1,78e-2

2. Produção de OBs: influência da temperatura, instar larval e concentração do inóculo em larvas incubadas individualmente

Não houve diferença significativa entre as concentrações de inóculo (5×10^6 e 5×10^7 OBs/ml) ($P > 0,05$) (Tabela 1, figura 1), apesar de haver uma tendência de maior produção com 5×10^7 OBs/ml. A idade da larva influenciou significativamente a produção de OBs ($P < 0,05$) (Tabela 1), enquanto que se observou a influência dos parâmetros de temperatura, idade da larva e de suas interações com a concentração de inóculo para a variável resposta de peso das larvas ($P < 0,05$) (Tabela 2). Portanto, a análise da produção de OBs e do peso das larvas foi realizada separadamente para cada um dos instares avaliados. Observou-se maior produção de OBs com larvas de 4º instar incubadas a 23°C em relação às larvas de 3º instar (aRR 0,36; $P = 0,0493$) (figura 2).

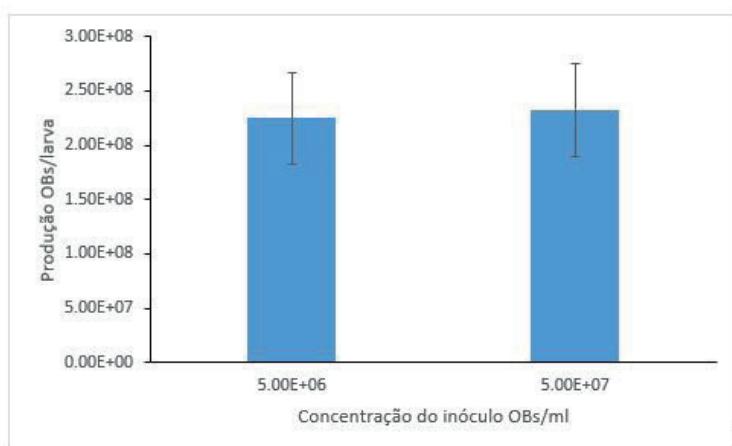


Figura 1. Produção média de OBs/larva em relação à concentração do inóculo. Larvas de 3º e 4º instares de *C. includens* inoculadas com ChinNPV-Buritis. Barra de erros indica o erro padrão. Não foi observada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).

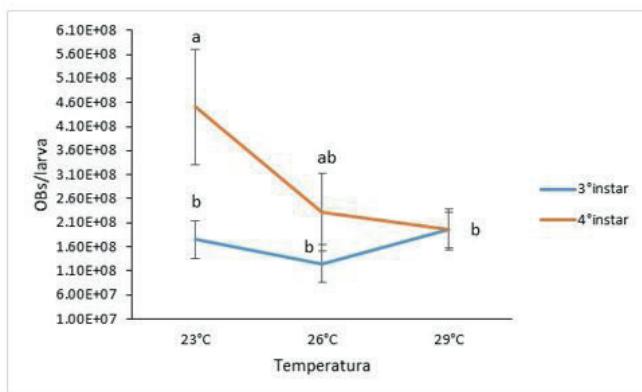


Figura 2. Produção média de OBs/larva em relação à temperatura e instar larval. Larvas de 3º e 4º instares de *C. includens* inoculadas com ChinNPV-Buritis. Barra de erros indica o erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0.05$).

O peso das larvas foi significativamente maior em algumas interações de idade, temperatura e concentração de inóculo, notadamente no 4º instar (Tabela 2, figura 3). De forma geral, não se observou efeito significativo da infecção viral no peso das larvas, quando comparado ao controle negativo, sem infecção. Para efeito de comparação, realizou-se o cálculo do valor médio de OBs/mg. Os valores obtidos ficaram entre $9,07 \times 10^5$ e $1,45 \times 10^7$ OBs/mg. Valores similares foram obtidos para larvas de *S. frugiperda* infectadas com SfMNPV. O peso por larva foi de 0,033 e 0,154g, enquanto que a produção de OBs por larva foi de $1,06 \times 10^8$ e $1,09 \times 10^9$ para larvas de 3º e 4º instares respectivamente (Rios-Velasco et al., 2012). Em outro estudo com essas larvas, mas usando um isolado de SfMNPV diferente obteve-se valores próximos de peso das larvas e produtividade de OBs. Neste caso não houve diferença significativa entre concentrações de inóculo de 5×10^6 e 1×10^7 OBs/ml (Ruiz et al., 2015). Em larvas de *H. armigera* infectadas com *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV) os valores ficaram em torno de 2 a 5×10^7 OBs/mg (Arrizubieta et al., 2016).

