

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO VEGETAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LORENA CONTARINI MACHADO

PRODUÇÃO *in vivo* DE BACULOVIRUS SPODOPTERA EM
LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)

ALEGRE

2016

LORENA CONTARINI MACHADO

**PRODUÇÃO *in vivo* DE BACULOVIRUS SPODOPTERA EM
LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior

ALEGRE

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Machado, Lorena Contarini, 1990-

M149p Produção in vivo de baculovirus spodoptera em lagartas de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) / Lorena Contarini Machado. – 2016.

41 f. : il.

Orientador: Hugo José Gonçalves dos Santos Junior.

Coorientadores: Hugo Bolsoni Zago ; Dirceu Pratissoli.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Controle biológico. 2. Inseticida biológico. 3. Baculoviridae. I. Santos Junior, Hugo José Gonçalves dos. II. Zago, Hugo Bolsoni. III. Pratissoli, Dirceu. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 63

LORENA CONTARINI MACHADO

**PRODUÇÃO *in vivo* DE BACULOVIRUS SPODOPTERA EM
LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

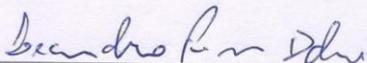
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 18 de julho de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA



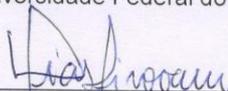
Prof. Dr. Hugo Bolsani Zago
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



Prof. Dr. Leandro Pin Dalvi
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Dirceu Pratisoli
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Victor Dias Pirovani
Instituto Federal de Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela onipresença em minha vida.

A minha família, por todo amor e apoio.

Ao orientador Prof. Dr. Hugo José Gonçalves dos Santos Junior, pela orientação e amizade.

Aos coorientadores Prof. Dr. Hugo Bolsoni Zago e Dr. Dirceu Pratissoli pelo apoio e orientação. Ao pesquisador Fernando Hercos Valicente, bem como a Prof^a. Dr^a. Márcia Flores da Silva Ferreira e a Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira A. da Silva Conforti a atenção e orientação prestada.

A todos os amigos do Laboratório de Entomologia, em especial a equipe de estagiários do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos: Laura Vaillant Ribeiro, Romário Vargas Garcia e Valderson Cabral de Arruda durante a execução dos experimentos. Aos doutorandos Carlos Eduardo Costa Paiva e Priscila Stinguel pelas valiosas sugestões para execução desta pesquisa.

A todas as pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES), pelo auxílio financeiro para as pesquisas.

A Embrapa Milho e Sorgo pela assistência prestada para execução da pesquisa.

Ao Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário (NUDEMAFI) pelo suporte para realização deste trabalho e a Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de realizar o curso.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	1
1.2 CONTROLE MICROBIANO: BACULOVÍRUS.....	2
1.3 PRODUÇÃO DE BACULOVÍRUS E O CANIBALISMO	5
1.4 REFERÊNCIAS.....	8
2 CAPÍTULO I	12
2.1 INTRODUÇÃO	13
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.2.1 Multiplicação e manutenção de <i>Spodoptera frugiperda</i>	15
2.2.2 Obtenção e produção de SfMNPV	16
2.2.3 Determinação da densidade e período de exposição visando a produção <i>in vivo</i> de SfMNPV em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	16
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
2.3.1 Canibalismo	19
2.3.2 OB/Lagarta	21
2.3.3 OB/g.....	22
2.3.4 OB/total.....	23
2.3.5 LE/hectare	26
2.3.6 OB/100 lagartas	28
2.3.7 Estimativa do número máximo de ciclos/ano e produtividade/ano.....	29
2.4 CONCLUSÃO	33
2.5 REFERÊNCIAS.....	34

RESUMO

O canibalismo é um dos principais problemas para biofábricas e laboratórios, pois alguns microrganismos entomopatogênicos como o vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) tem como hospedeiro específico lagartas de *S. frugiperda*, dificultando a produção massal deste agente biológico *in vivo*. Desta forma, objetivou-se aperfeiçoar o método de produção *in vivo* de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda* baseado na densidade de lagartas e no período de exposição ao vírus. Foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda* com 4 dias de idade inoculando-as em duas densidades (50 lagartas/recipiente e 100 lagartas/recipiente) e cinco períodos de exposição (48, 72, 96, 120 e 144 horas) em dieta artificial contendo a suspensão viral do isolado 6 (1×10^8 OB/mL) de SfMNPV, mantidas a 31 °C. Para a testemunha a dieta artificial estava isenta de SfMNPV. Assim, 48 horas após a exposição com vírus, os recipientes de ambas densidades foram congelados recolhendo todas as lagartas por repetição e contabilizando, pesando e armazenando-as a 4 °C, para posterior purificação, quantificação de poliedros e cálculos dos parâmetros. O mesmo procedimento foi realizado para cada período de exposição. Os dados foram submetidos a análise de variância ao nível de 5% de probabilidade e para verificar o efeito do período de exposição os dados foram submetidos a análise de regressão. Com base nos parâmetros avaliados, a densidade de 100 lagartas/recipiente no período de exposição de 96 horas é um método indicado para a produção *in vivo* do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Controle biológico. Inseticida biológico. Baculoviridae.

ABSTRACT

Cannibalism is one of the main problem for biofactories and laboratories, due to specific entomopathogenic microorganisms such as the virus, *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* isolate (SfMNPV), which has a specific larvae host (*S. frugiperda*) and this makes the mass production of this biological agent *in vivo* difficult. Therefore, the objective of this study was to improve the method of *in vivo* production of SfMNPV in *S. frugiperda* larvae based on density and virus exposure period. *S. frugiperda* larvae were used with 4 days of age, inoculating them in two densities (50 larvae/container and 100 larvae/container) and five exposure periods (48, 72, 96, 120 and 144 hours) in artificial diet containing isolated viral suspension of 6 (1×10^8 OB/mL) of SfMNPV maintained at 31°C. For the control, the artificial diet was free of SfMNPV. After 48 hours of exposing the virus, containers with both densities were frozen and all the larvae were collected per repetition and counting, weighing and storing them at 4 °C. Afterwards, they were purified, the polyhedral were quantified and the parameters were calculated. The same procedure was done for each exposure period. Data were submitted to analysis of variance at 5% probability and to determine the effect of the exposure period, the data were submitted to regression analysis. Based on the evaluated parameters, the density of 100 larvae/container in 96-hour exposure period is an appropriate method for the production *in vivo* of the 6 SfMNPV in *S. frugiperda* larvae.

