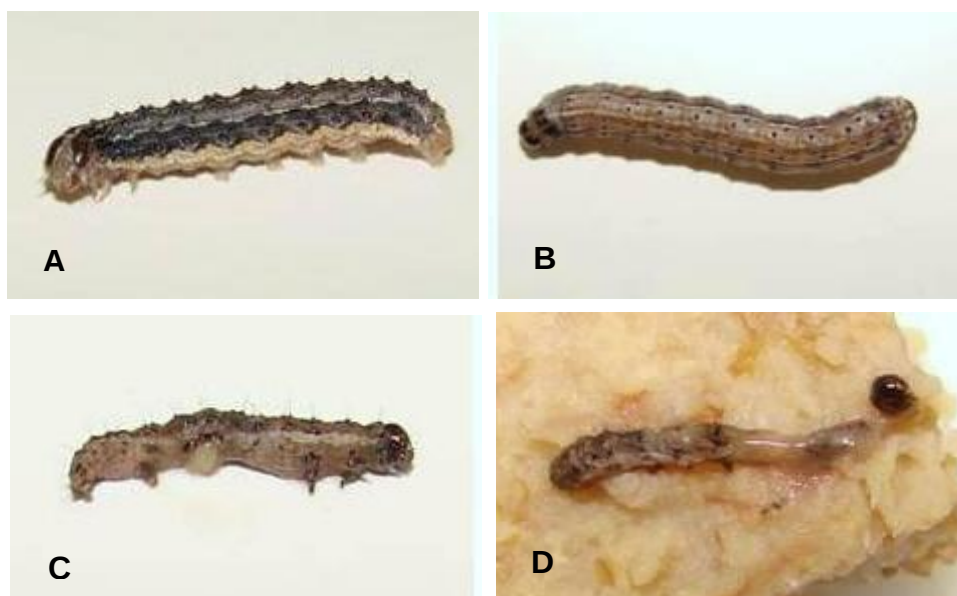




**Avaliação da atividade inseticida de  
isolados de SfMNPV com o branqueador  
óptico "*Blankophor P167*"**

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

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 231***

### **Avaliação da atividade inseticida de isolados de SfMNPV com o branqueador óptico “*Blankophor P167*”**

Lorena Carvalho de Souza  
Zilda Maria de Araújo Ribeiro  
Filipe Israel Azevedo  
Marlinda Lobo de Souza  
Fernando Hercos Valicente  
Maria Elita Batista de Castro

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

**Presidente:** *Miguel Borges*

**Secretária-Executiva:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Membros:** *Diva Maria de Alencar Dusi*  
*Luiz Adriano Maia Cordeiro*  
*José Roberto de Alencar Moreira*  
*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*  
*Samuel Rezende Paiva*

**Suplentes:** *João Batista Tavares da Silva*  
*Margot Alves Nunes Dode*

**Supervisor editorial:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Normalização Bibliográfica:** *Ligia Sardinha Fortes*

**Editoração eletrônica:** *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

**Foto:** Lagartas *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo vírus SfMNPV e/ou branqueador *Blankophor P167* (1%). (A) dieta com água (controle), (B) dieta com branqueador (controle), (C) dieta com vírus, (D) dieta com vírus e branqueador. Concentração viral usada:  $1,6 \times 10^8$  OB/ml.

1ª edição

1ª impressão (2008):

**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**

A 945 Avaliação da atividade inseticida de isolados de SfMNPV com o branqueador óptico "Blankophor P167". / Lorena Carvalho de Souza ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.  
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 231).

1. *Spodoptera frugiperda* – Controle biológico. 2. Bioinseticida. 3. Praga – Controle I. Souza, Lorena Carvalho de. II. Série.

632.96 – CDD 21

# SUMÁRIO

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>Resumo .....</b>                 | <b>5</b>  |
| <b>Abstract .....</b>               | <b>6</b>  |
| <b>Introdução .....</b>             | <b>7</b>  |
| <b>Materiais e Métodos .....</b>    | <b>8</b>  |
| <b>Resultados e Discussão .....</b> | <b>9</b>  |
| <b>Referências .....</b>            | <b>16</b> |

# Avaliação da atividade inseticida de isolados de SfMNPV com o branqueador óptico “*Blankophor P167*”

---

**Lorena Carvalho de Souza<sup>1</sup>**  
**Zilda Maria de Araújo Ribeiro<sup>2</sup>**  
**Filipe Israel Azevedo<sup>3</sup>**  
**Fernando Hercos Valicente<sup>4</sup>**  
**Marlinda Lobo de Souza<sup>5</sup>**  
**Maria Elita Batista de Castro<sup>5</sup>**

## Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do branqueador óptico *Blankophor P167* na atividade inseticida de isolados de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) na lagarta do cartucho-do-milho (*S. frugiperda*). Bioensaios foram conduzidos, usando os isolados virais SfMNPV I-18 e SfMNPV I-19, sendo cada tratamento repetido três vezes. Os tratamentos consistiram de cinco concentrações virais  $2,5 \times 10^5$ ;  $1,3 \times 10^6$ ;  $6,5 \times 10^6$ ;  $3,2 \times 10^7$  e  $1,6 \times 10^8$  OB/ml, sem e com acréscimo de 1% do branqueador *P167*. Os controles usados foram branqueador sem vírus e água somente. Ambos isolados, I-18 e I-19, quando misturados com o branqueador causaram maior mortalidade larval do que quando utilizados sem branqueador. As análises dos bioensaios mostraram que a  $CL_{50}$  resultante da combinação do isolado I-18 com *P167* foi reduzida cerca de 10 vezes quando comparada a  $CL_{50}$  do tratamento sem branqueador, sendo esse efeito mais acentuado em bioensaios com o isolado I-19. A concentração viral (I-19) requerida para matar 50% dos insetos testados foi cerca de 15 vezes menor quando o vírus foi misturado com *P167*. O tempo letal médio ( $TL_{50}$ ) foi determinado e, para ambos isolados, observou-se uma redução no número de dias à medida que a concentração viral foi aumentada. Este efeito foi também observado com a adição do branqueador, mesmo em concentrações virais mais baixas. Ambos os isolados virais foram potencializados com o uso do *Blankophor P167*, sugerindo que o branqueador pode ter facilitado a passagem das partículas virais pela membrana peritrófica, resultando num aumento da atividade viral e conseqüente aumento da mortalidade larval.

**Palavras-chave:** Baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, branqueadores ópticos, bioensaios, mortalidade, atividade inseticida.

---

<sup>1</sup>Graduanda em Biomedicina, Centro Universitário de Brasília/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>2</sup>Bióloga, MSc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>3</sup>Graduando em Biologia, Universidade de Brasília/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>4</sup>Eng. Agrônomo, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>5</sup>Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

# Evaluation of the insecticidal activity of SfMNPV isolates with the optical brightener “*Blankophor P167*”

---

## Abstract

The objective of the present study was to evaluate the effect of the optical brightener *Blankophor P167* on the insecticidal activity of *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) isolates in the fall armyworm (*S. frugiperda*). Bioassays were conducted using the isolates SfMNPV I-18 and SfMNPV I-19, being each treatment repeated three times. The treatments consisted of five viral concentrations  $2.5 \times 10^5$ ;  $1.3 \times 10^6$ ;  $6.5 \times 10^6$ ;  $3.2 \times 10^7$  and  $1.6 \times 10^8$  OB/ml, without and with addition of 1% *P167* brightener. The controls used were brightener without virus and water only. Both isolates, I-18 and I-19, when mixed with the brightener caused a greater larval mortality than as used without the brightener. The bioassays analyses showed that the  $CL_{50}$  resulting from the combination of the isolate I-18 with *P167* was reduced about 10 times when compared to the  $CL_{50}$  of the treatment without the brightener, being this effect more prominent in bioassays with the I-19 isolate. The viral concentration (I-19) required to kill 50% of the tested insects was about 15 times less than for the virus mixed with *P167*. The average lethal time ( $TL_{50}$ ) was determined and a reduction in the number of days was observed for both isolates as the viral concentration was increased. This effect was also observed with the brightener addition, even at lower viral concentrations. Both viral isolates were potentialized by the use of the *Blankophor P167*, suggesting that the brightener may have facilitated the viral particles to pass through the peritrophic membrane, resulting in a viral activity increase and consequent larval mortality increase.

Keywords: Baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, optical brightener, bioassays, mortality, insecticidal activity.

## Introdução

Os baculovirus pertencem à família *Baculoviridae* que está dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). São patogênicos a insetos, sendo a maioria da ordem Lepidoptera. São constituídos de um DNA de dupla fita de 80 a 200 kb (Theilmann *et al.*, 2005).

Os baculovirus apresentam duas formas infectivas: o vírus derivado do corpo de oclusão (ODV- *occlusion derived virus*) e o vírus extracelular (BV- *Budded Virus*) (GRANADOS e WILLIAMS, 1986). Estas formas virais possuem genótipos idênticos, porém exercem papéis distintos no ciclo de vida do vírus apresentando diferenças na morfologia, composição protéica, especificidade do tecido (BLISSARD e ROHRMANN, 1990). Partículas ODV são empacotadas com números variados de nucleocapsídeos por envelope, e várias dessas partículas são imersas em uma matriz protéica composta basicamente por poliedrina, denominada de poliedros ou corpos de oclusão (OB - *occlusion bodies*). Essas partículas virais são responsáveis pela transmissão da infecção de inseto para inseto.

Os baculovirus são de grande interesse na agricultura principalmente devido ao seu uso no controle de pragas. A principal rota natural de infecção no inseto é por ingestão de alimento contaminado com partículas virais na forma ocluída OB. Os corpos de oclusão são ingeridos pela larva e dissolvidos no lúmen do intestino liberando os ODV. Essas partículas virais passam pela membrana peritrófica do intestino médio e entram nas células colunares, via fusão de membrana mediada por receptores específicos (HORTON e BURAND, 1993). A replicação do vírus nessas células resulta na produção de vírus extracelulares (BV), estabelecendo uma infecção sistêmica e morte do inseto em poucos dias (ENGELHARD *et al.*, 1994).

