

LAURO MORALES CREPALDI

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA ASSOCIAÇÃO DE BRANQUEADORES ÓTICOS AO VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Flávio Moscardi

CURITIBA – PARANÁ

2000

Avaliação dos efeitos biológicos da associação de branqueadores óticos ao vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).

Lauro Morales Crepaldi

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora:



Dr. Flávio Moscardi (Orientador)

Prof. Dr. Alfredo de Oliveira



Prof. Dr. Amarildo Pasini

Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva

Profa. Dra Sonia Maria Noemberg Lázzari

Ao meu pai David Morales, *in memoriam*, e
a minha mãe Maria Crepaldi, que estiveram
sempre ao meu lado,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À direção da EMATER-Paraná, por permitir a realização do Curso.

À Embrapa Soja, pela cessão dos laboratórios, equipamentos e instalações da Empresa.

Ao Dr. Flávio Moscardi pela orientação, ensinamentos e apoio durante todas as fases deste trabalho.

Ao Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, Embrapa Soja, pela ajuda, sugestões e apoio constante.

Aos professores do Curso de Entomologia da UFPR pela orientação e apoio.

À Josiani G. Kastelic, pelo apoio e sugestões no trabalho.

Aos colegas da EMATER-Paraná, em especial ao Engenheiro Agrônomo Fernando Adegas, por assumir parte das minhas tarefas durante a realização do curso.

Aos funcionários da Embrapa Soja, Fabio Paro, Ivanilda L. Soldorio, Jovenil da Silva e Tercilia Maria Zamboni Gelinskas, pela ajuda nos trabalhos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1. Vírus de insetos.....	6
3.2. Família <i>Baculoviridae</i>	7
3.3. Uso de vírus da Família <i>Baculoviridae</i> como inseticida biológico.....	9
3.4. Estratégias para contornar as limitações de baculovírus para o controle de insetos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Material biológico utilizado na pesquisa.....	28
4.2. Branqueadores óticos.....	28
4.3. Multiplicação do VPNMAg.....	29
4.4. Bioensaios.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Efeito da associação de branqueadores óticos na CL ₅₀ do VPNMAg, inoculado em lagartas de 2º instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	36
5.2. Efeito da associação de branqueadores óticos selecionados na CL ₅₀ do VPNMAg, inoculado em lagartas de 2º instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	37
5.3. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg, no tempo médio de mortalidade de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , inoculadas no 2º instar.....	41

5.4. Efeito da associação de branqueadores óticos na CL ₅₀ do VPNMAg, inoculado em lagartas de 4º instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	43
5.5. Efeito da associação de Tinopal DMS ao VPNMAg, aplicado em plantas de soja, na mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	45
5.6. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg, inoculado em lagartas de 2º instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao vírus.....	47
5.7. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg, inoculado em lagartas de 3º instar de <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
5.8. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg, inoculado em lagartas de 3º instar de <i>Rachiplusia nu</i>	50
5.9. Efeito da associação de Tinopal DMS ao VPNMAg exposto à radiação ultravioleta em três períodos.....	53
5.10. Efeito da associação de Tinopal DMS ao VPNMAg exposto à radiação ultravioleta por 90 Minutos.....	54
5.11. Preferência alimentar em dieta artificial contendo branqueadores óticos para lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	56
5.12. Peso de pupas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentadas em dieta contendo branqueadores óticos.....	57
5.13. Formulação do VPNMAg com Tinopal DMS em substituição ao caulim.....	58
5.14. Quantificação de corpos poliédricos de inclusão em Lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> mortas pelo VPNMAg associado ao Tinopal DMS.....	60
6. CONCLUSÕES.....	63
7. LITERATURA CITADA.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de branqueadores óticos, na concentração de 0,5 %, associados ao vírus de poliedrose nuclear de <i>Anticarsia gemmatalis</i> e inoculado em lagartas do 2º ínstar	37
Tabela 2. Efeito de branqueadores óticos, nas concentrações de 0,1 %, 0,25 % e 0,5 %, associados ao VPNMAg e inoculado em lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> de 2º ínstar.....	40
Tabela 3. Efeito de branqueadores óticos no tempo médio de mortalidade (TM) de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , provocada por seu VPN (1,0 × 10 ⁴ CPI/ml) inoculado em larvas do 2º ínstar.....	42
Tabela 4. Efeito de branqueadores óticos, na concentração de 0,5 %, associados ao vírus de poliedrose nuclear de <i>Anticarsia gemmatalis</i> e inoculado em lagartas do 4º ínstar.....	44
Tabela 5. Efeito de branqueadores óticos selecionados na atividade do VPNMAg em lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> resistentes ao vírus.....	48
Tabela 6. Mortalidade (%) de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , inoculadas no 3º ínstar, provocada pelo VPNMAg associado aos branqueadores óticos selecionados na concentração de 0,5 %.....	49
Tabela 7. Efeito de branqueadores óticos, na concentração de 0,5 %, associados ao VPNMAg e inoculados em lagartas de 3º ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i>	50
Tabela 8. Mortalidade (%) de lagartas de <i>Rachiplusia nu</i> , inoculadas no 3º ínstar, provocada pelo VPNMAg associado aos branqueadores óticos selecionados na concentração de 0,5 %.....	51

Tabela 9. Efeito de branqueadores óticos na concentração de 0,5 %, associados ao VPNMAG e inoculado em lagartas de 3º ínstar de <i>Rachiplusia nu</i>	51
Tabela 10. Mortalidade (%) de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> por seu VPNMAG associado ao Tinopal DMS a 0,5 % e exposto à radiação ultravioleta durante três períodos.....	53
Tabela 11. Mortalidade (%) de lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> por seu VPNMAG associado a branqueadores óticos a 0,5 % e exposto à radiação ultravioleta durante 90 minutos.....	54
Tabela 12. Atividade original remanescente (AOR) do VPN de <i>Anticarsia gemmatalis</i> ($1,0 \times 10^5$ CPI/ml), depois de exposto à luz ultravioleta por 90 minutos, utilizando branqueadores óticos na concentração de 0,5 % como protetores contra a radiação UV.....	55
Tabela 13. Efeito de branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico, utilizados a 0,5 %, na preferência alimentar observada em lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , durante oito períodos.....	57
Tabela 14. Peso de pupas ($X \pm EP$) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , formadas por lagartas alimentadas em dieta artificial contendo branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico a 0,5 %.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito na concentração letal (CL) do VPNMAg, em lagartas de 2º instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , associado a quatro branqueadores óticos em três concentrações...	38
Figura 2. Mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i> pelo VPNMAg associado ao Tinopal DMS, aplicado em plantas de soja em casa de vegetação.....	46
Figura 3. Concentração letal (CL) do VPNMAg, em lagartas de 2º instar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , purificado, formulado em caulim ou formulado em Tinopal DMS.....	59
Figura 4. Número de corpos poliédricos de inclusão (CPI) produzidos em lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> mortas por seu VPNMAg e por VPNMAg + Tinopal DMS.....	60

RESUMO

As investigações com substâncias associadas aos vírus de insetos, principalmente do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, como estratégia para diminuir o tempo de mortalidade ou para contornar possíveis problemas de resistências incluem, entre outras, os branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico. Esses produtos, utilizados ordinariamente em fábricas de sabão, detergentes, tintas e como branqueadores de fibras em geral, são utilizados, também, em técnicas biológicas envolvendo microorganismos. Recentemente, foi demonstrado o potencial desses branqueadores como protetores dos vírus de insetos contra a radiação ultravioleta (UV), bem como, o aumento da eficiência de alguns vírus utilizados como inseticidas microbianos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito biológico da associação de branqueadores óticos, disponíveis no mercado brasileiro, ao vírus de poliedrose nuclear (VPN) de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (VPNMAg), e verificar a eficiência dessa associação nos hospedeiros, *Spodoptera frugiperda* (Smith) e *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae).

Inicialmente, foram avaliados onze branqueadores óticos na concentração de 0,5 % associados ao VPNMAg, em concentrações variando entre 10 corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml e $1,0 \times 10^7$ CPI/ml, verificando tanto o efeito na mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* quanto na proteção do vírus exposto durante 90 minutos à radiação UV.

Dos branqueadores óticos usados, quatro que potencializaram o efeito do VPNMAg, todos derivados do ácido stilbene disulfônico (Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Leukophor DUB e BRY 10 D2 100), foram selecionados e avaliados em lagartas de *A. gemmatalis* suscetíveis e resistentes ao VPN e nos hospedeiros alternativos *S. frugiperda* e *R. nu*. Foram avaliados, ainda: o efeito do branqueador Tinopal DMS no número de corpos poliédricos de inclusão formados em *A. gemmatalis*, o efeito dos branqueadores óticos na preferência alimentar de *A. gemmatalis*, o peso das pupas formadas em dieta contendo branqueadores óticos e a implicação do Tinopal DMS na formulação do vírus de *A. gemmatalis* em substituição ao caulim, utilizado como material inerte na formulação desse vírus.

A adição de Tinopal UNPA-GX a 0,5 % ao VPNMAg reduziu a concentração letal média (CL_{50}) do vírus de *A. gemmatalis* de 7.811,3 CPI/ml para 53,9 CPI/ml, quando aplicado em lagartas do 2º instar, *i.e.*, uma redução de 144,8 vezes; e reduziu a CL_{50} do VPN em 356,0 vezes em lagartas de 4º instar de *A. gemmatalis*. Entretanto, o maior efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg foi observado com lagartas resistentes ao vírus. Nesses insetos, a redução na CL_{50} foi de 61.667 vezes com o VPN associado ao Tinopal UNPA-GX a 0,5 %. Resultados similares foram observados com Tinopal DMS (37.000 vezes), BRY 10 D2

100 (60.656 vezes) e Leukophor DUB (10.000 vezes). Em todos os ensaios, a mortalidade dos insetos foi concentração-dependente. Na aplicação do VPNMAg, associado ao Tinopal DMS a 0,1 %, em plantas de soja, os resultados demonstraram que $3,0 \times 10^{10}$ CPI/ha, aproximadamente $1/5$ da dose utilizada para o controle de *A. gemmatalis*, a mortalidade aumentou de 16,5 % para 95 %.

O tempo médio para ocorrer a mortalidade, ou tempo de mortalidade, (TM), avaliado com lagartas de *A. gemmatalis* inoculadas no 2º instar, foi reduzido em 27,1 % com o VPNMAg na concentração de $1,0 \times 10^4$ CPI/ml e associado ao branqueador Tinopal UNPA-GX a 0,5 %. Todos os branqueadores selecionados reduziram o TM na concentração de 0,5 %; na menor concentração dos branqueadores (0,1 %) apenas o Tinopal DMS diminuiu significativamente o TM.

A associação dos branqueadores óticos ao VPNMAg aumentou a mortalidade de *S. frugiperda* e *R. nu*. O VPNMAg, na concentração de $1,0 \times 10^5$ CPI/ml, causou mortalidade de 17,1 % em *R. nu* e de 86,4 % quando associado ao Tinopal UNPA-GX. Nessa mesma concentração, o VPNMAg não foi infectivo a *S. frugiperda*, mesmo associado aos branqueadores. Porém, na concentração de $1,0 \times 10^7$ CPI/ml, a mortalidade de *S. frugiperda* foi de 3,8 % e quando associado ao Tinopal UNPA-GX a mortalidade foi de 87,1 %.

A exposição do VPNMAg à radiação ultravioleta, durante 90 minutos, reduziu a mortalidade de *A. gemmatalis* de 78,9 %, para 29,7 %. A mesma suspensão viral adicionada de alguns branqueadores óticos, e exposta à radiação UV, manteve o mesmo nível de mortalidade dos insetos após a exposição, variando entre 86,8 % com Leukophor DUB e 97,8 % com BRY 190 D2 100 e Tinopal UNPA-GX.

Os testes de livre escolha demonstraram que a presença de branqueador na superfície do alimento provoca deterrência alimentar e o peso das pupas, formadas a partir de lagartas alimentadas em dieta contendo branqueador ótico na superfície, foi significativamente menor para o Tinopal UNPA-GX.

Não houve diferença na mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* quando o caulim, utilizado como material inerte nas formulações do VPNMAg, foi substituído pelo Tinopal DMS, porém, a dispersão do produto na água ocorreu mais facilmente com o vírus formulado com o branqueador.

Os branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico são substâncias, que do ponto de vista prático, apresentam grande potencial para serem associadas ao sistema VPNMAg-*A. gemmatalis* por diminuir a CL_{50} do VPN e o tempo de mortalidade do inseto hospedeiro.

Além disso, a associação de branqueadores óticos ao VPNMAg pode permitir o controle de lagartas de *A. gemmatilis* altamente resistentes ao seu VPN, bem como aumentar o espectro de seus hospedeiros. Os branqueadores apresentam, também, grande potencial como material inerte nas formulações comerciais dos vírus de insetos.

ABSTRACT

Several substances have been associated with insect viruses, mainly *Nucleopolyhedrovirus*, as a strategy to reduce time to kill the hosts or to counteract resistance, including the optical brighteners stilbene disulfonic acid derivatives. Optical brighteners are widely used in detergent, paper, dyes, plastic and organic coating industries and as a fluorochrome for microorganisms. Recently, the effects of brighteners to protect *Nucleopolyhedrovirus* against ultraviolet light, as well as to enhance some insect viruses efficacy were reported. The objectives of the current study were to evaluate the biological effects of *Anticarsia gemmatalis* Hübner nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV) in combination with optical brighteners available in the Brazilian market and to verify their efficacy against the alternate hosts *Spodoptera frugiperda* (Smith) and *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae).

A preliminary test was carried out with eleven optical brighteners at 0.5 % concentration (wt./vol. or vol./vol.) to evaluate the effect on *A. gemmatalis* mortality, as well as the effect of virus protection against the UV light, when the virus suspension was exposed to a germicidal lamp for 90 minutes. Four optical brighteners, among those that showed enhancement of AgMNPV, all stilbene disulfonic acid derivatives (Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Leukophor DUB and BRY 10 D2 100), were selected and evaluated in both susceptible and resistant *A. gemmatalis* insects, and in the alternative hosts *S. frugiperda* and *R. nu*. The following aspects were also evaluated: the number of polyhedral inclusion bodies (PIB) formed in *A. gemmatalis* caterpillars when Tinopal DMS was added to the AgMNPV; the effect of brighteners on *A. gemmatalis* feeding preference; the weight of pupae reared in diet that comprised the optical brighteners; and the effect of Tinopal DMS in the virus formulation substituting kaolin as an inert material.

The addition of Tinopal UNPA-GX at a 0.5 % concentration to AgMNPV reduced the mean lethal concentration (LC₅₀) from 7,811.3 PIB/ml to 53.9 PIB/ml, when applied against 2nd-instar *A. gemmatalis* caterpillars, *i. e.*, a LC₅₀ reduction of 144.8-fold. For 4th-instar *A. gemmatalis* caterpillars the LC₅₀ was reduced from 54,505.9 PIB/ml to 153.1 PIB/ml (356.0-fold). However, among selected brighteners, the relative increase in activity was much higher in the resistant insects than in the susceptible ones. In the former group, addition of 0.5 % Tinopal UNPA-GX to AgMNPV decreased the LC₅₀ values from $3,7 \times 10^7$ PIB/ml to $6,0 \times 10^2$ PIB/ml (*i.e.*, a reduction of 61,666-fold). Similar results were observed with Tinopal DMS (37,000-fold), BRY 10 D2 100 (60,655-fold), and Leukophor DUB (10,000-fold). The effect of brighteners as an activity enhancer was concentration dependent. When Tinopal DMS was added to AgMNPV

suspension, and applied to soybean plants at 3.0×10^{10} PIB/ha (approximately $1/5$ of the recommended dosage to control *A. gemmatalis*), the mortality was enhanced from 16.5 % to 95 %.

The mean time of mortality (TM) estimated for 2nd-instar *A. gemmatalis* larvae was reduced by ≈ 27 % when Tinopal UNPA-GX was added to the AgMNPV at 1.0×10^4 PIB/ml. All selected optical brighteners at a 0.5 % concentration reduced the TM; however, for the lowest optical brightener concentration (0.1 %), only Tinopal DMS reduced significantly the TM.

The addition of 0.5 % optical brighteners to AgMNPV enhanced the mortality in the alternative hosts *S. frugiperda* and *R. nu*. The mortality of *R. nu* by AgMNPV alone at 1.0×10^5 PIB/ml was 17.1 %. When the virus was associated with Tinopal UNPA-GX, the mortality of *R. nu* larvae was 86.4 %. In the same concentration the AgMNPV did not cause *S. frugiperda* mortality even associated with optical brighteners. However, at the 1.0×10^7 PIB/ml AgMNPV concentration, the mortality of *S. frugiperda* was 3.8 % by the virus alone, compared to 87.1 % when the virus was added to Tinopal UNPA-GX.

Ultraviolet light (UV) radiation for 90 minutes reduced NPV-caused mortality of *A. gemmatalis* from 78.9 % to 29.7 %. The same viral suspension when associated to selected brighteners (Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Leukophor DUB, BRY 10 D2 100 e BRY 10 D2 150), and exposed to UV radiation, kept high levels of insect mortality, ranging from 86.8 % with Leukophor DUB to 97.8 % with BRY 10 D2 100 and Tinopal UNPA-GX.

Free choice tests showed that the presence of optical brighteners onto the diet surface caused alimentary deterrence. However, apparently, this effect is more related to the texture of the diet than to its nutritional quality. The weight of pupae reared on diet with Tinopal UNPA-GX associated with AgMNPV was significantly lower than those reared on diet without optical brighteners. Like in the free choice tests, the texture of the diet surface might have been responsible for the lower insect development.

There was no difference in the mortality of *A. gemmatalis* caterpillars when kaolin was replaced by Tinopal DMS as the inert material in the AgMNPV formulation. However, the dispersion in water was better with the brighteners than the original formulation.

The results of the present work allowed to conclude that optical brighteners stilbene disulfonic acid derivatives are substances that show a great potential to be associated in AgMNPV-*A. gemmatalis* system, because they reduce the LC_{50} of the virus and its time to kill the host. In addition, the association of AgMNPV to the optical brighteners permits the control of highly resistant *A. gemmatalis* larvae, as well as enhances the mortality of alternative hosts.

The optical brighteners also show a great potential as an inert material in commercial formulation of insect viruses.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, paralelamente à identificação e o conhecimento relacionado às viroses de insetos, têm sido, também, desenvolvidos esforços para aumentar a eficácia destes patógenos como inseticidas microbianos. A família *Baculoviridae*, constituída atualmente de dois gêneros, *Nucleopolyhedrovirus*, que compreende os vírus de poliedrose nuclear (VPN) e *Granulovirus* que compreende os vírus de granulose (VG), é a que tem sido mais considerada quanto ao desenvolvimento de inseticidas virais para o controle de insetos (Moscardi, 1999). Esses vírus, restritos aos invertebrados, oferecem grande potencial como alternativa aos inseticidas químicos por apresentarem alta virulência aos hospedeiros, e segurança aos usuários e ao meio ambiente (Smith, 1976; Alves, 1986; Huber, 1986; Young, 1989; Kunimi *et al.*, 1996; Alves *et al.*, 1998; Moscardi, 1999).

Esse esforço se deve, entre outras razões, a algumas características intrínsecas e dificultadoras – enquanto inseticidas microbianos – destes organismos na sua relação com o hospedeiro, bem como, à forma como são utilizados para o controle de insetos-pragas, tanto em ecossistemas agrícolas como florestais. Assim, a utilização dos vírus de insetos em programas de manejo integrado de pragas (MIP) tem sido, ainda, restrita a algumas espécies (Shapiro & Robertson, 1992; Shapiro & Dougherty, 1994; Kunimi *et al.*, 1996). Na agricultura brasileira, são efetivamente utilizados os VPNs da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (VPNMAg) e da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (VPNMSf) (Lepidoptera: Noctuidae) e o VG do mandarová-da-mandioca, *Erinnyis ello* (L.) (VGEe) (Lepidoptera: Sphingidae). Entretanto, de forma extensiva, apenas o vírus da lagarta-da-soja, que vem sendo utilizado anualmente em mais de um milhão de hectares (Moscardi, 1999).

Dentre as características que dificultam a utilização ordinária dos vírus de insetos nos programas de MIP, sua ação relativamente lenta tem sido a grande limitação, exigindo, entre outros cuidados, o acompanhamento sistemático da população do inseto alvo. Este fator é o que mais tem contribuído para a associação do VPNMAg com doses reduzidas de inseticidas químicos (Morales, 1998). A especificidade – outra característica intrínseca dos baculovírus – embora seja uma qualidade desejada nos produtos utilizados em determinados programas de MIP, dificulta o sistema de controle quando ocorre mais de uma espécie no mesmo período e, ainda, inibe a ação da iniciativa privada no desenvolvimento de produtos, a custos compatíveis, à base desses patógenos. Outro fator importante é a desativação por raios ultravioletas (UV) (Jaques, 1968; Ignoffo, 1992), comprometendo o período ativo do vírus, quando aplicado em campo. Outros aspectos, como a época ideal de aplicação, o tipo de formulação, a dinâmica da população

da praga, as condições de tempo, a dificuldade de produção e armazenamento em escala comercial, também limitam a utilização desses inseticidas microbianos. Dessa forma, apenas alguns programas utilizam, de forma extensiva, esses agentes de controle de pragas, não obstante tenha ocorrido, ao longo dos últimos anos, a identificação e o registro comercial de muitos vírus de insetos, em vários países (Moscardi, 1999).

Além disso, são observadas variações significantes na habilidade dos insetos em resposta aos principais grupos de patógenos, sendo que a pressão de seleção pode proporcionar mudanças crescentes nestas respostas (Burgess, 1971; Briese, 1986). Em várias espécies de insetos têm sido selecionadas populações resistentes aos vírus (Briese, 1981, Fuxa, 1993, Abot *et al.*, 1996). Martignoni (1957) relatou um aumento na concentração letal média (CL_{50}) para o VG de *Eucosma griseana* (Hübner) (VGEg) (Lepidoptera: Tortricidae) após uma epizootia desse patógeno. Com *S. frugiperda*, também foi observado em campo lagartas no final da estação apresentando menor susceptibilidade ao VPN do que a população no início da estação (Fuxa *et al.*, 1988). Em laboratório, uma colônia de *A. gemmatalis* submetida à pressão seletiva desenvolveu alta resistência ao seu VPN (Abot *et al.*, 1996). Embora a ocorrência de resistência a vírus deva ser considerada, não há relatos de insetos resistentes a baculovírus onde esse patógeno é utilizado como inseticida microbiano (Fuxa, 1993).

Devido às características dos VPNs, têm ocorrido esforços para aumentar sua eficácia, tanto por meio da associação com produtos que possam aumentar ou potencializar sua virulência (Yadawa, 1971; Bell & Kanavel, 1975; Shapiro & Bell, 1982; Young & Yearian, 1986; Shapiro *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 1997), quanto pela seleção de biótipos mais virulentos – naturais ou por meio de passagens seriadas em hospedeiros alternativos (Smirnoff, 1963; Shapiro & Ignoffo, 1970; Wood *et al.*, 1981; Morales, 1991; Morales & Moscardi, 1993a; Grewal *et al.*, 1998) – ou, ainda, mais recentemente, pela engenharia genética dos baculovírus (McCutchen *et al.*, 1991; Bonning & Hammock, 1992; 1996; Kunimi *et al.*, 1996; Ignoffo & Garcia, 1997; Hammock, 1998).

As investigações com substâncias associadas aos vírus de insetos, como estratégia para contornar as dificuldades de uso dos baculovírus como inseticidas microbianos incluem: os próprios inseticidas químicos (Ignoffo & Montoya, 1966; Jaques & Morris, 1981; Harper, 1986; Silva, 1992; Moscardi, 1999); o ácido bórico (Shapiro & Bell, 1982; Bijjur *et al.*, 1991; Chaudhari, 1992; Morales *et al.*, 1997); a quitinase (Shapiro *et al.*, 1987); a azadiractina, normalmente associada a deterrência alimentar e encontrada em plantas de “neem” (*Azadirachta indica*) e de cinamomo (*Melia azedarach*) (Shapiro *et al.*, 1994); a “enhancina” – proteína associada aos VGs de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (VGpu) (Tanada, 1985) e *Trichoplusia ni*

Hübner (VGTn) (Lepidoptera: Noctuidae) (Derksen & Granados, 1988; Gallo *et al.*, 1991) –; os açúcares e os óleos vegetais (soja, milho e algodão) como fagoestimulantes, para maior consumo do patógeno (Andrews *et al.*, 1975; Smith *et al.*, 1982; Luttrell *et al.*, 1983; Alves *et al.*, 1992) e, mais recentemente, os branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico (Martignoni & Iwai, 1985; Shapiro, 1992; Vail *et al.*, 1993; Fuxa & Richter, 1998).

Os branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico são substâncias orgânicas conhecidas desde a década de 1930 e utilizadas como clareadores para algodão; atualmente são usados, ordinariamente, nas indústrias de detergentes, papel, plásticos, fibras e tintas (Lanter, 1966). Além disso, Darken (1962) relatou a utilização dessas substâncias em técnicas biológicas, demonstrando que os branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico passavam através da parede celular de algumas bactérias, agindo como marcadores.

Martignoni & Iwai (1985) fizeram o primeiro relato do efeito de um branqueador ótico como protetor da radiação UV para o vírus de *Orgyia pseudotsugata* (McDunnough) (VGO_p) (Lepidoptera: Lymantriidae). Em estudos posteriores envolvendo protetores contra a luz UV para o vírus de *Lymantria dispar* (L.) (VPNMLd) (Lepidoptera: Lymantriidae), Shapiro (1992) relatou que oito branqueadores óticos, de 23 avaliados, proporcionaram total proteção ao VPN, confirmando, dessa forma, o potencial dessas substâncias para uso associado aos vírus de insetos. Segundo Villame (1958), os branqueadores óticos são capazes de absorver a energia da luz UV e transformá-la em luz visível e Shapiro & Argauer (1995) relataram que estes compostos absorvem rapidamente a luz UV e emitem luz na porção azul do espectro visível. Com a absorção da radiação A-UV e B-UV, eles proporcionam, para alguns microorganismos, proteção contra os efeitos da radiação UV

Os branqueadores óticos descritos por Martignoni & Iwai (1985) e por Shapiro (1992), além de proteger o VPN da ação dos raios UV, demonstraram, também, aumentar a atividade viral. Os trabalhos de Shapiro & Robertson (1992), com o VPNMLd, comprovaram que a adição de branqueadores óticos ao VPN reduziu a CL₅₀ entre 400 e 1.800 vezes, e o tempo letal médio (TL₅₀), na concentração de $1,0 \times 10^6$ corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml, foi reduzido de 12,2 dias para 6,2 dias, sugerindo que estas substâncias inibem ou alteram a natureza da matriz peritrófica, criando fendas que permitem a passagem dos nucleocapsídeos da luz do mesêntero para a hemocele, provocando, dessa forma, maior rapidez no processo infeccioso. Os resultados foram semelhantes com o vírus de poliedrose citoplasmática de *L. dispar*, havendo diminuição da CL₅₀ $1,21 \times 10^5$ CPI/ml para $1,40 \times 10^2$ CPI/ml e do TL₅₀ de 13,2 dias para 8,4 dias, com o vírus a $1,0 \times 10^6$ CPI/ml. Além de reduzir o tempo de mortalidade (TM) dos insetos e a CL₅₀

dos VPNs testados, Shapiro & Dougherty (1994) relataram que o vírus do gênero *Entomopoxvirus* de *Amsaca* sp. e o VPN de *Autographa californica* (Speyer) (VPNMAc) (Lepidoptera: Noctuidae), quando associados a um branqueador ótico, provocaram infecção e mortalidade em lagartas de *L. dispar* tolerantes aos dois vírus.

Adams *et al.* (1994) demonstraram que a presença de virions nas células colunares do intestino médio do inseto ocorreu mais rapidamente quando o VPN estava associado a um branqueador ótico. Recentemente, Wang & Granados (1999) relataram que as proteínas da matriz peritrófica poderiam ser solubilizadas pela ação de um branqueador ótico (Calcofluor). Ensaio *in vivo* demonstraram que o Calcofluor inibiu severamente a formação da matriz peritrófica em larvas de *T. ni*, bem como aumentou a suscetibilidade dos insetos à infecção pelo baculovírus.