Keywords: Biological control. Biological Insecticide. Baculoviridae.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Spodoptera frugiperda*

A espécie *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é conhecida popularmente no Brasil como “lagarta do cartucho” ou “lagarta militar” trata-se de um inseto com hábito alimentar diversificado, atacando culturas de importância econômica, destacando-se aquelas da família Poaceae como: milho, sorgo, trigo e arroz (CRUZ, 1995; MOREIRA; ARAGÃO, 2009). A distribuição ocorre em todas as regiões do território nacional, devido as condições climáticas favoráveis e por encontrar alimentação disponível ao longo do ano (CRUZ, 1995).

Os adultos são mariposas de hábito noturno, apresentam asa anterior de coloração cinza e os machos diferenciam-se das fêmeas pois possuem manchas mais claras. Os ovos são depositados em massa, com médias variando entre 143 a 250 por postura, sendo observado um número máximo de 13 posturas por fêmea, que são recobertos por pelos e escamas que retiram do próprio corpo. Ao eclodir dos ovos, as lagartas passam por seis estágios até atingirem a fase de pupa (CRUZ, 1995; MOREIRA; ARAGÃO, 2009). O ciclo biológico varia principalmente conforme as condições de temperatura e alimentação, como por exemplo, em linhagens de milho a variação foi de 21,3 a 45,7 dias para temperatura de 25 ± 1 °C (SARMENTO et al., 2002; SOUZA; ÁVILA; PARRA, 2001; BAVARESCO et al., 2003; ROSA et al., 2012).

Os sintomas de ataque das lagartas, considerando a cultura do milho, ocorre ainda no estágio inicial que são observados a partir da superfície foliar raspada deixando uma membrana translúcida e quando maiores alojam-se no cartucho do milho consumindo folhas novas e a parte apical do colmo. Além disso, também podem atacar o pendão e a espiga penetrando em qualquer parte, até mesmo na parte basal, diferentemente da espécie *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) que prefere alimentar-se dos estilos-estigmas do milho e grãos localizados no topo da espiga (MOREIRA; ARAGÃO, 2009).

1.2 CONTROLE MICROBIANO: BACULOVÍRUS

Para minimizar as perdas decorrentes do ataque dos insetos-pragas é importante a implementação de um programa de manejo fitossanitário, o qual baseia-se na premissa de combinações de táticas efetivas de controle que contribuam para redução dos danos e conseqüentemente à manutenção da densidade populacional abaixo do nível de dano econômico (FRAGOSO, 2014).

Dentre as táticas, o controle microbiano é uma opção, e consiste na utilização de entomopatógenos, tais como bactérias, nematoides, fungos e vírus (ALVES, 1998; RODRIGUEZ; BELAICH; GHIRINGHELLI, 2012; LACEY et al., 2015). Pesquisas comprovam a eficiência do vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV), conhecido como Baculovirus spodoptera, e apontam como sendo um potencial agente de controle biológico, aumentando o interesse das indústrias de produtos fitossanitários na formulação e produção de bioinseticidas a base de SfMNPV (BARRETO et al., 2005; VALICENTE; TUELHER, 2009; BARRERA et al., 2011). Para *S. frugiperda* na cultura do milho havia apenas dois produtos à base de entomopatógeno (*Bacillus thuringiensis*) registrados no Agrofite (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do MAPA), Xentari® e Thuricide®. Porém, com o recente lançamento de CartuchoVit®, formulado a base de SfMNPV, uma nova alternativa está disponível para o manejo de *S. frugiperda* (AGROFIT, 2016).

Os Baculovírus pertencem à família Baculoviridae, um grande e diversificado grupo de vírus entomopatogênicos, que atua principalmente nos lepidópteros (HERNIOU; JEHLE, 2007). Esta família divide-se em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Deltabaculovirus*, *Grammabaculovirus* com base em evidências filogenéticas e características morfológicas e biológicas (JEHLE et al., 2006). Atualmente, o gênero *Alphabaculovirus* é constituído por 32 espécies, dentre as quais *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV), 14 espécies do gênero *Betabaculovirus*, uma espécie de *Deltabaculovirus* e duas espécies de *Grammabaculovirus* (ICTV, 2016).

Uma característica dos Baculovírus é a produção de duas formas fenotipicamente distintas do vírus durante o ciclo de infecção, a forma oclusa (ODV- *occlusion derived virus*) e não oclusa (BV- *budded virus*), diferindo-se principalmente na

composição do envelope e estruturas (BLISSARD, 1996). Ambas atuam no processo de infecção do inseto, sendo ODV no início da infecção do hospedeiro e BV célula a célula do órgão infectado (BLISSARD, 1996).

Na natureza encontram-se os corpos de oclusão (OB - *occlusion bodies*) que são liberados no ambiente após a lise celular e morte do hospedeiro infectado. Assim, quando novos hospedeiros ingerem os corpos de oclusão (OB) através da alimentação, o pH alcalino do intestino dos insetos promove a dissolução do OB e liberação de ODV (BLISSARD, 1996). Os corpos de oclusão (OB) permitem que o Baculovírus permaneça em um estado dormente no ambiente e não perca a viabilidade fora do hospedeiro (SLACK; ARIF, 2007).

Desta forma, o processo infeccioso primário inicia-se quando os corpos de oclusão (OB) que estão sobre a superfície do alimento são ingeridos pela fase larval susceptível (Figura 1). Os OBs ingeridos se solubilizam no mesêntero liberando o vírus derivado da forma oclusa (ODV) que atravessam a membrana peritrófica (MP) (1) e fundem-se com as células epiteliais do intestino (2), posteriormente são liberados no citoplasma os nucleocapsídeos que se dirigem ao núcleo (3) havendo a primeira replicação do DNA viral (4). Porém, outra parte destes nucleocapsídeos, atingem a membrana basal (MB) (5) e formam vírus brotados (não oclusa-BVs) (6) dirigindo-se a hemocele, iniciando o processo secundário atingindo outros tecidos (7). Novos nucleocapsídeos são formados (BVs) favorecendo a dispersão da infecção (8). Em um processo mais avançado da infecção formam-se OBs (9) que acumulam-se e são liberados pela ruptura das células podendo infectar novos hospedeiros (Figura 1) (CABALLERO et al.,2009).