Alguns fatores têm limitado o uso de baculovirus no campo, dentre eles incluem o período entre a aplicação do bioinseticida e a morte da praga e a inativação do vírus por radiação solar (UV). Por este motivo, vários aditivos químicos vêm sendo testados para melhorar a proteção dos formulados contra UV e aumentar a atividade ou mesmo a patogenicidade do patógeno (SHAPIRO, 1992; SHAPIRO e ROBERTSON, 1992; IGNOFFO *et al.*, 1997; TAMEZ-GUERRA *et al.*, 2000; MCGUIRE *et al.*, 2001; OKUNO *et al.*, 2003; SHAPIRO e FARRAR JUNIOR, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2003). Recentemente, estudos mostraram que um isolado do baculovirus LdMNPV, que normalmente não se replica no intestino médio da lagarta, ao ser utilizado com um branqueador fluorescente (Calcofluor M2R) resultou em infecções produtivas. Também, Dougherty *et al.* (2006) observaram que o uso do branqueador *Blankophor P167* em sistemas de infecção *in vitro* promoveu a replicação viral e a inibição de apoptose, e que provavelmente o branqueador seja parcialmente responsável pelo aumento da atividade de LdMNPV observada em larvas de *Lymantria dispar* (L.).

O uso do baculovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) como agente de controle da lagarta do cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*) tem sido feito em bem menor escala comparado ao uso do baculovirus para combate a lagarta da soja (AgMNPV). Eventos vêm sendo investigados quanto ao nível de infectividade, fragilidade da cutícula da larva infectada, canibalismo em insetos criados em laboratório e dificuldades de controle no campo devido à migração do inseto para dentro do cartucho do milho (CHAPMAN et al., 1999).

Portanto, o desenvolvimento de estratégias que visem aumentar a mortalidade do inseto alvo e também ampliar o espectro de hospedeiros torna-se bastante interessante.

Dando continuidade a estudos de infecção viral com uso de branqueador óptico, bioensaios foram conduzidos com larvas de *Spodoptera frugiperda* visando avaliar o efeito dessa combinação na infectividade ou atividade dos isolados I-18 e I-19 de SfMNPV.

## Materiais e Métodos

**Insetos:** Larvas de *Spodoptera frugiperda* mantidas em dieta artificial, em câmaras com fotoperíodo, temperatura e umidade controladas (FT = 14h, T = 28°C e UR = 70%) foram cedidas pela Plataforma de Criação de Insetos do Núcleo Temático de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**Vírus:** Isolados 18 (I-18) e 19 (I-19) de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) foram cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo (Dr. Fernando H. Valicente).

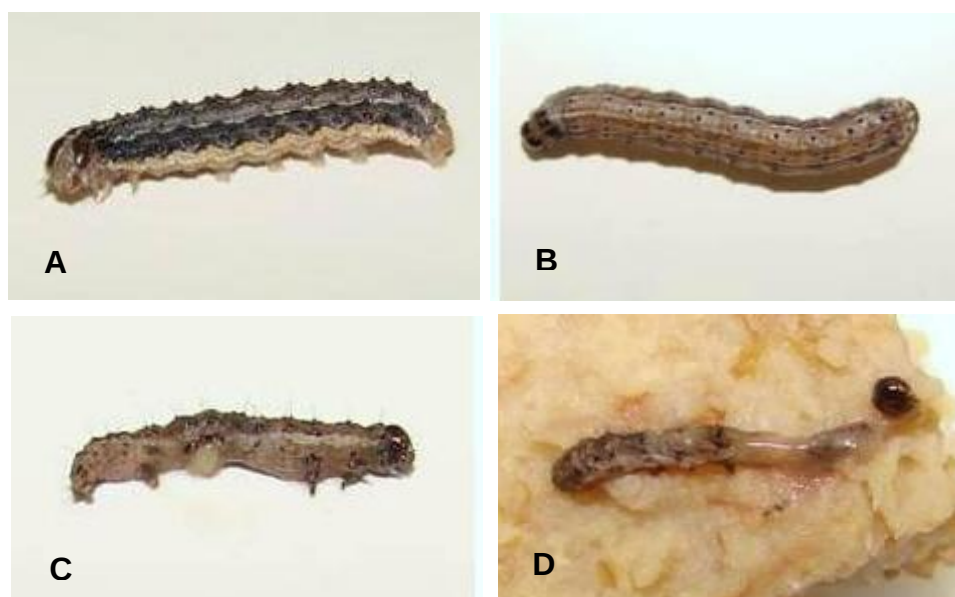
**Multiplicação de vírus e purificação de poliedros:** Lagartas infectadas e mortas foram trituradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris 0,01M, pH 7,8; EDTA 0,001M). O macerado foi filtrado em gaze e centrifugado a 12.000rpm (Sorvall RC-5B, rotor SS-34) por 15min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em TE (Tris 0,01M, pH 7,8; EDTA 0,001M). O material foi novamente centrifugado e o *pellet* ressuspense em 10ml de TE. Um volume de 5ml do material foi colocado em gradiente de sacarose de densidade 1,17 a 1,30g/ml e centrifugado a 24.000rpm (Sorvall OTD 75B, rotor AH 627) por 40min. Uma banda de poliedros formada no terço inferior do tubo foi coletada com uma pipeta Pasteur e diluída 4 vezes em TE. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (poliedros purificados) ressuspense em água destilada e armazenado a -20 °C.