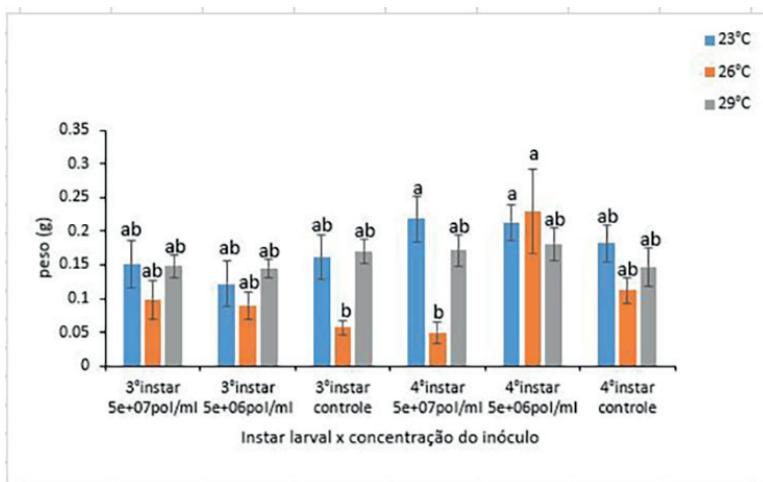


Figura 3. Peso médio (g) por larva de *C. includens*, de acordo com temperatura, concentração do inóculo viral e instar larval. Larvas de 3º e 4º instares de *C. includens* inoculadas com ChinNPV-Buritis e controle sem inoculação. Barra de erros indica o erro padrão. Colunas com letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0.05$).

Foi possível observar uma menor tendência de mortalidade das larvas incubadas a 23°C quando comparadas à outras temperaturas (dados não apresentados). Da mesma forma, na temperatura de 26°C ocorreu menor mortalidade em relação às larvas incubadas a 29°C. Além disso, a 29°C ocorreram formação de pupas em uma parte das larvas de 4ºinstar submetidas à inoculação de vírus. A temperatura de 29°C foi descartada para produção massal pela grande quantidade de larvas apresentando rompimento do tegumento e/ou formação de pupas.

Pode-se inferir pela observação do peso das larvas de 4ºinstar que houve uma redução da taxa de metabolismo energético das larvas incubadas a 23°C e possivelmente esse aumento de peso pode ter contribuído para a grande produção de OBs observada nesta interação. Foi demonstrado em estudo com *H. armigera* para produção do vírus HearNPV uma correlação positiva entre aumento de peso e maior produção de OBs (Arrizubieta et al., 2016). Apesar de que no estudo mencionado os autores também tivessem usado larvas de 5º instar, não houve diferença significativa entre temperaturas

de incubação (23°C , 26°C e 30°C) e de instares para a produção de OBs.

Cabe ressaltar que embora não tenha ocorrido mortalidade das larvas incubadas a 23°C , elas apresentavam sintomas típicos da doença causada por baculovírus, especialmente a redução da movimentação e palidez na coloração do tegumento. Possivelmente, se houvesse incubação por períodos acima de 7 dias após a inoculação, as larvas haveriam morrido com o sintoma típico de rompimento do tegumento causado pelo ChinNPV como foi comprovado em outros experimentos de laboratório realizados pelo nosso grupo nesta temperatura (dados não apresentados).