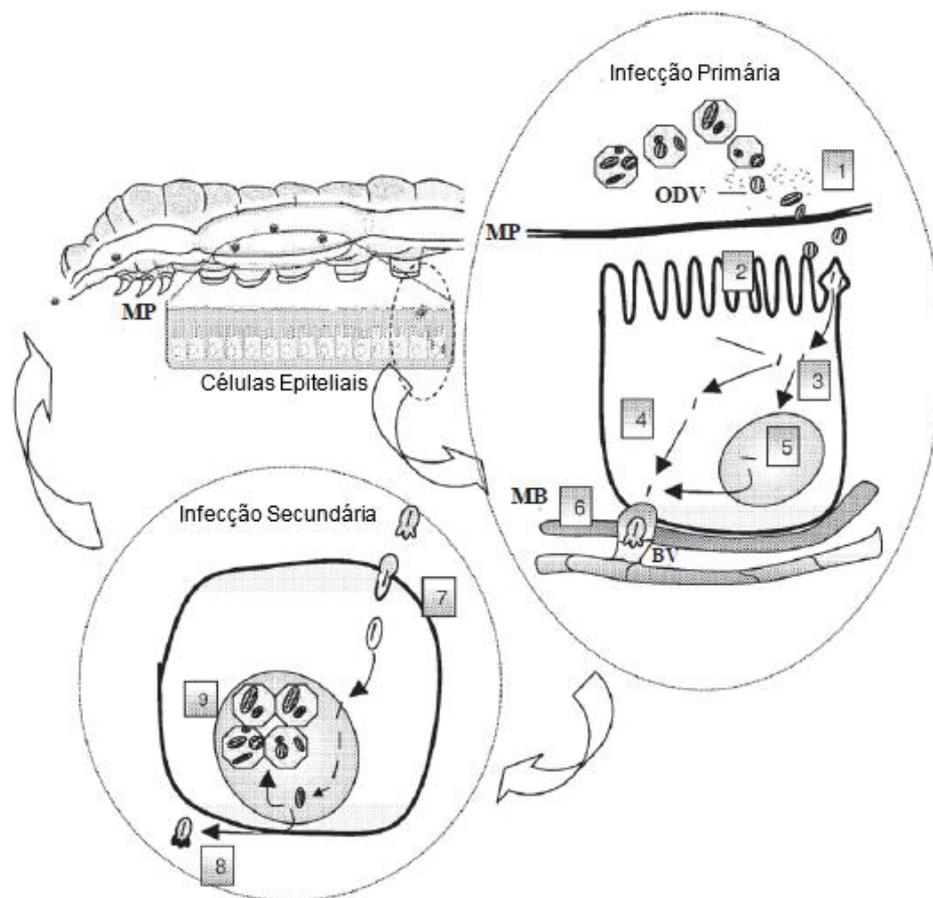


Figura 1. Representação esquemática do processo infeccioso do Baculovírus. (Fonte: Adaptação de CABALLERO et al., 2009).

Uma característica que favorece a utilização de bioinseticidas a base de Baculovírus está relacionada à especificidade pelo hospedeiro natural, pois diminui o risco de afetar inimigos naturais (RODRIGUEZ; BELAICH; GHIRINGHELLI, 2012). Como comprovado em alguns estudos, a exemplo, a seletividade observada ao parasitoide larval *Microplitis pallidipes* (Szépligeti, 1902) (Hymenoptera: Braconidae) de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) que completam o ciclo em lagartas infectadas com o vírus *Spodoptera exigua nucleopolihedrovirus* (SeNPV), além disso, também podem ser vetores quando ovipositam em hospedeiros infectados e posteriormente em hospedeiros saudáveis (JIANG et al., 2011).

Dessa forma, a busca por isolados mais eficientes e que possam ser utilizados no manejo integrado de *S. frugiperda* pode ser comprovado pelos trabalhos desenvolvidos pela Embrapa Milho e Sorgo. Em levantamentos a campo de inimigos naturais de *S. frugiperda* em Cascavel (PR) e regiões do estado de Minas Gerais

foram coletados diversos isolados de Baculovirus, ampliando o Banco de isolados da Embrapa Milho e Sorgo (VALICENTE 1989; VALICENTE; BARRETO 1999). Estudos posteriores demonstraram a variabilidade da eficiência destes isolados em função da concentração de Baculovirus utilizada, porém os sintomas em relação a mortalidade das lagartas permaneciam o mesmo, tais como: descoloração, palidez, liquefação do tegumento e falta de apetite (BARRETO et al., 2005).

Além de selecionar isolados patogênicos e virulentos, o pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Fernando Hercos Valicente, selecionou um isolado que não ocasiona a liquefação do tegumento imediatamente após a morte do inseto e com base em análise de sequenciamento e amplificação da região genômica do vírus constataram a deleção da adenina no gene v-*ch1a* localizada na posição 297, ocasionando uma mutação que reduz a produção de um polipeptídeo envolvido na liquefação do tegumento (VALICENTE et al., 2008; VIEIRA et al., 2012). Essa característica despertou ainda mais o interesse para a formulação de inseticidas a base de Baculovirus para o controle da lagarta-do-cartucho, facilitando a produção massal e minimizando as perdas do material viral com a liquefação imediata do tegumento após morte das lagartas (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010a).

1.3 PRODUÇÃO DE BACULOVÍRUS E O CANIBALISMO

Em relação a produção de Baculovirus existem dois sistemas: *in vitro* e *in vivo*. A produção *in vitro*, baseia-se na replicação em cultivo de células, para isto é crucial a escolha adequada da célula que será utilizada na multiplicação do vírus, pois além de ser susceptível deve-se replicar em abundância para produzir elevado rendimento de OB (CLAUS et al., 2012). Além disso, algumas outras propriedades são relevantes, tais como adaptabilidade em culturas em suspensão, capacidade para crescer em meio isento de soro, de baixo custo, capacidade de crescer em biorreatores industriais e ser geneticamente estável (CLAUS et al., 2012). As células IPLB-Sf 21 e Sf19, por exemplo, provenientes do ovário de *S. frugiperda* são susceptíveis aos Baculovirus AgMNPV (*Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus*), SfMNPV, SINPV (*Spodoptera litura nucleopolyhedrovirus*) e

TnSNPV (*Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus*) (CLAUS et al., 2012). Porém os vários ciclos de replicação, seja através de frascos de culturas de tecidos ou biorreatores, podem ocasionar alterações genotípicas conhecida como “efeito de passagem”, tais como mutações e redução na formação de corpos de oclusão (KRELL, 1996; CHAKRABORTY; REID, 1999; PEDRINI; WOLFF; REID, 2004).

Por outro lado, a produção *in vivo*, requer a criação massal do hospedeiro sadio ou até mesmo de um hospedeiro alternativo dependendo da maneira da inoculação viral (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010b). Entretanto, devido ao hábito canibal das lagartas de *S. frugiperda*, a inoculação viral (procedimento para infectar as lagartas sadias com o vírus) pode ser realizada individualmente ou mesmo que a inoculação viral seja feita com um número maior de lagartas de *S. frugiperda* no mesmo recipiente, as mesmas são individualizadas após 24 ou 48h. E, quando utiliza-se hospedeiro alternativo (não canibal), deve-se efetuar a passagem em apenas uma geração evitando que o Baculovírus adquira especificidade para o hospedeiro alternativo (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010b).