**Infecção de larvas *Spodoptera frugiperda* (bioensaios):** Isolados de SfMNPV (I-18 e I-19), separados e em combinação com o branqueador *Blankophor P167*, foram testados em

diferentes concentrações utilizando um fator de diluição de 5x:  $2,6 \times 10^5$ ,  $1,3 \times 10^6$ ,  $6,5 \times 10^6$ ,  $3,2 \times 10^7$ ,  $1,6 \times 10^8$  OB/ml e branqueador 1%. Larvas de 3/4º instar foram colocadas em copos de plástico de 50ml, fechados com tampas de acrílico, e mantidas em câmaras com fotoperíodo, temperatura e umidade controladas (FT = 14h, T = 28°C e UR = 70%). Após um período de jejum de 12 horas, foi adicionada dieta artificial com o inóculo nas diferentes concentrações virais. Para cada tratamento foram utilizadas 30 larvas, sendo 1larva/tratamento com três repetições. Outras 30 larvas foram mantidas apenas em dieta com branqueador (controle) e outras 30 dieta com água autoclavada (controle). A partir do 3º dia, os bioensaios foram monitorados para determinação dos parâmetros de mortalidade: taxa de mortalidade (%), concentração letal (CL<sub>50</sub>) e tempo letal (TL<sub>50</sub>).

## Resultados e Discussão

Lagartas sadias (*S. frugiperda*), quando alimentadas com dieta artificial contendo vírus ou vírus e branqueador combinados, ficaram doentes apresentando sintomas típicos de infecção viral com alta produção de partículas virais e conseqüente taxa mortalidade. Monitoramento durante o período de infecção das larvas mostra que estes sintomas foram mais acentuados em lagartas que foram alimentadas com a mistura de vírus e branqueador (Fig. 1). O branqueador ótico *Blankophor P167* foi capaz de aumentar a atividade viral nas lagartas testadas, evento este comprovado pela determinação dos parâmetros de mortalidade.



**Fig. 1.** Lagartas *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo vírus SfMNPV e/ou branqueador *Blankophor P167* (1%). (A) dieta com água (controle), (B) dieta com branqueador (controle), (C) dieta com vírus, (D) dieta com vírus e branqueador. Concentração viral usada:  $1,6 \times 10^8$  OB/ml.

As taxas de mortalidade avaliadas mostraram que todos os tratamentos que continham o vírus SfMNPV (I-18 e I-19), combinado com branqueador óptico *Blankophor P167*, exceto na maior concentração de I-18 testada, tiveram seus índices de mortalidade superiores quando comparados com os tratamentos que continham somente vírus (Tabelas 1 e 2, Fig. 2 e Fig. 3). Os percentuais de mortalidade média obtidos do I-18 combinado com branqueador óptico variaram de aproximadamente 38% para a menor concentração viral ( $2,6 \times 10^5$  OB/ml) a 81% para a maior concentração ( $1,6 \times 10^8$  OB/ml), enquanto sem branqueador foram obtidos percentuais menores para as mesmas concentrações virais (6% e 84%, respectivamente).

Tabela 1. Percentual médio de mortalidade de lagartas *S. frugiperda* infectadas pelo vírus SfMNPV I-18 combinado com *Blankophor P167* (1%).

| Concentração<br>(OB/ml) | *Total de<br>larvas mortas<br>I18 + P167 | **Média | Mortalidade<br>média (%)<br>I18 + P167 | *Total de<br>larvas<br>mortas<br>I18 | **Média | Mortalidade<br>média (%)<br>I18 |
|-------------------------|------------------------------------------|---------|----------------------------------------|--------------------------------------|---------|---------------------------------|
| $2,6 \times 10^5$       | 34                                       | 11,33   | 37,78                                  | 6                                    | 2,00    | 6,67                            |
| $1,3 \times 10^6$       | 53                                       | 17,67   | 58,88                                  | 7                                    | 2,33    | 7,77                            |
| $6,5 \times 10^6$       | 66                                       | 22,00   | 73,33                                  | 38                                   | 12,67   | 42,22                           |
| $3,2 \times 10^7$       | 72                                       | 24,00   | 80,00                                  | 67                                   | 22,33   | 74,44                           |
| $1,6 \times 10^8$       | 73                                       | 24,33   | 81,11                                  | 76                                   | 25,33   | 84,44                           |

\*Bioensaios realizados em 3 repetições: 30 larvas/ tratamento/repetição. \*\*Média de 3 repetições.