Um dos parâmetros que mais influenciam o custo de produção de baculovírus é a quantidade de vírus utilizada na inoculação. Desta forma, a concentração viral mais baixa de 5×10^6 OBs/ml foi considerada a ideal para a produção e padronizada para os ensaios subsequentes. Da mesma forma, em estudo com *H. armigera* infectadas com HearNPV, as doses menores de inóculo ($5,5 \times 10^6$ OBs/ml) apresentaram peso de larvas e produção de OBs similares aos tratamentos com doses de inóculos maiores (Arrizubieta et al., 2016).

Outro fator que pode influenciar decisivamente nos custos de produção é a incubação das larvas em grupos. Este tipo de inoculação em grupos, diminui consideravelmente a mão-de-obra e espaço físico comparado ao que a individualização das larvas requer.

3. Influência da temperatura na produção de OBs em larvas individualizadas ou agrupadas

Similarmente ao experimento 1, verificou-se que a infecção viral não influenciou no peso das larvas quando comparado ao controle negativo ($F=0,0001$; $df=1,56$; $P=0,9930$). A incubação das larvas em grupos não teve efeito significativo no peso ($F=0,96$; $df = 1, 56$; $P = 0,3308$) e na produção de OBs das larvas ($F=1,33$; $df = 1, 36$; $P = 0,2554$), embora uma tendência de redução nos valores tenha sido observada quando comparada à incubação individual (Figura 4). Em relação ao parâmetro de temperatura de incubação não houve diferença na produção de OBs/larva entre 23°C e 26°C ($F=1,41$; $df = 1,36$; $P = 0,2413$). No entanto, o peso das larvas incubadas à 26°C foi significativamente maior ($F=4,50$; $df = 1, 56$; $P = 0,0382$).

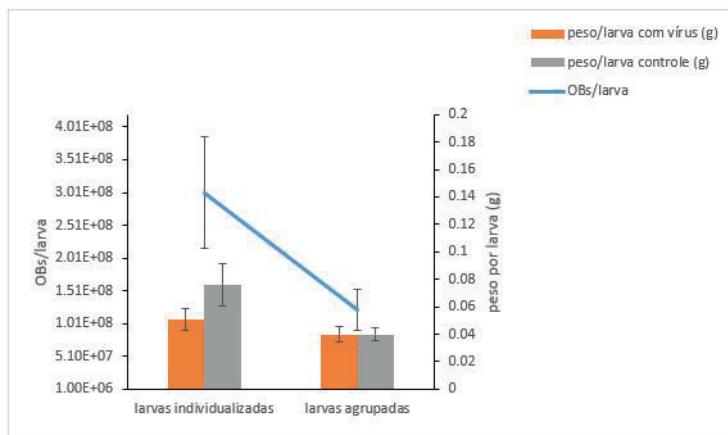


Figura 4. Peso médio (g) e produção média de OBs por larva incubadas em condições individualizadas ou em agrupamentos com 10 larvas. Larvas de 3º instar de *C. includens* inoculadas com ChinNPV-Buritis e controle sem inoculação. Barra de erros indica o erro padrão. Não foi observada diferença entre os tratamentos ($P>0,05$).

A ausência de comportamento canibal é uma vantagem para a criação de larvas em grupos. Em estudo com larvas de *H. armigera*, as quais apresentam comportamento canibal, verificou-se que a criação em grupos afetou negativamente a quantidade de OBs por larva (Arrizubieta et al., 2016). O mesmo comportamento canibal é observado em larvas de *S. frugiperda*, sendo necessária sua individualização ou multiplicação do vírus em hospedeiro alternativo, como por exemplo em *S. eridania* (Valicente et al., 2010).