O canibalismo está incluso como um dos principais fatores limitantes para a produção em larga escala destacados por Valicente et al. (2013), devido a necessidade de individualização, aumentando dessa forma o risco de contaminação e os custos de produção do bioinseticida, visto que sistemas mecânicos para individualização envolve altos custos de capital associado (CHERRY et al., 1997). Este comportamento é encontrado em muitas espécies e não envolve somente indivíduos carnívoros, destacando-se a ordem Lepidoptera (RICHARDSON, et al., 2010). Para a espécie *S. frugiperda*, em alguns casos esse comportamento pode estar relacionado com a defesa, cujo avaliações em condições de campo verificaram que plantas de milho com menor densidade de lagarta, e, portanto, apresentando menores danos com a alimentação atraíam menos predadores e parasitoides (CHAPMAN et al., 2000). Em contrapartida, esse hábito pode representar riscos para espécie quando patógenos são adquiridos através do consumo de indivíduos contaminados (CHAPMAN, 1999a). Em geral o canibalismo varia com o crescimento dos indivíduos, com o aumento da densidade e, disponibilidade de alimento (ANDOW et al., 2015; CHAPMAN, 1999b; ELVIRA; WILLIAMS; CABALLERO, 2010). No entanto, esse comportamento parece não ser obrigatório em *S. frugiperda*, e

testes preliminares devem ser realizados para conhecer a taxa de canibalismo e ajustar método mais eficiente de criação (DA SILVA; PARRA, 2013).

Atualmente o método da produção *in vivo* é o empregado na formulação do bioinseticida a base de SfMNPV no Brasil e tanto a individualização quanto a criação de um hospedeiro alternativo, para se minimizar as perdas com o canibalismo, acarretam custos para as biofábricas e tornam-se fatores alvos para a pesquisa. Desta forma, a produção comercial de um produto a base de Baculovírus requer o respaldo de pesquisas que contribuam para torná-lo competitivo no mercado. Assim, este trabalho teve como objetivo aperfeiçoar o método de produção *in vivo* de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *S. frugiperda* baseado na densidade de lagartas e no período de exposição ao vírus.

1.4 REFERÊNCIAS

- AGROFIT. 2016. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do MAPA**. Disponível em: < http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- ALVES, S.B. 1998. **Controle microbiano de insetos**. 2ª ed. Piracicaba, Fealq.1163p.
- ANDOW, D.A.; FARIAS, J.R.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, D.; NASCIMENTO, A.R.B.; OMOTO, C. Dynamics of cannibalism in equal-aged cohorts of *Spodoptera frugiperda*. **Ecological Entomology**, v.40, n.3, p.229-236, 2015.
- BARRERA, G.; SIMÓN,O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. **Biological Control**, v. 58, n.2, p. 113-120, 2011.
- BARRETO, M.R.; GUIMARÃES, C.T.; TEIXEIRA, F.F; PAIVA, E.; VALICENTE, F.H. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 67-75, 2005.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M.S.; GRÜTZMACHER, A.D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biología comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.)(Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural**, v.33, n.6, p.993-998, 2003.
- BLISSARD, G.W. Baculovirus-insect cell interactions. **Cytotechnology**, v.20, p.73-93, 1996.
- CABALLERO, P.; MURILLO, R.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes em España. **Revista Colombiana de Entomología**, v.35, n.2, p.105-115, 2009.
- CHAKRABORTY, S.; REID, S. Serial Passage of a *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* Cell Cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.73, p.303-308, 1999.
- CHAPMAN, J.W.; WILLIAMS, T.; ESCRIBANO, A.; CABALLERO, P.; CAVE, R.D.; GOULSON, D. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. **Ecological Entomology**, v. 24, n.3, p. 268-275, 1999a.
- CHAPMAN, J.W.; WILLIAMS, T.; ESCRIBANO, A.; CABALLERO, P.; CAVE, R.D.; GOULSON, D. Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Behavioral Ecology**, v.10, n.3, p. 298-303, 1999b.

CHAPMAN, J.W.; WILLIAMS, T.; MARTÍNEZ, A.M.; CISNEROS, J.; CABALLERO, P.; CAVE, R.D.; GOULSON, D. Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) reduce the risk of predation? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.48, n.4, p. 321-327, 2000.

CHERRY, A.J.; PARNELL, M.A.; GRZYWACZ, D. JONES, K. The optimization of *in vivo* nuclear polyhedrosis virus production in *Spodoptera exempta* (Walker) and *Spodoptera exigua* (Hübner). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.70, n.1, p.50-58, 1997.

CLAUS, J.D.; GIORIA, V.V.; MICHELOUD, G.A.; VISNOVSKY, G. Production of Insecticidal Baculoviruses in Insect Cell Cultures: Potential and Limitations. In: SOLONESKI, S. **Insecticides – Basic and Other Applications**. In Tech, 2012. p. 127-152.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. 45p. (Circular Técnica, 21).

DA SILVA, C.S.B.; PARRA, J.R.P. New method for rearing *Spodoptera frugiperda* in laboratory shows that larval cannibalism is not obligatory. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.57, n.3, p. 347-349, 2013.

ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Journal of economic entomology**, v.103, n.3, p. 577-582, 2010.

FRAGOSO, Débora Ferreira Melo. **Opções de manejo de *Neoleucinoides elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) com bases bioecológicas e controle mecânico, biológico e extratos de plantas**. 2014. 132f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo Centro de Ciências Agrárias, Alegre, 2014.

HERNIOU, E.A.; JEHLE, J.A. Baculovirus Phylogeny and Evolution. **Current Drug Targets**, v.8, n.10, p.1043-1050. 2007.

ICTV. 2016. Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (International Committee of Virus Taxonomy). Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> >. Acesso em: 22 fev. 2016.

JEHLE, J.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.C.; CORY, J.S.; HERNIOU, E.A.; ROHRMANN, G.F.; THEILMANN, D.A.; THIEM, S.M.; VLAK, J.M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Archives of Virology**, v.151, p.1257-1266, 2006.

JIANG, J.; ZENG, A.; JI, X.; WAN, N.; CHEN, X. Combined effect of nucleopolyhedrovirus and *Microplitis pallidipes* for the control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. **Pest Management Science**, v. 67, p. 705-713, 2011.

KRELL, P.J. Passage effect of virus infection in insect cells. **Cytotechnology**, v.20, p.125-137, 1996.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v.132, p.1-41, 2015.

