

Processo de Produção Comercial de Baculovírus em Grande Escala

Os problemas fitossanitários são um entrave para a produção de alimentos no mundo, com elevada participação dos insetos-praga cujas perdas estão em torno de 28%. No Brasil, as perdas chegam a 30% da produção com um prejuízo de 2,2 bilhões de dólares para a atividade. Situação semelhante ocorre no milho, onde um complexo de insetos-praga pode limitar o rendimento da cultura. Dentre esses, a lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), ocupa uma posição de destaque com status de praga-chave no Brasil, causando perdas médias anuais de 25%. Em condições de altas densidades populacionais, essa espécie pode causar perdas severas de 70% na produção, principalmente quando a cultura é implantada em épocas favoráveis ao aparecimento deste inseto.

Para resolver esta situação, o principal método de controle utilizado baseia-se na utilização de inseticidas organossintéticos com pulverizações sistemáticas que obedecem a um calendário de aplicações. O uso indiscriminado desse método tem sido constantemente relatado na cultura do milho, chegando a 14 pulverizações por cultivo (observação pessoal) onde são gastos anualmente milhões de reais para o controle dessa praga.

A preferência do uso do controle químico deve-se à facilidade de adoção pelo agricultor, por ser um método efetivo e com resultados mais rápidos. Atualmente, devido a relatos de casos de resistência dos insetos aos inseticidas químicos, e impactos em organismos benéficos, falhas no controle de pragas têm sido constantes, o que compromete a produtividade e eleva os custos de produção. Por outro lado, a preocupação com a segurança alimentar e a contaminação do ambiente tem levado o consumidor a preferir alimentos cada vez mais seguros. Portanto, tem-se buscado alternativas de controle eficientes, de fácil adoção, compatíveis com outros métodos de controle, específicos para a praga-alvo, com menor risco de contaminação dos alimentos, de rios e nascentes, do aplicador e do ambiente.

Uma alternativa viável para alcançar esses objetivos é o uso do controle biológico para a lagarta-do-cartucho, dentro do contexto do Manejo Integrado de Pragas (MIP). Naturalmente, no campo são encontrados vários agentes, e dentre estes podemos citar os parasitóides, predadores e entomopatógenos. Alguns desses agentes são eficientes no controle da lagarta e podem ser utilizados em programas de controle biológico em grande escala.

Levantamentos realizados pela Embrapa Milho e Sorgo identificaram diversos agentes de controle biológico pertencentes às ordens de insetos dípteras e hymenoptera, bem como agentes entomopatogênicos. Dentre os agentes entomopatogênicos, o Baculovírus é um dos mais estudados. Esse grupo é composto por uma fita dupla de DNA e pertence à família Baculoviridae. A infecção do inseto ocorre por ingestão dos poliedros virais (Figura 1) e a penetração ocorre nas células epiteliais do intestino médio. Os nucleocapsídeos são transportados para o núcleo das células, logo após a penetração, liberando o

**Sete Lagoas, MG
Setembro, 2010**

Autores

Fernando Hercos Valicente
Eng.-Agrônomo, Doutor em Entomologia-Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, valicent@cnpms.embrapa.br

Edmar de S. Tuelher
Eng.-Agrônomo, Mestre em Entomologia, Pesquisador Associado da Du Pont do Brasil S.A. Divisão Pioneer Sementes, tuelher@pioneer.com

Emerson Cristi de Barros
Doutorando em Fitotecnia, bolsista FAPEMIG, emersoncristi@gmail.com

seu DNA e iniciando o processo de replicação viral. Nos estágios finais da infecção na lagarta, ocorre a ruptura das células, seguida da morte do inseto e liquefação dos tecidos.