Mesmo para larvas consideradas não-canibais como *A. gemmatalis*, a inoculação de vírus AgMNPV em maiores doses, assim como maior densidade de larvas (25 larvas comparado a 20 ou 15 larvas por copo de 300ml) provocou um comportamento de canibalismo, embora isto não tenha afetado a produção total de OBs por copo (Moscardi et al., 1997). No trabalho mencionado também não houve diferença significativa entre a menor e maior dose de inóculo (1×10^6 e 1×10^7 OBs/ml), embora a utilização de larvas de *A. gemmatalis* com tamanho de 2cm resultou em produção significativamente maior por inseto (em torno de 2×10^9 OBs/larva). Em trabalho com grupos

com densidade de 30 larvas de *A. epsilon* para a produção de *Agrotis epsilon multiple nucleopolyhedrovirus* (AgipMNPV) foram obtidos valores médios de $3,7 \times 10^8$ OBs/larva e $1,4 \times 10^9$ OBs/g (Behle, 2018). No trabalho mencionado avaliou-se também a patogenicidade do material produzido, e concluiu-se que o melhor custo/benefício ocorreu com larvas de 4° e 5° instares e com concentrações de inóculo entre 1×10^6 e 1×10^7 OBs/ml.

No nosso estudo não foi verificada a ocorrência de canibalismo nos grupos com densidade de 10 larvas de *C. includens* de terceiro instar. Estudos com larvas de uma espécie do mesmo gênero, *Chrysodeixis chalcites* visando à produção massal de *Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus* (ChchNPV) mostraram a viabilidade de produção em grupos de até 200 larvas de 4°, 5° ou 6° instar, embora a maior produção ocorreu em larvas de 6° instar (Bernal et al., 2018).

As condições para produção de baculovírus visando seu uso como biopesticida buscam a obtenção de um maior número de partículas virais (OBs) por inseto, preservando suas características biológicas. Vários fatores podem afetar a produção de OBs. Para cada combinação de vírus-hospedeiro é necessário a otimização dos fatores para maximizar a produção in vivo. Para o isolado ChinNPV-Buritis os valores de produção e produtividade estão dentro da faixa normalmente alcançadas nos diferentes sistemas de produção de baculovírus in vivo. Luiz et al. (2018) trabalharam com outro isolado de ChinNPV para a produção massal em *C. includens* em faixas de temperatura (22°C , 25°C e 28°C) e concentrações de inóculo ($4,3 \times 10^6$ e 10^7 OBs/ml) próximos ao utilizado em nosso trabalho e também não observaram diferenças significativas na produção de OBs em relação à concentração de inóculo. No entanto, a produção foi significativamente maior a 25°C (produção média de $9,5 \times 10^9$ OBs/larva). No referido trabalho, porém eles utilizaram larvas com idade um pouco mais avançada (15 e 16 dias) em comparação ao nosso trabalho (idade média de 8 a 10 dias).

Durante seu processo evolutivo, as populações naturais virais tendem a convergir para um equilíbrio entre genótipos que matam rapidamente a larva e genótipos que produzem mais OBs, consequentemente favorecendo a transmissão horizontal. Foi demonstrado em estudo com nove genótipos que compõem uma população natural de SfMNPV uma alta correlação

entre rápida velocidade de morte e menor produção de OBs, provavelmente devido ao menor tamanho das larvas que morrem rapidamente (Simon et al., 2008). Geralmente os isolados mais produtivos tendem a ser aqueles com menor virulência (Barrera et al., 2011; Cabodevilla et al., 2011; Murillo et al., 2006). No entanto, em trabalho comparativo entre diferentes isolados naturais de *Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus* (SeMNPV) não houve diferença significativa na produção de OBs entre os isolados, mesmo em alguns mais virulentos (Luna-Espino et al., 2018). A coexistência de genótipos distintos e misturas genotípicas com transmissibilidade semelhante foi sugerida em trabalho abrangendo a análise da variabilidade genotípica e fenotípica de isolados de SeMNPV, obtidos em solos de casa de vegetação (Murillo et al., 2006).