Essas características descritas demonstram o potencial que os branqueadores óticos, derivados do ácido stilbene disulfônico, apresentam como substâncias que podem ser exploradas na busca de estratégias para contornar algumas limitações dos baculovírus enquanto inseticidas microbianos. Dessa forma, o presente trabalho estudou a associação do VPNMAc com os branqueadores óticos disponíveis no mercado brasileiro, avaliando diferentes efeitos biológicos dessa associação.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de branqueadores óticos, disponíveis no mercado brasileiro, ao VPNMAg, nos seguintes parâmetros:

- a. CL₅₀ do VPNMAg em lagartas de *A. gemmatalis*;
- b. TM pelo VPNMAg em lagartas de *A. gemmatalis*;
- c. CL₅₀ do VPNMAg em lagartas de *A. gemmatalis* resistentes ao vírus;
- d. mortalidade dos hospedeiros alternativos *S. frugiperda* e *R. nu* pelo VPNMAg;
- e. proteção do VPNMAg contra a radiação UV;
- f. preferência alimentar de lagartas de *A. gemmatalis* em dieta contendo branqueadores óticos;
- g. peso de pupas de *A. gemmatalis* formadas de lagartas alimentadas em dieta contendo branqueadores óticos;
- h. número de CPI formados em lagartas de *A. gemmatalis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Vírus de insetos

Os vírus se diferenciam de outros parasitos intracelulares porque contêm apenas um tipo de ácido nucléico, que pode ser o DNA ou o RNA, e pela formação da progênie que ocorre com a síntese independente de seus componentes – usando os recursos do hospedeiro – os quais se reúnem posteriormente (Kalmakof & Longworth, 1980). Das infecções de insetos, a doença viral é uma das mais extensamente investigadas. Esses estudos são o resultado do grande interesse no conhecimento básico e aplicado dos vírus e foram possíveis a partir do desenvolvimento de equipamentos complexos, como o microscópio eletrônico, bem como de técnicas sofisticadas de bioquímica, sorologia, patologia, cultura de tecidos e tecnologia do DNA recombinante (Tanada & Kaya, 1993).

De acordo com estudos morfológicos, bioquímicos e biofísicos, o último relatório do “International Committee of Virus Taxonomy” (ICTV) reúne os diferentes grupos de vírus de insetos em 16 famílias (Murphy *et al.*, 1995). Diferente de outras entidades biológicas, a classificação dos vírus não está hierarquicamente organizada no modelo binomial, embora muitos vírus sejam colocados em níveis de família (sufixo viridae), subfamília (sufixo virinae) e gênero (sufixo vírus). As definições convencionais, para descrever o táxon espécie, não se aplicam a esses organismos e, em muitos casos, o vírus de uma espécie de inseto é denominado pelo nome do seu respectivo hospedeiro. Por exemplo, o vírus de poliedrose nuclear múltiplo de *A. californica* é designado como VPNM_{Ac} (Boucias & Pendland, 1998).

Tradicionalmente, e do ponto de vista prático, os vírus encontrados em invertebrados têm sido divididos em dois grandes grupos: os que apresentam formações protéicas, denominadas corpos de inclusão, visíveis em microscópios óticos; e aqueles que não apresentam corpos de inclusão, ou vírus não inclusos, e, portanto só podem ser observados em microscópio eletrônico. (Smith, 1976; Alves, 1986; Tanada & Kaya, 1993; Lobo de Souza & Lecuona, 1996). Nos insetos, devido à falta de estudos mais detalhados, a maioria dos vírus conhecidos pertence ao grupo com corpos de inclusão, por serem mais facilmente diagnosticados e por estarem, geralmente, associados a insetos economicamente importantes. Por outro lado, insetos como *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) e *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae), que foram intensivamente estudados, são identificados como hospedeiros de uma grande quantidade de vírus não inclusos que causam doenças crônicas e infecções agudas (Boucias & Pendland, 1998).

Os vírus são organismos extremamente heterogêneos e os entomopatogênicos estão presentes em muitos dos principais taxa de vírus. Na maioria dos grupos virais, onde ocorre vírus de insetos, ocorrem, também, membros que infectam plantas e animais vertebrados. Por outro lado, as famílias *Ascoviridae*, *Baculoviridae* e *Polydnaviridae*, são associados, apenas, a hospedeiros invertebrados (Tanada & Kaya, 1993; Lobo de Souza & Lecuona, 1996; Gröner 1986; Boucias & Pendland, 1998) e a maioria das associações descritas entre vírus e insetos é com a família *Baculoviridae* (Entwistle, 1983).

3.2. Família *Baculoviridae*

Os vírus de insetos da família *Baculoviridae* estavam previamente contidos em apenas um gênero (*Baculovirus*) dividido em três subgêneros: o subgênero A, compreendendo os vírus de poliedrose nuclear (VPN) e, dividido em dois subgrupos morfológicos – o vírus de poliedrose nuclear, com apenas um nucleocapsídeo por envelope (VPNS) (espécie tipo: *Bombyx mori* VPNS), e o vírus de poliedrose nuclear com múltiplos nucleocapsídeos por envelope (VPNM) (espécie tipo: *Autographa californica* VPMN) –; o subgênero B, com os vírus de granulose (VG) (espécie tipo: *Plodia interpunctella* VG); e o C, representado pelos vírus baciliformes não inclusos (VNO) (Bilimoria, 1986). Posteriormente, a família *Baculoviridae* foi dividida em duas subfamílias, sendo, os dois primeiros grupos (VPN e VG), colocados na subfamília *Eubaculovirinae*, e os vírus não inclusos (VNO), na subfamília *Nudibaculovirinae* (Francki *et al.*, 1991). Atualmente a família *Baculoviridae* está dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus*, que envolve os VPNs, e *Granulovirus* que compreende os VGs (Murphy *et al.*, 1995).

Os VPNs e os VGs são unidades biológicas complexas e parasitos obrigatórios, já que dependem de um hospedeiro para sua replicação e dispersão no ambiente (Boucias & Pendland, 1998). São caracterizados por alguns componentes básicos; o virion, considerado a unidade infectiva do vírus, contém uma molécula circular dupla de ácido nucléico (DNA) de 80 a 220 kilobases (kb) (Miller, 1988), envolvida por uma estrutura denominada capsídeo. Esse conjunto de ácido nucléico mais capsídeo forma o nucleocapsídeo, que em determinados estágios da replicação viral, está envolto em um envelope (membrana dupla). A esse conjunto de DNA+ capsídeo+ envelope, dá-se a denominação de virion. Nos VPNs os virions estão inclusos em estruturas denominadas de poliedros, com tamanho variando entre 1,0 a 15,0 micrometros (μm) (Boucias & Pendland, 1998), e compostos essencialmente por um polipeptídeo chamado poliedrina. Nos vírus de poliedrose nuclear múltiplo (VPNM), além de um número variável de

virions por poliedro (pode haver mais de 100 virions/poliedro), varia, também (entre 1 e 17), o número de nucleocapsídeos por envelope, sendo que nos vírus de poliedrose nuclear único ou simples (VPNS), ocorre apenas um nucleocapsídeo por envelope (Bilimoria, 1986). Nos VGs, os virions estão inclusos em “grânulos” cuja proteína é a granulina e medem, aproximadamente, de 0,3 a 0,5 μm . Nas granuloses são encontrados apenas um, raramente dois, virions por envelope (Federici, 1986).

A principal forma de transmissão dos VPNS para os hospedeiros suscetíveis ocorre por meio da ingestão (*per os*) de partículas virais inclusas e, possivelmente, por virions livres (Boucias & Pendland, 1998) durante a alimentação, na fase larval. Após a ingestão, os corpos de inclusão ou poliedros são dissolvidos e, no mesêntero, cuja formação é endodérmica, ocorre a penetração dos nucleocapsídeos nas células colunares. Nessa fase da infecção, ocorre a fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática das células colunares das microvilosidades do mesêntero do inseto e a seqüente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula do hospedeiro, que migra para o interior do núcleo dessas células. Dentro do núcleo, ocorre a liberação do genoma viral e a replicação do vírus, constituindo-se na infecção primária. Durante esse processo, são produzidas duas formas, ou fenótipos do vírus: um vírus não incluído; e um número limitado de partículas de vírus inclusos. Em Lepidoptera, a maioria dos baculovírus produz, nas células colunares, o fenótipo não incluído; as inclusões não são normalmente sintetizadas (Boucias & Pendland, 1998). A forma não incluída é a responsável pela infecção posterior dos diferentes tecidos do inseto, que ocorre principalmente através do sistema traqueal (Engelhard *et al.*, 1994). No núcleo das células dos tecidos suscetíveis, ocorre nova replicação do vírus (*de novo*) e se constitui na infecção secundária, com grande formação de corpos poliédricos de inclusão (Granados & Williams, 1986).

Em geral, o modo de infecção e replicação dos VGs são semelhantes ao das poliedroses nucleares. Os grânulos são dissolvidos pelo suco digestivo do hospedeiro e os envelopes liberados são anexados e fundidos à membrana plasmática das células colunares. A virogênese inicia-se no núcleo com a formação do estroma viral, seguida de lise da membrana nuclear, e é completada no núcleo e também no citoplasma das células (Granados & Williams, 1986; Tanada & Kaya, 1993; Boucias & Pendland, 1998).

A disseminação dos vírus pode ocorrer por meio dos próprios hospedeiros infectados – transovigênica (ovos contaminados externamente), transovariana (oócitos contaminados no ovário da fêmea), canibalismo e cópula – ou por outros organismos, como os predadores (insetos, pássaros) e os parasitóides, especialmente os da ordem Hymenoptera. Outras formas de

disseminação são os fatores climáticos como a chuva e o vento, e fatores físicos como máquinas, equipamentos, animais e o próprio homem (Alves & Lecuona, 1998)

3.3. Uso de vírus da Família *Baculoviridae* como inseticida biológico

Esse grupo de vírus, normalmente denominado apenas de baculovírus, oferece grande potencial como inseticida microbiano por apresentar segurança ao usuário e ao meio ambiente, e alta virulência aos hospedeiros (Smith, 1976; Alves, 1986; Huber, 1986; Young, 1989; Kunimi et al., 1996; Moscardi, 1999). São os vírus de insetos mais intensivamente estudados e foram isolados de mais de 700 invertebrados, incluindo, na Classe Insecta, espécies das Ordens Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Neuroptera Trichoptera e Thysanura, além de hospedeiros na Ordem Decapoda (Crustacea) e Arachnida (Bilimoria, 1986; Tanada & Kaya, 1993; Boucias & Pendland, 1998). As granuloses, entretanto, foram isoladas todas dentro da Ordem Lepidoptera, em mais de 200 espécies (Alves, 1986; Federici, 1986; Boucias & Pendland, 1998).

Embora a importância desses agentes biológicos, como alternativa aos inseticidas químicos, seja reconhecida na formulação de programas de MIP, tanto para sistemas agrícolas como para sistemas florestais, são, ainda, de utilização restrita devido a alguns fatores intrínsecos e extrínsecos destes organismos (Shapiro & Robertson, 1992; Shapiro & Dougherty, 1994; Kunimi et al., 1996). Dentre as características dos vírus de insetos, os principais componentes que dificultam sua utilização regular como inseticidas microbianos são: a ação relativamente lenta ou o tempo de desenvolvimento da doença (Smits et al., 1987; Shapiro et al., 1994; Heinz et al., 1995; Moscardi & Sosa-Gómez, 1996), a especificidade (Smith, 1976; Bilimoria, 1986; Boucias & Pendland, 1998) – embora desejada em programas de MIP, restringe o retorno econômico para a empresa privada (Huber, 1986; Moscardi & Sosa-Gómez, 1996) – e a desativação por raios ultravioletas (David, 1969; Shapiro, 1984; Ignoffo et al., 1997), comprometendo a persistência no ambiente.

3.3.1. Tempo de desenvolvimento da doença

O tempo de desenvolvimento da doença é considerado o período entre a ingestão do vírus e a morte do inseto – também avaliado, como tempo de mortalidade – e é devido, primeiramente, à inter-relação do hospedeiro com o patógeno, devendo ser caracterizado como um fator intrínseco das duas espécies. Como valores gerais, o período compreendido entre o início da infecção e a

utilizada, e, embora o tempo de mortalidade possa ser considerado relativamente longo, quando comparado ao efeito dos inseticidas químicos, o consumo foliar das lagartas doentes foi bastante reduzido. Lagartas sadias inoculadas no 3º instar com 800 poliedros/lagarta consumiram em média 108 cm² de área foliar de soja, enquanto lagartas infectadas consumiram cerca de 27 cm², representando uma redução de quatro vezes no consumo de alimento (Moscardi, 1986).

3.3.2. Resistência

Os vírus de insetos estudados como agentes de controle biológico são organismos endêmicos e vêm coevoluindo com os seus hospedeiros. Ao longo do tempo, surgiram genes capazes de conferir resistência aos insetos e se encontram fixados de forma discreta nas populações (Briese, 1986), entretanto, poucos casos são encontrados na literatura referentes à modificação na resposta a um VPN em populações naturais de insetos. As investigações envolvendo diferentes grupos de vírus indicam que as mudanças na resistência de uma população de inseto devem ser controladas, ou por complexos mecanismos genéticos, ou, em alguns casos, por um único gene autossômico. No último caso, alelos dominante e recessivo foram relatados determinando resistência. De acordo com Sosa-Gómez & Moscardi (2000), a resistência a um vírus por parte de uma larva pode ser dividida em dois aspectos fundamentais: uma resistência generalizada em todas as células do hospedeiro, ou uma resistência localizada nas estruturas responsáveis pela entrada do vírus no organismo, *i.e.*, o tubo digestivo no caso dos baculovírus em que a infecção é adquirida *per os*. Entre os mecanismos de defesa são citados: a inativação dos virions no intestino do inseto por substâncias com ação antiviral; dificuldade em atravessar a matriz peritrófica, que tem como uma das principais funções atuar como uma barreira contra os agentes infecciosos; a não fusão dos virions com as células do intestino por alterações nos receptores das células epiteliais; inibição da replicação viral nas células epiteliais; eliminação rápida das células do intestino quando infectadas; destruição dos virions na hemolinfa, entre outros (Inoue & Miyagawa, 1978; Briese, 1986; Tanada & Kaya, 1993; Boucias & Pendland, 1998; Sosa-Gómez & Moscardi, 2000).

A observação de resistência a um vírus em população de *E. griseana* coletada em campo – aproximadamente 38 vezes – foi relatada por Martignoni (1957), após a ocorrência natural de uma epizootia do seu vírus de granulose, sendo que a modificação de suscetibilidade nos insetos foi atribuída à mortalidade das larvas mais suscetíveis da população. Isso equivale a dizer que houve, de forma natural, a seleção de um grupo de insetos menos suscetíveis ao vírus. Em lagartas de *S. frugiperda* coletadas em campo, em diferentes épocas do mesmo ano, Fuxa *et al.* (1988) encontraram variações na dose letal média (DL₅₀) entre 5,7 poliedros/inseto e 14,9

poliedros/inseto. Em colônias de laboratório submetidas à pressão seletiva a dose letal para matar 50% da população foi de 5,9 CPI por inseto em lagartas suscetíveis, e de 18,7 CPI por inseto em lagartas resistentes (Fuxa & Richter, 1989). A interrupção da pressão seletiva resultou em colônia igualmente suscetível, tal como a testemunha. Para uma colônia brasileira de *A. gemmatalis* submetida por 15 gerações à pressão de seleção, o nível de resistência ao seu VPN foi de 2.748 vezes. Também nesse inseto, a interrupção da pressão seletiva, por onze gerações, conduziu a colônias suscetíveis ao vírus (Moscardi, 1998; Sosa-Gómez & Moscardi, 2000). Lagartas dessa espécie, criadas nos Estados Unidos, também desenvolveram resistência ao VPN após a terceira geração, entretanto, o nível de resistência foi de aproximadamente cinco vezes (Abot *et al.*, 1996).

Outros exemplos de resistência a baculovírus foram relatados por Briese (1981), Fuxa *et al.* (1988) e Fuxa (1993). É importante observar, entretanto, que não se conhece nenhum relato de resistência a um baculovírus usado como inseticida microbiano (Fuxa, 1987; 1993), embora estes vírus não tenham sido, ainda, utilizados de maneira extensiva e com frequência suficiente para permitir uma avaliação adequada desse fenômeno (Fuxa, 1993). Provavelmente, a exposição constante de insetos a VPNs, utilizados como inseticidas microbianos, resultará na seleção de indivíduos menos suscetíveis em populações naturais (Anderson, 1982), assim como se verificou com os insetos expostos aos inseticidas químicos (Fuxa, 1987). Considerando que o uso dos baculovírus, como inseticidas microbianos, pode aumentar substancialmente nos próximos anos, são necessários estudos para se determinar a possibilidade do desenvolvimento de resistência e os mecanismos envolvidos nesse fenômeno (Moscardi, 1999). Os estudos conduzidos há anos nesse sentido, com o VPNMAg (Sosa-Gómez & Moscardi, 1994; Abot *et al.*, 1995; Abot *et al.*, 1996; Fuxa & Richter, 1998) servem como referencial para o adequado manejo de resistência, caso venha a ser detectada em condições de campo.

3.3.3. Efeito da idade do hospedeiro no tempo de desenvolvimento da infecção viral

Além dos fatores genéticos, Briese & Podgwaite (1985) relacionaram o desenvolvimento, *i.e.*, a idade do hospedeiro, e os fatores ambientais como causadores da mudança na suscetibilidade de uma população a um determinado vírus entomopatogênico. A relação entre a idade de um inseto e sua resposta à infecção por vírus é relatada em diferentes trabalhos, comparando, principalmente, larvas de diferentes instares. Na maioria dos casos, tem sido demonstrado que o aumento da resistência é diretamente proporcional ao desenvolvimento do inseto. Ignoffo (1966) avaliou a suscetibilidade de lagartas de diferentes idades de *H. zea* e

morte do inseto tem sido considerado entre 5 e 12 dias (Ignoffo, 1966), e entre 7 e 11 dias (Lobo de Souza & Lecuona, 1996) para os VPNs e entre 4 e 25 dias para os VGs (Lobo de Souza & Lecuona, 1996). Esse período, entretanto, é notadamente influenciado pela espécie, pela idade na qual o hospedeiro é infectado, pela dose utilizada, pelo isolado viral e pelas condições climáticas.

Ignoffo (1966) relatou a morte de larvas de *Heliothis (Helicoverpa) zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) ocorrendo entre dois e quatro dias, quando infectadas no início do desenvolvimento com variantes virulentos do VPN do inseto. Por outro lado, Armargier *et al.* (1981) relataram um tempo de mortalidade de 30 dias em larvas de *Pandemis heparana* Denis & Schiffermülles (Lepidoptera: Tortricidae) e de até 100 dias em larvas em diapausa. Larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae) infectadas com seu vírus de granulose (VGDs) apresentaram o TL₅₀ de 24 dias (Lecuona & Alves, 1988) e *Chilo indicus* Kapur (Lepidoptera: Pyralidae) de 20 a 25 dias (Mehta & David, 1980).

O VPNMLd tem sido utilizado com relativo sucesso para reduzir a população dessa praga de florestas (Rollinson *et al.*, 1965; Podgwaite, 1989), entretanto, a eficácia no campo tem se mostrado irregular, pois esse vírus age de forma vagarosa e permite que as lagartas continuem a se alimentar por quase duas semanas após a exposição ao patógeno (Shapiro *et al.*, 1994).

Em alguns casos, com o inseto contaminado, mesmo com o tempo de mortalidade se estendendo além de uma semana, o tempo de alimentação e o consumo são diminuídos, representando menor comprometimento das plantas atacadas pela praga. Cox *et al.* (1972) relataram que larvas de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), infectadas com seu VPN, cessaram a alimentação alguns dias depois de contaminadas, morrendo cinco a sete dias após, com o rompimento do tegumento e liberação de grande quantidade de vírus. O consumo de alimento por lagartas desses insetos, infectados com seu VPN no primeiro ínstar, foi 99,7 % menor do que em lagartas não infectadas, e o tempo de mortalidade foi entre 5,4 e 9,4 dias (Chiaravalle, 1988). Com o mesmo inseto, Livingston *et al.* (1980) encontraram o tempo de mortalidade variando entre 6,9 a 8,1 dias. Em testes de campo, o VPN aplicado contra *P. includens*, na dose de 247 lagartas equivalentes (LE)/ ha, reduziu a população do inseto somente 12-13 dias após a aplicação (McLeod *et al.*, 1982). Em laboratório, o tempo letal médio avaliado por Gomez *et al.* (1999), para *S. frugiperda*, variou entre 8,3 dias e 10,0 dias, para diferentes isolados testados.

Para a lagarta-da-soja, *A. gemmatilis*, principal inseto desfolhador da cultura da soja no Brasil, observa-se, também, variações no período de mortalidade quando exposta ao seu VPNMAg. Segundo Moscardi (1986), o tempo letal médio – da inoculação à morte da lagarta – variou entre 6,69 dias e 8,1 dias em lagartas de início do 4º ínstar, dependendo da dose do vírus

Heliothis virescens Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) ao VPN de *H. zea* (VPNMHz). Para as duas espécies, ocorreu 100 % de mortalidade com as larvas de cinco dias de idade; para larvas de nove dias de idade, a mortalidade foi de 12,0 % e de 9,9 %, para *H. zea* e *H. virescens*, respectivamente. Também, o TL₅₀ foi de 6,8 dias para as lagartas de *H. zea* infectadas aos sete dias de idade, e de 3,4 dias para lagartas infectadas com um dia de idade. Para *H. virescens*, o TL₅₀ foi, respectivamente, de 6,6 dias e de 3,2 dias, para lagartas infectadas aos sete dias e com um dia de idade.

Payne *et al.* (1981) relataram o aumento da resistência a um VG em *Pieris rapae* L. e *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae), como sendo diretamente proporcional ao peso das larvas dos insetos. De forma semelhante, Evans (1981) relacionou o peso de larvas de *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) à resistência ao seu vírus de granulose. Em *P. includens*, Chiaravalle (1988) relatou a concentração letal média (CL₅₀) como sendo de apenas 1,1 CPI/mm² de dieta para lagartas de 1º ínstar, e de 50,0 CPI/mm² de dieta para lagartas de 4º ínstar. Nessa espécie o TL₅₀ foi também afetado pela idade dos insetos.

Em lagartas de *A. gemmatalis* o efeito da idade revelou uma diferença na suscetibilidade ao seu VPN de 930 vezes, entre indivíduos mais suscetíveis e mais resistentes. A DL₅₀ em lagartas de 2º ínstar foi de 103 poliedros/ larva, enquanto que para lagartas de 5º ínstar, a DL₅₀ foi de 4.100 poliedros/ larva (Boucias *et al.*, 1980). Segundo Moscardi (1986), a suscetibilidade de *A. gemmatalis* ao seu VPN decresce à medida que progride o desenvolvimento larval. Lagartas do 2º ínstar necessitaram de apenas 9,3 poliedros/lagarta para uma mortalidade de 50%, enquanto que para o 5º ínstar, foram necessários 445 poliedros/lagarta para ocasionar a mesma mortalidade, o que significa uma redução de aproximadamente 48 vezes na suscetibilidade de lagartas do 5º ínstar, em relação às lagartas do 2º ínstar.

Vinte espécies de insetos nos quais a resistência pode ser observada, em função da idade do hospedeiro, foram relacionadas por Briese (1986). A análise dos dados comparando as DL₅₀ e o peso dos insetos demonstrou, por meio de regressão linear, que o peso corporal foi responsável pela variação na regressão. Os dados mostraram, ainda, grande diferença à infecção por vírus entre as espécies, refletindo a variabilidade interespecífica que ocorre na relação idade × resistência dos insetos. Resultados semelhantes foram encontrados por Bucher & Turnock (1983) com *Mamestra configurata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) e por Evans (1983), com lagartas de *Heliothis (Helicoverpa) armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Para Evans (1981), entretanto, em lagartas de *M. brassica* houve maior aumento na resistência ao VG no 5º ínstar, e em larvas mais velhas dessa espécie, sugerindo que essa relação linear, entre o peso do inseto e a resistência, não se ajusta a todos os períodos de desenvolvimento. Além disso, as mudanças na

suscetibilidade à infecção por VG também foram observadas dentro de um mesmo ínstar, em lagartas de *P. brassicae* (David *et al.*, 1971).

Dessa forma, o verdadeiro modelo de resistência durante o desenvolvimento deve levar em conta a diferença na suscetibilidade que ocorre dentro do mesmo ínstar e a regressão linear, como modelo de resistência, representa a média das mudanças que ocorrem durante a fase larval do inseto. Dois pontos podem ser identificados onde ocorrem desvios significativos na relação linear entre a resistência e o peso do inseto. Esses correspondem ao período em que a larva está entrando no seu último ínstar e imediatamente antes da fase de prepupa. A razão para esse maior aumento nos índices de resistência nessas duas fases larvais poderia ser atribuída às mudanças no balanço do hormônio juvenil e de muda, que ocorrem nesse período (Evans, 1983).

A relação direta entre o peso do inseto e a resistência não deve ser visto como uma relação que ocorre *a priori*, já que o agente infeccioso deve ser capaz de provocar infecção independente do tamanho do hospedeiro (Payne, 1982). A questão é se o efeito é meramente de dose necessária para iniciar a infecção, ou se o peso está correlacionado com as mudanças nos mecanismos de defesa do organismo. Segundo Briese (1986), a análise de várias espécies, considerando a dose/mg de peso, sugere que ambos os efeitos devem estar envolvidos. Essa relação entre a idade do hospedeiro e o tempo de mortalidade tem efeito prático na utilização destes agentes microbianos, indicando que o patógeno deve ser aplicado no início do desenvolvimento do inseto.

3.3.4. Efeito dos fatores ambientais no tempo de desenvolvimento da infecção viral

Muitos fatores ambientais podem interferir na relação vírus × hospedeiro e alguns podem atuar diretamente sobre o patógeno afetando sua eficiência, quando utilizado em campo como inseticida microbiano. Em teoria, o pH do solo – altamente alcalinos ou ácidos – deve exercer algum tipo de efeito sobre os poliedros virais, assim como o tipo e a cobertura do solo. Existem evidências de compostos químicos liberados de determinadas folhas, ou formados pela associação com a água que se condensa na superfície da folha, alterando a atividade de vírus (Tinsley, 1979). Outro fator que pode agir sobre os insetos, alterando sua resposta à presença do vírus, é a qualidade do alimento consumido, especialmente componentes nutricionais específicos como a deficiência de sucrose nas dietas, que aumenta a suscetibilidade de *P. brassicae* à infecção por VG (David & Taylor, 1977).

A temperatura também tem sido relacionada como um dos fatores afetando a suscetibilidade dos insetos à infecção por vírus. Tanada (1967) refere-se à recuperação de insetos à infecção viral,

quando os insetos são transferidos para altas temperaturas, como “terapia térmica”. Esse fenômeno não é completamente conhecido e pode ocorrer, tanto por aumentar a resistência dos insetos como por efeito deletério sobre o vírus (Tanada & Kaya, 1993). Para os vírus de *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae) e *P. unipuncta*, a alta temperatura parece inibir o desenvolvimento do vírus (Watanabe & Tanada, 1972; Kobayashi *et al.*, 1981). Além disso, a temperatura ambiental exerce papel no período de infecção; em temperaturas maiores do que 40° C, e menores do que 10° C, ocorre inibição do processo infeccioso em alguns vírus de insetos, que pode estar relacionada tanto com o metabolismo dos hospedeiros como com o mecanismo de penetração/invasão do vírus. Para o VG de *P. rapae* (VGPr) a infecção foi inibida a 36° C. Com o VPN de *T. ni*, ocorreu inibição na temperatura de 39° C (Tanada, 1963). O melhor desenvolvimento do VPNMAg ocorreu a 30° C e a infecção foi inibida tanto na temperatura de 10° C como de 40° C (Johnson *et al.*, 1982). No Brasil, em regiões de temperatura média baixa, tem sido observado um prolongamento do período de incubação do VPNMAg, além de menor mortalidade dos insetos (Moscardi & Sosa-Gómez, 1996).

Outro fator que parece afetar diretamente a suscetibilidade dos insetos às infecções virais é a luz (Briese, 1986), entretanto, o seu efeito tem sido pouco estudado (Tanada & Kaya, 1993). Watanabe & Takamiya (1976) relataram que larvas de bicho-da-seda, criadas continuamente no escuro, foram aproximadamente 10 vezes mais suscetíveis ao VPN do que larvas criadas em ambiente com claridade. Dois fatores aparentam estar envolvidos: a redução na razão entre células colunares suscetíveis e células não suscetíveis no epitélio do intestino médio (Watanabe & Takamiya, 1976) e a inabilidade do inseto em sintetizar proteína antiviral na ausência da luz (Hayashiya *et al.*, 1976).