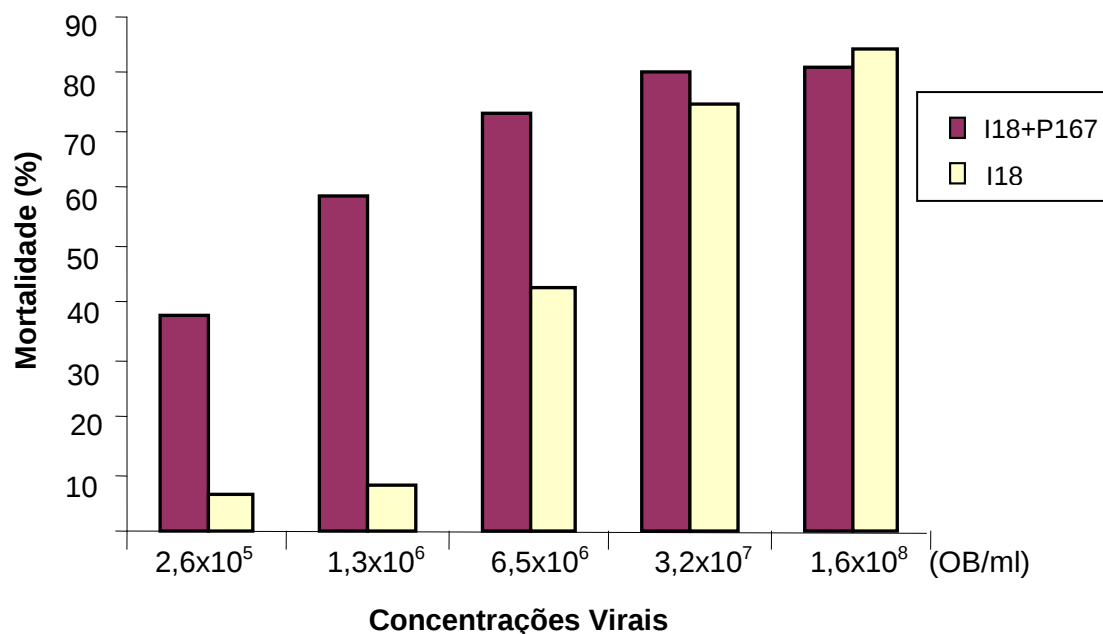


Fig. 2. Efeito do vírus SfMNPV I-18 combinado com branqueador *Blankophor P167* na mortalidade de lagartas *S. frugiperda*.

A Fig. 2 também demonstra que na concentração mais alta, a utilização do branqueador torna-se desnecessária, pois o SfMNPV I18 já consegue grande percentual de mortalidade mesmo sem a combinação, reafirmando que o branqueador é eficiente nas concentrações baixas. O I-19, mesmo sendo altamente infectivo, também apresentou um incremento. Em presença do branqueador, foram obtidas maiores taxas de mortalidade (44% e 96%), comparadas com os tratamentos que continham somente o vírus (24% e 85%). Observa-se que o uso do branqueador potencializou ambos isolados virais, marcadamente nas concentrações mais baixas.

Tabela 2. Percentual médio de mortalidade de lagartas *S. frugiperda* infectadas pelo vírus SfMNPV I-19 combinado com *Blankophor P167* (1%).

| Concentração (OB/ml) | *Total de larvas mortas I-19 + P167 | **Média | Mortalidade média (%) | *Total de larvas mortas I-19 | **Média | Mortalidade média (%) |
|----------------------|-------------------------------------|---------|-----------------------|------------------------------|---------|-----------------------|
| $2,6 \times 10^5$    | 40                                  | 13,33   | 44,44                 | 22                           | 7,33    | 24,44                 |
| $1,3 \times 10^6$    | 54                                  | 18,00   | 60,00                 | 25                           | 8,33    | 27,78                 |
| $6,5 \times 10^6$    | 62                                  | 20,67   | 68,89                 | 31                           | 10,33   | 34,44                 |
| $3,2 \times 10^7$    | 65                                  | 21,66   | 72,22                 | 50                           | 16,67   | 55,55                 |
| $1,6 \times 10^8$    | 86                                  | 28,67   | 95,55                 | 76                           | 25,33   | 84,44                 |

\*Bioensaios realizados em 3 repetições: 30 larvas/ tratamento/repetição. \*\*Média de 3 repetições.

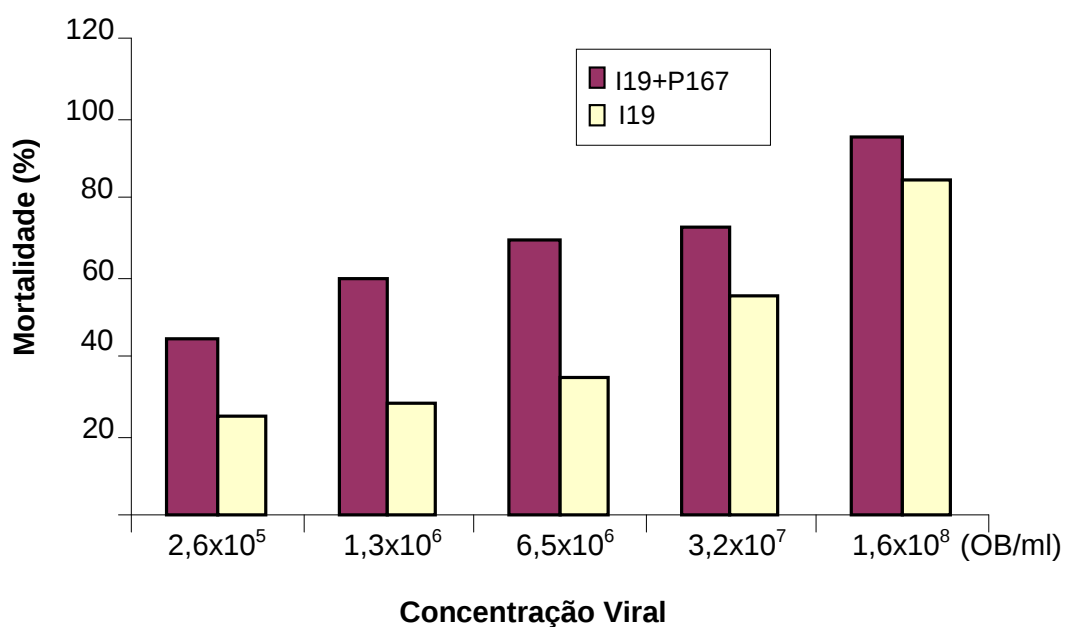


Fig. 3. Efeito do vírus SfMNPV I-19 combinado com branqueador *Blankophor P167* na mortalidade de lagartas *S. frugiperda*.