Outro fator que pode influenciar a produção de OBs é o armazenamento após a morte da larva. Em estudo com SfMNPV verificou-se um rendimento 40% superior de OBs obtidos de larvas de *S. frugiperda* mantidas a 15°C, por 9 dias após a morte, em relação às larvas mantidas a 5°C ou -20°C (Ramirez-Arias et al., 2019). Estudos com ChinNPV e *C. includens* serão necessários para verificar as condições ideais *post-mortem* para a produção de OBs. Além disso, a presença de outros patógenos, incluindo a co-infecção com outros vírus como os iflavírus poderia acarretar problemas nas propriedades inseticidas dos OBs produzidos (Carballo et al., 2017), sendo imprescindível o controle de qualidade, com análise da pureza e bioensaios periódicos do material produzido.

Conclusão

A utilização de larvas de quarto instar e as temperaturas de 23°C e 26°C para incubação de larvas *C. includens* são recomendadas para produção in vivo de ChinNPV. A incubação de larvas em grupos e a concentração menor de vírus no inóculo (5×10^6 OBs/ml) são indicadas para reduzir os custos da produção.

Agradecimentos

À Embrapa pelo auxílio financeiro. Aos Dr. Daniel R. Sosa-Gomez (Embrapa Soja) e Francisco G. V. Schmidt (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) pelo fornecimento de pupas de *Chrysodeixis includens*. Ao Dr. Luís A. M. Palhares de Melo (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) pelo auxílio na análise estatística dos dados. Ao Dr. Rogério Biaggioni Lopes (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) pela concessão do isolado viral e revisão crítica do manuscrito.

Referência Bibliográfica

ALEXANDRE, T. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; CRAVEIRO, S. R.; CUNHA, F.; FONSECA, I. C. B.; MOSCARDI, F.; CASTRO, M. E. B. Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 98-104, 2010.

ARRIZUBIETA, M.; SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Determinant factors in the production of a co-occluded binary mixture of *Helicoverpa armigera Alphabaculovirus* (HearNPV) genotypes with desirable insecticidal characteristics. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, e0164486, 2016.

BARRERA, G.; SIMÓN, O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. **Biological Control**, v. 58, p. 113-120, 2011.

BEHLE, R. W. In vivo production of *Agrotis ipsilon* Nucleopolyhedrovirus for quantity and quality. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 1, p.101-107, 2018.

BENASSI, V. L. R. M.; VALENTE, F. I.; COMÉRIO, E. F.; CARVALHO, S. Lagarta-falsa-medideira. *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857), nova praga do maracujazeiro no Espírito Santo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 941-943, 2012.

BERNAL, A.; SIMON, O.; WILLIAMS, T.; MUÑOZ, D., CABALLERO, P. Remarkably efficient production of a highly insecticidal *Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus* (ChchNPV) isolate in its homologous host. **Pest Management Science**, v. 74, n. 7, p. 1586-1592, 2018.

CABODEVILLA, O.; IBAÑEZ, I.; SIMÓN, O.; MURILLO, R.; CABALLERO, P.; WILLIAMS, T. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v. 5, p. 184-192, 2011.

CARBALLO, A.; MURILLO, R.; JAKUBOWSKA, A.; HERRERO, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Co-infection with iflavirus influences the insecticidal properties of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus occlusion bodies: implications for the production and biosecurity of baculovirus insecticides. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, e0177301, 2017.

CONTE, O.; OLIVEIRA, F. T. de; HARGER, N.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. **Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2013/14 no Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 56 p. (Embrapa Soja. Documentos, 356).

COSTA, N. R.; CASTRO, M. E. B. de; SIHLER, W.; PEGORARO, R. A.; SOUZA, M. L. de. **Análise da estabilidade genética do *Erinnyis ello* granulovírus aplicado em Santa Catarina como bioinseticida no período de 1986 a 2000**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 110).

CRAVEIRO, S. R.; SANTOS, L. A. V. M.; TOGAWA, R. C.; INGLIS, P. W.; GRYNBERG, P.; RIBEIRO, Z. M. A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B. Complete genome sequences of six *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus isolates from Brazil and Guatemala. **Genome Announcements**, v. 4, e01192-16, 2016.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R companion to applied regression**. 3rd ed. Thousand Oaks: Sage, 2019.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Ed.). **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier, 2012. 1337 p.