É evidente que muitos fatores nutricionais, físicos ou químicos, que de alguma forma são agentes ambientais estressores, podem influenciar no nível de suscetibilidade dos insetos a esse grupo de vírus. Embora as mudanças na suscetibilidade por fatores ambientais sejam relativamente menores do que as mudanças observadas em relação ao peso/idade do hospedeiro, os fatores ambientais devem ser considerados, ou controlados, em qualquer análise de resistência dos insetos aos baculovírus (Briese, 1986).

3.3.5. Efeito da luz ultravioleta em vírus de insetos

A radiação solar é o principal fator que compromete a persistência dos VPNs quando aplicados em campo (Smith, 1976; Young & Yearian, 1986; Ignoffo *et al.*, 1997), e o corpo de inclusão de natureza protéica, no qual as partículas infectivas dos VPNs e dos VGs estão

inclusas, é um componente de estabilidade desses grupos de vírus, para sobreviver à exposição na natureza (Tinsley, 1979). Mesmo assim, sua infectividade, quando aplicados sobre plantas, é rapidamente perdida pela radiação solar (Jaques, 1977; Ignoffo *et al.*, 1977; Tinsley, 1979; Ignoffo *et al.*, 1997).

Diferentes estudos têm demonstrado que comprimentos de onda da luz UV, presentes na luz solar, inativam os baculovírus de forma semelhante à luz ultravioleta germicida, que tem comprimento de onda em torno de 254 nanômetros (nm) (Gudauskas & Cannerday, 1968; Jaques, 1975; Hughes *et al.*, 1999). Em geral, a exposição do vírus ao comprimento de ondas entre 280 a 320 nm, presentes na luz solar, e que alcançam a superfície da Terra, é quase tão eficiente como a exposição às ondas curtas (254 nm), que não alcançam a superfície (Jaques, 1977). A comparação entre diferentes comprimentos de onda, utilizando uma preparação purificada do VGPr, demonstrou que o efeito da radiação UV decresceu progressivamente com o aumento do comprimento de onda (David, 1969). É considerado como o espectro mais destrutivo aquele com comprimento de onda entre 290 e 400 nm (Ignoffo *et al.*, 1997), compreendendo, portanto, as regiões UV-A (320-400 nm) e UV-B (280-310 nm) (Shapiro *et al.*, 1983). A sensibilidade das partículas virais à radiação solar tem motivado investigações com a adequação do período de aplicação no campo, bem como a adição de substâncias às formulações dos vírus permitindo prolongar sua atividade e eficiência de controle de pragas em campo (Alves, 1986; Batista Filho *et al.*, 1998).

3.4. Estratégias para contornar as limitações de baculovírus para o controle de insetos

As possíveis estratégias a serem desenvolvidas para contornar as características intrínsecas dos baculovírus, melhorando sua eficácia como inseticida microbiano e, dessa forma, aumentando a sua utilização em programas de MIP, devem contemplar, principalmente, os modelos que possibilitem selecionar os isolados mais virulentos, diminuir o tempo de infecção e mortalidade, aumentar o tempo de persistência do vírus no ambiente e controlar os insetos-praga que ocorram simultaneamente na mesma área. Além disso, deve-se desenvolver estratégias que permitam conviver com os aspectos de resistência, que pode, eventualmente, ser observada em algum sistema vírus-inseto.

3.4.1. Seleção de variantes virulentos

Numerosos estudos envolvendo a inter-relação entre baculovírus e seus hospedeiros demonstram a origem geográfica de ambos, vírus e inseto, como fatores que podem afetar a característica da curva de dose-resposta à infecção (Magnoler, 1970; Shapiro & Ignoffo, 1970; Rollinson & Lewis, 1973; Vasiljević & Injac, 1973; Hughes *et al.*, 1983; Shapiro & Robertson, 1991; Escribano *et al.*, 1999). Assim, uma forma possível de seleção de variantes mais eficientes de VPNs e VGs é a avaliação da infectividade de isolados existentes nas diversas regiões de ocorrência do inseto (Ossowski, 1960; Smirnov, 1961; Vasiljević & Injac, 1973).

Com isolados do VPN de *L. dispar*, originários da França, Iugoslávia, Itália, Estados Unidos e Japão (Magnoler, 1970) e isolados do vírus dos Estados Unidos, Japão e Iugoslávia (Rollinson & Lewis, 1973), foram encontradas diferenças maiores do que 1.000 vezes na atividade do vírus. Vasiljević & Injac (1973) estudaram a susceptibilidade de larvas de *L. dispar*, ao seu VPN, originárias de diferentes regiões e, também, isolados de diferentes regiões. Os autores relataram que as larvas da Iugoslávia foram mais suscetíveis aos isolados do Japão e dos Estados Unidos; as larvas da Bulgária foram mais suscetíveis aos VPNs coletados nos Estados Unidos e na Rússia. A diferença de atividade do sistema mais infectivo para o menos infectivo foi de 10.000 vezes, com os autores concluindo que ocorrem diferenças na patogenicidade do VPNMLd isolados de diferentes regiões geográficas, assim como ocorrem diferenças na susceptibilidade dos hospedeiros de diferentes regiões geográficas. Entre 19 isolados do VPNMLd provenientes da Europa, Ásia e América do Norte, Shapiro *et al.* (1984) relataram, para insetos criados em Nova Jersey (EUA), uma diferença na CL₅₀ de 2.940 vezes entre o isolado mais virulento e o menos virulento. As diferenças entre os isolados de uma mesma região geográfica, americana ou europeia, apresentaram variações menores do que aquelas observadas entre regiões distantes.

Isolados do vírus de *S. frugiperda*, obtidos de lagartas infectadas, provenientes da Argentina, Nicarágua e Estados Unidos (dois isolados), confirmados como sendo raças de uma mesma espécie de baculovírus por meio de análise do DNA viral, apresentaram CL₅₀, em lagartas provenientes de Honduras, variando entre $2,0 \times 10^5$ CPI/ml e $1,2 \times 10^7$ CPI/ml (Escribano *et al.*, 1999). Gomez *et al.* (1999), avaliando sete isolados geográficos desse VPN, encontraram variações na CL₅₀ entre 5.631 CPI/ml de dieta, para um isolado de Sertaneja, PR, e 25.310 CPI/ml de dieta, para um isolado de Sete Lagoas, MG, este, aproximadamente 4,5 vezes menos virulento. Neste trabalho não houve diferença entre os isolados testados, quanto ao tempo de mortalidade dos insetos.

3.4.2. Seleção de variantes virulentos por passagem seqüenciada

Para Reichelderfer (1975), o potencial de mutação de um determinado vírus pode ser obtido avaliando-se as mudanças na sua virulência e/ou as mudanças na resistência do hospedeiro, após a passagem seriada do vírus em altas concentrações ou, ainda, determinando-se o número de diferentes hospedeiros nos quais um determinado vírus pode se replicar com sucesso. Aparentemente, a heterogeneidade de uma população de vírus natural pode conter partículas adaptadas à uma nova espécie, e a passagem seriada seleciona essas partículas virais como variantes da população original. Assim, a mudança gradual da forma icosaédrica – que ocorreu em pequena quantidade no VPN original – para a forma cubóide do poliedro do VPN de *B. mori*, quando passado seriadamente por *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae), foi atribuída por Watanabe *et al.* (1975) como sendo o resultado da seleção desse variante mais adaptado ao novo hospedeiro.

Além do aspecto morfológico descrito por Watanabe *et al.* (1975), a passagem seqüencial de isolados naturais por hospedeiros alternativos pode aumentar a virulência e reduzir o tempo de mortalidade para espécies que apresentam, ordinariamente, pequena susceptibilidade a um determinado baculovírus (Smirnov, 1963; Stairs *et al.*, 1981; Tompkins *et al.*, 1981; Tompkins *et al.*, 1988; Morales & Moscardi, 1993a). Nesse sentido, vários estudos foram realizados tentando adaptar isolados de vírus a hospedeiros alternativos, que resultassem em variantes mais virulentos ou mais adaptados para a produção *in vivo* em espécies mais facilmente criadas em laboratório (Gröner, 1986). Vail *et al.* (1973) avaliaram a infectividade do VPNMAc em *T. ni*, após passar o VPN seqüenciadamente em *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e em *Estigmene acrea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). Os autores concluíram que o VPN foi virulento para *T. ni*, mesmo depois de propagado nos dois hospedeiros alternativos, e que a produção em larga escala pode ser feita selecionando-se o inseto mais conveniente.

A passagem seriada do VPNMAg em *P. includens*, relatada por Pavan *et al.* (1981), provocou mortalidade de até 24 % no hospedeiro alternativo. Os autores atribuíram a característica de “murcha”, observada nos insetos, a um vírus latente em *P. includens*, induzido pela ação do VPN de *A. gemmatalis*. Após a passagem seriada, as lagartas de *A. gemmatalis* foram menos suscetíveis ao VPN. Outra avaliação da atividade biológica do VPN de *A. gemmatalis*, após passagem seriada, foi relatada por Pavan & Ribeiro (1989) em *D. sacharalis*, constatando níveis de eficiência comparados ao VG que ocorre naturalmente nesta espécie.

Uma tentativa para desenvolver um isolado de *A. californica* eficiente para o controle do complexo de lepidópteros encontrados em soja – *A. gemmatalis*, *P. includens* e *R. nu* –, não

logrou êxito (Morales, 1991; Moscardi, 1999). Embora a passagem seriada tenha selecionado variantes virulentos para os hospedeiros alternativos, a nova população do vírus tornou-se eficiente apenas para a espécie onde o vírus foi replicado e pouco infectiva às outras espécies, exceto quando o VPNM_{Ac} foi multiplicado em *P. includens*. Nesse caso, o isolado obtido em uma única passagem, manteve-se igualmente infectivo a *P. includens* e *R. nu*, sugerindo que esse vírus poderia ser desenvolvido como inseticida biológico para as duas espécies (Morales, 1991; Morales *et al.*, 1993).

3.4.3. Baculovírus recombinantes

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento recente de vírus de insetos modificados geneticamente, aumentou o interesse no potencial dessas viroses para o controle de insetos, tanto pelas empresas privadas quanto pelas instituições governamentais (Wood & Granados, 1991; Boning & Hammock, 1996). O que se espera é a obtenção de patógenos com ação mais rápida sobre o hospedeiro e que afetem, também, maior número de espécies-pragas. A especificidade dos vírus de insetos tem sido um dos aspectos prejudiciais aos investimentos da iniciativa privada para o desenvolvimento desses entomopatógenos, pois as empresas privadas preferem desenvolver produtos ou moléculas de maior espectro de hospedeiros e com maiores possibilidades de mercado. Por outro lado, o aumento de hospedeiros de um vírus pode prejudicar a característica de seletividade destes organismos, altamente desejável quando utilizados como inseticidas biológicos em programas de MIP.

O esforço para a obtenção de vírus geneticamente modificados com essas características tem sido direcionado para os vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, encontrados apenas em artrópodes e já utilizados como inseticidas biológicos, principalmente para o controle de larvas de Lepidoptera (Richards *et al.*, 1998). A modificação desses organismos pode combinar o efeito patogênico do vírus com a ação inseticida de algumas toxinas, hormônios ou enzimas (Boning & Hammock, 1996; Hammock, 1998), ou mesmo com inseticidas químicos (McCutchen *et al.*, 1997). Em princípio, qualquer gene que codifique uma proteína que comprometa o desenvolvimento larval e reduza os prejuízos causados pela alimentação do inseto é considerado candidato para expressão em vírus recombinante. Os venenos específicos aos insetos e encontrados nos próprios artrópodes, oferecem uma fonte interessante de toxinas que podem ser incorporadas nos genomas de baculovírus (Boning & Hammock, 1996).

A primeira toxina introduzida e produzida por um vírus modificado, para o controle de inseto, foi encontrada no escorpião *Buthus eupeus* (Carbonell *et al.*, 1988). Entretanto, por razões

desconhecidas, essa toxina não aumentou a eficácia do vírus recombinante. Outro gene que codifica uma toxina de escorpião, considerada inseto-específica e obtida de *Androctonus australis*, foi inserido no genoma do vírus de *A. californica* (AcAaIT) e tem sido reconhecido como um dos mais promissores. Essa toxina age no canal de sódio do sistema nervoso do hospedeiro e pode matar o inseto 30 % mais rápido do que o vírus selvagem (McCutchen *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1991; Bonning & Hammock, 1992; 1996). Em lagartas de *T. ni*, o TL₅₀ foi reduzido em até 40 % e o dano por desfolha em repolhos foi reduzido em mais de 60 %, quando comparado com o prejuízo causado por larvas infectadas com o VPN natural (Stewart *et al.*, 1991; Cory *et al.*, 1994; Kunimi *et al.*, 1996). Resultados semelhantes foram relatados por Hoover *et al.*, (1995) com esse vírus recombinante em larvas de *H. virescens*.

A toxina TxP1, derivada do ácaro *Pyemotes tritici* foi, também, expressa no vírus de *A. californica* (Tomalski & Miller, 1991). O ácaro utiliza essa toxina para imobilizar insetos maiores do que 150.000 vezes seu tamanho. O mecanismo de ação não é conhecido e o vírus recombinante, que expressa essa toxina, provocou mortalidade no inseto em um tempo 30-40 % menor do que o vírus natural. (Bonning & Hammock, 1996). Os genes que codificam toxinas produzidas pelo *B. thuringiensis* já foram incorporados ao vírus de *A. californica*, sem, no entanto, apresentar um aumento da ação inseticida (Boucias & Pendland, 1998).

Alguns hormônios e enzimas que controlam os processos fisiológicos dos insetos, como o balanço da água, a metamorfose ou a reprodução, têm sido expressados em VPNs. Um recombinante do vírus de *B. mori*, expressando hormônio diurético, provocou mortalidade 20 % mais rápida do que o vírus natural (Maeda, 1989), entretanto, a expressão do hormônio envolvido com a muda e a liberação da cutícula, em VPN de *A. californica*, não demonstrou maior eficiência do que o vírus natural (Eldridge *et al.*, 1992). O vírus de *A. californica* modificado para expressar a enzima parcialmente responsável pela degradação do hormônio juvenil (hormônio juvenil esterase), avaliado em larvas de *T. ni* e *H. virescens*, apresentou menor tempo letal e menor prejuízo por alimentação (Bonning *et al.*, 1995; Bonning & Hammock, 1996). O hormônio protorácico, que estimula a produção de ecdisônio, foi também expressado no VPN de *A. californica*. Embora tenha aumentado a produção do hormônio, não houve redução no tempo de mortalidade dos insetos, além do que inibiu a atividade do vírus. Outros hormônios também testados não contribuíram para melhorar a eficiência desses vírus de insetos (Bonning & Hammock, 1996).

A remoção do gene *egt* do vírus de *A. californica* – responsável pela codificação da enzima UDP-glicosil transferase (O'Reilly & Miller, 1989), prolongando a vida do hospedeiro doente para maximizar a capacidade reprodutiva do vírus (Hammock, 1998) – permitiu antecipar a morte

do inseto em 27 % (Miller, 1995) e houve redução de 30 % na progênie do vírus replicado em *H. zea* (Bonning & Hammock, 1996) e até 40 % menos do que com o vírus natural, em lagartas de *T. ni* (Kunimi *et al.*, 1996).

Nos vírus geneticamente modificados, o que se espera não é o estabelecimento e a reciclagem em longo prazo, como no controle biológico clássico, mas o efeito imediato similar aos dos inseticidas químicos, utilizados sempre que necessários e com a mesma seletividade do vírus natural. Ordinariamente, a progênie do vírus modificado é menor (menor número de poliedros virais) do que nos vírus naturais e pode ser considerado como uma limitante para sua reciclagem, porém, é considerado como um aspecto de segurança, quando liberados no ambiente.

Os riscos associados com a utilização em larga escala de um vírus modificado levam em conta, entre outros fatores, o efeito sobre organismos benéficos e a predominância dos vírus modificados sobre os vírus naturais (McCutchen *et al.*, 1996). Além disso, os vírus são agentes que podem permanecer viáveis no ambiente por muitos anos, e com os vírus modificados existe uma probabilidade de que não possam ser removidos uma vez estabelecidos no ambiente (Richards *et al.*, 1998). Estes riscos potenciais têm levado vários segmentos da sociedade a reclamar por avaliações mais detalhadas, antes de incluir esses organismos em programas de controle de insetos (McCutchen *et al.*, 1996). Embora com alguns testes efetuados em campo, os vírus modificados não têm sido aplicados em grandes áreas, mesmo experimentalmente, ou registrados para uso comercial (Richards *et al.*, 1998).

3.4.4. Substâncias associadas aos baculovírus

Diferentes substâncias têm sido avaliadas procurando aumentar a eficiência dos vírus de insetos, entre elas, os próprios inseticidas químicos, que podem proporcionar vantagens para programas de MIP. Teoricamente, essa combinação poderia permitir: a diminuição da quantidade de cada agente, com a correspondente redução de custos; menor impacto no ambiente (águas e solos); menor prejuízo aos organismos benéficos; e reduzir a pressão de seleção, que pode promover o aparecimento de grupos de insetos resistentes a cada um dos agentes (Harper, 1986). O efeito da associação de vírus de insetos com inseticidas químicos foi relatado por Luttrell *et al.* (1979), Jaques & Morris (1981) e por Mohamed *et al.* (1983), entre outros. Estudos envolvendo inseticidas e herbicidas (utilizados em pós-emergência), mostraram que o vírus de *A. gemmatalis* não foi afetado pelos pesticidas, e a mistura com baixas doses dos inseticidas ($1/4$ a $1/8$ da dose recomendada) foi eficiente para controlar o inseto em altas populações (Moscardi, 1989; Moscardi & Sosa-Gómez, 1992; Silva, 1995). Essa estratégia tem sido recomendada quando a

população da lagarta-da-soja encontra-se acima dos níveis tolerados para a utilização do vírus isoladamente. Dados levantados no Estado do Paraná mostraram que na safra 1998/99, essa prática foi utilizada em mais de 20 % das aplicações do patógeno (Morales, 1998).

Algumas substâncias avaliadas em associação ao VPNMLd, a maioria de ácidos orgânicos e inorgânicos, em diferentes concentrações, não apresentaram detrimento ao VPN, nem causaram efeito tóxico para o inseto; apenas o ácido bórico e o ácido sórbico aumentaram a mortalidade causada pelo vírus (Shapiro & Bell, 1982). Os autores concluíram que o ácido bórico e o borato de sódio poderiam atuar como estressores para o inseto e, dessa forma, aumentar a susceptibilidade ao vírus. Resultados semelhantes com o ácido bórico foram relatados com *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Chaudhari, 1992 e Chundurwar *et al.*, 1990) e com *H. armigera* (Bijur *et al.*, 1991). Para *A. gemmatalis*, uma suspensão do VPNMAg adicionada de 0,045 g de ácido bórico/100 ml de dieta, diminuiu a CL₅₀ de $1,52 \times 10^5$ para $7,95 \times 10^2$ CPI/ml de dieta. Também o TL₅₀, com 250 poliedros/ml de dieta, foi reduzido de 13,6 dias com o VPNMAg isoladamente para 9,1 dias com o VPNMAg + ácido bórico (Morales *et al.*, 1997).

O extrato de neem, cujo principal componente é a azadiractina, obtido da planta *Azadirachta indica*, possui propriedades deterrentes e inseticidas para vários grupos de insetos (Pradham & Jotwani, 1968; Koul *et al.*, 1987; Zehnder & Warthen, 1988; Shapiro *et al.*, 1994) e, quando associado ao vírus de *L. dispar*, em diferentes concentrações, não apresentou efeito na atividade biológica do VPNMLd (Shapiro *et al.*, 1994). Entretanto, foi observada a ação deterrente do extrato, mantendo os insetos por maior período de tempo na fase larval. Foi considerado pelos autores como um efeito promissor, devido ao menor desfolhamento provocado pelos insetos, sem interferência na atividade do vírus. A azadiractina é encontrada, também, no cinamomo (*Melia azedarach*), planta encontrada vegetando em todas as regiões brasileiras. O extrato aquoso da flor dessa planta em mistura com o VPN de *A. gemmatalis* não interferiu na atividade biológica do vírus, porém, aumentou o período larval em todas as concentrações utilizadas, tanto em mistura, como isoladamente (Morales, L., M. U. Ventura & F. Moscardi, não publicado).

Uma lipoproteína codificada pelo genoma viral e denominada de fator sinérgico (FS), isolada do VG de *P. unipuncta* proveniente do Havá, demonstrou aumentar a virulência de certos baculovírus. De acordo com Tanada (1985), o FS age como uma molécula de união para os sítios receptores da membrana plasmática da célula hospedeira e como receptor para o envelope viral, facilitando a conexão entre a membrana plasmática e o envelope. Esse fator foi, também, identificado por Derksen & Granados (1988) no VG de *T. ni*, apresentando, entretanto, forma diferente de ação. O maior efeito do FS do VGTn parece ser o aumento da eficiência da infecção,

causado pelo rompimento da matriz peritrófica do inseto hospedeiro (Gallo *et al.*, 1991). Posteriormente, essa lipoproteína foi caracterizada como uma metalloprotease (Lepore *et al.*, 1996). A associação do FS ao vírus de *T. ni*, nas concentrações de 1 a 40 nanogramas (ng) por larva, aumentou a mortalidade do inseto de 20,8 %, com o vírus isoladamente, para 93,1 %, com o vírus mais o FS. Associado ao VPNMAG, causou diminuição do tempo de mortalidade de *T. ni* em até 63 horas (Gallo *et al.*, 1991).

3.4.5. Protetores contra a radiação ultravioleta

Uma grande variedade de substâncias tem sido associada aos baculovírus na tentativa de protegê-los dos efeitos da UV, prolongando, dessa forma, o efeito inseticida desses vírus. Jaques (1971) testou 29 produtos, ou combinações de produtos, como agentes protetores do vírus de *T. ni*, sugerindo que o efeito residual desse vírus pode ser prolongado por produtos com características físico-químicas diferentes e com diferentes mecanismos de ação. Nesse trabalho, o melhor resultado obtido nas aplicações em folhas de repolho foi a associação do vírus com albumina de ovo e tinta nanquim.

Uma estreita correlação entre a absorvância da luz UV – com comprimento de ondas entre 280 e 310 nanômetros (região B), de diferentes substâncias químicas, utilizadas em cosméticos como protetor solar – e a proteção do VPNMLd, foi relatada por Shapiro *et al.* (1983), sendo a melhor proteção obtida com um composto derivado de ácido sulfônico na concentração de 10%. Outro produto que demonstrou efeito protetor ao VPNMLd foi o ácido úrico (Shapiro, 1984). Em trabalhos recentes, Ignoffo *et al.* (1997) avaliaram, para o VPN de *H. zea*, o efeito protetor de cinco produtos – benzopurpurin, alizarin, amarelo brilhante, Shade (adjuvante comercial formulado pela Sandoz) e carvão – contra a radiação ultravioleta, tanto da luz natural, como a obtida de lâmpadas simulando a radiação de UV-A (320-400nm) e UV-B (290-320 nm). O benzopurpurin e o carvão conferiram a melhor proteção ao VPN exposto a uma fonte artificial de UV, e apenas o carvão, em luz natural.

3.4.6. Branqueadores óticos

O primeiro relato de um branqueador ótico (Tinopal DCS) como protetor para um VPN, contra a radiação UV, foi de Martignoni & Iwai (1985), para o vírus de *O. pseudotsugata*. Em estudos posteriores, envolvendo protetores contra UV para o VPNMLd, Shapiro (1992) relatou 17 branqueadores óticos, utilizados na concentração de 1,0 %, mantendo a atividade original

remanescente (AOR) do vírus maior do que 70 %, após a exposição à radiação; além disso, oito branqueadores, todos do grupo do stilbene disulfônico, promoveram proteção completa da atividade biológica do VPN, *i.e.*, 100 % da AOR. Nenhum dos branqueadores testados provocou mortalidade, nem afetou adversamente o crescimento ou o desenvolvimento dos insetos. Com os branqueadores selecionados, mesmo na concentração de 0,1 %, houve proteção do VPN, sendo que o efeito obtido foi diretamente proporcional à concentração utilizada. Estudos de aplicações do VPN de *Anagrapha falcifera* (Kirby) (Lepidoptera: Noctuidae) (VPNMAf), associado ao branqueador ótico Tinopal LPW (= Calcofluor M2R, Sigma Chemical Co.), na concentração de 1,0 % para o controle de *H. zea* em parcelas de algodão, demonstraram que a perda de 50% da atividade do vírus ocorreu aos 11,5 dias com o branqueador e aos 5,5 dias com o vírus isoladamente (Vail *et al.*, 1993).

Segundo Villaume (1958), os branqueadores óticos são capazes de absorver a energia da luz UV e transformá-la em luz visível. Shapiro & Argauer (1995) relataram que esses compostos absorvem rapidamente a luz ultravioleta e emitem luz na porção azul do espectro visível. Com a absorção da radiação A-UV e B-UV, eles proporcionam, para alguns microorganismos, proteção contra os efeitos da radiação UV. Além de propiciar proteção contra a radiação ultravioleta, aos vírus testados – também ao nematóide entomopatogênico *Steinernema carpocapsae* Weiser (Nickle & Shapiro, 1992) –, os branqueadores óticos do grupo do stilbene disulfônico afetam, também, o tempo e a taxa de mortalidade dos insetos por vírus (Shapiro, 1992; Vail *et al.*, 1993; Webb *et al.*, 1994a; 1994b; Shapiro & Argauer, 1995; Zou & Young, 1996; Fuxa & Richter, 1998; Grewal *et al.*, 1998). Os componentes e os derivados do branqueador ótico Tinopal LPW, utilizados separadamente, não apresentaram os mesmos efeitos do branqueador ótico (Shapiro & Argauer, 1997).

Shapiro & Robertson (1992) avaliaram cinco branqueadores óticos (Leukophor BS, Leukophor BSB, Phorwite AR, Phorwite RKH e Tinopal LPW) nas concentrações de 0,001%, 0,01%, 0,1% e 1,0%, associados ao VPNMLd. A adição desses branqueadores ao vírus reduziu a CL₅₀ de 18.000 CPI/ml para valores entre 10 CPI/ml e 44 CPI/ml, *i.e.*, uma redução entre 400 e 1.800 vezes aproximadamente. Além disso, a associação do VPN aos branqueadores diminuiu, também, o TL₅₀ em seis dias, com o VPN na concentração de 1×10^5 CPI/ml. Em geral, os branqueadores óticos com maior intensidade de fluorescência, propriedade comum dessas substâncias, apresentaram, também, maior efeito na atividade relativa do VPNMLd (Argauer & Shapiro, 1997).

A associação do branqueador ótico Blankophor BBH ao “Gypchek – nome comercial do VPN de *L. dispar* –, aplicado em parcelas de carvalho, na concentração de $2,5 \times 10^{11}$ CPI/ha,

diminuiu o TL₅₀ de 20,1 dias para 12,1 dias, quando utilizado na concentração de 0,5 % (14 kg por ha), e para 15,3 dias, na concentração de 0,05 % (1,4 kg por ha). Houve, também, aumento na mortalidade dos insetos de 79,0 % para 90,0%, quando usado na concentração de 0,5 % (Webb *et al.*, 1994b). Também, uma formulação experimental do VPN de *L. dispar* adicionada ao Blankophor BBH, nas concentrações de 0,5 % e 0,1 %, provocou redução significativa na população de lagartas, bem como na desfolha das plantas, quando comparado com as plantas testemunhas. A avaliação de resíduos desse branqueador, aplicado em árvores de carvalho, nas concentrações de 0,5 %, 0,1 % e 0,02 %, apresentaram quantidades aderidas à folhagem, no dia da aplicação, de até 1.332 microgramas/g de folha seca (Webb *et al.*, 1996).

Com os resultados observados no aumento da atividade do VPNMLd, pela adição de Phorwite AR, outros vírus associados a branqueadores óticos foram, também, avaliados para essa praga de floresta. O vírus de *A. californica*, mesmo em altas concentrações (10⁷ CPI/ml), não produziu infecção no inseto, e quando associado ao Phorwite AR provocou 77,0 % de mortalidade. De forma semelhante, o vírus do gênero *Entomopoxvirus* de *Amsacta* sp. (Lepidoptera: Arctiidae), originalmente não infectivo a *L. dispar*, provocou 54,5 % de larvas mortas quando associado ao branqueador. Também, a adição de Phorwite AR a 1,0 % na suspensão de um vírus de poliedrose citoplasmática de *L. dispar* (VPCLd) reduziu a CL₅₀ de 1,2 × 10⁵ CPI/ml, para 1,5 × 10² CPI/ml, e o TL₅₀ de 13,2 dias para 8,4 dias. (Shapiro & Dougherty, 1994).