MOREIRA, H.J. da C.; ARAGÃO, F.D. **Manual de Pragas do Milho**, p.86-93. Campinas, 2009.

PEDRINI, M.R. DA S.; WOLFF, J.L.C.; REID, S. Fast accumulation of few polyhedra mutants during passage of a *Spodoptera frugiperda multicapsid nucleopolyhedrovirus* (Baculoviridae) in Sf9 cell cultures. **Annals of Applied Biology**, n.145, p.107-112, 2004.

RICHARDSON, M.L.; MITCHELL, R.F.; REAGEL, P.F.; HANKS, L.M. Causes and consequences of cannibalism in noncarnivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v.55, p.39-53, 2010.

RODRIGUEZ, V.A.; BELAICH, M.N.; GHIRINGHELLI, P.D. Baculoviruses: Members of Integrated Pest Management Strategies. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. (Eds). **Integrated pest management and pest control: Current and future tactics**. Rijeka: In Tech, 2012. p.463-480.

ROSA, A.P.A.; TRECHA, C.O.; ALVES, A.C.; GARCIA, L.; GONÇALVES, V.P. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em linhagens de milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.1, p. 39-45, 2012.

SARMENTO, R. de A.; AGUIAR, R. W. de S.; AGUIAR, R. de A.S. de S.; VIEIRA, S.M.J.; OLIVEIRA, H.G. de; HOLTZ, A.M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v.18, n.2, p. 41-48, 2002.

SLACK, J. M.; ARIF, B. M. The baculovirus occlusion-derived virus: Virion structure and function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99-165, 2007.

SOUZA, A.M.L.; ÁVILA, C.J; PARRA, J.R.P. Food intake and utilization by *Diatraea saccharalis* (Fabr.)(Lepidoptera: Pyralidae), *Heliothis virescens* (Fabr.) and *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) at two different temperatures. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p. 11-17, 2001.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovirus**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2009. 14p. (Circular Técnica, 114).

VALICENTE, F.H. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.18, n.1, p. 119-130, 1989.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.2, p. 333-337, 1999.

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; BARROS, E.C. **Processo de formulação do *Baculovirus spodoptera* em pó molhável**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010a. 5p. (Circular Técnica, 156).

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; PENA, R.C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M.R.F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 191-199, 2013.

VALICENTE, F.H.; TULHER, E.S.; BARROS, E.C. **Processo de produção comercial de baculovírus em grande escala**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010b. 6p. (Circular Técnica, 157).

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; PAIVA, C.E.C.; GUIMARÃES, M.R.F., MACEDO, C.V.; WOLFF, L.C. A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7, n.1, p.77-82, 2008.

VIEIRA, C.M.; TUELHER, E.S.; VALICENTE, F.H.; WOLFF, J.L.C. Characterization of a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.111, n.2, p. 189-192, 2012.

2 CAPITULO I

MÉTODO PARA PRODUÇÃO *in vivo* DE BACULOVIRUS SPODOPTERA EM LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda*

2.1 INTRODUÇÃO

Na década de 80 foi instalado no Brasil pelo pesquisador Dr. Flávio Moscardi (Embrapa Soja) o maior programa de uso de bioinseticida viral utilizando AgMNPV para controle da Lagarta-da-soja (RIBEIRO; SOUZA; KITAJIMA, 1998). Recentemente um produto a base de SfMNPV foi disponibilizado ao mercado brasileiro para o manejo de *S. frugiperda*, intensificando pesquisas voltadas à formulação de Baculovírus e o número de requisições de patentes para a comercialização deste produto (VALICENTE, comunicação pessoal).

O método *in vivo* é o empregado para a formulação do bioinseticida a base de SfMNPV no Brasil. No entanto, o canibalismo é um dos principais problemas para as biofábricas e laboratórios que visam a multiplicação deste agente biológico *in vivo* pois o hospedeiro específico, *S. frugiperda*, apresenta este hábito comportamental (CHAPMAN, 1999; VALICENTE et al., 2013). Assim, demandam de mão-de-obra com a individualização a fim de anular a ocorrência do canibalismo ou a criação de um hospedeiro alternativo (não canibal), devendo-se efetuar a passagem em apenas uma geração para evitar que o vírus adquira especificidade para o hospedeiro alternativo. Esse procedimento na etapa de fabricação acarreta o aumento nos custos e tempo de produção (VALICENTE; TULHER; BARROS, 2010).

Além disso, outros fatores devem ser considerados para produção *in vivo*, tais como a densidade e o substrato de inoculação. Em geral o canibalismo intensifica-se com o aumento da densidade populacional e crescimento dos indivíduos, principalmente nos estágios de desenvolvimento mais avançado (ELVIRA; WILLIAMS; CABALLERO, 2010). E quanto ao substrato de inoculação, recentemente foram estudadas folhas de milho e mamona, demonstrando que as folhas de mamona reduzem o canibalismo (VALICENTE et al., 2013). A dieta artificial sem formaldeído também é uma opção que pode ser empregada para a inoculação do vírus sem que o mesmo perca a viabilidade (GUPTA et al., 2007).

Diante deste contexto, melhorar o desempenho da replicação *in vivo* é de interesse comercial e um fator chave para viabilizar economicamente a produção, fazendo-se de grande importância estudos que contribuam no processo de fabricação do bioinseticida (LACEY et al., 2015). Desta forma, objetivou-se aperfeiçoar o método

de produção *in vivo* de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *S. frugiperda* baseado na densidade de lagartas e no período de exposição ao vírus.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, Setor de Entomologia do NUDEMAFI (Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças) localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES), em Alegre, Espírito Santo, Brasil.

2.2.1 Multiplicação e manutenção de *Spodoptera frugiperda*

A criação de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de pupas provenientes do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). A multiplicação e manutenção foram realizadas em sala climatizada a temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 12 horas. Os adultos foram mantidos em gaiola de PVC alimentados por meio de algodão embebido em solução de sacarose a 10%. Para a oviposição, utilizou-se folhas de papel branco recobrando o interior das gaiolas, sendo retiradas a cada dois dias para a remoção das posturas. As posturas foram mantidas em potes plásticos transparentes até a eclosão dos neonatos. Estes foram transferidos com o auxílio de um pincel de cerdas macias para recipientes de acrílico (50 mL) contendo dieta artificial à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja descrita por Nalim (1991 apud SOUZA; ÁVILA; PARRA, 2001), posteriormente com aproximadamente quatro dias foram individualizadas em gerbox[®] plástico (3 cm diâmetro) até a formação de pupa e posteriormente a emergência dos adultos, cujo os mesmos eram transferidos para as gaiolas de criação, dando continuidade ao ciclo.