LUIZ, C. F. C.; VALICENTE, F. H.; DIMATE, F. R.; COSTA, V. H. D.; MELO,

I. V. P. Otimização de parâmetros para a produção em larga escala de baculovírus para *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 8., 2018, Goiânia. **Inovação, tecnologias digitais e sustentabilidade da soja:** anais. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 175.

LUNA-ESPINO, J. C.; CASTREJON-GOMEZ, V. R.; PINEDA, S.; FIGUEROA, J. I.; MARTÍNEZ, A. M. Effect of four multiple nucleopolyhedrovirus isolates on the larval mortality and development of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae): determination of virus production and mean time to death. **Florida Entomologist**, v. 101, n. 2, p. 153-159, 2018.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 1, p. 129-146.

MOSCARDI, F.; LEITE, L. G; ZAMATARO, C. E. Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): effect of virus dosage, host density and age. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 121-132, 1997.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, M. L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. (Ed.). **Microbes and microbial technology**: agricultural and environmental applications. New York: Springer, 2011. p. 415-445.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. de F.; SOSA-GOMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja:** manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 213-334.

MURILLO, R.; ELVIRA, S.; MUÑOZ, D.; WILIAMS, T.; CABALLERO, P. Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain. **Biological Control**, v. 38, p. 157-165, 2006.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculoviruses expression vectors**: a laboratory manual. New York: Oxford University, 1992. p. 3-7.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 10 agosto 2020.

RAMIREZ-ARIAS, F. G.; LASA, R.; MURILLO, R.; NAVARRO-DE-LA-FUENTE, L.; MERCADO, G.; WILLIAMS, T. Post-mortem incubation influences occlusion body production in nucleopolyhedrovirus-infected larvae of *Spodoptera frugiperda* **Biological Control**, v. 135, p. 33-40, 2019.

REID, S.; CHAN, L.; VAN OERS, M. Production of entomopathogenic viruses. In: MORALES-RAMOS, J. A.; ROJAS, M. G.; SHAPIRO-ILAN, D. I. (Ed). **Mass production of beneficial organisms**: invertebrates and entomopathogens. London: Elsevier, 2014. p. 437-482.

RIOS-VELASCO, C.; GALLEGOS-MORALES, G.; BERLANGA-REYES, D.; CAMBERO-CAMPOS, J.; ROMO-CHACÓN, A. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 3, p. 752-757, 2012.

RUIZ, C.; GOMEZ-VALDERRAMA, J.; CHAPARRO, M.; SOTELO, P.; VILLAMIZAR, L. Adjusting the conditions of a system for the in vivo production of a nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biotecnología Aplicada**, v. 32, p. 4311-4316. 2015.

SANCHES, M. M.; SIHLER, W.; SILVA, C. E. P.; GUIMARÃES, G. C.; BENITO, N. P.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; SOUZA, M. L. Characterization of a *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus isolate from Brazilian Cerrado and assessment of its co-infection with *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 62, e19180688, 2019.

SIMON, O.; WILLIAMS, T.; LOPEZ-FERBER, M.; TAULEMESSE, J. M.; CABALLERO, P. Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v. 44, n. 3, p. 321-333, 2008.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Microbial control of soybean pest insects and mites. In: LACEY, L. A. (Ed.). **Microbial control of insect and mite pests**: from theory to practice. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 199-208.

SOUZA, M. L. de; SIHLER, W.; SANCHES, M. M.; SCHMIDT, F. G. V.; BENITO, N. P.; SILVA, M. L. da; FARIA, M. R. de; LOPES, R. B. **Ocorrência de baculovírus em larvas de *Chrysodeixis includens* em cultivo de soja na região do Cerrado.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016. 19 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 313). (A data da referência enviada nessa publicação estava 2015).

SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, n. 4, p. 343-345, 2015.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S.; BARROS, E. C. de. **Processo de produção comercial de Baculovírus em grande escala.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 5 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 157).

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern applied statistics with S.** 4th ed. New York: Springer, 2002. Disponível em: <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4>. Acesso em: 02 maio 2020.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