Em lagartas de *S. frugiperda*, a adição de Tinopal LPW, na concentração de 0,1 %, a dois isolados geográficos de VPN, causou aumento na mortalidade das duas preparações. A CL₅₀ com o VPN isoladamente variou entre 0,2 CPI/mm² de dieta e 6,1 CPI/mm² de dieta, mas situando-se entre 2,0 × 10⁻⁵ CPI/mm² de dieta, e 4,0 × 10⁻² CPI/mm² de dieta para o VPN + Tinopal LPW, correspondendo a uma redução entre 164 e 303.000 vezes (Hamm & Shapiro, 1992).

A avaliação de um conjunto de vírus associados ao Tinopal LPW, para o controle de *H. zea*, mostrou redução na CL₅₀ variando entre 2,0 vezes para o VPN de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) (VPNMGm) e 50,0 vezes para o VPNMAc. A adição do Tinopal LPW diminuiu, também, o TL₅₀ em três dias, exceto com o VPNSHz que foi semelhante ao VPN isoladamente (Shapiro & Vaughn, 1995).

A adição de Calcofluor a 0,1 % ao VPN de *P. includens* (VPNPi) reduziu a CL₅₀ de 970 CPI/mm² de dieta para 0,0625 CPI/mm² de dieta e o TL₅₀ de 15,9 dias para 6,4 dias, na concentração de 0,08 %. Em folhas de soja pulverizadas com o equivalente a 9,6 × 10¹⁰ CPI/ha, a mortalidade de lagartas de *P. includens* aumentou de 10,9 % com o VPN para 29,2 % com o

VPN adicionado de Calcofluor a 0,1 %. Com folhas de algodão, a mortalidade pelo VPN sem o branqueador foi de 24,4 % e de 37,0 % quando associado ao branqueador. Nos testes em campo de soja e com população natural de *P. includens*, a mortalidade foi de 32,0 % com o VPN na dose de $1,5 \times 10^{12}$ CPI/ha, e de 47,0 % com o VPN associado ao branqueador a 1,0 % (Zou & Young, 1996).

O VPNMAf é relatado infectando 31 espécies de Lepidoptera em 10 famílias (Hostetter & Puttler, 1991), apresentando potencial para ser utilizado como agente de controle microbiano em diferentes complexos de pragas (Farrar & Ridgway, 1997; Grewal *et al.*, 1998). A infectividade desse VPN, quando associado ao branqueador ótico Tinopal LPW, foi avaliada nos seguintes insetos: *H. virescens*, *S. exigua*, *H. zea* e *T. ni*, todos considerados pragas de importância econômica em sistemas agrícolas. O aumento da eficiência do VPN, avaliado por meio da CL_{50} , variou entre 2,9 vezes e 13,6 vezes, dependendo da espécie, sendo o maior efeito observado em lagartas de *T. ni*. O TL_{50} foi, também, alterado de forma significativa, particularmente em baixas concentrações do vírus (Vail *et al.*, 1996). O VPNMAf associado ao Blankophor BBH foi, também, estudado por Farrar & Ridgway (1997) em *H. zea*, *S. exigua* e *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Os autores constataram aumento na mortalidade das três espécies em razão da associação do branqueador, sendo que a diferença na potência do VPN, observada entre as espécies, não foi alterada significativamente. De forma semelhante, Grewal *et al.* (1998) relataram que a adição de Blankphor a 1,0 % ao VPNMAf aumentou significativamente a virulência em *H. zea*, *S. exigua*, *S. frugiperda* e *P. xylostella*, sendo que o maior aumento da atividade viral foi observado nas espécies *S. exigua* e *P. xylostella*.

Em razão dois efeitos observados – potencialização e proteção do vírus contra a radiação ultravioleta – na associação dos branqueadores óticos ao VPNMLd, Dougherty *et al.* (1996) determinaram, separadamente, o grau de proteção e o efeito potencializador para o VPNMAc, utilizado em *T. ni*, e o VPNMLd no próprio hospedeiro. Nesse estudo, a CL_{50} do VPNMLd decresceu 214 vezes e a CL_{50} do VPNMAc decresceu 41 vezes. Com os dados do VPN protegido da UV, foi possível distinguir entre a proteção e o aumento de virulência para ambos os sistemas estudados, determinando, ainda, que o VPNMAc é mais resistente ao comprimento de onda utilizado no trabalho (302 nm), do que o VPNMLd.

Recentemente, Fuxa & Richter (1998) estudaram a reversão de resistência para o sistema VPNMAg-*A. gemmatalis*, considerando que o sistema apresenta significativo potencial para este problema, já que em laboratório esse inseto apresentou elevados níveis de resistência e que o vírus tem sido aplicado em aproximadamente 1,0 milhão de ha anualmente no Brasil. Paralelamente a interrupção da pressão de seleção, que selecionou uma população do inseto cinco

vezes mais resistente, os autores consideraram que o uso de Tinopal LPW, com efeito sinérgico no VPN, pode contrapor-se à resistência nesse sistema. Esses resultados, entretanto, levantam a questão para os autores de que o aumento da virulência provocado por essa associação poderia desenvolver mais rapidamente colônias de insetos resistentes.

O mecanismo de ação desses branqueadores óticos não é, ainda, totalmente conhecido. Shapiro & Robertson (1992) postularam que estas substâncias podem inibir ou alterar a matriz peritrófica, criando fendas que facilitariam a penetração de uma grande quantidade de nucleocapsídeos do vírus e, dessa forma, aumentar a eficácia do patógeno. A matriz peritrófica, em muitos insetos, é composta principalmente de quitina, proteínas e ácido hialurônico, revestindo o intestino médio e agindo como uma barreira à infecção (Brandt *et al.*, 1978).

Adams *et al.* (1994) demonstraram que após 48 horas da inoculação do VPNMLd havia diferenças no núcleo das células colunares das larvas infectadas com o VPN e com o VPN associado ao branqueador ótico. O exame em microscópio eletrônico revelou que as lagartas alimentadas com o VPN isoladamente não continham virions, enquanto que as lagartas alimentadas com o VPN mais o branqueador apresentavam muitos núcleos das células colunares do intestino médio hipertrofiados. Esses dados sugerem que o processo infectivo ocorre mais rapidamente na presença dos branqueadores, influenciando na velocidade das infecções primária e, conseqüentemente, secundária assim como, no tempo de mortalidade do inseto hospedeiro. Recentemente, Wang & Granados (1999) relataram que as proteínas componentes da matriz peritrófica poderiam ser solubilizadas *in vitro* pelo Calcofluor, um branqueador do grupo do ácido stilbene disulfônico. Os ensaios *in vivo* demonstraram que o branqueador inibiu, de forma severa, a formação da matriz peritrófica em cinco espécies de Lepidoptera, incluindo *T. ni*, *L. dispar*, *H. zea* e *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). Essa inibição foi acompanhada por um aumento da suscetibilidade das larvas de *T. ni* à infecção por baculovírus. A ruptura da ligação quitina-proteína da matriz peritrófica, causada pelo Calcofluor, resultou na degradação do muco intestinal, principal proteína e normalmente resistente a degradação, que tem uma importante função de proteção no intestino médio do inseto. Segundo os autores, o estudo revela o modo de ação do Calcofluor como agente potencializador para vírus de insetos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi efetuado no laboratório de patologia de insetos e em casa de vegetação do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja), em Londrina-Paraná, no período compreendido entre agosto de 1997 e julho de 2000.

4.1. Material biológico utilizado na pesquisa

4.1.1. Insetos

Foram utilizadas três espécies de insetos, obtidos de colônias estabelecidas segundo Hoffmann-Campo *et al.* (1985), em dieta artificial modificada de Greene *et al.* (1976). As espécies *A. gemmatilis* e *R. nu* foram coletadas em campos de soja, e *S. frugiperda* em campo de milho, na região de Londrina, Paraná. As lagartas de *A. gemmatilis* resistentes ao seu VPN provieram de colônias de insetos da 46^a, 47^a e 48^a geração, submetidas à pressão de seleção pelo vírus, e estabelecidas no mesmo insetário a partir de insetos obtidos em lavoura de soja no município de Sertanópolis, PR.

4.1.2. Vírus

O VPNMAg foi obtido da coleção de entomopatógenos do Centro Nacional de Pesquisa de Soja da Embrapa, coletado em Londrina-Paraná em 1979 e denominado isolado LD79.

4.2. Branqueadores óticos

Dois grupos de branqueadores óticos foram utilizados na pesquisa. Os branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico foram: Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Uvitex BHT (Ciba Especialidades Químicas Ltda.); BRY 10 D2 100, BRY 10 D2 150 (Makhteshim Chemical Works Ltda.); Hostalux KS-N, Hostalux ETBN (Hoechst); Leukophor DUB, Leukophor BSBB-2 (Clariant S.A.). Os derivados do composto diestiril bifenil foram: Uvitex NFW 450 e Tinopal CBS (Ciba Especialidades Químicas Ltda.).

4.3. Multiplicação do VPNMAg

A suspensão original do vírus em estoque foi diluída em água estéril, obtendo-se uma concentração de $2,5 \times 10^6$ corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml, avaliada em câmara de Neubauer. Nessa suspensão foram mergulhadas pequenas porções ($2,0 \text{ cm}^3$) de dieta artificial de Greene *et al.* (1976), omitindo-se o formol (Vail *et al.*, 1968). A dieta contaminada foi colocada em copos de plástico de 50 ml e após a secagem da superfície foram colocadas quatro lagartas de 3º instar de *A. gemmatalis* por copo, mantidas em câmara B. O. D. a $26 \pm 2^\circ \text{ C}$, umidade relativa (UR) de $70 \pm 10 \%$ e fotofase de 14 horas. As lagartas mortas por vírus foram maceradas em água estéril e a mistura resultante foi coada em algodão e centrifugada a 1.000 rpm durante dois minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 8.000 rpm por 20 minutos, sendo, então, o “pellet” diluído em água estéril, homogeneizado, contado em câmara de Neubauer e armazenado em freezer (-17° C) em frascos de plástico de 50 ml, como suspensão estoque com $1,4 \times 10^9$ CPI/ml.

4.4. Bioensaios

4.4.1 Procedimentos gerais

Para cada teste a ser conduzido, primeiramente o VPNMAg ($1,4 \times 10^9$ CPI/ml) foi diluído em água estéril em concentrações variando entre $1,0 \times 10^9$ CPI/ml e $1,0 \times 10^2$ CPI/ml. As diluições dos branqueadores foram obtidas tomando-se 0,10 g/ml, 0,25 g/ml ou 0,50 g/ml do branqueador para 100 ml de água destilada, obtendo-se, respectivamente, as diluições 0,10 %, 0,25 % e 0,50 %.

Após a primeira série de diluições do VPN, as preparações finais foram obtidas tomando-se 1,0 ml de cada concentração do vírus e adicionando a 9,0 ml de água destilada, ou de uma diluição do branqueador, sendo, então, 0,15 ml da preparação desejada pipetada e distribuída uniformemente sobre a superfície da dieta artificial (50 ml), contida em copos de papel parafinado de 400 ml. Após a secagem da suspensão, foram colocadas seis lagartas em cada copo, sendo os tratamentos mantidos em câmara B. O. D. a $26 \pm 2^\circ \text{ C}$, UR de $70 \pm 10 \%$ e fotofase de 14 horas. As avaliações foram realizadas diariamente, a partir do quinto dia da infecção, com a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925) e a concentração letal

média (CL_{50}), intervalo de confiança e o χ^2 determinados por análise de próbites, baseada no método de Finney (1971).

A atividade relativa (AR) foi calculada como sendo a razão entre a CL_{50} do vírus isoladamente, e a CL_{50} do vírus adicionado ao branqueador. O tempo médio de mortalidade (TM) foi calculado para a concentração de $1,0 \times 10^4$ CPI/ml do vírus, de acordo com a seguinte equação:

$$TM = \frac{\Sigma (D1 \times N1 + D2 \times N2 \dots + Dn \times Nn)}{\text{Número total de lagartas mortas pelo VPNMAg}}$$

onde:

D= Dia da avaliação

N=Número de larvas mortas pelo VPNMAg

4.4.2. Avaliação preliminar

O primeiro teste foi efetuado para verificar a existência de branqueadores óticos, encontrados no mercado brasileiro, com alguma eficiência quando associados ao VPNMAg, bem como selecionar os produtos com maior potencial para avaliações dos efeitos biológicos dessa associação.

No teste preliminar tentou-se conduzir os bioensaios incorporando-se o vírus à dieta artificial, conforme descrito por Morales & Moscardi (1993b), porém, a limitação do volume disponível dos branqueadores, e o tempo gasto na condução dos testes, determinaram a modificação nos procedimentos quanto a administração do vírus às lagartas. Nesse ensaio, o VPNMAg foi utilizado em concentrações variando entre $1,0 \times 10^7$ CPI/ml, e 10 CPI/ml, e os branqueadores óticos na concentração de 0,5 % (peso/volume ou volume/volume). Foram utilizados os seguintes produtos encontrados no mercado brasileiro: Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Tinopal CBS, BRY 10 D2 100, BRY 10 D2 150, Hostalux ETBN, Hostalux KS-N, Leukophor DUB, Leukophor BSBB-2, Uvitex NFW 450, Uvitex BHT. Os tratamentos do teste preliminar incluíram, além da associação dos branqueadores com o VPN, uma testemunha com água e uma testemunha com cada branqueador a 0,5 % utilizado isoladamente. Nesse bioensaio, foram utilizadas 30 lagartas de *A. gemmatalis* por tratamento, inoculadas no 2º instar, repetidos três vezes, e os demais procedimentos conforme descritos no item 4.4.1.

4.4.3. Efeito dos branqueadores óticos selecionados na CL₅₀ do VPNMAg e no TM, com lagartas de *A. gemmatalis* inoculadas no 2º instar

O detalhamento da associação dos branqueadores óticos selecionados ao vírus de *A. gemmatalis*, em relação a CL₅₀ e TM, foi efetuado com os seguintes branqueadores óticos: Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Leukophor DUB e BRY 10 D2 100, nas concentrações de 0,10 %, 0,25 % e 0,50 %. O VPNMAg foi utilizado em concentrações variando entre $1,0 \times 10^6$ CPI/ml e 10 CPI/ml, com 35 lagartas por tratamento e cinco repetições. As avaliações foram realizadas diariamente, após o quinto dia da infecção até o décimo dia, sendo os demais procedimentos conforme descrito no item 4.4.1. O TM foi avaliado com o VPNMAg na concentração de $1,0 \times 10^4$ CPI/ml, seguindo os procedimentos gerais para os bioensaios, utilizando-se os mesmos branqueadores selecionados e diluídos nas mesmas concentrações. Cada teste foi repetido três vezes com 35 lagartas por tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. O cálculo do TM foi feito de acordo com a fórmula descrita no item 4.4.1.

4.4.4. Efeito dos branqueadores óticos selecionados na CL₅₀ do VPNMAg, com lagartas de *A. gemmatalis* inoculadas no 4º instar.

A concentração do VPNMAg variou entre $1,0 \times 10^2$ CPI/ml e $1,0 \times 10^8$ CPI/ml, e os branqueadores óticos selecionados foram testados a 0,5 %, utilizando-se 30 lagartas do 4º instar por tratamento/repetição, com três repetições e os demais procedimentos para os bioensaios (4.4.1.).

4.4.5. Ensaio em casa de vegetação

O ensaio foi efetuado utilizando-se plantas de soja no início do florescimento (R1-R2), previamente semeadas em vasos e mantidas em casa de vegetação. Foram utilizados sete vasos (seis plantas/vaso) para cada tratamento, sendo a aplicação do vírus isoladamente e a aplicação do vírus associado ao Tinopal DMS feitas com pulverizador costal manual de precisão (CO₂), equipado com um bico cone JD 10-1, regulado para liberar o equivalente a 100 litros de calda por ha. Os tratamentos utilizados foram: 1) água (testemunha), 2) VPNMAg ($3,0 \times 10^{10}$ CPI/ha),

3) VPNMAg ($1,5 \times 10^{11}$ CPI/ha), 4) VPNMAg ($3,0 \times 10^{10}$ CPI/ha) + Tinopal DMS a 0,10 %, 5) VPNMAg ($3,0 \times 10^{10}$ CPI/ha) + Tinopal DMS a 1,0 %, 6) VPNMAg ($1,5 \times 10^{11}$ CPI/ha) + Tinopal DMS a 0,10 %, 7) VPNMAg ($1,5 \times 10^{11}$ CPI/ha) + Tinopal DMS a 1,0 % e 8) Tinopal DMS a 1,0 %. Após a aplicação foram coletadas quatro folhas do terço superior das plantas relativas a cada tratamento. As coletas foram feitas imediatamente após a pulverização (dia zero) e a cada dois dias, até o 12º dia. As folhas, com o pecíolo envolto em algodão úmido, foram colocadas, individualmente, em recipientes de plástico de 132,25 cm², modelo “Gerbox”, contendo papel de filtro no fundo. Em cada recipiente foram colocadas 20 lagartas do segundo ínstar (80 por tratamento), mantidos durante 24 horas (tempo suficiente para o consumo da folha) em câmara B. O. D. a $26 \pm 2^\circ$ C, UR de 70 ± 10 % e fotofase de 14 horas, sendo, então, transferidas individualmente para copos de plástico contendo dieta artificial, e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. As avaliações foram realizadas diariamente do 5º até o 10º dia da infecção, verificando a mortalidade que foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925).

4.4.6. Efeito dos branqueadores óticos selecionados na CL₅₀ do VPNMAg, com lagartas de *A. gemmatalis* resistentes ao VPN inoculadas no 2º ínstar

As lagartas utilizadas neste ensaio (46^a, 47^a e 48^a geração) apresentavam resistência maior do que 3.500 vezes em relação à colônia suscetível utilizada nos demais ensaios. A concentração do VPNMAg variou entre $1,0 \times 10^5$ CPI/ml e 10 CPI/ml, para o vírus associado aos branqueadores óticos e entre $1,0 \times 10^9$ CPI/ml, e $1,0 \times 10^5$ CPI/ml, com o VPN isoladamente. Os branqueadores selecionados foram utilizados a 0,5 % com três repetições e 30 lagartas por tratamento/repetição, sendo os demais procedimentos dos bioensaios conforme os já descritos no item 4.4.1.

4.4.7. Efeito dos branqueadores óticos selecionados na CL₅₀ do VPNMAg, com lagartas de *S. frugiperda* e *R. nu* inoculadas no 3º ínstar

Os ensaios com esses hospedeiros alternativos foram conduzidos com o VPNMAg nas concentrações entre $1,0 \times 10^9$ CPI/ml e $1,0 \times 10^4$ CPI/ml, e os branqueadores selecionados, na concentração de 0,5 %. Os ensaios foram realizados conforme descrito nos procedimentos gerais, com três repetições e 30 lagartas por tratamento/repetição. Para *S. frugiperda* foi

necessário alterar parte do procedimento, em razão do canibalismo observado nesta espécie. Dessa forma, os insetos foram mantidos inicialmente em número de quatro por recipiente de 400 ml, durante quatro dias, sendo, então, individualizados em copos menores, de 50 ml, contendo dieta artificial não contaminada. As avaliações foram realizadas diariamente, após o 5º dia da infecção, até o 12º dia, não sendo possível calcular a CL₅₀ do VPNMAg isoladamente com lagartas de *S. frugiperda*, porque a mortalidade na maior concentração utilizada foi de apenas 6,54 %.

4.4.8. Efeito dos branqueadores óticos na proteção do VPNMAg contra a radiação ultravioleta

Para determinar o nível de proteção contra a radiação UV, conferido por um branqueador ótico, o VPNMAg foi diluído em uma concentração de 1×10^5 CPI/ml (suficiente para provocar, aproximadamente, 80 % de mortalidade das lagartas de *A. gemmatalis* inoculadas no 2º instar), em água destilada ou em uma concentração de branqueador de 0,5 %. Em recipientes de plástico de 132,2 cm², modelo “Gerbox”, foram colocados 200 ml de dieta artificial, sobre os quais foram pipetados e espalhados 0,3 ml da suspensão viral. Os branqueadores óticos utilizados foram: Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Tinopal CBS, BRY 10 D2 100, BRY 10 D2 150, Hostalux ETBN, Hostalux KS-N, Leukophor DUB, Leukophor BSBB-2, Uvitex NFW 450, Uvitex BHT. Os recipientes com a dieta contendo o vírus, ou o vírus mais o branqueador, foram expostos, dentro de uma capela de fluxo laminar, à luz UV durante 90 minutos, produzida por uma lâmpada germicida de 30 w (modelo NIS G30 T8), localizada a 40 cm de altura dos recipientes. Recipientes iguais, não expostos à radiação, foram utilizados como testemunhas. Após o período de radiação, em cada recipiente - três por tratamento e repetidos três vezes - foram colocadas 10 lagartas de 2º instar de *A. gemmatalis* e mantidos nas condições descritas no item 4.4.1. As avaliações foram realizadas diariamente, do 5º ao 10º dia da infecção, sendo os dados obtidos submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 0,5 % de probabilidade. A porcentagem de mortalidade causada pelo vírus, com e sem exposição à radiação UV, foi o critério utilizado para a avaliação da atividade original remanescente (AOR) (Ignoffo & Batzer, 1971). O tempo de exposição utilizado neste ensaio foi determinado, em ensaio preliminar, utilizando-se o VPNMAg e o VPNMAg em mistura com Tinopal UNPA-GX, expostos durante 90, 180 e 360 minutos.

4.4.9. Efeito de branqueadores óticos selecionados na preferência alimentar de lagartas de *A. gemmatalis*.

Os branqueadores óticos selecionados (Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Leukophor DUB e BRY 10 D2 100) foram inicialmente diluídos a 0,5 % em água destilada, sendo 0,07 ml dessa solução, ou de água destilada pura, pipetados em porções de 2,0 cm³ (2,0 cm x 2,0 cm x 0,5 cm) de dieta artificial de Greene *et al.* (1976). Quatro porções da dieta tratada - duas com o branqueador ótico e duas com água - foram distribuídas equidistantes em recipientes de plástico modelo "Gerbox", contendo papel de filtro no fundo. Após a secagem do alimento, foram colocadas 16 lagartas de *A. gemmatalis* de 2º instar em cada recipiente, mantidas em condições ambientais. Para cada produto, foram utilizados 20 recipientes com um total de 320 lagartas para cada branqueador. Foram feitas oito avaliações com 12 horas de intervalo entre elas, verificando a presença ou ausência de insetos sobre as porções dos alimentos. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 0,5 % de probabilidade.

4.4.10. Efeito no peso de pupas de *A. gemmatalis*, formadas de lagartas alimentadas em dieta contendo os branqueadores óticos selecionados

As pupas utilizadas nessa avaliação foram oriundas de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas, a partir do 2º instar, em dieta artificial contendo os branqueadores óticos selecionados (Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Leukophor DUB e BRY 10 D2 100) a 0,5 %. A solução do branqueador (0,3 ml) foi espalhada sobre a superfície da dieta artificial, contida nos copos de 400 ml. As testemunhas, constituíram-se de pupas oriundas de lagartas alimentadas em dieta artificial adicionada apenas de água destilada. Para cada tratamento, foram avaliadas 33 pupas, recolhidas e pesadas diariamente a partir do 12º dia. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 0,5 % de probabilidade. Os demais procedimentos são os descritos no item 4.4.1.

4.4.11. Formulação do VPNMAg com Tinopal DMS

O VPNMAg foi formulado com Tinopal DMS em substituição ao caulim, que é utilizado como substância inerte na formulação desenvolvida pela Embrapa Soja e comercializada por

diversas empresas privadas. Inicialmente, 200 lagartas mortas pelo vírus foram trituradas, coadas e tomadas duas porções iguais de 10 gramas cada uma. Em cada uma das porções foram adicionadas 10 gramas da substância inerte, caulim ou Tinopal DMS, sendo a pasta formada misturada, homogeneizada e espalhada em uma superfície de vidro. Após a secagem em condições ambientais, as formulações foram trituradas manualmente e armazenadas em freezer. O ensaio foi feito incorporando-se o vírus formulado à dieta artificial conforme descrito por Morales & Moscardi (1993b), nas concentrações de 60, 180, 540, 1600 e 4860 CPI/ml de dieta. Uma diluição de vírus purificado foi utilizada como comparação. As avaliações foram realizadas diariamente, após o 5º dia da infecção até o 10º dia, com a mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925) e a CL_{50} , intervalo de confiança e o χ^2 determinados no nono dia, por meio de análise de próbites, baseada no método de Finney (1971).

4.4.12. Efeito do branqueador ótico Tinopal DMS no número de corpos poliédricos de inclusão (CPI), produzidos em lagartas de *A. gemmatalis* mortas pelo VPN

Para avaliar o número de poliedros formados em lagartas mortas pelo vírus, e pelo vírus associado ao branqueador ótico Tinopal DMS, foram inoculadas 120 lagartas de várias idades com uma suspensão de vírus na concentração de $1,0 \times 10^6$ CPI/ml, e 120 lagartas com uma preparação do vírus ($1,0 \times 10^6$ CPI/ml) associado ao branqueador ótico a 0,5 %. Para cada tratamento foram avaliadas 70 lagartas mortas pelo vírus. Neste ensaio, manteve-se os mesmos procedimentos gerais descritos do item 4.4.1, até a morte dos insetos. Os insetos mortos pelo VPNMAg foram recolhidos diariamente, a partir do 5º dia, pesados, colocados individualmente em recipientes de vidro e armazenados em freezer (- 17° C) até o momento da avaliação, feita em câmara de Neubauer. Para a contagem do número de poliedros, as lagartas foram degeladas e maceradas, sendo os recipientes completados até 5 ml com água destilada. Conseguiu-se melhor homogeneização, utilizando-se esferas de vidro dentro dos recipientes, com agitação por alguns segundos. O número de poliedros produzidos foi comparado pelo teste t ($P \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Efeito da associação de branqueadores óticos na CL_{50} do VPNMAg, inoculado em lagartas de 2º instar de *Anticarsia gemmatalis*

A adição de branqueadores óticos encontrados no mercado brasileiro, derivados do ácido stilbene disulfônico, aumentou a atividade do VPNMAg, reduzindo a CL_{50} , em até 91 vezes, e o TM das lagartas, em mais de três dias. Dos 11 branqueadores óticos avaliados, sete deles reduziram a CL_{50} do VPNMAg, e entre os branqueadores eficientes houve grande diferença no aumento da atividade do vírus (Tabela 1).

A associação de Tinopal UNPA-GX ao VPNMAg, determinada dez dias após a infecção, reduziu a CL_{50} de 7.083,0 (5.795,1-10.759,8) CPI/ml para 77,8 (40,5-117,4) CPI/ml, indicando uma atividade relativa (AR) de 91,0 vezes. Os demais branqueadores que diminuíram a CL_{50} do VPNMAg foram: o BRY 10 D2 100 para 172,4 (95,9-294,9) CPI/ml (AR de 41,1 vezes), o Tinopal DMS para 198,1 (120,2-314,7) CPI/ml (AR de 35,7 vezes), o Leukophor DUB para 632,0 (407,1-990,5) CPI/ml (AR de 11,2 vezes), o Uvitex BHT para 1.457,7 (969,2-2.338,4) CPI/m (AR de 4,8 vezes), o Hostalux KS-N para 2.038,8 (1.390,2-3.161,1) CPI/ml (AR de 3,5 vezes) e o BRY 10 D2 150 para 2.528,5 (1.560,5-4.524,3) CPI/ml (AR de 2,8 vezes). Dos branqueadores avaliados que não aumentaram a mortalidade de *A. gemmatalis* pelo VPNMAg (Tinopal CBS, Leukophor BSBB, Hostalux ETBN e Uvitex NFW), dois são branqueadores óticos derivados do composto diestiril bifênil (Uvitex NFW 450 e Tinopal CBS). Nenhum dos branqueadores óticos utilizados isoladamente provocou mortalidade nos insetos. Observação semelhante foi feita por Shapiro (1992).