Outro resultado expressivo se refere à redução da concentração letal (CL<sub>50</sub>) quando os dois isolados de SfMNPV foram comparados. A CL<sub>50</sub> obtida de bioensaios com o isolado I-18 (10<sup>7</sup>OB/ml) decresceu de 10 vezes (10<sup>6</sup>OB/ml), quando o tratamento foi o isolado + branqueador ótico (Tabela 3). Com o I-19 o efeito foi ainda maior, a CL<sub>50</sub> foi reduzida mais de 15 vezes (9,7x10<sup>6</sup> para 5,8x10<sup>5</sup> OB/ml) (Tabela 4). Isso demonstra que para matar 50% da população testada, a quantidade de vírus necessária é muito menor quando se usa o inóculo viral I-19 com branqueador óptico. Isso pode ser explicado por dois aspectos vantajosos que consistiram do bioensaio: o fato do isolado viral usado (I-19) ser mais infectivo, isto é, mais virulento (BARRETO et al., 2005; WOLFF et al., 2008) aliado à entrada de um maior número de partículas virais, resultante do possível aumento na permeabilidade da membrana peritrófica ocasionado pelo uso do branqueador óptico.

Tabela 3. Concentração letal média (CL<sub>50</sub>) determinada por análise de Probit. Bioensaios de lagartas *S. frugiperda* infectadas com vírus SfMNPV I-18 e P167 (1%).

| Vírus                     | CL <sub>50</sub> (OB/ml) | Limites Fiduciais 95%    | Slope | χ <sup>2</sup> |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|----------------|
| <b>SfMNPV I-18 + P167</b> | 1,21x10 <sup>6</sup>     | 334254,93 - 3139854,83   | 5,78  |                |
| <b>SfMNPV I-18</b>        | 1,26x10 <sup>7</sup>     | 4990648,25 - 74922456,90 | 5,37  |                |
|                           |                          |                          | 1,49  |                |

\*CL<sub>50</sub> determina a concentração viral necessária para matar metade da população de larvas infectadas.  
P167 – branqueador *Blankophor P167*

Tabela 4. Concentração letal média (CL<sub>50</sub>) determinada por análise de Probit. Bioensaios de lagartas *S. frugiperda* infectadas com vírus SfMNPV I-19 e P167 (1%).

| Vírus                     | CL <sub>50</sub> (OB/ml) | Limites Fiduciais 95%     | Slope | χ <sup>2</sup> |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------|----------------|
| <b>SfMNPV I-19 + P167</b> | 5,83x10 <sup>5</sup>     | 109851,06 - 1553743,73    | 0,58  | 3,88           |
| <b>SfMNPV I-19</b>        | 9,74x10 <sup>6</sup>     |                           |       |                |
|                           |                          | 1435689,91 - 104762197,79 | 0,65  | 6,08           |

\*CL<sub>50</sub> determina a concentração viral necessária para matar metade da população de larvas infectadas.  
P167 – branqueador óptico *Blankophor P167*

O tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) foi determinado ambos isolados e observou-se uma redução no tempo necessário para matar 50% das larvas à medida que a concentração viral foi aumentada. Nos tratamentos de SfMNPV I-18, houve diminuição da TL<sub>50</sub> em todas as concentrações testadas, quando comparados os tratamentos com branqueador óptico e sem branqueador óptico (Tabela 5 e Fig. 4). O mesmo ocorreu com os tratamentos de SfMNPV I-19, porém a diferença foi menos acentuada (Tabela 6 e Fig. 5).

**Tabela 5. Tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) determinado por análise de Probit. Bioensaios de lagartas *S. frugiperda* infectadas com vírus SfMNPV I-18 e *Blankophor P167* (1%).**

| Vírus                     | Concentração (OB/ml) | TL <sub>50</sub> (dias) | Limites Fiduciais 95% | Slope | $\chi^2$ |
|---------------------------|----------------------|-------------------------|-----------------------|-------|----------|
| <b>SfMNPV I-18 + P167</b> | 2,6x10 <sup>5</sup>  | 15,25                   | 12,91-19,77           | 4,26  | 24,63    |
|                           | 1,3x10 <sup>6</sup>  | 9,18                    | 7,92-11,28            | 3,89  | 27,65    |
|                           | 6,5x10 <sup>6</sup>  | 4,86                    | 3,56-5,91             | 2,07  | 10,48    |
|                           | 3,2x10 <sup>7</sup>  | 4,65                    | 3,70-5,40             | 2,50  | 7,52     |
|                           | 1,6x10 <sup>8</sup>  | 4,43                    | 3,20-5,34             | 3,18  | 21,90    |
| <b>SfMNPV I-18</b>        | 2,6x10 <sup>5</sup>  | 42,71                   | 25,37-199,55          | 2,89  | 4,80     |
|                           | 1,3x10 <sup>6</sup>  | 41,58                   | 25,55-150,24          | 2,76  | 6,36     |
|                           | 6,5x10 <sup>6</sup>  | 31,03                   | 15,84-1769,73         | 2,78  | 20,86    |
|                           | 3,2x10 <sup>7</sup>  | 5,77                    | 4,06-7,68             | 4,64  | 13,46    |
|                           | 1,6x10 <sup>8</sup>  | 4,84                    | 3,99-5,65             | 4,27  | 2,00     |

\*TL<sub>50</sub> determina o tempo necessário para matar metade da população de larvas infectadas.