Foto: Elliot W. Kitajima

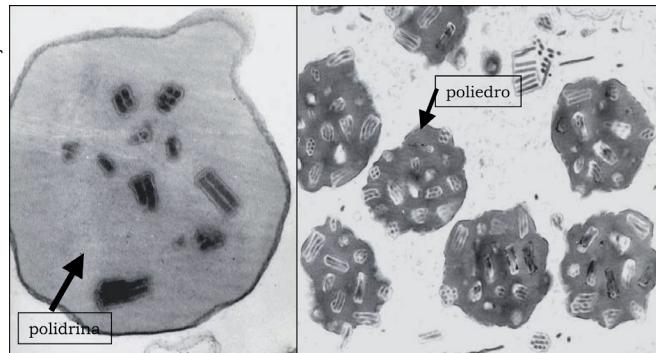


Figura 1. Micrografia eletrônica de tecido de *S. frugiperda* infectada por Baculovírus: infecção por um isolado de nucleopoliedrovírus (MVPN), podendo-se observar a polidrina (A) (proteína do MVPN) e os poliedros do baculovírus (B).

A seleção de um agente de controle biológico para que possa ser usado comercialmente é baseada na sua capacidade de reprodução em grande escala, custos de produção, e na sua eficiência em relação a outros métodos de controle.

Hoje na Embrapa Milho e Sorgo, o banco de baculovírus conta com 22 isolados que já foram estudados, caracterizados e sua eficiência avaliada para o controle da lagarta-do-cartucho. Dentre estes, os isolados I-18, I-19 e o I-6NR são nucleopoliedrovírus de *S. frugiperda* (SFMNPV) também chamados de *Baculovirus spodoptera* (e apresentam as melhores características, como a compatibilidade com outros agentes de controle, e eficiência de controle, podendo ser produzido comercialmente em grande escala). Neste processo de produção, o foco será o isolado 6-NR pelo fato de que este isolado não causa a liquefação do tegumento do inseto imediatamente após a sua morte. Esta característica facilita a coleta de lagartas mortas para posterior processamento e formulação. Por outro lado, os isolados I-18 e I-19 são muito eficientes, porém causam o rompimento do tegumento do inseto. Este fator ocasiona um aumento da mão de obra no sistema de produção em larga escala.

Nesse sentido, muitos avanços tecnológicos foram obtidos, visando diminuir os custos e aumentar a sua competitividade com outros métodos de controle. Assim, atualmente é possível produzir doses de *Baculovirus spodoptera* em escala comercial a um custo mais baixo.

Processo de Produção em Grande Escala de *Baculovirus spodoptera*

Para que o processo de produção em larga escala tenha sucesso, alguns fatores importantes devem ser observados. De um modo geral a produção do baculovírus pode ser dividida em três etapas ou fases:

1. Criação massal do hospedeiro sadio: lagarta-do-cartucho;
2. Infecção do hospedeiro sadio com o agente de controle biológico;
3. Coleta e armazenamento do hospedeiro infectado após a morte.

Criação Massal do Hospedeiro Sadio

A produção massal do hospedeiro alternativo é realizada artificialmente em salas de criações aclimatizadas, em condições assépticas e controladas. Para garantir a assepsia, é necessário que a sala de criação do hospedeiro sadio fique separada fisicamente do local onde se faz a infecção, a coleta e o armazenamento do hospedeiro infectado. Todo o material usado nesta sala deve ser esterilizado, e permanecer somente nesta sala. A separação da criação artificial é um cuidado muito importante no processo de produção das lagartas, pois evita a contaminação indesejada dos insetos sadios e da colônia. No caso de contaminação da colônia, esta deve ser reiniciada com lagartas sadias. Se os devidos cuidados não forem tomados, o rendimento nesta etapa fica comprometido.