O TM, calculado com o vírus na concentração de $1,0 \times 10^4$ CPI/ml, também foi afetado pelos branqueadores utilizados a 0,5 % (Tabela 1). Para o vírus isoladamente, o TM foi de 9,91 dias; para o VPNMAg associado aos branqueadores, o TM variou entre 6,81 dias, com o Tinopal UNPA-GX – portanto, uma diferença de 3,1 dias –, e 9,95 dias para o Uvitex NFW, que não apresentou nenhum efeito no TM. O Tinopal DMS reduziu o TM em 2,86 dias, enquanto o BRY 10 D2 100 e o Leukophor DUB reduziram o TM em 2,65 dias e 2,24 dias, respectivamente. Nesse ensaio, o produto mais eficiente, tanto na avaliação da CL_{50} , quanto na avaliação do TM, foi o Tinopal UNPA-GX. Para a realização dos experimentos subsequentes, considerou-se apenas os quatro produtos mais eficientes nesta primeira etapa, *i.e.*, Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, Leukophor DUB e BRY 10 D2 100.

Tabela 1. Efeito de branqueadores óticos, na concentração de 0,5 %, associados ao vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* e inoculado em lagartas do 2º instar.

Tratamentos ¹	CL ₅₀ ²	Intervalo de Confiança (95 %)	AR ³	TM ⁴	χ^2 (ns)
VPNMAg + água	7.083,0	5.795,1 - 10.759,8	1,0	9,91	0,61
+Tinopal UNPA-GX	77,8	40,5 - 117,4	91,0	6,81	1,65
+Tinopal DMS	198,1	120,2 - 314,7	35,7	7,05	3,58
+Tinopal CBS	11.205,4	6.873,4 - 20.936,4	0,6	9,93	2,68
+Leukophor DUB	632,0	407,1 - 990,5	11,2	7,67	1,40
+Leukophor BSBB	5.186,8	2.913,7 - 11.340,4	1,4	9,27	1,72
+Hostalux KS-N	2.038,8	1.390,2 - 3.161,1	3,5	8,74	1,68
+Hostalux ETBN	4.856,3	3.299,6 - 7.684,1	1,4	9,11	1,56
+BRY 10 D2 100	172,4	95,9 - 294,9	41,1	7,26	0,39
+BRY 10 D2 150	2.528,5	1.560,5 - 4.524,3	2,8	8,03	1,95
+Uvitex BHT	1.457,7	969,2 - 2.338,4	4,8	9,28	5,52
+Uvitex NFW	23.534,9	12.230,0 - 65.765,2	0,3	9,95	2,54

¹30 larvas por tratamento para cada concentração; três repetições.

²Concentração letal média (CL₅₀) expressa em corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

³Atividade Relativa (AR) foi calculada dividindo-se a CL₅₀ do VPNMAg pela CL₅₀ do VPNMAg + branqueador ótico.

⁴TM = Tempo de mortalidade em dias.

5.2. Efeito da associação dos branqueadores óticos selecionados na CL₅₀ do VPNMAg, inoculado em lagartas de 2º instar de *Anticarsia gemmatalis*

A atividade relativa (AR) do VPN de *A. gemmatalis* aumentou com a associação de todos os branqueadores óticos testados, considerando a relação entre log. da concentração vs. probabilidade de mortalidade (Próbites) (Fig. 1).

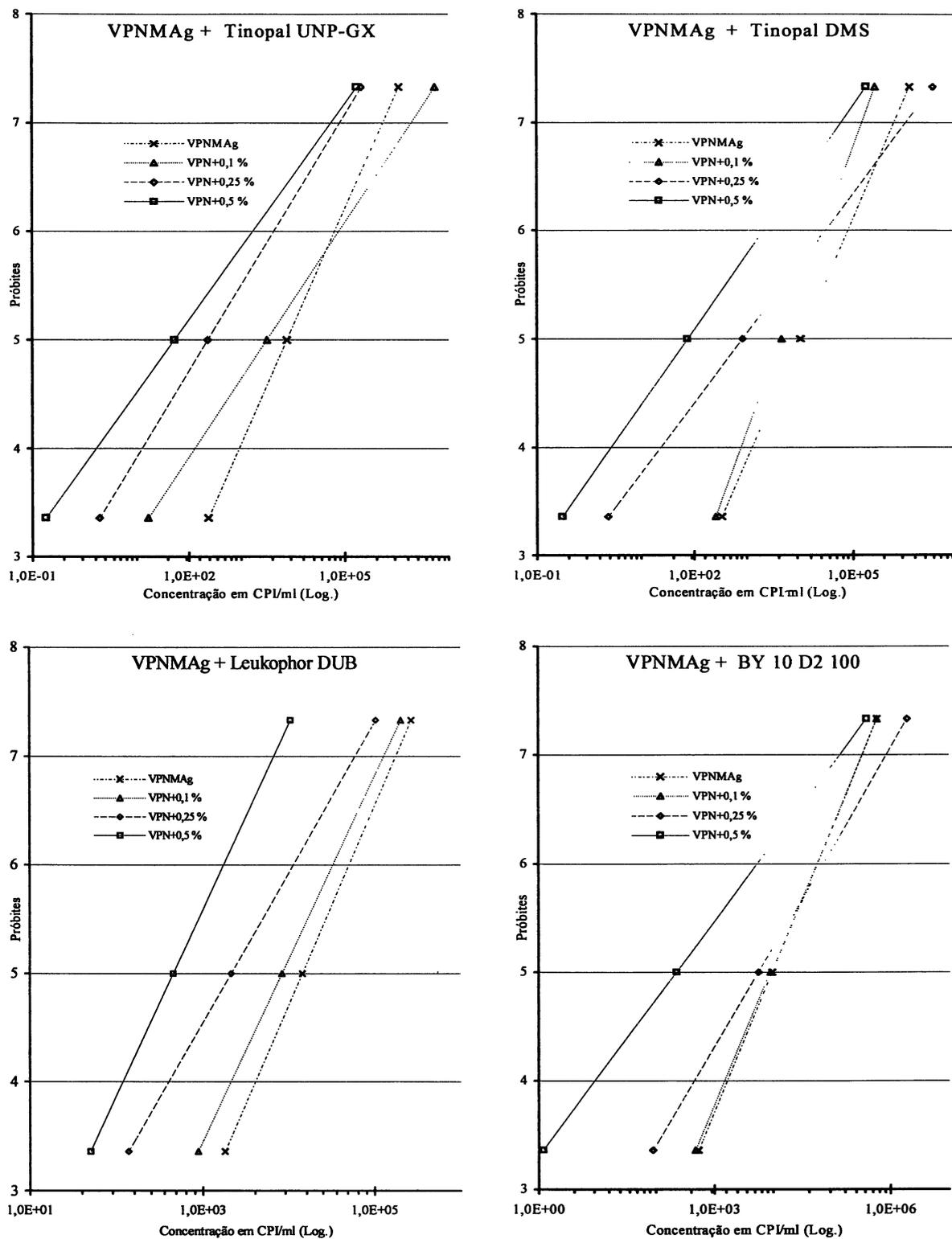


Figura 1. Efeito na concentração letal (CL) do VPNMAg, inoculado em lagartas de 2^o instar de *Anticarsia gemmatilis*, associado a quatro branqueadores óticos, em três concentrações (ver tabela 2).

No grupo de ensaios com os branqueadores na concentração de 0,10 %, apenas o BRY 10 D2 100 não diminuiu a CL_{50} do VPNMAG, avaliado pela superposição do intervalo de confiança (95 %). Esse branqueador, também não diminuiu a CL_{50} na concentração de 0,25 %, avaliado pelo mesmo critério (Tabela 2). Para os demais branqueadores, na concentração de 0,10 %, a CL_{50} do vírus foi reduzida de 7.811,3 CPI/ml para 3.187,8 CPI/ml, com o Tinopal UNPA-GX; de 10.190,9 CPI/ml para 4.562,8 CPI/ml, para o Tinopal DMS e de 14.438,8 CPI/ml para 8.331,9 CPI/ml, com o Leukophor DUB. Portanto, o aumento da AR do vírus, com os branqueadores nessa concentração, foi de, no máximo, 2,4 vezes. Na concentração de 0,25 %, a AR foi de 33,2 vezes para o Tinopal UNPA-GX, 12,1 vezes para o Tinopal DMS, 6,7 vezes para o Leukophor DUB e de 1,7 vezes para o BRY 10 D2 100 (Tabela 2).

Na maior concentração utilizada (0,50 %) para os branqueadores, a CL_{50} do VPNMAG foi reduzida de 7.811,3 CPI/ml para 53,9 CPI/ml, com o vírus associado ao Tinopal-UNPA-GX, portanto, um aumento de 144,8 vezes na eficiência do VPN. Nessa concentração, a atividade relativa foi de 135,1 vezes para o Tinopal DMS, de 42,3 vezes para o BRY 10 D2 100 e de 31,7 vezes para o Leukophor DUB. Com os resultados desse experimento, verificou-se que o efeito dos branqueadores óticos como potencializadores da atividade do VPNMAG mostrou-se concentração-dependente e que, mesmo em baixas concentrações (0,10 %), alguns branqueadores óticos podem aumentar a eficiência desse vírus.

Esses resultados são comparáveis com aqueles relatados por Fuxa & Richter (1998), nos quais a adição de Tinopal LPW a 1,0 % ao VPNMAG reduziu a CL_{50} de 3.243 CPI/ml para 56 CPI/ml, *i.e.*, uma redução de 58 vezes. Porém, resultados mais expressivos foram encontrados por Shapiro & Robertson (1992), que relataram uma redução variando entre 400 e 1.800 vezes na CL_{50} do VPNMLd, quando o branqueador Phorwite RKH a 1,0 % foi adicionado à suspensão viral e aplicado em lagartas do 2º instar. Os autores relataram, também, que o Tinopal LPW aumentou a mortalidade de larvas de 4º instar em 1.700 vezes, concluindo que esses produtos são extremamente eficazes e reduções significativas na CL_{50} podem ocorrer com concentrações tão baixas como 0,01 %. Em trabalho posterior, onde foram utilizados quatro branqueadores óticos selecionados, foi relatado que a adição destes branqueadores a 0,01 % não provocou aumento na eficiência do vírus de *L. dispar*, confirmando, porém, aumento na atividade relativa de até 1.016 vezes (Argauer & Shapiro, 1997), e de 2.667 vezes (Shapiro & Argauer, 1997), quando o branqueador foi utilizado na concentração de 1,0 %. Zou & Young (1996) também verificaram aumento crescente da eficiência do VPNPi, quando adicionado a um branqueador (Tinopal LPW) em várias concentrações, sendo que a mortalidade de larvas de 2º instar de *P. includens*

Tabela 2. Efeito de branqueadores óticos, nas concentrações de 0,1 %, 0,25 % e 0,5 %, associados ao VPNMAg e inoculado em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* de 2º instar.

Tratamentos ¹	CL ₅₀ ²	Intervalo de Confiança (95%)	Equação	Atividade Relativa ³	χ^2 (ns)
Tinopal UNPA-GX					
VPN + água	7.811,3	6.360,6 - 9.652,0	$Y^4 = 1,08236 \log(x) + 0,78667$	1,0	2,09
VPN + 0,10 %	3.187,8	2.259,6 - 4.627,6	$Y = 0,72033 \log(x) + 2,47631$	2,4	4,51
VPN + 0,25 %	235,0	177,7 - 319,1	$Y = 0,78923 \log(x) + 3,12860$	33,2	3,49
VPN + 0,50 %	53,9	39,5 - 71,5	$Y = 0,66465 \log(x) + 3,84885$	144,8	17,43
Tinopal DMS					
VPN + água	10.190,9	8.202,3 - 12.649,6	$Y = 1,11906 \log(x) + 0,54702$	1,0	0,07
VPN + 0,10 %	4.562,8	3.813,6 - 5.436,5	$Y = 1,31425 \log(x) + 0,19083$	2,2	4,62
VPN + 0,25 %	842,2	617,1 - 1.186,2	$Y = 0,64254 \log(x) + 3,12029$	12,1	2,81
VPN + 0,50 %	75,4	39,9 - 119,9	$Y = 0,68871 \log(x) + 3,70698$	135,1	0,02
BRY-10 D2 100					
VPN + água	9.687,4	7.538,0 - 12.512,1	$Y = 1,30945 \log(x) - 0,21975$	1,0	4,42
VPN + 0,10 %	9.048,9	7.065,6 - 11.743,9	$Y = 1,28636 \log(x) - 0,08962$	1,1	4,32
VPN + 0,25 %	5.676,3	3.872,9 - 9.142,4	$Y = 0,91651 \log(x) + 1,55936$	1,7	0,91
VPN + 0,50 %	229,0	154,5 - 333,2	$Y = 0,72194 \log(x) + 3,29629$	42,3	3,56
Leukophor DUB					
VPN + água	14.438,9	11.909,9 - 17.480,6	$Y = 1,83359 \log(x) - 2,62391$	1,0	2,84
VPN + 0,10 %	8.331,9	6.751,6 - 10.168,4	$Y = 1,68361 \log(x) - 1,60103$	1,7	3,21
VPN + 0,25 %	2.146,9	1.713,3 - 2.721,8	$Y = 1,38055 \log(x) + 0,40024$	6,7	0,29
VPN + 0,50 %	455,4	371,9 - 555,3	$Y = 1,70967 \log(x) + 0,45499$	31,7	0,01

¹35 lagartas por tratamento para cada concentração; cinco repetições.

²Concentração letal média (CL₅₀) expressa em corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

³Atividade Relativa (AR) foi calculada dividindo-se a CL₅₀ do VPNMAg pela CL₅₀ do VPNMAg + branqueador

⁴Mortalidade expressa em próbites.

variou entre 18,3 % para o branqueador a 0,01 % e 91,8 % para o branqueador a 0,16 %. Os autores relataram, ainda, que o aumento da atividade relativa do VPN_{Pi} foi de aproximadamente 15 vezes em lagartas de 1º ínstar e de 1.600 vezes em lagartas do 2º ínstar.

A magnitude dos acréscimos na eficiência dos vírus, quando associados aos branqueadores óticos, como os relatados por Shapiro & Robertson (1992) com o VPN_{MLd}, por Hamm & Shapiro (1992) com o VPN_{MSf} e por Zou & Young (1996) com o VPN_{Pi}, não foram observados com o VPN_{MAg} em lagartas de *A. gemmatalis* suscetíveis ao vírus. Da mesma forma, não foi observada a mesma eficiência na associação do Calcofluor M2R (=Tinopal LPW) ao VPN_{MAf}, sendo o aumento da atividade do vírus utilizado contra *H. virescens*, *H. zea*, *S. exigua* e *T. ni*, entre 2,9 vezes e 13,6 vezes (Vail *et al.*, 1996). Dougherty *et al.* (1996) relataram aumento na atividade do VPN_{MLd}, associado ao Tinopal LPW, de 214 vezes, e do VPN_{MAc}, aplicado em *T. ni*, de 41 vezes. Esses autores sugerem que os branqueadores óticos promovem maiores aumentos na atividade daqueles VPNs com alta CL₅₀ (menos virulentos), e são menos eficientes com os VPNs com baixa CL₅₀ (mais virulentos).

A despeito dos excelentes resultados observados, os dados relatados nos diferentes trabalhos sugerem uma grande variação entre os sistemas (vírus-insetos hospedeiros). Portanto, o efeito potencializador dos branqueadores óticos na atividade de VPNs poderá não apresentar a mesma magnitude em todos os sistemas.

5.3. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPN_{MAg} no TM de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* inoculadas no 2º ínstar

A adição de Tinopal UNPA-GX a 0,5 % ao VPN da lagarta-da-soja, na concentração de $1,0 \times 10^4$ CPI/ml, reduziu o tempo de mortalidade do inseto em 27,1 %. Na concentração de 0,5 % o TM foi menor para todos os branqueadores selecionados (Tabela 3); a 0,1 % o TM foi menor apenas para o Tinopal DMS. Com o Tinopal UNPA-GX a 0,5 %, o TM diminui de 7,77 dias com o VPN_{MAg} isoladamente para 5,66 dias com o VPN_{MAg} + branqueador, portanto, uma diferença de 2,11 dias. A adição do Tinopal UNPA-GX a 0,10 % e a 0,25 %, não resultou em diferença significativa no TM. Os resultados foram semelhantes para o Leukophor DUB a 0,5 %: o TM diminui de 8,87 dias com o VPN_{MAg} para 6,72 dia com o VPN_{MAg} + branqueador, uma diferença de 2,15 dias, sendo que nas concentrações de 0,10 % e 0,25 % não houve diferença significativa no TM (Tabela 3).

Para o Tinopal DMS e o BRY 10 D2 100 a 0,5 % a diferença no TM foi, respectivamente, de 1,81 e 1,45 dia, sendo que, para estes dois branqueadores, houve diferença significativa no

TM, mesmo na concentração de 0,25 %. O TM diminuiu de 8,72 dias com o VPN para 7,32 dias com o VPN + Tinopal DMS; e de 8,36 dias com o VPN para 7,66 dias com o vírus + BRY 10 D2 100 (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de branqueadores óticos no tempo médio de mortalidade (TM¹) de lagartas de *Anticarsia gemmatilis*, provocada por seu VPN ($1,0 \times 10^4$ CPI/ml) inoculado em larvas do 2º ínstar.

Concentração dos Branqueadores (%)	Branqueadores			
	Tinopal UNPA-GX	Tinopal DMS	BRY10 D2 100	Leukophor DUB
VPNMAg+Água	7,77 a ²	8,72 a	8,36 a	8,87 a
VPNMAg+0,1 %	8,22 a	7,90 b	8,58 a b	8,39 a
VPNMAg+0,25 %	6,68 a b	7,32 b c	7,66 b c	7,72 a b
VPNMAg+0,5 %	5,66 b	6,91 c	6,91 c	6,72 b
CV (%)	12,35	4,46	5,40	7,99

¹Tempo de mortalidade (TM) em dias.

²Médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

A associação do vírus de *L. dispar* ao Tinopal LPW na concentração de 0,01 %, referida por Argauer & Shapiro (1997), não afetou o TL₅₀, diminuindo de 11,1 dias com o VPN para 10,9 dias com o VPN + Tinopal LPW, sendo que com o branqueador a 0,1 % o TL₅₀ foi reduzido de 11,1 dias com o VPN para 8,8 dias com VPN + branqueador, uma redução de 2,3 dias mas não significativa pela superposição do limite fiducial (95 %). Na concentração de 1,0 %, o TL₅₀ foi reduzido em 4,1 dias, sendo diferente estatisticamente pelo critério adotado. Entretanto, outros branqueadores (Blankophor RKH, Blankophor BBH e Blankophor P167) avaliados pelos autores, na concentração de 0,1 %, também mostraram diferenças significativas quanto ao TL₅₀. Com o vírus de *P. includens*, a adição do branqueador Tinopal LPW na concentração de 0,01 % reduziu o TL₅₀ em lagartas do 2º ínstar, de 15,9 para 14,8 dias, e a 0,16 %, de 15,9 para 5,7 dias (Zou & Young, 1996). Essa mesma eficiência foi relatada com a adição do branqueador

ótico Phorwite AR (1,0 %) ao VPCLd. Na concentração de $1,0 \times 10^5$ CPI/ml, o TL_{50} foi reduzido de 24,3 para 10,4 dias, portanto, uma diferença de 13,9 dias. Entretanto, com o vírus na concentração de $1,0 \times 10^7$ CPI/ml a diferença foi de apenas 1,3 dia, *i.e.*, de 9,5 dias com o vírus para 8,2 dias com o vírus + branqueador, sugerindo que o TL_{50} sofre maior redução quando o vírus é utilizado em concentrações menores (Shapiro & Dougherty, 1994).

O maior efeito no TL_{50} causado pela associação de branqueadores óticos com vírus em baixas concentrações foi, também, relatado por Vail *et al.* (1996). A adição de Tinopal LPW a 1,0 % ao VPN de *A. falcifera*, utilizado a 0,05 CPI/mm², reduziu o TL_{50} em lagartas neonatas de *H. zea* de 16,1, para 7,2 dias, uma redução de aproximadamente 9,0 dias. Quando o VPN foi usado na concentração de 1,5 CPI/mm², o TL_{50} foi reduzido de 5,2 para 5,0 dias. Os resultados foram semelhantes para *S. exigua*, *H. virescens* e *T. ni*. Em contraste com outros trabalhos, Martinez *et al.* (2000) relataram aumento no tempo de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* inoculadas com o VPNMSf associado ao Tinopal LPW a 1,0 %, quando comparado com o vírus isoladamente.

Os resultados indicam que a associação dos branqueadores óticos ao VPNMAg pode antecipar a mortalidade de *A. gemmatalis* em mais de dois dias, sendo que a redução no TM aumenta com maiores concentrações dos branqueadores. Considerando que a restrição ao uso do vírus da lagarta-da-soja não está ligada ao seu custo de produção – o custo do produto formulado disponível no mercado brasileiro é, ordinariamente, menor do que o custo dos inseticidas químicos utilizados para o controle da praga – mas ao tempo de mortalidade do inseto, a redução do TM parece ser o efeito mais importante dessa associação.

5.4. Efeito da associação de branqueadores óticos na CL_{50} do VPNMAg, inoculado em lagartas do 4º instar de *Anticarsia gemmatalis*

A atividade relativa do VPNMAg associado ao branqueador ótico Tinopal UNPA-GX a 0,5 % foi maior em lagartas de *A. gemmatalis* do 4º instar (AR= 356,0) do que em lagartas do 2º instar (AR=144,8) (Tabelas 4 e 2). Com os demais branqueadores utilizados, a AR foi sempre maior no grupo das lagartas de 2º instar, sugerindo que os branqueadores óticos, exceto o Tinopal UNPA-GX, exercem maior ação potencializadora quando o VPN associado ao branqueador é aplicado em lagartas do 2º instar. Para lagartas do 4º instar, a CL_{50} com o VPN utilizado isoladamente foi de 54.505,9 CPI/ml sendo de 153,1 CPI/ml para o VPN associado ao Tinopal UNPA-GX, de 965,6 ao Tinopal DMS, de 2.438,7 ao BRY 10 D2 100 e de 10.711,9 ao Leukophor DUB (Tabela 4). A concentração do vírus associado aos branqueadores óticos

Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS e BRY 10 D2 100 a 0,5 %, necessária para matar 50 % das lagartas de *A. gemmatalis* de 4º instar (Tabela 4), é menor do que a concentração do vírus utilizado isoladamente para matar 50 % das lagartas de 2º instar (Tabela 2).

Com o VPN de *L. dispar* associando ao Tinopal LPW a 1,0 %, Shapiro & Robertson (1992) obtiveram, com larvas de 4º instar, redução na CL_{50} de, aproximadamente, 1.700 vezes, próximo da redução obtida em larvas de 2º instar, que foi de 1.837 vezes e Zou & Young (1996) relataram que a porcentagem de mortalidade em lagartas de *P. includens* não diferiu significativamente entre o 2º, o 3º e o 4º instares, quando o Calcofluor White M2R foi adicionado à suspensão do vírus a 0,1 %. Entretanto, com o branqueador a 1,0 %, a mortalidade foi significativamente maior no 3º e 4º instares.

Tabela 4. Efeito de branqueadores óticos, na concentração de 0,50 %, associados ao vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* e inoculado em lagartas do 4º instar.

Tratamentos ¹	CL_{50} ²	Intervalo de Confiança (95%)	Atividade Relativa ³	χ^2 (ns)
VPNMAg+Água	54.505,9	32.676,8-90.274,9	1,0	2,62
+Tinopal UNPA-GX	153,1	49,9-307,6	356,0	1,65
+Tinopal DMS	965,6	384,5-7.310,0	56,4	1,26
+BRY 10 D2 100	2.438,7	1.182,4-4.753,1	22,3	5,07
+Leukophor DUB	10.711,9	6.261,4-17.574,3	5,1	3,91

¹ 30 larvas por tratamento para cada concentração; três repetições.

² Concentração letal média (CL_{50}) expressa em corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

³ Atividade Relativa (AR) foi calculada dividindo-se a CL_{50} do VPNMAg pela CL_{50} do VPNMAg + branqueador.

O efeito no desenvolvimento dos insetos inoculados com o VPNMAg associado aos branqueadores óticos foi mais perceptível em lagartas do 4º instar. A associação de todos os branqueadores óticos utilizados com o VPNMAg afetou o desenvolvimento das lagartas, evidenciando-se com o Tinopal UNPA-GX, na qual as lagartas mortas apresentavam, aproximadamente, metade do peso das lagartas mortas com o VPNMAg utilizado isoladamente.

O fator de resistência devido à idade, entre lagartas de *A. gemmatalis* do 4º e do 2º instar, para o vírus utilizado isoladamente – calculado como sendo a razão entre a CL_{50} do VPNMAg para lagartas do 4º instar (54.505,9 CPI/ml) (Tabela 4) e a média das CL_{50} para as lagartas do

2º instar, nos ensaios de cada branqueador (8.112,7 CPI/ml) (Tabela 2) – foi de 6,7 vezes, semelhante aos relatados por Moscardi (1986), que foi de 5,8 vezes, considerando o número de poliedros por mm² de dieta, e de 7,5 vezes, quando avaliado com o número de poliedros por lagarta.

5.5. Efeito da associação de Tinopal DMS ao VPNMAG, aplicado em plantas de soja, na mortalidade de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*

A adição de Tinopal DMS a 0,1 % ao VPNMAG na concentração de $3,0 \times 10^{10}$ CPI/ha – aproximadamente $\frac{1}{5}$ da dose utilizada para o controle do inseto no campo – aumentou a mortalidade de lagartas de 2º instar, alimentadas com folhas de soja coletadas imediatamente após a aplicação, de 16,5 % para 95,0 %. Com o branqueador a 1,0 % a mortalidade foi de 96,9 %, não havendo, portanto, diferença na mortalidade dos insetos com o aumento da concentração do branqueador (Figura 2). No quarto dia após a aplicação do vírus, a mortalidade das lagartas com o VPN na dose reduzida ($\frac{1}{5}$ da recomendada) foi de 1,3 %; com o VPN associado ao Tinopal DMS a 0,1 % e a 1,0 %, foi de 31,7 % e 68,4 %, respectivamente, demonstrando o efeito da maior concentração do branqueador. Essa diferença na mortalidade, observada em relação à concentração do branqueador – 0,1 % ou 1,0 % –, para a dose reduzida do vírus, se manteve até o 10º dia da avaliação.

Com o VPN a $1,5 \times 10^{11}$ CPI/ha, a mortalidade no dia da aplicação foi semelhante (> 90 %) para todos os tratamentos, *i.e.*, o VPN com o branqueador nas concentrações de 0,1 % e 1,0 % e sem o branqueador. Nas avaliações subseqüentes, com o VPN na dose de $1,5 \times 10^{11}$ CPI/ha, a mortalidade dos insetos se manteve semelhante em todos os tratamentos. O vírus na dose reduzida ($3,0 \times 10^{10}$ CPI/ha), quando associado ao Tinopal DMS a 1,0 %, foi tão eficiente quanto as aplicações do VPN na dose normal ($1,5 \times 10^{11}$ CPI/ha), com e sem o branqueador. Os dados sugerem que a dose reduzida do vírus, quando associada ao branqueador ótico a 0,1 %, é tão eficiente quanto a dose normal recomendada, avaliando-se a mortalidade no dia da aplicação. Esse resultado, entretanto, deve ser avaliado com cuidado, porque Moscardi (1986) relata 72,40 % de mortalidade em *A. gemmatalis* com a dose do vírus de 10 LE/ha, uma dose igual à utilizada no presente ensaio.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Webb *et al.* (1994b), nos quais a adição de Blankophor BBH a 0,05 % ou a 0,5 % ao VPNMLd na dose de $2,5 \times 10^{11}$ CPI/ha provocou igual mortalidade que o VPN na dose de $2,5 \times 10^{12}$ CPI/ha. Para os autores, o custo de

produção pode ser um fator limitante no uso de baculovírus para o controle de pragas e a associação de branqueadores óticos a esses patógenos pode ser uma alternativa para aqueles vírus que apresentam alto custo de produção, onde o custo do branqueador possa ser compensado pela menor dose do vírus. De acordo com Webb *et al.* (1994a), o custo do vírus para o controle de *L. dispar* é de 8 dólares por árvore, e os cálculos especulativos com um décimo da dose do vírus associado ao Blankophor BBH a 0,1 % resultaria em uma redução de custos de 3 dólares/árvore (Webb *et al.*, 1996). Martinez *et al.* (2000) condicionam a utilização de vírus associado aos branqueadores óticos para o controle de *S. frugiperda* em milho, na América Central, apenas se houver alta eficiência com baixas concentrações do branqueador (<0,1%) ou, ainda, se o volume das aplicações puderem ser reduzidas.