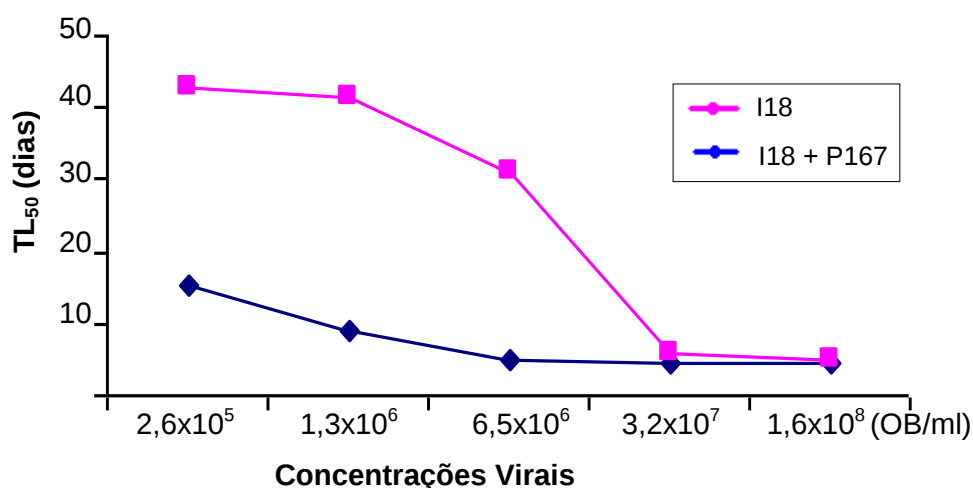


Fig. 4. Efeito do vírus SfMNPV I-18 combinado com branqueador *Blankophor P167* no tempo letal (TL<sub>50</sub>) em bioensaios com lagartas *S. frugiperda*.

Tabela 6. Tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) determinado por análise de Probit. Bioensaios de lagartas *S. frugiperda* infectadas com vírus SfMNPV I-19 e *Blankophor P167* (1%).

| Vírus                     | Concentração (OB/ml) | TL50 (dias) | Limites Fiduciais 95% | Slope | $\chi^2$ |
|---------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|-------|----------|
| <b>SfMNPV I-19 + P167</b> | 2,6x10 <sup>5</sup>  | 10,67       | 8,27-22,88            | 2,99  | 13,32    |
|                           | 1,3x10 <sup>6</sup>  | 7,38        | 6,22-9,24             | 2,71  | 5,49     |
|                           | 6,5x10 <sup>6</sup>  | 6,08        | 5,01-7,27             | 3,24  | 11,43    |
|                           | 3,2x10 <sup>7</sup>  | 5,54        | 3,64-7,49             | 7,13  | 32,93    |
|                           | 1,6x10 <sup>8</sup>  | 3,35        | 2,89-3,69             | 6,85  | 6,13     |
| <b>SfMNPV I-19</b>        | 2,6x10 <sup>5</sup>  | 33,38       | 17,47-1634,67         | 2,64  | 14,33    |
|                           | 1,3x10 <sup>6</sup>  | 24,75       | 15,73-112,63          | 2,07  | 16,77    |
|                           | 6,5x10 <sup>6</sup>  | 18,93       | 12,60-81,97           | 2,24  | 15,26    |
|                           | 3,2x10 <sup>7</sup>  | 10,07       | 8,61-12,68            | 3,57  | 16,33    |
|                           | 1,6x10 <sup>8</sup>  | 4,66        | 3,96-5,41             | 6,70  | 26,97    |

\*TL<sub>50</sub> determina o tempo necessário para matar metade da população de larvas infectadas.