2.2.2 Obtenção e produção de SfMNPV

Para o ensaio foi utilizado o isolado 6, proveniente do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, por não ocasionar a liquefação do tegumento imediatamente após a morte do inseto.

A multiplicação do vírus foi feita a partir de uma alíquota inicial na concentração de 1×10^8 OB/mL, sendo pipetada (70 μ l) na superfície da dieta artificial (sem formaldeído) contida em tubos de fundo chato de vidro (2 cm diâmetro x 8 cm altura) e em seguida lagartas sadias de *S. frugiperda* com 8 dias foram individualizadas. Após a infecção e morte esses indivíduos foram recolhidos e congelados para posteriormente serem macerados e purificados.

A purificação seguiu a metodologia proposta por Hashimoto et al. (2000) com modificações, as lagartas infectadas foram maceradas em água destilada autoclavada contendo SDS a 1% (Dodecil Sulfato de Sódio) e filtrada em tecido *voile* com intuito de facilitar a remoção do tecido gorduroso da lagarta e separar o líquido resultante das partes mais grosseiras da lagarta. O filtrado foi deixado sob agitação orbital a 250 rpm por 30 minutos. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 6000 rpm/20 minutos durante três vezes. Após a última centrifugação o precipitado obtido foi ressuspenso em água destilada esterilizada e armazenado a 4 °C para serem posteriormente empregadas no experimento.

2.2.3 Determinação da densidade e período de exposição visando a produção *in vivo* de SfMNPV em lagartas de *Spodoptera frugiperda*

Para a execução do ensaio foram utilizadas lagartas de *S. frugiperda*, provenientes da criação massal mantida no Laboratório de Entomologia do NUDEMAFI. Os neonatos foram transferidos para câmara climatizada regulada a 31 °C.

Para determinar a densidade e o período de exposição para a produção *in vivo* de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda* avaliou-se duas densidades (50 e 100 lagartas) e cinco períodos de exposição (48, 72, 96, 120 e 144 horas), estabelecidos

de acordo os resultados encontrados por Stinguel (2016). Para cada tratamento, utilizou-se quatro repetições e a testemunha foi estabelecida para cada densidade, sendo observadas por todo período de exposição, garantindo a isenção de contaminação dos lotes e atestando o estado de conservação da dieta.

Assim, após a obtenção da suspensão viral de SfMNPV (Isolado 6) e ajuste para 1×10^8 OB/mL em câmara de Neubauer®, uma alíquota (770 μ l) foi pipetada e distribuída uniformemente sobre a superfície da dieta artificial (aproximadamente 60 mL) depositada na unidade amostral (recipiente de acrílico (Tipo gerbox®) 11 cm de largura x 11 cm de profundidade x 3,5 cm de altura) com o auxílio de uma alça de Drigalski. A dieta artificial utilizada no ensaio experimental é similar à adotada para manutenção dos insetos, porém sem adição de formaldeído e, para a testemunha foi adicionada água destilada esterilizada sobre a superfície da dieta.

Posteriormente a evaporação da suspensão viral e água destilada estéril nas unidades amostrais, lagartas de quatro dias mantidas a 31 °C foram distribuídas com o auxílio de um pincel de cerdas macias de acordo com a densidade e, em seguida transferidos para câmara climatizada regulada a 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Assim, para determinar os parâmetros de produção de poliedros produzidos ao longo de cada período de exposição, quando completadas 48 horas após a exposição com vírus, os recipientes contendo ambas as densidades foram congelados (para facilitar a avaliação) recolhendo todas as lagartas por repetição e contabilizando, pesando e armazenando-as a 4 °C, para posterior purificação e quantificação de poliedros. Seguiu-se esse mesmo procedimento quando completou 72, 96, 120 e 144 horas após a exposição com vírus.

Após os procedimentos, os seguintes parâmetros foram avaliados: **(1)** Contagem do número de lagartas mortas coletadas por período de exposição em cada repetição; **(2)** Peso (g) das lagartas mortas por período exposição em cada repetição; **(3)** Percentagem de mortalidade: número de lagartas mortas no período de exposição/total de insetos; **(4)** Percentagem de canibalismo: [(número total insetos - número de lagartas mortas no período de exposição) *100]/ número total insetos; **(5)** Corpos de oclusão total (OB total): número de poliedros quantificados em câmara de Neubauer® x volume da amostra (10 mL); **(6)** Corpos de oclusão por lagarta

(OB/lagarta): OB total/pelo número de lagartas coletadas de cada repetição; **(7)** Lagarta equivalente por hectare (LE/ha): $3 \times 10^{11} / \text{OB/lagarta}$ de cada repetição (OBS: LE/ha baseia-se no número estimado de lagartas necessárias para se obter 3×10^{11} OB que refere-se a dose do bioinseticida para pulverizar em um hectare para controle efetivo da praga (MAPA, 2015); **(8)** Corpos de oclusão por grama (OB/g): OB total/peso das lagartas coletadas de cada repetição; **(9)** Corpos de oclusão pelo número de lagartas mortas a cada 100 lagartas inoculadas (OB/100 Lagartas): percentagem de mortalidade*OB/lagarta.

Com base nos parâmetros, foi selecionado o melhor resultado obtido com o período de exposição e densidade, avaliando hipoteticamente o número máximo de ciclos de produção anual e estimando a produtividade/ano. Para isso adaptou-se a fórmula empregada por Subramanian et al. (2006), ao invés de estimar a tempo de mortalidade das lagartas pelos valores TL_{50} (Período médio letal a 50% da população), substituímos pelo valor do período de exposição selecionado. Assim, foi feita uma estimativa hipotética do número máximo de ciclos de produção anual (Fórmula 1). E da produtividade/ano (Fórmula 2) com a suposição de que 1.000 larvas são inoculadas por ciclo de produção. De acordo com as fórmulas abaixo:

- Fórmula 1: Número máximo de ciclos/ano: $[(365 \times 24) / \text{Período de exposição selecionado}]$
- Fórmula 2: Produtividade/ano: $[(365 \times 24 \times \text{OB}/100 \text{ Lagartas} \times 10) / \text{Período de exposição selecionado}]$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5 (densidade x período de exposição) em parcela subdivida no tempo. Os dados foram submetidos a análise de variância ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o efeito do período de exposição sobre o canibalismo e os parâmetros de produção de vírus os dados foram submetidos à análise de regressão, ao nível de 5% de significância.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Canibalismo

Analisando o parâmetro canibalismo não houve interação significativa entre os fatores densidade e período de exposição ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, desta forma os mesmos foram analisados isoladamente (p-value=0,063) (Tabela 1). O canibalismo na densidade de 100 lagartas/recipiente diferiu-se estatisticamente pelo teste F da densidade de 50 lagartas/recipiente (Tabela 1), apresentado médias de 64,25 e 52,2%, respectivamente.