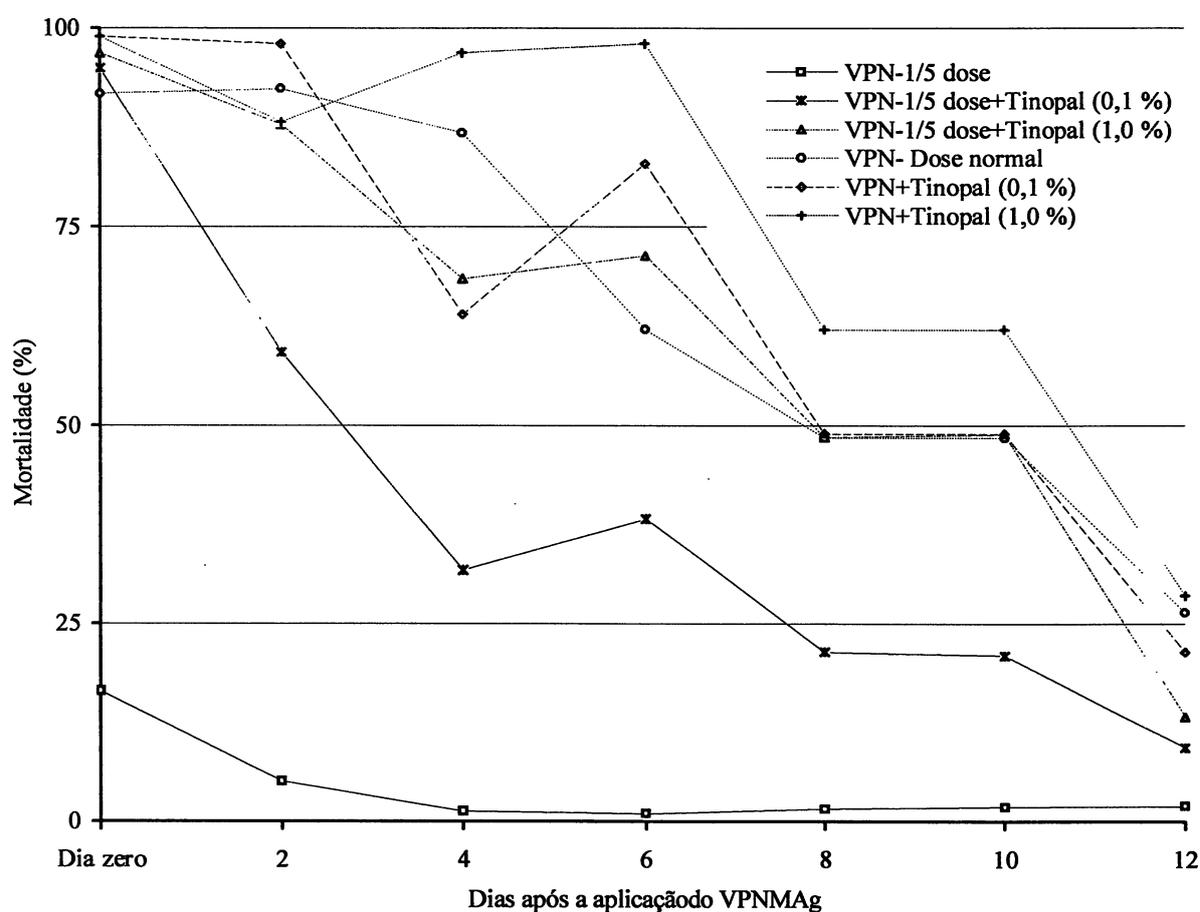


Figura 2. Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* pelo VPNMAg associado ao branqueador ótico Tinopal DMS, aplicado em plantas de soja em casa de vegetação.

Para o VPNMAg, produzido a custos extremamente baixos no Brasil – menor do que um real/ha (Santos, B. informação pessoal) –, parece economicamente inviável a aplicação extensiva desse VPN associado a um branqueador ótico, com o objetivo de diminuir a quantidade de vírus utilizada. Considerando que os branqueadores com maior eficiência têm custo variando entre 15 e 25 reais o kg (informações dos fabricantes), na concentração de 0,1 % (considerando-se um volume de água de 100 litros/ha) o custo do branqueador seria de, aproximadamente, 2 reais/ha. Entretanto, se houver diminuição no tempo de mortalidade do inseto, nessa concentração do branqueador, *i.e.*, aproximadamente 100 g/ha, esses produtos poderiam substituir os inseticidas químicos que vêm sendo utilizados em mistura ao VPNMAg, em mais de 20 % das aplicações do vírus para o controle da lagarta-da-soja (Morales, 1998). Deve ser considerada, ainda, a possibilidade dessa associação em aplicações onde se utiliza baixo volume de calda, principalmente por meio de aeronaves, nas quais se poderia obter preparações concentradas, com pequenas quantidades de branqueador.

5.6. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg, inoculado em lagartas do 2º instar de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao vírus

Entre os branqueadores testados (Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS, BRY 10 D2 100 e Leukophor DUB), o aumento relativo na atividade do VPN de *A. gemmatalis* foi maior nos insetos resistentes do que nos insetos suscetíveis. No grupo dos insetos resistentes, a adição do Tinopal UNPA-GX a 0,5 % ao VPNMAg reduziu a CL_{50} de $3,7 \times 10^7$ CPI/ml para $6,0 \times 10^2$ CPI/ml, *i.e.*, uma redução de 61.667 vezes – comparada a 144,8 vezes em insetos suscetíveis –, o que demonstra a maior eficiência com esse grupo de insetos (Tabelas 2 e 5). Resultados similares foram observados com o Tinopal DMS (37.000 vezes), BRY 10 D2 100 (60.656 vezes), e Leukophor DUB (10.000 vezes). Fuxa & Richter (1998), trabalhando com uma colônia de *A. gemmatalis* resistente ao VPNMAg (aproximadamente cinco vezes), relataram que o branqueador Tinopal LPW reduziu a CL_{50} de 15.349 CPI/ml para 628 CPI/ml, *i.e.*, uma redução de 24,4 vezes; para os insetos suscetíveis, a redução foi de 3.243 CPI/ml para 56 CPI/ml (57,9 vezes), concluindo que a redução na CL_{50} , devido ao branqueador ótico, foi, proporcionalmente, maior em larvas suscetíveis do que em larvas de *A. gemmatalis* resistentes ao seu VPN.

Neste trabalho evidenciou-se que larvas de *A. gemmatalis* altamente resistente ao vírus tornaram-se suscetíveis pela combinação do VPN com branqueadores óticos, demonstrando o potencial de utilização destas substâncias em populações de insetos resistentes, tanto para o

estudo desses mecanismos, como para eventuais aplicações para reverter situações de resistência. Deve ser ressaltado, entretanto, que embora tenha sido selecionada em laboratório uma população de *A. gemmatalis* extremamente resistente ao seu VPN (Abot *et al.*, 1996), e as aplicações do vírus no Brasil se situem em torno de 1,0 milhão de ha/ano (Moscardi & Sosa-Gómez, 1996), as populações do inseto coletadas em diferentes regiões, com exposições ao VPN por vários anos, permanecem suscetíveis ao vírus (Abot *et al.*, 1995).

Tabela 5. Efeito de branqueadores óticos selecionados na atividade do VPNMAg em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* resistentes ao vírus.

Tratamentos ¹	CL ₅₀ ²	Intervalo de Confiança (95%)	Atividade Relativa ³	χ ² (ns)
VPNMAg	3,7 × 10 ⁷	3,2 × 10 ⁷ - 4,4 × 10 ⁷	1,0	1,38
+Tinopal UNPA-GX	6,0 × 10 ²	4,6 × 10 ² - 7,7 × 10 ²	61.667	4,44
+Tinopal DMS	1,0 × 10 ³	6,0 × 10 ² - 1,5 × 10 ³	37.000	4,93
+BRY 10 D2 100	6,1 × 10 ²	3,2 × 10 ² - 1,1 × 10 ³	60.656	0,68
+Leukophor DUB	3,7 × 10 ³	1,1 × 10 ³ - 9,8 × 10 ³	10.000	1,39

¹ 30 larvas por tratamento para cada concentração; três repetições.

² Concentração letal média (CL₅₀) expressa em corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

³ Atividade Relativa (AR) foi calculada dividindo-se a CL₅₀ do VPNMAg, pela CL₅₀ do VPNMAg + o branqueador ótico.

5.7. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg inoculado em lagartas do 3º instar de *Spodoptera frugiperda*

A mortalidade causada em lagartas de *S. frugiperda* pelo vírus de *A. gemmatalis*, na maior concentração utilizada (1,0 × 10⁹ CPI/ml), foi de 6,5 %. Nas concentrações de 1,0 × 10⁵, 1,0 × 10⁶ e 1,0 × 10⁷ CPI/ml, não houve insetos mortos pelo vírus até o 12º dia da avaliação (Tabela 6), não sendo, portanto, possível calcular a CL₅₀ do VPNMAg para esse inseto. As CL₅₀ do VPNMAg associado aos branqueadores óticos Tinopal UNPA-GX e Tinopal DMS

foram semelhantes ($6,6 \times 10^6$ e $6,5 \times 10^6$ CPI/ml). Foram, também, semelhantes com o BRY 10 D2 100 e o Leukophor DUB ($1,8 \times 10^7$ e $1,6 \times 10^7$ CPI/ml) (Tabela 7). De forma semelhante, a baixa patogenia do VPN de *A. gemmatalis* à outras espécies foi relatada por Carner *et al.* (1979), Pavan *et al.* (1981) e Moscardi (1986). Para *Spodoptera latifascia* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) o VPNMAG na dose de 8×10^5 CPI/lagarta, causou mortalidade em apenas 2,1 % dos insetos (Moscardi, 1986).

Embora a atividade do VPNMAG tenha sido potencializada pelos branqueadores óticos, a concentração necessária para matar 90,0 % das lagartas de *S. frugiperda* é extremamente alta, sendo de $1,9 \times 10^8$ CPI/ml com o vírus associado ao Tinopal UNPA-GX, de $2,2 \times 10^8$ CPI/ml com o Tinopal DMS, de $7,6 \times 10^8$ CPI/ml associado ao BRY 10 D2 100 e de $2,8 \times 10^8$ CPI/ml associado ao Leukophor DUB (Tabela 7). Dessa forma, a utilização prática desse VPN como inseticida microbiano, para este inseto, parece pouco provável, sendo o custo de produção do vírus um fator limitante. Entretanto, os resultados sugerem que a associação desses branqueadores com outros vírus que apresentam, naturalmente, uma faixa maior de hospedeiros, como os VPNs de *A. californica* e de *A. falcifera*, bem como, com o VPN da própria espécie, deve ser considerada.

Tabela 6. Mortalidade (%) de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, inoculadas no 3º instar, provocada pelo VPNMAG associado aos branqueadores óticos selecionados na concentração de 0,5 %.

Tratamentos ¹	VPNMag		Branqueadores óticos							
			Tinopal UNPA-GX		Tinopal DMS		BRY 10 D2 100		Leukophor DUB	
	n ²	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Testemunha	102	0	100	2,0	102	0,9	100	0	105	0
$1,0 \times 10^4$	-	-	102	0	104	0	106	0	101	0
$1,0 \times 10^5$	104	0	102	0	104	4,8	103	0	108	2,8
$1,0 \times 10^6$	104	0	101	26,2	106	28,5	104	13,4	105	8,6
$1,0 \times 10^7$	106	0	101	50,5	103	56,8	104	49,0	105	48,6
$1,0 \times 10^8$	104	3,8	103	87,1	104	82,5	105	68,6	103	75,7
$1,0 \times 10^9$	107	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

²Número de insetos tratados em três repetições.

Tabela 7. Efeito de branqueadores óticos, na concentração de 0,5 %, associados ao VPNMAg e inoculado em lagartas do 3º ínstar de *Spodoptera frugiperda*.

Tratamentos ¹	CL ₅₀ ²	Intervalo de Confiança (95%)	CL ₉₀	Intervalo de Confiança (95%)	χ ² (ns)
VPNMAg+Água	-	-	-	-	-
+Tinopal UNPA-GX	6,6 × 10 ⁶	4,2 × 10 ⁶ - 9,9 × 10 ⁶	1,9 × 10 ⁸	9,9 × 10 ⁷ - 4,9 × 10 ⁸	2,14
+Tinopal DMS	6,5 × 10 ⁶	4,4 × 10 ⁶ - 9,8 × 10 ⁶	2,2 × 10 ⁸	1,1 × 10 ⁸ - 5,3 × 10 ⁸	1,49
+BRY 10 D2 100	1,8 × 10 ⁷	1,2 × 10 ⁷ - 3,0 × 10 ⁷	7,6 × 10 ⁸	3,0 × 10 ⁸ - 3,2 × 10 ⁹	3,30
+Leukophor DUB	1,6 × 10 ⁷	1,1 × 10 ⁷ - 2,4 × 10 ⁷	2,8 × 10 ⁸	1,5 × 10 ⁸ - 7,2 × 10 ⁸	3,38

¹ 35 larvas por tratamento para cada concentração; três repetições.

² Concentração letal média (CL₅₀) expressa em corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

5.8. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg, inoculado em lagartas do 3º ínstar de *Rachiplusia nu*

O vírus de poliedrose nuclear de *A. gemmatilis* foi mais infectivo a *R. nu* do que a *S. frugiperda*, com a formação de corpos poliédricos de inclusão nos tecidos infectados de ambas as espécies. O VPNMAg sem a adição de branqueadores óticos causou mortalidade em *R. nu*, nas concentrações utilizadas no ensaio, variando entre 17,1 % (1,0 × 10⁵ CPI/ml) e 97,8 % (1,0 × 10⁹ CPI/ml). Quando foi adicionado ao Tinopal UNPA-GX a mortalidade de *R. nu* foi de 46,5 %, com o vírus na concentração de 1,0 × 10³ CPI/ml e 98,9 % na concentração de 1,0 × 10⁷. Para os demais branqueadores testados, os resultados foram semelhantes (Tabela 8). A CL₅₀ para o vírus de *A. gemmatilis* utilizado isoladamente foi de 1,8 × 10⁶ CPI/ml. Os branqueadores óticos selecionados, e utilizados a 0,5 %, também aumentaram a eficiência do VPNMAg nessa espécie: a CL₅₀ do vírus + Tinopal UNPA-GX foi de 2,1 × 10³ CPI/ml, *i.e.*, uma AR de 857,1 vezes em relação ao vírus utilizado isoladamente; a CL₅₀ do VPNMAg associado ao Leukophor DUB foi de 6,9 × 10³ CPI/ml; de 8,8 × 10³ CPI/ml quando associado ao BRY 10 D2 100 e de 9,5 × 10³ CPI/ml adicionado ao Tinopal DMS (Tabela 9). O aumento da eficiência do VPNMAg em *R. nu*, devido ao branqueador, variou entre 189,5 vezes com o Tinopal DMS e 857,1 vezes com o Tinopal UNPA-GX, portanto, um aumento na eficiência 5,9 vezes maior do

que o aumento da eficiência do vírus, associado ao mesmo branqueador (Tinopal UNPA-GX a 0,5 %) e utilizado em *A. gemmatilis*.

Tabela 8. Mortalidade (%) de lagartas de *Rachiplusia nu*, inoculadas no 3º ínstar, provocada pelo VPNMAg associado aos branqueadores óticos selecionados na concentração de 0,5 %.

Tratamentos ¹	VPNMAg + Branqueadores óticos									
	VPNMAg		Tinopal UNPA-GX		Tinopal DMS		BRY 10 D2 100		Leukophor DUB	
	n ²	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Testemunha	91	2,2	91	2,2	91	2,2	91	2,2	91	2,2
1,0 × 10 ³	-	-	88	46,5	91	22,5	90	15,9	89	33,7
1,0 × 10 ⁴	-	-	91	58,4	90	59,1	87	55,3	91	46,6
1,0 × 10 ⁵	90	17,1	90	86,4	88	73,3	90	86,4	90	79,5
1,0 × 10 ⁶	85	38,6	91	95,5	88	84,9	90	93,2	90	79,3
1,0 × 10 ⁷	92	73,3	92	98,9	90	97,7	87	97,6	90	98,9
1,0 × 10 ⁸	96	91,5	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0 × 10 ⁹	92	97,8	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Corpos poliédricos de inclusão(CPI)/ml.

²Número de insetos tratados em três repetições.

Tabela 9. Efeito de branqueadores óticos, na concentração de 0,5 %, associados ao VPNMAg e inoculado em lagartas do 3º ínstar de *Rachiplusia nu*.

Tratamentos ¹	CL ₅₀ ²	Intervalo de Confiança (95%)	Atividade Relativa ³	χ ² (ns)
VPNMAg + Água	1,8 × 10 ⁶	1,2 × 10 ⁶ - 2,8 × 10 ⁶	1,0	0,68
+Tinopal UNPA-GX	2,1 × 10 ³	9,0 × 10 ² - 4,0 × 10 ³	857,1	3,14
+Tinopal DMS	9,5 × 10 ³	5,3 × 10 ³ - 1,6 × 10 ⁴	189,5	5,59
+BRY 10 D2 100	8,8 × 10 ³	5,9 × 10 ³ - 1,3 × 10 ⁴	204,5	5,53
+Leukophor DUB	6,9 × 10 ³	3,8 × 10 ³ - 1,2 × 10 ⁴	260,8	3,52

¹ 35 larvas por tratamento para cada concentração; três repetições.

² Concentração letal média (CL₅₀) expressa em corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

³ Atividade Relativa (AR) foi calculada dividindo-se a CL₅₀ do VPNMAg, pela CL₅₀ do VPNMAg + o branqueador ótico.

No Brasil, um grande número de pragas de culturas comerciais, com viroses conhecidas, como nos insetos dos gêneros *Heliothis/Helicoverpa*, nas espécies *S. frugiperda*, *R. nu*, *T. ni*, *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), entre outras, são controladas por inseticidas químicos de largo espectro. Os branqueadores óticos poderiam ajustar-se a esses sistemas, onde os VPNs aparentemente não têm a mesma eficiência que o VPN de *A. gemmatalis*, permitindo, dessa forma, aumentar a possibilidade do controle microbiano de outros insetos em nossos agroecossistemas.

O modo de ação desses branqueadores óticos não é, ainda, totalmente conhecido. Segundo Shapiro & Robertson (1992) essas substâncias provocariam rupturas na matriz peritrófica facilitando a penetração de maior número de nucleocapsídeos nas células colunares. Adams *et al.* (1994) demonstraram, 48 horas após a inoculação do VPNMLd, diferenças nos núcleos das células colunares de larvas de *L. dispar* alimentadas com o VPN e com o VPN associado ao Tinopal. A verificação por microscópio eletrônico demonstrou que as lagartas alimentadas com o VPN isoladamente não apresentavam células com virions, entretanto, o intestino médio das larvas alimentadas com o VPN + Tinopal apresentava muitos núcleos das células colunares hipertrofiados e preenchidos com grande quantidade de virions. Esses dados sugerem que a infecção ocorre mais rapidamente na presença dos branqueadores óticos, influenciando na velocidade do processo de infecção e, conseqüentemente, no tempo de mortalidade do inseto hospedeiro.

De acordo com Washburn *et al.* (1998), os resultados do trabalho com um recombinante do VPN de *A. californica* em larvas de 4º ínstar de *T. ni* evidenciaram que o efeito do branqueador M2R foi o de prevenir a descamação das células epiteliais do intestino médio infectadas pelos primeiros inóculos. Recentemente, Wang & Granados (1999) relataram que as proteínas da matriz peritrófica poderiam ser solubilizadas *in vitro* pelo Calcofluor, um derivado do ácido stilbene disulfônico. Ensaio *in vivo* demonstraram que o branqueador inibiu, de forma severa, a formação da matriz peritrófica em diferentes espécies de insetos. Essa inibição foi seguida por um aumento na suscetibilidade das lagartas à infecção por baculovírus e, também, resultou na degradação da mucina do intestino, proteína que exerce uma função essencial na proteção do intestino médio dos insetos. É sabido que a integridade da matriz peritrófica exerce papel importante, agindo como uma barreira contra agentes infecciosos. De acordo com Barbehenn & Martin (1995), o tamanho dos poros da matriz peritrófica em Lepidoptera varia entre 21 e 29 nm enquanto que as partícula infectantes dos baculovírus medem 40-70 nm por 250-400 nm (Boucias & Pendland, 1998). Por outro lado, Lehane (1997) considera que em larvas de lepidópteros a matriz peritrófica não é uma barreira efetiva contra os vírus.

5.9. Efeito da associação de Tinopal DMS ao VPNMAg, exposto à radiação ultravioleta em três períodos

A mortalidade de *A. gemmatalis* por seu VPN não exposto à radiação UV, na concentração de $1,0 \times 10^5$ CPI/ml foi de, aproximadamente, 86,0 % (considerando a média dos ensaios dos três períodos avaliados), sendo reduzida para 62,7 %, 50,9 % e 42,9 % quando o VPN foi exposto, respectivamente, a 90, 180 e 360 minutos à radiação UV (Tabela 10). Mesmo ocorrendo menor mortalidade dos insetos com o aumento do tempo de exposição do VPN a UV, para os períodos testados não houve diferença significativa na mortalidade de *A. gemmatalis*. Com o VPNMAg associado ao Tinopal DMS, e não exposto a radiação UV, a mortalidade variou entre 95,8 % e 100 %, e com o VPN exposto à luz ultravioleta a mortalidade variou entre 93,0 % e 96,8 %, não havendo diferença significativa entre os tratamentos com o VPN exposto e não exposto à radiação UV. Com esses resultados preliminares, optou-se por avaliar o efeito da associação dos branqueadores óticos ao vírus de *A. gemmatalis*, na proteção contra a radiação UV, expondo o VPNMAg durante 90 minutos a radiação.

Tabela 10. Mortalidade (%) de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* por seu VPNMAg¹ associado ao Tinopal DMS a 0,5 % e exposto à radiação ultravioleta durante três períodos.

Período de exposição (minutos)	Sem Ultravioleta		Com Ultravioleta	
	VPNMAg	VPNMAg+Tinopal DMS	VPNMAg	VPNMAg+Tinopal DMS
90	87,7 a ²	100 a	62,7 b c	94,4 a
180	82,8 a	100 a	50,9 c	96,8 a
360	87,0 a b	95,8 a	42,9 c	93,0 a
CV (%)	11,482			

30 larvas por tratamento para cada repetição; três repetições.

¹ VPNMAg = $1,0 \times 10^5$ corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

² Médias seguidas da mesma letra, na tabela, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

5.10. Efeito da associação de branqueadores óticos ao VPNMAg exposto à radiação ultravioleta por 90 minutos

A exposição do VPNMAg à radiação UV durante 90 minutos reduziu a mortalidade do inseto pelo VPN de 78,9 % para 29,7 %. Porém, com a adição de alguns branqueadores óticos (BRY 10 D2 100, Leukophor DUB, Tinopal DMS, Tinopal UNPA-GX e BRY 10 D2 150) à suspensão viral, foi mantido o mesmo nível de mortalidade dos insetos após a exposição à UV (Tabela 11). Quatro branqueadores óticos não demonstraram boa proteção ao VPNMAg (Uvitex BHT, Hostalux ETBN, Leukophor BSBB e Hostalux KS-N) e dois branqueadores (Uvitex NFW e Tinopal CBS), ambos do grupo diestiril-bifenil, não tiveram efeito como protetores ao VPNMAg contra a radiação UV. A AOR do VPNMAg foi mantida entre 14,9 % com o branqueador Uvitex NFW e 100 % com o BRY 10 D2 100 e o Tinopal UNPA-GX (Tabela 12). Os melhores resultados foram observados com os mesmos branqueadores que causaram os maiores aumentos na atividade do VPNMAg, como apresentados na Tabela 2.

Tabela 11. Mortalidade (%) de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* por seu VPNMAg¹ associado a branqueadores óticos a 0,5 % e exposto à radiação ultravioleta durante 90 minutos.

Tratamentos ²	Mortalidade (%) ³	Mortalidade (%) após radiação UV
VPNMAg + Água	78,9 a b	29,7 g h
+ BRY 10 D2 100	97,8 a	97,8 a
+ Leukophor DUB	97,8 a	86,8 a
+ Tinopal DMS	97,8 a	95,7 a
+ Tinopal UNPA-GX	96,8 a	97,8 a
+ BRY 10 D2 150	94,4 a	75,3 a b c
+Leukophor BSBB	88,4 a	60,0 b c d e
+ Hostalux KS-N	82,9 a b	50,0 c d e f
+ Uvitex BHT	95,8 a	47,3 d e f
+Tinopal CBS	80,9 a b	38,6 e f g
+ Hostalux ETBN	76,2 a b c	41,8 e f g
+Uvitex NFW	80,5 a b	12,0 h

¹VPNMAg = $1,0 \times 10^5$ corpos poliédricos de inclusão (CPI)/ml.

²30 larvas por tratamento para cada repetição; três repetições.

³ Médias seguidas de mesma letra, na tabela, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 12. Atividade original remanescente (AOR) do VPN de *Anticarsia gemmatalis* ($1,0 \times 10^5$ CPI/ml), depois de exposto à radiação ultravioleta por 90 minutos, utilizando branqueadores óticos na concentração de 0,5 % como protetores contra a UV.

OAR ¹				
< 30	30-50	50-70	70-90	>90
Uvitex NFW	Uvitex BHT	Leukophor BSBB	Leukophor DUB	BRY 10 D2 100
	Tinopal CBS	Hostalux KS-N	Tinopal DMS	Tinopal UNPA-GX
	VPNMAg ²	Hostalux ETBN	BRY 10 D2 150	

¹Atividade Original Remanescente (AOR) foi baseada na mortalidade das lagartas com o VPN exposto e não exposto a radiação ultravioleta.

²AOR do VPNMAg = 37,6 %.

30 larvas para cada concentração do VPN por tratamento e três repetições/tratamento.

Resultados análogos foram mostrados por Shapiro (1992), usando branqueadores como protetores para o VPN de *L. dispar*. Entre 23 branqueadores testados, 17 mantiveram a atividade original do vírus maior do que 70 %; oito mantiveram a atividade em 100 % e três branqueadores não foram eficientes como protetores da luz UV. Os branqueadores óticos que apresentaram eficiência foram os do grupo do ácido stilbene disulfônico.

As substâncias avaliadas como protetores da luz UV para patógenos de insetos, de acordo com Shapiro *et al.* (1983), pode ser separada em dois grupos. No primeiro, a radiação é refletida por esse material e inclui o óxido de zinco, o óxido de titânio, silicatos e talco. No segundo grupo, as substâncias químicas agem absorvendo a radiação ultravioleta e emitindo radiação no espectro visível. Os branqueadores óticos rapidamente absorvem a luz UV, que é convertida em ondas longas e emitida a 440 nm na porção azul do espectro visível (Villaume, 1958). O primeiro relato sugerindo o efeito de branqueadores óticos como agentes de proteção contra a luz ultravioleta para um vírus de inseto foi feito por Martignoni & Iwai (1985), com o branqueador Tinopal DCS na concentração de 5,0 %, associado ao vírus de *O. pseudotsugata*.

Mesmo considerando as aplicações realizadas em condições adequadas de tempo (umidade, temperatura, insolação, período do dia, etc.), os vírus quando utilizados no controle de pragas são desativados pela luz, principalmente pela radiação ultravioleta (Jaques, 1975), determinando o período ativo do patógeno. Em condições de superposição de gerações, o

período ativo do vírus pode ser um dos componentes limitantes na eficiência do controle do inseto. Nessa condição, a atividade do vírus pode não ser mantida por um período de tempo suficiente para causar infecção nos indivíduos que eclodem alguns dias após a aplicação do VPN, comprometendo a eficiência final do controle do inseto alvo. Os branqueadores óticos mostraram ser substâncias com possibilidades de proteger o vírus da lagarta-da-soja, mantendo a atividade do VPN mesmo após ter sido submetido à radiação UV germicida. O uso dessa associação, entretanto, deve ser avaliado considerando-se o efeito em campo, bem como a relação custo/benefício dos produtos disponíveis no mercado.