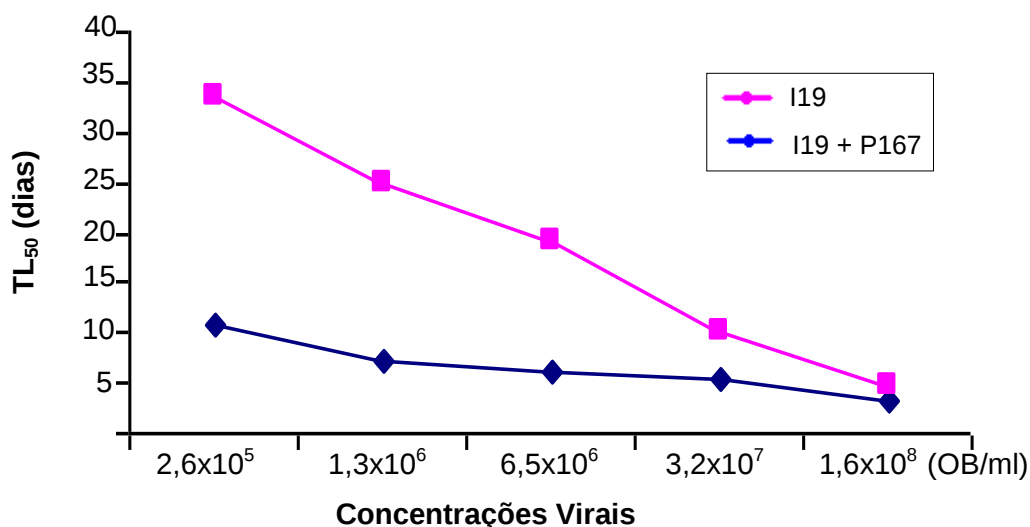


Fig. 5- Efeito do vírus SfMNPV I-19 combinado com branqueador *Blankophor P167* no tempo letal (TL<sub>50</sub>) em bioensaios com lagartas *S. frugiperda*.

Trabalhos descritos anteriormente mostram que substâncias químicas como os branqueadores ópticos podem atuar aumentando a porosidade da membrana peritrófica do intestino médio da lagarta (BRANDT et al., 1978; ELORZA et al., 1983; WANG e GRANADOS, 2000; ZHU et al., 2007). Com base nisso e na análise dos dados obtidos neste trabalho, observa-se que ambos isolados virais foram potencializados com o uso do branqueador *Blankophor P167*. Isso sugere que o branqueador pode ter facilitado a passagem das partículas virais pela membrana peritrófica, resultando num aumento da atividade viral e assim maior mortalidade das larvas.

## Agradecimentos

À Ana Cristina M. M. Gomes pelo processamento do material para microscopia eletrônica (Cenargen) e ao Dr. Bergmann M. Ribeiro pela utilização do microscópio eletrônico (Universidade de Brasília-UnB).

Ao CNPq/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela concessão da Bolsa PIBIC.

## Referências

- BARRETO, M. E.; GUIMARÃES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, Londrina, PR, v. 34, p. 67-75, 2005.
- BLISSARD, G. W.; ROHRMAN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, US, v. 35, p. 127-155, 1990.
- BRANDT, C. R.; ADANG, M. J.; SPENCE, K. D. The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 32, p. 12-24, 1978.
- CHAPMAN, J. W.; WILLIAMS, T.; ESCRIBANO, A.; CABALLERO, B.; CAVE, R. D.; GOULSON, D. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. **Ecological Entomology**, London, GB, v. 24, p. 268-275, 1999.
- DOUGHERTY, E. M.; NARANG, N.; LOEB, M.; LYNN, D. E.; SHAPIRO, M. Fluorescent brightener inhibits apoptosis in baculovirus-infected gypsy moth larval midgut cells *in vitro*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, GB, v. 16, p. 157-168, 2006.
- ELORZA, M. V.; RICO, H.; SENTANDREU, R. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. **Journal of General Microbiology**, London, GB, v. 129, p. 1577-1582, 1983.

ENGELHARD, E. K.; KAM-MORGAN, L. N. W.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, US, v. 1, p. 3224-3227, 1994.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K. A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 1, p. 89-108.

HORTON, M. H.; BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 67, p. 1860-1868, 1993.

IGNOFFO, C. M.; HOSTTETER, D. L.; SIKOROWSKI, P. P.; SUTTER, G.; BROOKS, W. M. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology**, College Park, US, v. 6, p. 441-445, 1977.

MARTÍNEZ, A. M.; SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, NL, v. 109, p. 139-146, 2003.

MCGUIRE, M. R.; TAMEZ-GUERRA, P.; BEHLE, R. W.; STREETT, D. A. Comparative field stability of selected entomopathogenic virus formulations. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 94, p. 1037-1044, 2001.

OKUNO, S.; TAKATSUKA, J.; NAKAI, M.; OTOTAKE, S.; MASUI, A.; KUNIMI, Y. Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, Orlando, US, v. 26, p. 146-152, 2003.

SHAPIRO, M. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 85, p. 1682-1686, 1992.

SHAPIRO, M.; FARRAR JUNIOR, R. R. Fluorescent brighteners affect feeding rates of the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) and act as enhancers and sunlight protectants for its nucleopolyhedrovirus. **Journal of Entomological Science**, Tifton, US, v. 38, p. 286-299, 2003.

SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J. L. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculoviruses activity by optical brighteners. **Journal of Entomological Science**, Tifton, US, v. 85, p. 1120-1124, 1992.

TAMEZ-GUERRA, P.; MCGUIRE, M. R.; BEHLE, R. W.; HAMM, J. J.; SUMNER, H. R.; SHASHA, B. S. Sunlight persistence and rainfastness of spray-died formulations of baculoviruses isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 93, p. 210-218, 2000.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; JEHLE, J. A.; O'REILLY, D. R.; ROHRMANN, G. F.; THIEM, S.; VLAK, J. M. *Baculoviridae*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 177-185. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, BG, v. 30, p. 135-143, 2000.

WOLFF, J. L. C.; VALICENTE, F. H.; MARTINS, R.; OLIVEIRA, J. V.; ZANOTTO, P. M. A. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 89, p. 2102-1211, 2008.

ZHU, R.; LIU, K.; PENG, J.; YANG, H.; HONG, H. Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Pest Management Science**, Sussex, GB, v. 63, p. 296-300, 2007.