Tabela 1. Análise de variância da densidade (D), período de exposição (E) e a interação sobre o canibalismo e os parâmetros de produção de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV). (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Fonte de Variação	GL ¹	Canibalismo (%)		OB/Lagarta ⁴		OB/g	
		QM ²	p-value ³	QM	p-value	QM	p-value
Densidade (D)	1	1452,00	0,001	4,38E+21	0,047	7,54E+22	0,113
Período de Exposição (E)	4	5254,60	0,000	1,89E+22	0,000	9,74E+23	0,000
D x I	4	159,60	0,063	9,40E+20	0,261	5,03E+22	0,223
		OB/total		LE/ha ⁵		OB/100 Lagarta	
		QM	p-value	QM	p-value	QM	p-value
Densidade (D)	1	1,50E+24	0,009	6,1E+08	0,045	2,11E+24	0,032
Período de Exposição (E)	4	2,75E+24	0,000	4,9E+09	0,000	5,48E+24	0,000
D x I	4	3,57E+23	0,031	6,3E+08	0,001	6,92E+23	0,012

¹Grau de liberdade; ²Quadrado médio; ³Nível de significância (<0,05); ⁴OB Corpos de oclusão; ⁵LE Lagarta equivalente.

Em relação ao período de exposição o canibalismo ajustou-se ao modelo linear (R^2 0,97); $[(Y = -5,675 + 0,667 * X)]$ (Figura 1), apresentando nas primeiras 48 horas um canibalismo em torno de 25%, contudo este comportamento aumentou com o tempo, atingindo aproximadamente 86% nas 144 horas. Essa tendência corrobora com o estudo realizado com o mesmo isolado de Baculovírus utilizado nessa pesquisa, em que o período de exposição também influenciou a percentagem de canibalismo de lagartas de *S. frugiperda* quando alimentadas com folhas de milho, apresentando

maiores valores em 72h de exposição quando comparado a 48 horas (VALICENTE et al., 2013).

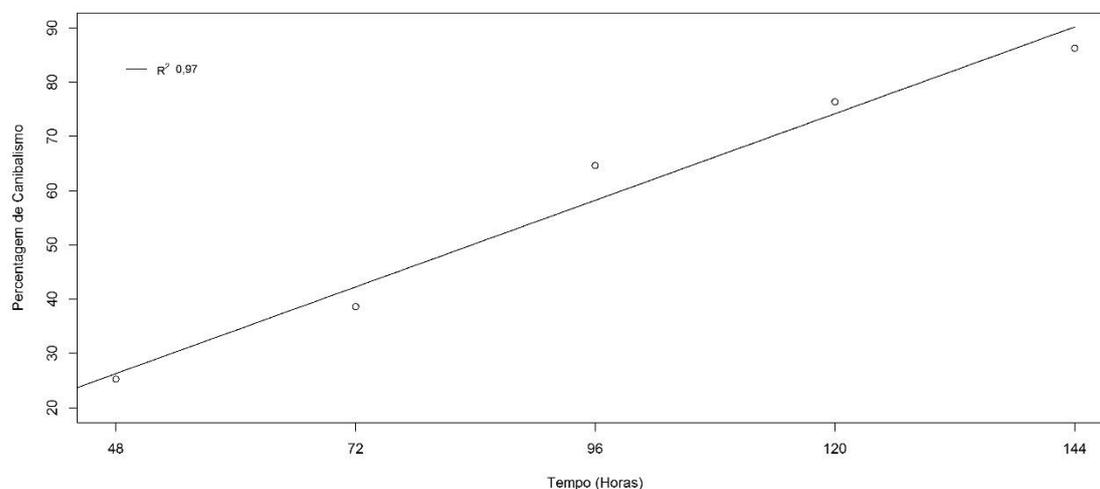


Figura 1. Percentagem de canibalismo de lagartas de *Spodoptera frugiperda* ao longo do período de exposição (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Os resultados demonstram que o canibalismo se intensifica com o aumento da densidade de insetos por recipiente e período de exposição. Este fato pode estar associado a metodologia empregada sem haver a individualização dos insetos ao longo do período de exposição. Em estudos com lagartas inoculadas nas densidades de 5, 10, 25 e 50 lagartas o canibalismo manteve-se constante com média de 23%. Contudo, essa diferença na percentagem de canibalismo, na densidade de 50 lagartas/recipiente, em relação ao presente trabalho pode ser justificada pois as lagartas foram previamente inoculadas com vírus em folhas de mamona por 48 horas e posteriormente transferidas para dieta artificial (STINGUEL, 2016). Pesquisas demonstram que lagartas inoculadas com vírus em folha de mamona apresentaram redução no canibalismo (VALICENTE et al., 2013). Apesar disso, em uma produção massal deve-se ressaltar que é válido minimizar custos com mão de obra na manipulação dos insetos, além disso, a demanda por folhas *in natura* para exposição seria evitada com a exposição realizada somente em dieta artificial.

Dessa forma, para evitar os prejuízos decorrentes deste hábito comportamental em um sistema de produção *in vivo* de Baculovírus, a melhor opção seria trabalhar com

períodos de exposição menores, evitando a necessidade de individualização ou utilização de um hospedeiro alternativo.

2.3.2 OB/Lagarta

Os dados relacionados ao parâmetro OB/Lagarta demonstram que não houve interação entre os fatores (densidade e período de exposição) (p -value=0,261) (Tabela 1). As densidades de 50 lagartas/recipiente e 100 lagartas/recipiente diferem entre si pelo teste F (p -value=0,047) (Tabela 1), apresentando uma média de produção de OB/Lagarta $5,09 \times 10^8$ e $7,18 \times 10^8$ OB/Lagarta, respectivamente. O período de exposição ajustou-se ao modelo linear (R^2 0,98); [(Y= $-6,03 \times 10^8$ + $1,26 \times 10^7 * X$)] (Figura 2), apresentando um aumento na produção de OB/Lagarta nos intervalos de períodos avaliados, variando de $6,82 \times 10^6$ a $1,16 \times 10^9$ OB/Lagarta em 48 e 144 horas de exposição respectivamente.