5.11. Preferência alimentar em dieta artificial contendo branqueadores óticos para lagartas de *Anticarsia gemmatalis*

A dieta contendo os branqueadores óticos Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS e BRY 10 D2 100 na concentração de 0,5 % foi, em algumas avaliações, menos visitada pelos insetos, sugerindo que a presença de algumas dessas substâncias tem efeito deterrente para lagartas de *A. gemmatalis* (Tabela 13). Na primeira avaliação, 12 horas após a liberação das lagartas na arena, o número de insetos contados no alimento contendo apenas água, no ensaio com o Tinopal DMS, foi de 4,22, sendo de 3,22 no alimento contendo o branqueador, constituindo-se na única diferença significativa nessa avaliação. Nas avaliações seguintes, o número de insetos foi diferente para o BRY 10 D2 100 (24 horas); Tinopal UNPA-GX, Tinopal DMS e BRY 10 D2 100 (36 horas); BRY 10 D2 100 (60 horas); Tinopal DMS (72 horas); Tinopal UNPA-GX (84 horas) e BRY 10 D2 100 (96 horas). Em nenhum período avaliado, houve diferença no número de insetos contados na dieta contendo o Leukophor DUB.

Resultados semelhantes foram encontrados por Vail *et al.* (1996), relatando que os resultados de testes de livre escolha confirmaram o efeito negativo do Tinopal LPW a 1,0 % no crescimento larval, por inibir a alimentação. De quatro espécies avaliadas, apenas *H. zea* em uma única avaliação não foi afetada negativamente pela presença de branqueador. Nas demais avaliações, o número de insetos no tratamento com água, em relação ao tratamento com o branqueador, foi significativamente maior para as quatro espécies testadas, concluindo que as lagartas têm uma preferência definitiva pelo alimento sem o branqueador. Farrar *et al.* (1995) relataram, também, moderada deterrência alimentar com o Blankophor BBH em lagartas de *L. dispar*.

É importante observar, entretanto, que em todos os tratamentos contendo o branqueador ótico, houve a formação de uma película, mais ou menos densa, em torno do alimento,

modificando, aparentemente, a textura da dieta. Esse efeito deve ser considerado, já que a quantidade de branqueador utilizado no ensaio (70 µl da solução em 2,0 cm³ de dieta) foi elevado, sugerindo um efeito físico exercendo influência na não preferência alimentar. Ainda, não foram verificadas diferenças no consumo de folhas contendo branqueadores óticos nas concentrações de 0,1 e 0,5 % nas aplicações em plantas de soja. Dessa forma, a não preferência observada nestes ensaios não se constitui impeditivo à utilização de branqueadores óticos

Tabela 13. Efeito de branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico, utilizados a 0,5 %, na preferência alimentar, avaliado pelo número de lagartas de *Anticarsia gemmatalis*, observadas na superfície da dieta artificial, durante oito períodos.

Tratamentos	Período avaliado (horas)							
	12	24	36	48	60	72	84	96
Água	2,05±0,14 a ¹	1,80±0,18 a	2,05±0,16 a	0,70±0,11 a	1,17±0,14 a	1,80±0,21 a	3,85±0,21 a	3,72±0,20 a
Tinopal UNPA-GX	1,92±0,16 a	1,45±0,12 a	1,32±0,15 b	0,77±0,08 a	1,10±0,12 a	1,65±0,20 a	3,27±0,13 b	3,30±0,23 a
CV (%)	34,71	42,53	40,88	55,81	52,28	53,99	21,97	27,30
Água	4,22±0,23 a	1,92±0,21 a	4,17±0,20 a	3,97±0,19 a	3,75±0,15 a	2,00±0,18 a	2,57±0,17 a	3,17±0,18 a
Tinopal DMS	3,22±0,23 b	1,50±0,15 a	3,32±0,25 b	3,55±0,20 a	3,72±0,15 a	2,72±0,23 b	2,37±0,20 a	2,85±0,20 a
CV (%)	27,70	48,43	27,45	23,49	17,89	38,53	33,47	28,08
Água	3,55±0,16 a	2,00±0,19 a	2,17±0,19 a	3,20±0,16 a	3,75±0,16 a	3,37±0,19 a	3,15±0,15 a	3,05±0,21 a
Leukophor DUB	3,40±0,20 a	1,97±0,23 a	2,25±0,23 a	3,35±0,04 a	3,52±0,19 a	3,42±0,17 a	3,07±0,14 a	2,90±0,23 a
CV (%)	20,47	48,45	42,99	24,64	21,84	23,89	20,97	33,94
Água	2,27±0,18 a	3,65±0,14 a	3,97±0,15 a	2,77±0,18 a	3,45±0,18 a	3,85±0,13 a	3,92±0,19 a	3,60±0,23 a
BRY 10 D2 100	3,47±0,17 a	2,95±0,14 b	3,30±0,15 b	2,55±0,17 a	2,55±0,17 b	3,37±0,21 a	3,42±0,16 a	2,85±0,14 b
CV (%)	23,29	19,66	19,15	29,65	26,98	21,53	21,97	20,80

¹Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna, para cada tratamento, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

5.12. Peso de pupas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas em dieta contendo branqueadores óticos

O peso das pupas formadas de lagartas alimentadas em dieta contendo branqueadores óticos foi menor em todos os tratamentos, quando comparado com o peso das pupas testemunhas. Entretanto, apenas com o Tinopal UNPA-GX a diferença foi significativa no nível de 5,0 % de

probabilidade (Tabela 14). Esses resultados são coerentes com a avaliação da preferência, conforme relatado no item 5.11, já que houve, em algumas avaliações, menor número de indivíduos alimentando-se em dieta contendo branqueadores (Tabela 13), comprometendo o desenvolvimento das lagartas e, conseqüentemente, menor peso das pupas. Deve se considerar, entretanto, que o branqueador foi colocado na superfície da dieta e a formação de uma película densa pode ter causado alguma dificuldade na alimentação, principalmente para as lagartas no início do desenvolvimento.

Tabela 14. Peso de pupas ($X \pm EP$) de *Anticarsia gemmatalis* resultantes de lagartas alimentadas em dieta artificial contendo branqueadores óticos derivados do ácido stilbene disulfônico a 0,5 %.

Tratamentos ¹	Peso em gramas ²	Amplitude Total
Água	0,206 \pm 0,0033 a	0,168 - 0,256
Leukophor DUB	0,196 \pm 0,0037 a	0,147 - 0,237
BRY 10 D2 100	0,195 \pm 0,0046 a	0,149 - 0,233
Tinopal DMS	0,191 \pm 0,0054 a	0,136 - 0,257
Tinopal UNPA-GX	0,163 \pm 0,0050 b	0,105 - 0,215
CV (%)		15,127

¹Foram avaliadas 33 pupas por tratamento.

²Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

5.13. Formulação do VPNMAg com Tinopal DMS em substituição ao caulim

Não houve diferença na mortalidade dos insetos pelo VPNMAg formulado com Tinopal DMS ou formulado em caulim, argila utilizada na formulação comercial desse vírus no Brasil. A CL_{50} foi de 1.132,9 (882,9-1495,2) CPI/ml para o vírus formulado em Tinopal DMS e de 853,0 (738,4-1.592,2) CPI/ml com o vírus formulado em caulim (Figura 3). O vírus purificado apresentou a CL_{50} de 578,5 (439,0-776,3), diferente significativamente pelo critério da

superposição dos valores do intervalo de confiança (95 %). Essa diferença se deve, possivelmente, à contagem dos poliedros virais da suspensão utilizada no bioensaio.

Na quantidade de material inerte que é utilizada na formulação do VPNMAG, o Tinopal DMS não proporcionou maior eficiência ao vírus, entretanto, a dispersão do produto na água, ocorreu mais facilmente com o vírus formulado com o branqueador, sugerindo a possibilidade de utilização desses produtos como material inerte nas formulações comerciais dos vírus de insetos. Outro aspecto que deve ser avaliado, é a manutenção da virulência dos VPNs quando armazenados em meios contendo os branqueadores óticos.

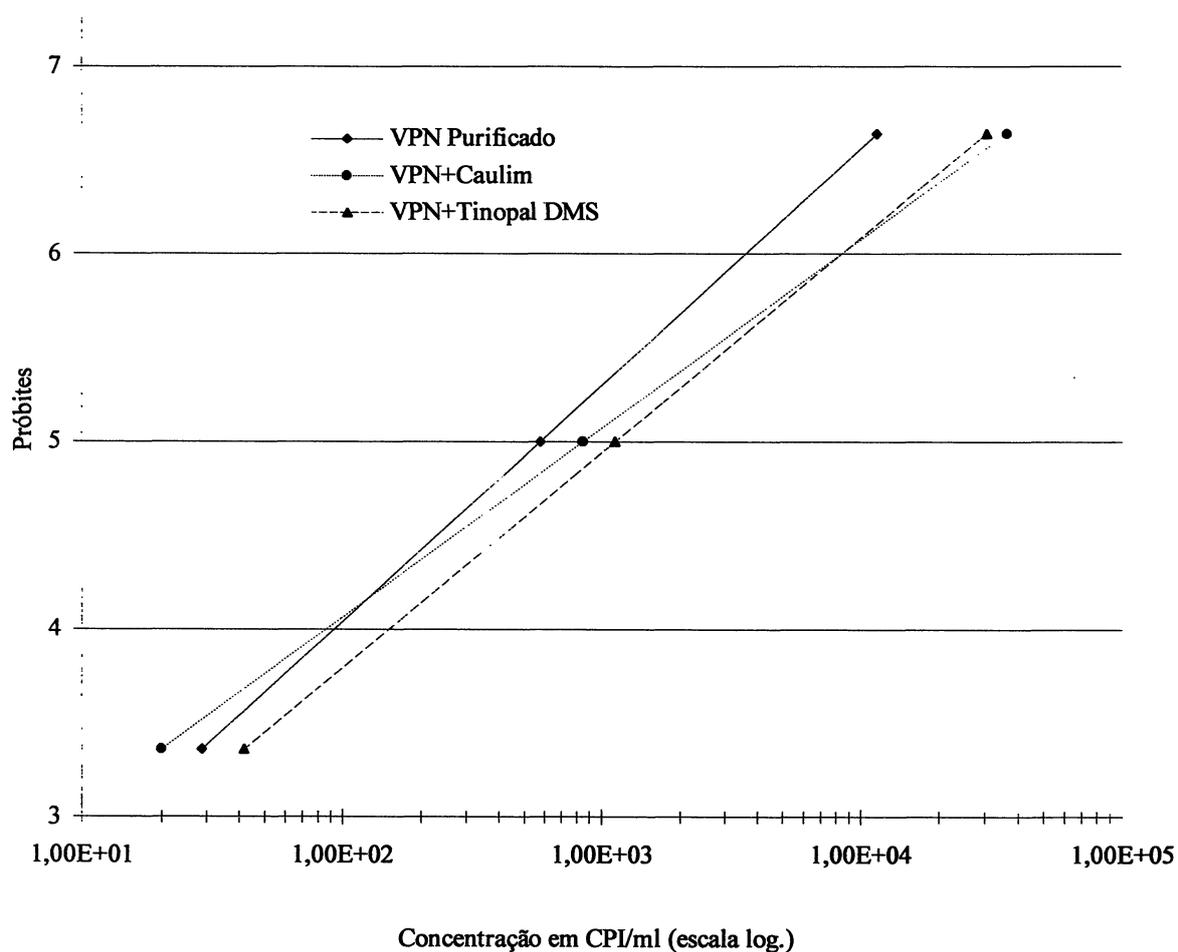


Figura 3. Concentração letal (CL) do VPNMAG em lagartas de 2º instar de *Anticarsia gemmatalis*, purificado e formulado em caulim ou em Tinopal DMS.

5.14. Quantificação de corpos poliédricos de inclusão em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* mortas pelo VPNMAg associado ao Tinopal DMS

O número de CPI produzidos em lagartas de *A. gemmatalis* mortas pelo seu VPN variou, conforme o peso do inseto, entre $0,22 \times 10^9$ CPI em lagarta de 13 mg, até $4,65 \times 10^9$ CPI em lagartas de 326 mg. Com o VPNMAg associado ao Tinopal DMS o número de poliedros produzidos foi de $0,11 \times 10^9$ CPI em lagarta de 15 mg e de $5,20 \times 10^9$ CPI em lagarta de 323 mg (Figura 4). Não houve diferença significativa entre a produção de poliedros em lagartas mortas pelo VPN associado ou não ao branqueador.

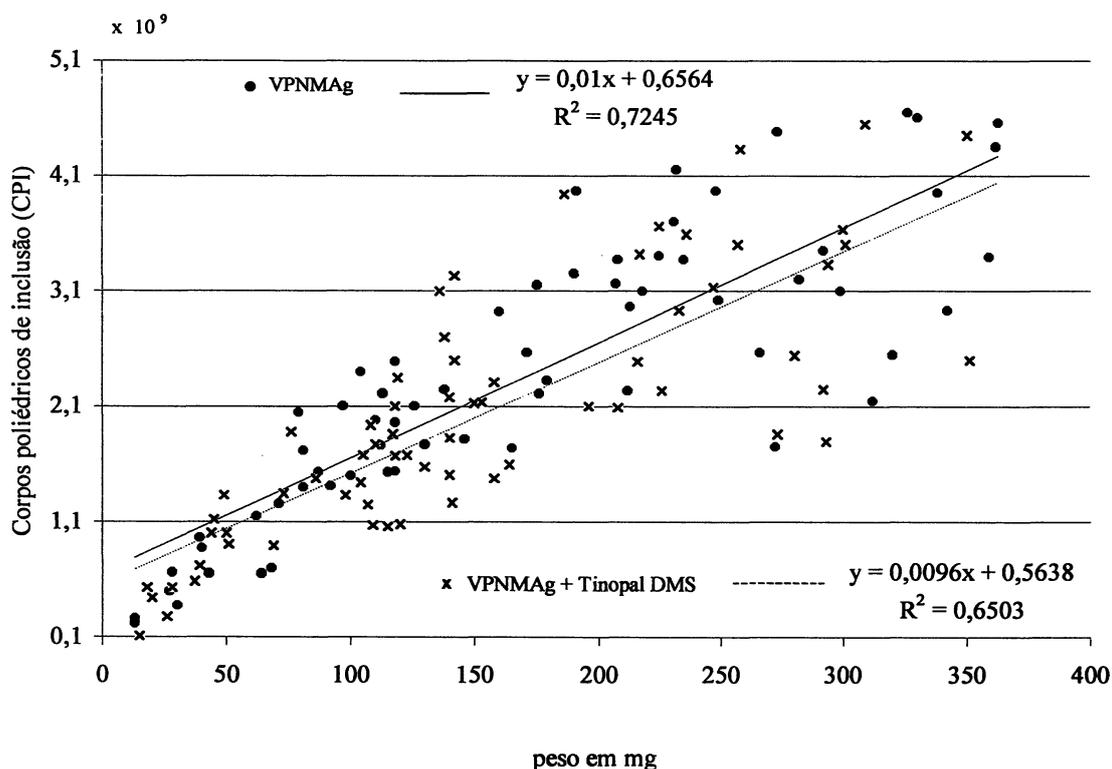


Figura 4. Número de corpos poliédricos de inclusão (CPI) produzidos em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* mortas por seu VPNMAg e por VPNMAg + Tinopal DMS.

A produção de CPI nos insetos mortos por vírus tem significado prático quando se considera a produção comercial de um VPN como inseticida microbiano, tanto na produção onde o vírus é coletado em insetos mortos no campo, quanto na produção em laboratório; como regra geral,

pode-se afirmar, para um determinado sistema vírus-inseto hospedeiro, que quanto maior o número de poliedros produzidos pelo inseto, menor será o custo de produção do vírus. A associação de Tinopal DMS ao VPNMAg, embora tenha antecipado a mortalidade do inseto, não alterou a produção de poliedros virais. É importante considerar, entretanto, a atividade/potência do vírus produzido. Para que seja possível maior eficiência de conversão de tecido do inseto hospedeiro em partículas virais infectantes, é necessário determinar-se as condições apropriadas para o máximo rendimento na produção de vírus (Sosa-Gómez & Moscardi, 1996). A associação de branqueadores óticos ao vírus poderia permitir a infecção em insetos maiores e, conseqüentemente, maior formação de partículas infectantes. Outro efeito possível, seria a antecipação da mortalidade e/ou redução da quantidade de vírus administrado ao hospedeiro, com diminuição no custo de produção do inseticida microbiano. Em laboratório, essa eficiência para a produção do VPN de *A. gemmatalis* foi determinada por Moscardi *et al.* (1997), com maior produção ocorrendo com a inoculação do vírus na concentração de $4,0 \times 10^7$ CPI/ml, em lagartas de final de 5° ínstar.

O Equivalente Larval, ou Lagarta Equivalente (LE), tem sido utilizado como parâmetro para definir doses a serem utilizadas em aplicações no campo, e varia de um vírus para outro em função da espécie hospedeira, do vírus inoculado e da idade (peso) do inseto avaliado. Calculado para lagartas de *A. gemmatalis* de 150 mg, o valor de 1 LE foi igual a $2,0 \times 10^9$ CPI, para lagartas mortas pelo vírus associado ou não ao branqueador ótico. Alves (1986) refere-se a 1 LE para lagartas de *H. zea* como sendo igual a $6,0 \times 10^9$ CPI. No controle da lagarta-da-soja, a dose recomendada do VPNMAg é de 50 LE por ha, considerando-se 1 LE, como sendo, na média, igual a $1,3 \times 10^9$ CPI (Moscardi, 1986).

Neste trabalho, os branqueadores óticos encontrados no mercado brasileiro e que apresentaram melhor eficiência na associação com o VPNMAg, todos do grupo do stilbene disulfônico, aumentaram significativamente a mortalidade pelo vírus em lagartas de *A. gemmatalis*, principalmente em insetos resistentes, assim como, propiciaram significativa proteção contra a radiação UV. Além disso, aumentaram de forma significativa a mortalidade de *S. frugiperda* e *R. nu* pelo VPNMAg. Esses resultados indicam que os branqueadores óticos são substâncias úteis para serem incluídas em formulações do VPNMAg, tanto para aumento da atividade, como para antecipar a mortalidade dos insetos, ou mesmo, em casos de resistência ao VPN que eventualmente possa ocorrer em populações de *A. gemmatalis* no campo. Os resultados indicam, ainda, que os branqueadores podem ser incluídos nos processos de produção de vírus de insetos em laboratório, diminuindo a quantidade de inóculo, o tempo de mortalidade

dos insetos e permitindo a produção de partículas infectantes em lagartas de maior peso corporal, possibilitando, dessa forma, maior produção de poliedros virais por inseto, com menor custo de produção.

Trabalhos futuros conduzidos em condições de campo devem avaliar a eficiência agronômica e o custo benefício da associação de branqueadores óticos com o VPNMAg, considerando, principalmente, o tempo de mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis*. Há que se considerar, nessa avaliação, possíveis efeitos indesejáveis ao ambiente.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. Os branqueadores óticos Tinopal UNPA, Tinopal DMS, BRY 10 D2 100, e Leukophor DUB potencializam, de forma significativa, a atividade do VPNMAg e antecipam substancialmente o tempo de mortalidade dos insetos.
- 6.2. O aumento da eficiência do VPN de *A. gemmatalis*, pela associação com branqueadores óticos, é mais acentuado em lagartas resistentes ao VPN do que em lagartas suscetíveis, sendo possível controlar populações de *A. gemmatalis* com alta resistência ao vírus.
- 6.3. A associação de branqueadores óticos (Tinopal UNPA, Tinopal DMS, BRY 10 D2 100, e Leukophor DUB) ao VPN de *A. gemmatalis* aumenta significativamente a mortalidade de *Spodoptera frugiperda* e *Rachiplusia nu*.
- 6.4. O vírus de poliedrose nuclear de *A. gemmatalis*, na dose de $3,0 \times 10^{10}$ CPI/ha (1/5 da dose recomendada para o controle em campo da lagarta-da-soja), associado ao Tinopal DMS a 0,1 %, quando avaliado em casa de vegetação, é tão eficiente quanto o vírus na dose recomendada de $1,5 \times 10^{11}$ CPI/ha.
- 6.5. Os branqueadores óticos Tinopal UNPA, Tinopal DMS, BRY 10 D2 100, Leukophor DUB e BRY 10 D2 150 protegem o VPNMAg da radiação UV artificial, emitida por lâmpada germicida de 30 w (modelo NIS G30 T8) durante 90 minutos.
- 6.6. Alguns branqueadores óticos interferem negativamente na alimentação dos insetos. Neste trabalho, não ficou determinado se o fenômeno ocorre devido à qualidade do alimento quando adicionado de um branqueador ótico, ou se é devido à barreira física criada pela película do produto sobre a dieta.
- 6.7. O peso das pupas de *A. gemmatalis* é menor quando as lagartas são alimentadas em dieta contendo branqueadores óticos a 0,5 %, especialmente com Tinopal UNPA-GX.
- 6.8. Não ocorre diferença na mortalidade dos insetos com o VPNMAg formulado em caulim, ou com Tinopal DMS, entretanto, a dispersão do VPN na água é melhor para o produto formulado com o branqueador ótico.

- 6.9. A adição do branqueador ótico Tinopal DMS a 0,5 % ao VPNMAg não altera o número de poliedros produzidos em lagartas mortas pelo vírus.

7. LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925.** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Abot, A. R., F. Moscardi, J. R. Fuxa, D. R. Sosa-Gómez & A. R. Richter. 1995.** Susceptibility of populations of *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and United States to a nuclear polyhedrosis virus. *J. Entomol. Sci.* 30: 62-69.
- Abot, A. R., F. Moscardi, J. R. Fuxa, D. R. Sosa-Gómez & A. R. Richter. 1996.** Development of resistance by *Anticarsia gemmatalis* from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure. *Biol. Control* 7: 126-130.
- Adams, J. R., C. A. Sheppard, M. Shapiro & G. J. Tompkins. 1994.** Light and electron microscopic investigations on the histopathology of the midgut of gypsy moth larvae infected with LdMNPV plus a fluorescent brightener. *J. Invertebr. Pathol.* 64: 156-159.
- Alves, S. B. 1986.** Vírus entomopatogênicos, p.171-187. In S. B. Alves (coord.), *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole. 407 p.
- Alves, S. B. & R. E. Lecuona. 1998.** Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos, p. 97-169. In S. B. Alves (coord), *Controle microbiano de insetos* (2ª ed.). Piracicaba, FEALQ. 1163 p.
- Alves, L. F. A., A. E. F. Leitão, N. T. Augusto, L. G. Leite & A. Batista Filho. 1992.** Utilização de adjuvante protetor contra radiação solar e fagoestimulante, em mistura com um vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Arq. Inst. Biol.* 59: 19-22.
- Alves S. B., P. S. M. Botelho, L. F. A. Alves & F. Moscardi. 1998.** Produção de vírus entomopatogênico, p. 871-887. In S. B. Alves (coord), *Controle microbiano de insetos* (2ª ed.). Piracicaba, FEALQ. 1163 p.
- Anderson, R. M. 1982.** Theoretical basis for the use of pathogens as biological control agents of pest pest species. *Parasitology* 84: 3-33.
- Andrews, G. L., F. A. Harris, P. P. Sikorowski & R. E. McLaughlin. 1975.** Evaluation of Heliothis nuclear polyhedrosis virus in cottonseed oil bait for control of *Heliothis virescens* and *H. zea* on cotton. *J. Econ. Entomol.* 68: 87-90
- Argauer, R. & M. Shapiro. 1997.** Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 90: 416-420.

- Armargier, A., S. Abol-Ela, S. Vergara, G. Meynadier, D. Martouret & G. Croizier. 1981.** Études histologiques et ultrastructurales des larves de *Pandemis heparana* (Lep. Tortricidae) au cours des stades avancés d'une baculovirose due à un nouveau virus inducteur de diapause. *Entomophaga* 26: 319-332.
- Barbehenn, R. V. & M. M. Martin, 1995.** Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *J. Insect Physiol.* 41:303-311.
- Batista Filho, A, S. B. Alves, L. F. A. Alves, R. M. Pereira & N. T. Augusto. 1998.** Formulação de entomopatógenos, p. 917-965. In S. B. Alves (coord), Controle microbiano de insetos (2ª ed.). Piracicaba, FEALQ. 1163 p.
- Bell, M. R. & R. F. Kanavel. 1975.** Potential of the bait formulation to increase effectiveness of nuclear polyhedrosis virus against the pink bollworm. *J. Econ. Entomol.* 68: 389-391.
- Bijjur, S., K. A. Kulkarni & S. Lingappa. 1991.** Evaluation of nuclear polyhedrosis with certain adjuvants for the control of *Heliothis armigera* (Hübner). *Indian J. Entomol.* 3: 479-483.
- Bilimoria, S. L. 1986.** Taxonomy and identification of baculoviruses, p 37-60. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Boca Raton, CRC, v.1. 275 p.
- Bonning, B. C. & B. D. Hammock. 1992.** Development and potential of genetically engineered viral pesticide. *Biotechnology & Genetic Engineering Review* 10: 455-489.
- Bonning, B. C., K. Hoover, T. F. Booth, S. Duffey & B. D. Hammock. 1995.** Development of a recombinant baculovirus expressing a modified juvenile hormone esterase with potential for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30: 177-194.
- Bonning, B. C. & B. D. Hammock. 1996.** Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annu. Rev. Entomol.* 41: 191-210.
- Boucias, D. G., D. W. Johnson & G. E. Allen 1980.** Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, larvae. *Environ. Entomol.* 9: 59-61.
- Boucias, D. G. & J. C. Pendland. 1998.** Principles of insect pathology. Massachusetts, Kluwer Academic Publisher. 632 p.
- Burges, H. D. 1971.** Possibilities of pest resistance to microbial control agents, p. 445-457. In H. D. Burges & N. W. Hussey (eds.), *Microbial control of insects and mites*. London & New York, Academic Press. 861 p.

- Brandt C. R., M. J. Adang & K. D. Spence. 1978.** The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. *J. Invertebr. Pathol.* 32:12-24.
- Briese, D. T. 1981.** Resistance of insect species to microbial pathogens, p. 511-545. In E. W. Davidson (ed.), *Pathogenesis of invertebrate microbial diseases*. Totowa, N. J., Allanheld, Osmun. 562 p.
- Briese, D. T. 1986.** Insect resistance to baculoviruses, p. 237-264. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Boca Raton CRC, v.2. 276 p.
- Briese, D. T. & J. D. Podgwaite. 1985.** Development of viral resistance in insect population, In K. Maramorosch & K. E. Sherman (eds.). *Viral insecticides for biological control*. New York. Academic Press. 361 p.
- Bucher, G. E. & W. J. Turnock. 1983.** Dosages responses of the larval instar of the Bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae), to a native nuclear polyhedrosis. *Can. Entomol.* 115: 341-349.
- Carbonell, L. F., M. R. Hodge, M. D. Tomalski & L. K. Miller. 1988.** Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene* 73: 409-418.
- Carner, G. R., J. S. Hudson & O. W. Barnett. 1979.** The infectivity of a nuclear polyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar for eight Noctuidae hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 33: 211-216.
- Chaudhari, S. 1992.** Formulation of nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera litura* with boric acid. *Indian Journal of Entomology* 54: 202-206.
- Chiaravalle, V. W. R. 1988.** Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua mortalidade e no consumo da área foliar da soja. São Paulo, ESALQ/USP, 1988.164 p. (Dissertação de Mestrado).
- Chundurwar, R. M., V. M. Pawar & M. R. More. 1990.** Efficacy of nuclear polyhedrosis virus in combination with boric acid and tannic acid against *Helicoverpa armigera* (Hüb) on chickpea. *Int. Chickpea Newsl.* 23: 17-18.
- Cory, J. S., M. L. Hirst, T. Williams, R. S. Hails, D. Goulson, B. M. Green, T. Carty, R. D. Possee, P. J. Cayley & D. H. L. Bishop. 1994.** Field trial of genetically improved baculovirus insecticide. *Nature* 370: 138-140.