As condições climáticas dentro da sala de criação do hospedeiro devem ser controladas e monitoradas para que haja uniformidade de tamanho e peso do hospedeiro sadio antes da infecção. Dentre estes fatores, a temperatura é um dos fatores mais importantes durante todo o processo de produção do hospedeiro. A temperatura ideal para a criação da lagarta-do-cartucho é de 25°C. Esta temperatura

é a ideal para o crescimento das larvas a serem infectadas com o *Baculovírus*, o que ocorre aos sete dias de idade. Para a manutenção desta temperatura, dentro da sala de criação deverão ser usados condicionadores de ar com controle de temperatura quente/frio e circuladores de ar. Os circuladores de ar facilitam a homogeneização dentro do ambiente, pois a temperatura na parte superior da sala é sempre maior que na parte inferior. Ao mesmo tempo, há o monitoramento diário da temperatura com termômetros digitais. A uniformidade das lagartas a serem infectadas é importante para que a mortalidade delas ocorra no mesmo dia. Isto facilita o manejo e o uso tanto das salas de criação como das de infecção. A umidade relativa do ar deve ser mantida em torno de $70 \pm 10\%$ para que não haja ressecamento da epiderme dos insetos, e mesmo a proliferação de contaminantes no recinto. Na multiplicação do hospedeiro sadio são utilizados: gaiolas feitas de PVC, potes plásticos, suportes de isopor com encaixe para recipientes plásticos de 50 ml (copos descartáveis de café), bandejas de alumínio e dieta artificial.

As gaiolas são utilizadas para a oviposição dos adultos (mariposas) da lagarta-do-cartucho. As gaiolas devem ser mantidas em locais ventilados, e com folhas de papel dependuradas reutilizando folhas tamanho A4(), para que haja maior número de posturas e menor mortalidade dos adultos. Os adultos podem ser alimentados com um mistura de água, mel e ácido ascórbico (10%). Os adultos se acasalam e colocam os ovos nas folhas de papel dependuradas. Todas as posturas são recortadas e cada postura é colocada individualmente dentro de um recipiente plástico de 50 ml contendo dieta artificial. Deve ser considerado o canibalismo existente entre os indivíduos do hospedeiro após o sétimo dia de idade. Nesse momento, é necessário que se faça a repicagem das larvas ou o chamado processo de individualização. Nesse processo, as lagartas são transferidas uma a uma para um recipiente plástico contendo aproximadamente 5g de dieta artificial. Esta quantidade de dieta é suficiente para o crescimento das lagartas até a fase de pupa. A partir da fase de pupa, o ciclo reinicia-se com os adultos.

Uso de hospedeiro alternativo: A criação segue os mesmos padrões da criação da *S. frugiperda*,

porém, as lagartas não precisam ser individualizadas aos sete dias de idade porque não são canibais. Neste caso, as lagartas podem permanecer juntas antes e após a contaminação com o baculovírus

Infecção do Hospedeiro Sadio com o Agente de Controle Biológico

Uma das partes mais importantes desse processo de produção é a infecção do hospedeiro sadio pelobaculovírus. Neste ponto, o baculovírus pode ser purificado ou não. Mas não se deve usar estoque de baculovírus não purificado em várias gerações de multiplicação. Recomenda-se a purificação do baculovírus a cada 3 ou 4 gerações. A purificação é feita em gradiente de sacarose. Nesse ponto, qualquer falha na infecção, higienização e controle da climatização interna da sala de criação do hospedeiro infectado pode comprometer todo o lote a ser produzido. Os mesmos cuidados com a assepsia e o controle das condições internas do recinto descrito no item 2.1 devem ser usados aqui.

A inoculação pode ser feita de três maneiras diferentes:

- 1- Inoculação do baculovírus em lagartas individualizadas;
- 2- Inoculação do baculovírus em grandes quantidades de lagartas;
- 3- Uso de hospedeiro alternativo.

Inoculação do Baculovírus em Lagartas Individualizadas (Lagartas Canibais)

As lagartas a serem usadas na produção em larga escala devem ter o tamanho e peso uniformes, de preferência com sete dias de idade, para propiciar uma infecção também uniforme e eficiente. Nossos resultados de pesquisa confirmam que as melhores temperaturas para criação da lagarta e posterior infecção com o baculovírus é de $25^{\circ}\text{C} \pm 2\text{C}$. Para uma melhor administração do sistema de produção, é necessário que se faça o controle e o registro de datas, para que se possa monitorar o ponto ideal para a infecção a partir do dia da eclosão das posturas. As posturas também devem permanecer em ambiente com temperatura controlada. Se houver necessidade, dependendo da escala

da biofábrica, as posturas podem permanecer na geladeira (4°C) para postergar a eclosão de larvas. Lagartas cujo ponto ideal de infecção foi monitorado, produzem uma maior quantidade de poliedros/lagarta aumentando o rendimento e diminuindo o custo de produção.