- Cox, M. E., A. D. Larson & R. L. Amborski. 1972.** Nuclear polyhedrosis virus of *Pseudoplusia includens*. J. Invertebr. Pathol. 19: 411-413.
- Darken, M. A. 1962.** Absorption and transport of fluorescent brightener in biological techniques. Science 13: 1704-1705.
- David, W. A. L. 1969.** The effect of ultraviolet radiation of known wavelengths on a granulosis virus of *Pieris brassicae*. J. Invertebr. Pathol. 14: 334-342.
- David, W. A. L., S. G. Clothier, M. & G. Taylor. 1971.** Bioassay on insect virus on leaves. II. The influence of certain factors associated with the larvae and the leaves. J. Invertebr. Pathol. 17: 178-185.
- David, W. A. L., & C. E. Taylor. 1977.** The effect of sucrose content of diets on susceptibility to granulosis virus disease in *Pieris brassicae*. J. Invertebr. Pathol. 30: 117-118.
- Derksen, A. C. G. & R. R. Granados. 1988.** Alteration of lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology 167: 242-250.
- Dougherty, E. M., K. P. Guthrie & M. Shapiro. 1996.** Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. Biol. Control 7: 71-74.
- Eldridge, R., D. R. O'Reilly & L. K. Miller. 1992.** Efficacy of a baculovirus pesticide expressing an eclosion hormone gene. Biol. Control 2: 104-110.
- Engelhard, E. K., L. N. W. Kam-Morgan, J. O. Washburn & L. E. Volkman. 1994.** The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 3224-3227.
- Entwistle, P. F. 1983.** Control of insect by virus diseases. Rev. Applied Entomol. 71: 890.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. D. Cave, J. W. Chapman & P. Caballero. 1999.** Selection of a Nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. J. Econ. Entomol. 92: 1079-1085.
- Evans, H. F. 1981.** Quantitative assessment of the relationships between dosage and response of the nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae*. J. Invertebr. Pathol. 37: 101-
- Evans, H. F. 1983.** The influence of larval maturation on responses of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) to nuclear polyhedrosis virus infection. Arch. Virol. 75: 163-
- Farrar Jr, R. R., R. L. Ridgway, S. P. Cook, K. W. Thorpe & R. E. Weeb. 1995.** Spray adjuvants for the nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): effects on viral potency and insect feeding behavior. J. Entomol. Sci. 30: 417-428.

- Farrar Jr, R. R. & R. L. Ridgway. 1997.** The celery looper (Lepidoptera: Noctuidae) baculovirus: potency and enhancement by Blankophor BBH against 3 lepidopteran species. *Environ. Entomol.* 26: 1461-1469.
- Federici, B. A. 1986.** Ultrastructure of baculoviruses, p. 61-88. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Boca Raton CRC, v.1. 275 p.
- Finney, D. J. 1971.** Probit analysis. London, Cambridge, Univ. Press, 333 p.
- Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson & F. Brown. 1991.** Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* 2: 117-123.
- Fuxa, J. R. 1987.** Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Annu. Rev. Entomol.* 32: 225-251
- Fuxa, J. R. 1993.** Insect resistance to viruses, p.197-209. In N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federici (eds.), *Parasites and pathogens of insects: pathogens*. Academic Press, San Diego. Vol. 2. 294 p.
- Fuxa, J. R., F. L. Mitchell & A. R. Richter. 1988.** Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. *Entomophaga* 33: 55-63.
- Fuxa, J. R. & A. R. Richter. 1989.** Reversion of resistance by *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 53:52-56.
- Fuxa, J. R. & A. R. Richter. 1998.** Repeated reversion of resistance to Nucleopolyhedrovirus by *Anticarsia gemmatalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 159-164.
- Gallo, L. G., B. G. Corsaro, P. R. Hughes & R. R. Granados. 1991.** In vivo enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 58: 203-210.
- Gomez, S. A., F. Moscardi & D. R. Sosa-Gómez. 1999.** Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. *Pesq. Agropec. Bras.* 9: 1539-1544.
- Granados, R. R. & K. A. Williams. 1986.** In vivo infection and replication of baculoviruses, p. 89-107. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Boca Raton CRC, v.1. 275 p.
- Greene, G. L., N. C. Leppla & W. A. Dickerson. 1976.** Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69: 487-488.

- Grewal, P. S., K. Webb, N. A. M. Van Beek, M. B. Dimock & R. Georgis. 1998.** Virulence of *Anagrapha falcifera* nuclear polyhedrosis virus to economically significant lepidoptera. J. Econ. Entomol. 91: 1302-1306.
- Gröner, A. 1986.** Specificity and safety of baculoviruses, 117-202 p. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.). The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology. Boca Raton CRC, v.1. 275 p.
- Gudauskas, R. T. & D. Cannerday. 1968.** The effect of heat, buffer, salt and H-ion concentration, and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear-polyhedrosis viruses. J. Invertebr. Pathol. 12: 405-411.
- Hamm J. J. & M. Shapiro. 1992.** Infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus enhanced by a fluorescent brightener. J. Econ. Entomol. 85: 2149-2152.
- Hammock, B. D. 1998.** Status of recombinant baculoviruses in insect pest control. Reviews in Toxicology 2: 205-221
- Harper, J. D. 1986.** Interaction between baculoviruses and other entomopathogens, chemical pesticides, and parasitoids, 133-156 p. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.). The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology. Boca Raton CRC, v.2. 276 p.
- Hayashiya, K., J. Nishida & Y. Uchida. 1976.** The mechanism of formation of the red fluorescent protein in the digestive juice of silkworm larvae- the formation of chlorophyllide-a. J. Appl. Entomol. Zool. 20: 37-43.
- Heinz, K. M., B. F. McCutchen, R. Herrmann, M. P. Parrella & B. D. Hammock. 1995.** Direct effects of recombinant nuclear polyhedrosis viruses on selected nontarget organisms. J. Econ. Entomol. 88: 259-264.
- Hoffmann-Campo, C. B., E. B. Oliveira & F. Moscardi. 1985.** Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, Embrapa-CNPSO, Documento 10, 20 p.
- Hoover, K., C. M. Schultz, S. S. Lane, B. C. Bonning, B. F. McCutchen, S. S. Duffey, & B. D. Hammock. 1995.** Reduction in damage to cotton plants by a recombinant baculovirus that knocks moribund larvae of *Heliothis virescens* off the plant. Biol. Control 5: 419-426.
- Hostetter, D. L. & B. Puttler. 1991.** A new broad spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper *Anagrapha falcifera* (Kirby) (Lepidoptera:Noctuidae). J. Econ. Entomol. 20: 1480-1488

- Huber, J. 1986.** Use of baculoviruses in pest management programs, p.181-202. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.). The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology. Boca Raton, CRC, v.1. 275 p.
- Hughes, P. R., R. R. Gettig & W. J. McCarthy. 1983.** Comparison of the time-mortality response of *Heliothis zea* to 14 isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. J. Invert. Pathol. 41: 256-261.
- Hughes, P. R., J. P. Foster & H. A. Wood. 1999.** Action spectra for the inactivation of AcMNPV and TnSNPV by ultraviolet light in sunlight. In "Society for Invertebrate Pathology – 32nd Annual Meeting". p. 47 (Abstracts).
- Ignoffo, C. M. 1966.** Susceptibility of the first instar of the bollworm *Heliothis zea* and the budworm *Heliothis virescens* to *Heliothis* NPV. J. Invertebr. Pathol. 8: 531-536.
- Ignoffo, C. M. 1992.** Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Fla. Entomol. 75:516-525.
- Ignoffo, C. M. & E. L. Montoya 1966.** The effect of chemical insecticides and chemical adjuvants of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 8: 409-412.
- Ignoffo, C. M. & O. F. Batzer. 1971.** Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. J. Econ. Entomol. 64: 850-853.
- Ignoffo, C. M., D. L. Hostetter, P. P. Sikorowski, G. Sutter & W. W. Brooks. 1977.** Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. Environ. Entomol. 6: 411-415.
- Ignoffo, C. M. & C. Garcia. 1997.** Effect of viral concentration and body weight on mortality of larvae of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to wild-type or recombinant strains of the nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 26: 955-960.
- Ignoffo, C. M., C. Garcia & S. G. Saathoff. 1997.** Sunlight stability and rain-fastness of formulations of *Baculovirus heliothis*. Environ. Entomol. 26: 1470-1474.
- Inoue, H & M. Miyagawa. 1978.** Regeneration of midgut epithelial cells the silkworm, *Bombyx mori*, infected with viruses. J. Invertebr. Pathol. 32: 373-380.
- Jaques, R. P. 1968.** The inactivation of the nuclearpolyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by gamma and ultraviolet radiation. Can. J. Microbiol. 14: 1161-1163.
- Jaques, R. P. 1971.** Tests on protectants for foliar deposits of a polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 17: 9-16.

- Jaques, R. P. 1975.** Persistence, accumulation, and denaturation of nuclear polyhedrosis and granulosis viruses, p. 90-100. In M. Summers, R. Engler, L. A. Falcon & P. V. Vail (Eds.), *Baculovirus for insect pest control: safety considerations*. Washington, D.C., American Society for Microbiology. 186 p.
- Jaques, R. P. 1977.** Field efficacy of viruses infections to the cabbage looper and imported cabbageworm on late cabbage. *J. Econ. Entomol.* 70: 111-118.
- Jaques, R. P. & O. N. Morris. 1981.** Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops, p. 695-715. In H. D. Burges (ed.), *Microbial control of pests and plant diseases*. London, Academic. 949 p.
- Johnson, D. W., D. G. Boucias, C. S. Barfield & G. E. Allen. 1982.** A temperature-dependent developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invert. Pathol.* 40: 292-298.
- Kalmakof, J. & Longworth, J. F. 1980.** *Microbial control of insect pest*. Wellington, New Zealand. Department of Scientific and Industrial Research. Bulletin 228. 102 p.
- Kobayashi, M., S. Inagaki & S. Kawase. 1981.** Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 386-394.
- Koul, O., K. Amansi & T. Ohtaki. 1987.** Effect of azadirachtin on the endocrine events of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 33: 103-108.
- Kunimi, Y, J. R. Fuxa & B. D. Hammock. 1996.** Comparison of wild type and genetically engineered nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* for mortality, virus replication and polyhedra production in *Trichoplusia ni* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 81: 251-257.
- Lanter, J. 1966.** Properties and evaluation of fluorescent brightening agents. *J. Soc. Dyes Colourists* 82: 125-132.
- Lecuona, R. E. & S. B. Alves. 1988.** Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, and granulosis virus on *Diatraea saccharalis* (F.,1794) at different temperatures. *J. App. Entomol.* 105: 223-228.
- Lehane, M. J. 1997.** Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 525-550.
- Lepore, L. S., P. R. Roelvink & R. R. Granados. 1996.** Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 131-140.

- Livingston, J. M., P. J. McLeod, W. C. Yearian & S. Y. Young. 1980.** Laboratory and field evaluation of a nuclear polyhedrosis virus of the soybean looper, *Pseudoplusia includens*. J. Ga. Entomol. Society 15: 194-199.
- Lobo de Souza, M. & R. E. Lecuona. 1996.** Virus entomopat6genos, p. 73-86. In R. E. Lecuona (ed.), Microorganismos pat6genos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Buenos Aires, Talleres Gr1ficos Mariano Mas, 338 p.
- Luttrell, R. G., W. C. Yearian & S. Y. Young. 1979.** Laboratory and field studies on the efficacy of selected chemical insecticide-Elcar (*Baculovirus heliothis*) combination against *Heliothis* spp. J. Econ. Entomol. 72: 57-60
- Luttrell, R. G., W. C. Yearian & S. Y. Young. 1983.** Effect of spray adjuvants on *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus efficacy. J. Econ. Entomol 76: 162-167.
- Maeda, S. 1989.** Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 1177-1183.
- Magnoler, A. 1970.** Susceptibility of gypsy moth larvae to *Lymantria* sp. nuclear and cytoplasmic viruses. Entomophaga 15: 407-412.
- MacCutchen, B. F., P. V. Choudary, R. Crenshaw, D. Maddox, S. G. Kamita, N. Palekar, S. Volrath, E. Fowler, B. D. Hammock & S. Maeda. 1991.** Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. Bio/Technology 9: 848-852.
- Martignoni, M. E. 1957.** Contributo alla conscenza di una granulose di *Eucosma griseana* (Hübner) (Tortricidae, Lepidoptera) quale fattore limitante il pullullamento dell'insetto nella Engadina alta. Mitt. Schweiz. Anst. Forstl. Versuchstierkd 32: 371-418.
- Martignoni, M. E. & P. J. Iwai. 1985.** Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of Douglas fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. J. Econ. Entomol. 78: 982-987.
- Martinez, A. M., D. Goulson, J. W. Chapmann, P. Caballero, R. D. Cave & T. Williams. 2000.** Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus bioinsecticide for resource-poor maize farmers in Mesoamerica ? Biol. Control 17: 174-181.
- McCutchen, B. F., R. Herrmann, K. M. Heinz, M. P. Parrella & B.D. Hammock. 1996.** Effects of recombinant baculoviruses on nontarget endoparasitoid of *Heliothis virescens*. Biol. Control 6: 45-50.

- McCutchen, B. F., M. D. Betana, R. Herrmann & B. D. Hammock. 1997.** Interactions of recombinant and wild-type baculoviruses with classical insecticides and pyrethroid-resistant tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol* 9:1179-1180.
- McLeod, P. J., S. Y. Young & W. C. Yearian. 1982.** Application of a baculovirus of *Pseudoplusia includens* to soybean: efficacy and seasonal persistence. *Environ. Entomol.* 11: 412-416.
- Mehta, U. K. & H. David. 1980.** A granulosis virus disease of sugarcane internode borer. *Madras Agriculture Journal.* 67: 616-619
- Miller, L. K. 1988.** Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 177-199.
- Miller, L. K. 1995.** Genetically engineered insect virus pesticides: present and future. *J. Invert. Pathol.* 65: 211-216.
- Mohamed, A. I., S. Y. Young & W. C. Yearian. 1983.** Susceptibility of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to microbial agent-chemical pesticide mixture on cotton foliage. *Environ. Entomol.* 12: 1403-1405.
- Morales, L. 1991.** Potencial de uso do baculovírus de *Autographa californica* (Speyer), no controle de *Pseudoplusia includens* (Walker), *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Rachiplusia nu* (Guenée) (Lep. Noctuidae). Jaboticabal. Universidade Estadual Paulista. 126 p. (Dissertação de Mestrado).
- Morales, L. 1998.** Uso do VPN de *Anticarsia gemmatalis* no programa de MIP-Soja no Paraná, p. 426-433. In Simpósio de controle biológico, 6. Conferências e mesas redondas. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz. 501 p.
- Morales, L. & F. Moscardi. 1993a.** Virulência para lagartas de *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Rachiplusia nu* (Guenée) do vírus de *Autographa californica* (Speyer) após passagem seriada em *C. includens* (Lep.: Noctuidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 22: 19-27.
- Morales, L. & F. Moscardi. 1993b.** Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. *An. Soc. Entomol. Brasil* 22: 535-540.
- Morales, L., F. Moscardi & S. Gravena. 1993.** Potencial do baculovírus de *Autographa californica* (Speyer) no controle de *Chrysodeixis includens* (Walker) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae). *Pesq. Agropec. Bras.* 28: 237-243.
- Morales, L., F. Moscardi, D. R. Sosa-Gómez, F. E. Paro & I. L. Soldorio. 1997.** Enhanced activity of *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus by boric acid in the laboratory. *An. Soc. Entomol. Brasil* 26: 115-120.

- Moscardi, F. 1986.** Utilização de vírus entomopatogênicos em campo, p. 187-202, In S. B. Alves (coord), Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole. 407 p.
- Moscardi, F. 1989.** Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis vírus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84: 51-56.
- Moscardi, F. 1998.** Resistance of *Anticarsia gemmatalis* to its nucleopolyhedrovirus (AgNPV) and evaluation of substances that enhance viral activity, pp. 421-425. In Simpósio de controle biológico, 6. Conferências e mesas redondas. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz. 501 p.
- Moscardi, F. 1999.** Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44: 257-289.
- Moscardi, F. & D. R. Sosa-Gómez. 1992.** Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil, p. 98-109. In L. G. Copping, M. B. Green & R. T. Rees (eds.), Pest management in soybean. London, Elsevier Applied Science, 369 p.
- Moscardi, F. & D. R. Sosa-Gómez. 1996.** Utilización de virus a campo, p.261-276. In R. E. Lecuona (ed.), Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Buenos Aires, Talleres Gráficos Mariano Mas, 338 p.
- Moscardi, F., L. G. Leite & C. E. Zamataro. 1997.** Production of nuclear polyhedrosis vírus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): effect of virus dosage, host density and age. An. Soc. Entomol. Brasil 26:121-132.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo & M. D. Summers (Eds.). 1995.** Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vol 10. New York, Springer-Verlag. 586 p.
- Nickle, W. R. & M. Shapiro. 1992.** Use of a stilbene brightener, Tinopal LPW, as a radiation protectant for *Steinernema carpocapsae*. J. Nematol. 24: 371-373.
- O'Reilly, D. R. & L. K. Miller. 1989.** A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. Science 245: 1110-1112.
- Ossowski, L. L. J. 1960.** Variation in virulence of a wattle bagworm virus. J. Insect Pathol. 2: 35-43.
- Pavan, O. H. & H. C. T. Ribeiro. 1989.** Selection of a baculovirus strain with a bivalent insecticidal activity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 84: 63-65.
- Pavan, O. H., D. G. Boucias & J. C. Pendland. 1981.** The effects of serial passage of a nucleopolyhedrovirus through an alternate host system. Entomophaga 26: 99-108.

- Payne, C. C., G. M. Tatchell & C. F. Williams. 1981.** The comparative susceptibilities of *Pieris brassicae* and *Pieris rapae* to a granulosis virus from *P. brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 273-280.
- Payne, C. C. 1982.** Insect viruses as control agents. *Parasitology* 84: 35-77.
- Podgwaite, J. D. 1989.** Gypchek, when you care enough to kill the very best! *Gypsy Moth News* 6-7.
- Pradham, S. & M. G. Jotwani. 1968.** Neem as an insect deterrent. *India Chem. Age* 19: 756-759.
- Reichelderfer, C. M. 1975.** Mutation potential of insect viruses, p. 73-76. In M Summers, R. Engler, L. Falcon & P. V. Vail (eds.). *Baculoviruses for insect pest control: safety considerations*. Washington, D.C., Am. Soc. for Microb. 186 p.
- Richards, A., M. Matthews & P. Christian. 1998.** Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 493-517.
- Rollinson, W. D., F. B. Lewis & W. E. Waters. 1965.** The successful use of a nuclear polyhedrosis virus against the gypsy moth. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 515-517.
- Rollinson, W. D. & F. B. Lewis. 1973.** Susceptibility of gypsy moth larvae to *Lymantria* spp. nuclear and cytoplasmic polyhedrosis viruses. *Plant Prot.* 24: 163-168.
- Shapiro, M. 1984.** Host tissues and metabolic products as ultraviolet screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* 13: 1131-1134.
- Shapiro, M. 1992.** Use of optical brighteners as radiation protectants for Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 85: 1682-1686.
- Shapiro, M. & C. Ignoffo. 1970.** Nucleopolyhedrosis of *Heliothis*: activity of isolates from *Heliothis zea*. *J. Invertebr. Pathol.* 16:107-111.
- Shapiro, M. & R. A. Bell. 1982.** Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. *Annu Entomol. Soc. Am.* 5: 346-349.
- Shapiro, M., P. P. Agin & R. A. Bell. 1983.** Ultraviolet protectants of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* 12: 982-985.
- Shapiro, M., J. L. Robertson, M. G. Injac, K. Katagiri & R. A. Bell. 1984.** Comparative infectivities of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus isolates from North America, Europe and Asia. *J. Econ. Entomol.* 77: 153-156.
- Shapiro, M., H. K. Priesler & J. L. Robertson. 1987.** Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by chitinase. *J. Econ. Entomol.* 80: 1113-1116.

- Shapiro, M. & J. L. Robertson. 1991.** Natural variability of three geographic isolates of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 84: 71-75.
- Shapiro, M. & J. L. Robertson. 1992.** Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. *J. Econ. Entomol.* 85: 1120-1124.
- Shapiro, M. & E. M. Dougherty. 1994.** Enhancement in activity of homologous and heterologous viruses against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by an optical brightener. *J. Econ. Entomol.* 87: 361-365.
- Shapiro M., J. L. Robertson & R. E. Webb. 1994.** Effect of neem seed extract upon the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and its nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 87: 356-360.
- Shapiro, M. & R. Argauer. 1995.** Effects of pH, temperature, and ultraviolet radiation on the activity of an optical brightener as a viral enhancer for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 88: 1602-1606.
- Shapiro, M. & J. L. Vaughn. 1995.** Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infections to cotton bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an optical brightener. *J. Econ. Entomol.* 88: 265-269.
- Shapiro, M. & R. Argauer. 1997.** Components of the stilbene optical brightener Tinopal LPW as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 90: 899-904.
- Silva, M, T. B. 1992.** Controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818- Lepidoptera: Noctuidae). II. *Baculovirus anticarsia*. *Ciênc. Rural* 22:261-265.
- Silva, M, T. B. 1995.** Associação de *Baculovirus anticarsia* com subdosagens de inseticidas no controle de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818). *Ciênc. Rural* 25: 353-358.
- Smirnof, W.A. 1961.** A virus disease of *Neodiprion swaini* Middleton. *J. Insect Pathol.* 3: 29-46.
- Smirnof, W.A. 1963.** Adaptation of a nuclear-polyhedrosis virus of *Trichiocampus viminalis* (Fallén) to larvae of *Trichiocampus irregularis* (Dyar). *J. Invertebr. Pathol.* 5: 104-110.
- Smith, K. M. 1976.** Virus-insect relationship. New York, Longman Inc. 291 p.
- Smith, D. B., D. L. Hostetter, R. E. Pinnell & C. M. Ignoffo. 1982.** Laboratory studies of viral adjuvants: formulation development. *J. Econ. Entomol.* 75: 16-20.
- Smits, P. H., M. van de Vrie & J. M. Vlak. 1987.** Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* on glasshouse crops. *Entomol. Exp. Appl.* 43: 73-80.

- Sosa-Gómez, D. R. & F. Moscardi. 1994.** Desenvolvimento de resistência de insetos a Baculoviruses, pp. 85-90. In Simpósio de controle biológico, 4. Conferências e Mesas Redondas. Pelotas. Embrapa CPCT.
- Sosa-Gómez, D. R. & F. Moscardi. 1996.** Producción de vírus patógenos de ácaros e insetos, p. 223-236. In R. E. Lecuona (ed.), Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Buenos Aires, Talleres Gráficos Mariano Mas, 338 p.
- Sosa-Gómez, D. R. & F. Moscardi. 2000.** Resistencia de lepidópteros a nucleopoliedovirus com enfase no sistema lagarta-da-soja-VPNAg, p.213-233. In I. S. de Melo & J. L. de Azevedo (eds.), Controle biológico.Jaguariúna, SP, EMBRAPA Meio Ambiente, 388 p.
- Stairs, G. R., T. Fraser & M. Fraser. 1981.** Changes in growth and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from *Choristoneura fumiferana* after passage in *Trichoplusia ni* and *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 38: 230-235.
- Stewart, L. M. D., M. Hirst, M. L. Ferber, A. T. Merryweather, P. J. Cayle & R. D. Possee. 1991.** Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. Nature 353: 85-88.
- Tanada, Y. 1963.** Epizootiology of infectious disease, p. 423-475. In E. A. Steinhaus (Ed.), Insect pathology: an advanced treatise.Vol. 2. New York, Academic Press. 689 p.
- Tanada, Y. 1967.** Effect of high temperatures on the resistance of insects to infectious diseases. J. Seric. Sci. Jpn. 36: 333-339.
- Tanada Y. 1985.** A Synopsis of studies on the synergistic property of an insect baculovirus: a tribute to Edward A. Steinhaus. J. Invertebr. Pathol. 45: 125-138.
- Tanada, Y. & H. K. Kaya. 1993.** Insect pathology. San Diego, California. Academic Press, Inc. 666 p.
- Tinsley, T. W. 1979.** The potential of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. Ann. Rev. Entomol. 24: 63-87.
- Tomalski, M. D. & L. K. Miller. 1991.** Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. Nature 352: 82-85.
- Tompkins, G. J., J. L. Vaughn, J. R. Adams & C. F. Reichelderfer. 1981.** Effects of propagating *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and its *Trichoplusia ni* variant in different hosts. Environ. Entomol.10: 801-806
- Tompkins, G. J., E.M. Dougherty, J. R. Adams & D. Diggs. 1988.** Changes in the virulence of nuclear polyhedrosis viruses when propagated in alternate noctuid (Lepidoptera: Noctuidae) cell lines and hosts. J. Econ. Entomol. 81: 1027-1032.

- Vail, P. V., T. J. Henneberry, A. N. Kishaloe & K. Y. Arkana. 1968. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.* 10: 84-93.
- Vail P. V., D. L. Jay & D. K. Hunter. 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper, *Autographa californica*, after passage through alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 16-20.
- Vail P. V., T. J. Henneberry, D. F. Hoffmann, M. R. Bell, L. J. F. Jech & J. S. Tebbets. 1993. The influence of a bait and fluorescent brightener on activity of the celery looper nuclear polyhedrosis virus for lepidopterous cotton pests, p. 1014-1016. In 46th Cotton Insect Research and Control Conference, 1993, New Orleans, LA. Beltwide Cotton Conferences (proceedings) 1660 p.
- Vail P. V., D. F. Hoffmann & J. S. Tebbets. 1996. Effects of a fluorescent brightener on the activity of *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus to four noctuidae pests. *Biol. Control* 7: 121-125.
- Vasiljević, L. & M. Injac. 1973. A study of gypsy moth viruses originating from different geographical regions. *Plan Prot.* 24: 169-186.
- Villaume, F. G. 1958. Optical bleaches in soaps and detergents. *J. Am. Oil Chem. Oc.* 35: 558-566.
- Wang, P. & R. R. Granados. 1999. Disruption of the insect midgut defense system by specific targeting of the peritrophic membrane. In "Society for Invertebrate Pathology - 32nd Annual Meeting". P. 78 (Abstracts).
- Washburn, J. O., B. A. Kirpatrick, S. E. Hass & L. E. Volkman. 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. *Biol. Control* 11: 58-69.
- Watanabe, H. & Y. Tanada. 1972. Infection of a nuclear polyhedrosis virus in armyworm *Pseudaletia unipunctata* Haworth (Lepidoptera: Noctuidae), reared at high temperature. *Appl. Entomol. Zool.* 7: 43-51.
- Watanabe, H., Y. Aratake & T. Kayamura. 1975. Serial passage of a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*, in larvae of rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 25: 11-17.
- Watanabe, H. & K. Takamiya. 1976. Susceptibility of the silkworm larvae, *Bombyx mori*, reared under different light conditions to polyhedrosis viruses. *J. Seric. Sci. Jpn.* 45: 403-406.

- Webb, R. E., N. H. Dill, J. D. Podgwaite, M. Shapiro, R. L. Ridgway, J. L. Vaughn, L. Venables & R. J. Argauer. 1994a.** Control of third and fourth instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) with Gypchek combined with a stilbene disulfonic acid additive on individual shade trees. *J. Entomol. Sci.* 29: 82-91.
- Webb, R. E., M. Shapiro, J. D. Podgwaite, R. L. Ridgway, L. Venables, G. B. White, R. J. Argauer, D. L. Cohen, J. Witcosky, K. M. Kester & K. W. Thorpe. 1994b.** Effect of optical brighteners on the efficacy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus in forest plots with high or low levels of natural virus. *J. Econ. Entomol.* 87: 134-143.
- Webb, R. E., N. H. Dill, J. M. McLaughlin, L. S. Kershaw, J. D. Podgwaite, S. P. Cook, K. W. Thorpe, R. R. Farrar, JR., R. L. Ridgway, R. W. Fuester, M. Shapiro, R. J. Argauer, L. Venables & G. B. White. 1996.** Blankophor BBH as an enhancer of nuclear polyhedrosis virus in arborist treatments against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 957-962.
- Wood, A. H., P. R. Hughes, L. B. Johnston & W. H. R. Langridge. 1981.** Increased virulence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by mutagens. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 236-241.
- Wood, A. H. & R. R. Granados. 1991.** Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 69-87.
- Yadawa, R. L. 1971.** On the chemical stressors of nuclear polyhedrosis virus of gypsy moth *Lymantria dispar*. *Z. Angew. Entomol.* 69: 303-311.
- Young, S. Y. 1989.** Problems associated with the production and use of viral pesticides. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, supl. 3. Rio de Janeiro, 84: 67-73.
- Young, S. Y. & W. C. Yearian. 1986.** Formulation and application of baculoviruses, p. 157-180. In R. R. Granados & B. A. Federici (eds.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*. Boca Raton, CRC, v.2. 276 p.
- Zehnder, G. & J. D. Warthen. 1988.** Feeding inhibition and mortality effects of neem-seed extract on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 81: 1040-1044.
- Zou, Y. & S. Y. Young. 1996.** Use of a fluorescent brightener to improve *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus activity in the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 89: 92-96.