A exposição das lagartas ao baculovírus pode ser feita por 24 ou 48 horas, dependendo da necessidade. A suspensão do bioinseticida é aplicada sobre folhas de milho previamente lavadas com hipoclorito de sódio (0,5%) e depois com água destilada. A concentração do baculovírus utilizado deve ficar entre 2×10^6 e 2×10^7 pol/ml. Se houver necessidade de se usar lagartas mais velhas (com oito dias de idade), recomenda-se aumentar a concentração do biopesticida, para garantir a morte do hospedeiro. Mas mesmo usando lagartas maiores, a temperatura do laboratório de criação e de incubação deve permanecer em 25°C.

Inoculação do Baculovírus em Grandes Quantidades de Lagartas (Lagartas Não Canibais)

Este é outro método recomendado para produção em larga escala, pelo fato de se ter um maior rendimento dentro do processo de produção. As lagartas sadias são infectadas em grupos de 100 a 250 lagartas de uma só vez, e não individualmente. Neste processo, as lagartas sadias são expostas às folhas de milho contaminadas pelo biopesticida como descrito anteriormente, durante 24 horas, em recipientes plásticos maiores (vasilhas plásticas tipo tupperware), e após este período as larvas são individualizadas em recipientes plásticos de 50 ml cada. Neste processo pode-se usar folhas de milho e/ou folhas de mamona previamente desinfetadas, como substrato para a aplicação do baculovirus. Resultados de pesquisa indicam que com a folha de mamona a lagarta desenvolve-se normalmente, torna-se infectada e produz uma quantidade de ???poliedros semelhante à obtida quando alimentada com folhas de milho. A vantagem da folha da mamona é a grande redução no percentual de canibalismo que ocorre entre as lagartas. Após o período de infecção, as lagartas devem ser individualizadas em recipientes plásticos de 50 ml para um maior rendimento. Durante todo este processo, a temperatura deve ser mantida em 25°C.

Uso de Hospedeiro Alternativo

O uso de hospedeiro alternativo para a multiplicação do baculovírus tem como objetivo principal evitar o canibalismo que ocorre com a lagarta-do-cartucho e, consequentemente, evitar a necessidade de individualização de lagartas, que é um processo lento e demorado. Deste modo, espera-se um maior rendimento no processo de produção em larga escala. A escolha deste hospedeiro deve ser cuidadosa. O hospedeiro não pode ser canibal e tem que reproduzir o baculovírus de forma integral. Nossos resultados indicam a *Spodoptera eridania* como um excelente hospedeiro alternativo. Com o uso deste hospedeiro alternativo, inoculam-se entre 50 e 100 lagartas em recipientes plásticos, e elas podem permanecer juntas até a morte.

Os cuidados devem ser os mesmos para evitar contaminação e a temperatura de incubação deve ser mantida a 25°C. Recomenda-se porém que todo o estoque do baculovírus da biofábrica seja multiplicado em lagartas de *S. frugiperda*. Somente uma geração deve ser multiplicada em *S. exigua*. Deste modo, evita-se que o baculovírus adquira especificidade para o hospedeiro alternativo. A produção de baculovírus deve obedecer o esquema da Figura 2, mostrado abaixo:

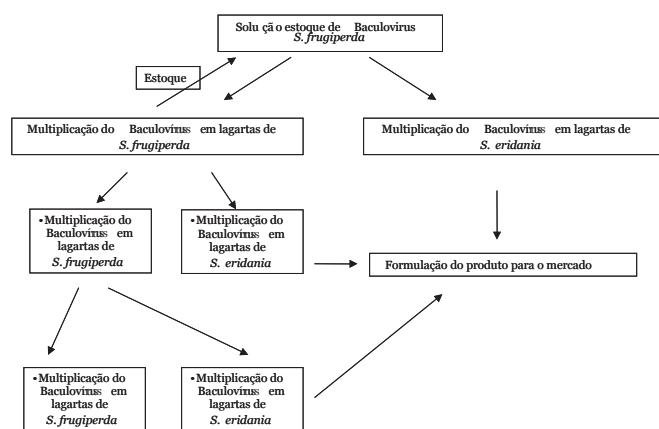


Figura 2. Esquema da multiplicação do *Baculovirus spodoptera* no hospedeiro *Spodoptera frugiperda*, e no hospedeiro alternativo *S. exigua*.

Como pode ser observado pelo esquema acima, todo o baculovírus é multiplicado uma vez no hospedeiro alternativo e deve ir para o processamento, a formulação e disponibilizado no mercado. Uma das grandes vantagens do hospedeiro alternativo é o melhor aproveitamento

do espaço do laboratório, pelo fato de este hospedeiro não ser canibal.

Coleta e Armazenamento do Hospedeiro Infectado Após a Morte

Para a coleta e armazenamento do *B. spodoptera* quando produzido em larga escala, o fator mais limitante é a liquefação do tegumento da lagarta imediatamente após a sua morte (Figura 3A). As larvas mortas se liquefazem, devido ao rompimento do tegumento, fazendo com que todo o líquido interno extravase dificultando a operação de coleta e armazenamento do material.

As pesquisas da Embrapa Milho e Sorgo têm voltado a atenção para um novo isolado que pertence ao seu Banco de Baculovírus. Esse novo isolado foi denominado de I-6, e apresenta uma característica única dentre os baculovírus: não causa o rompimento do tegumento do inseto imediatamente após a sua morte (Figura 3B). Característica essa importante para reduzir a mão de obra e o custo de produção durante processo de coleta do material infectado.

Foto: Fernando Hercos Valicente

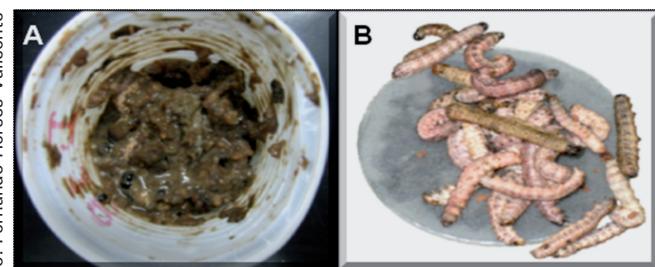


Figura 3. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* mortas por *Baculovirus spodoptera*. A = lagartas mortas com o isolado que rompe o tegumento; B = lagartas infectadas e mortas com o isolado (I-6) que não causa o rompimento imediato do tegumento.

Com o uso do isolado 6, as lagartas mortas com sintomas típicos de baculovírus são coletadas com pinças e acondicionadas em recipientes plásticos. Neste ponto do sistema de produção, as lagartas mortas podem ir para o processamento e a formulação, ou serem congeladas em freezer para posterior processamento. Este fator depende da disponibilidade de tempo, pessoal de apoio e do fluxo de produção da biofábrica. As lagartas mortas infectadas com baculovírus permanecem viáveis por mais de 1 ano quando congeladas a -20°C.

**Circular
Técnica, 157**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br
1^a edição
1^a impressão (2010): on line



Comitê de Publicações Presidente: *Antônio Carlos de Oliveira.*
Secretário-Executivo: *Elena Charlotte Landau.*

Membros: *Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.*

Supervisão editorial: *Adriana Noce.*
Revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros.*

Expediente Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro.*
Tratamento das ilustrações: *Tânia Mara A. Barbosa.*
Editoração eletrônica: *Tânia Mara A. Barbosa.*