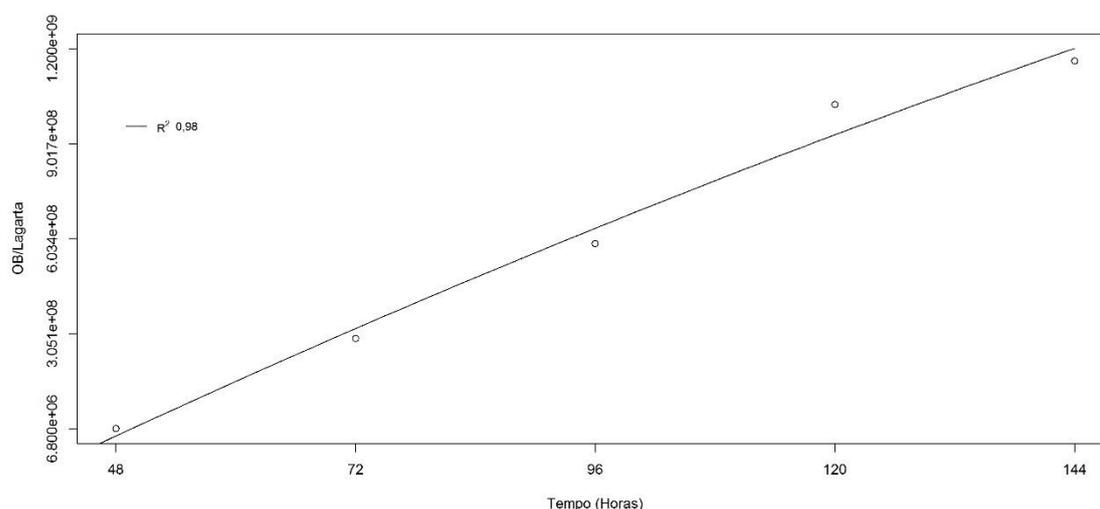


Figura 2. Produção de OB/Lagarta de *Spodoptera frugiperda* coletadas com *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) ao longo do período de exposição (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Os resultados demonstram que, apesar do canibalismo, uma densidade alta de lagartas pode contribuir para obter uma maior média de produção de OB/Lagarta,

possivelmente devido um maior número de insetos coletados na densidade de 100 lagartas/recipiente favorecendo maiores rendimentos de OB. Além disso, ao longo do período de exposição independentemente da densidade, essa produção é crescente, podendo estar relacionada com um maior tempo para o crescimento da lagarta e para a disseminação da infecção do Baculovírus em novos tecidos celulares.

O período de inoculação prolongado pode facilitar o vírus infectar os tecidos do hospedeiro, resultando no aumento de rendimento do vírus a 25 °C quando comparado a 30 °C, justamente por prolongar o período da morte do inseto uma vez que o metabolismo é menos intenso em temperaturas mais amenas (SUBRAMANIAN et al., 2006). Contudo, mesmo em temperaturas mais elevadas o desenvolvimento do Baculovírus no inseto não é prejudicado, e além disso, provoca a morte do hospedeiro mais rápido (ALI; YOUNG, 1991; STINGUEL, 2016), mantendo também um bom estado de conservação da dieta artificial sem necessidade de reposição da mesma e posterior individualização das lagartas.

2.3.3 OB/g

Outro parâmetro analisado foi OB/g, o qual não apresentou interação significativa (p-value= 0,223), avaliando-se os fatores isoladamente (Tabela 1). A densidade de 50 lagartas/recipiente obteve uma média de $5,90 \times 10^9$ OB/g e a densidade de 100 lagartas/recipiente uma média de $5,03 \times 10^9$ OB/g não diferindo-se estatisticamente pelo teste F (p-value=0,113) (Tabela 1). Em relação ao período de exposição, o parâmetro OB/g ajustou-se ao modelo quadrático segmentado com resposta platô (R^2 0,99); $[Y = (-1,07 \times 10^{10} + 2,74 \times 10^8 \cdot x - 9,75 \times 10^5 \cdot (x^2)) \cdot (x \leq -0,5 \cdot 9,75 \times 10^5)] \cdot (x > -0,5 \cdot 2,74 \times 10^8 / -9,75 \times 10^5)$] (Figura 3), ou seja, a produção de OB/g aumentou com o período de exposição até um ponto que estabilizou-se, provavelmente por infectar a maior parte dos tecidos do inseto.

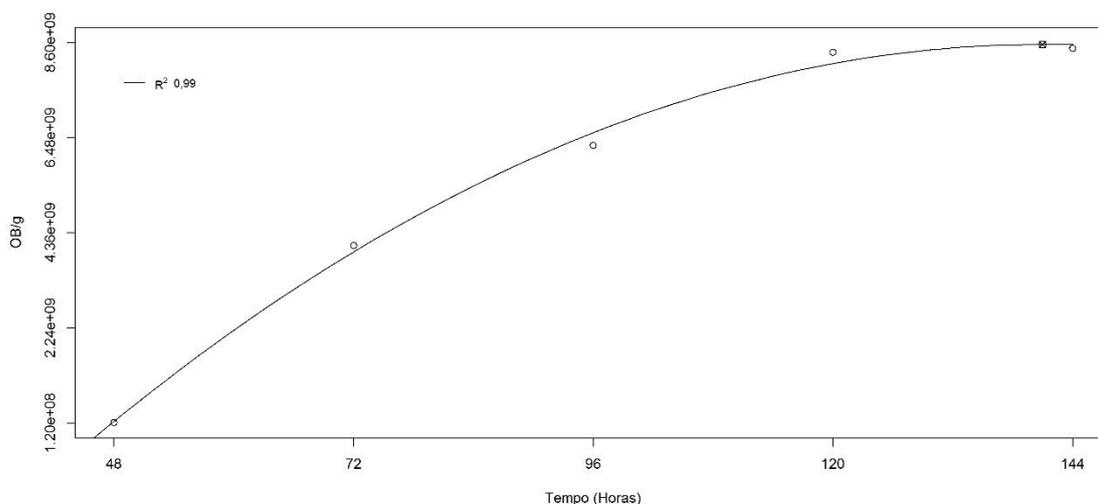


Figura 3. Produção de OB/g de *Spodoptera frugiperda* coletadas com *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) ao longo do período de exposição (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Os resultados comprovam que a alimentação da dieta e conseqüentemente a infecção dos insetos não foi interferida quando se dobrou o número de insetos na mesma área de exposição, demonstrando que a densidade não afetou o rendimento da produção de corpos de oclusão (OB) por grama de lagarta morta. A estimativa desse parâmetro fornece uma indicação de quanto e quão rapidamente os tecidos das lagartas estão sendo infectados e formando OB (HERNÁNDEZ-CRESPO et al., 2001). Além disso, a estimativa do rendimento de vírus por unidade de peso ao longo do período em diferentes hospedeiros pode ser uma forma para classificar espécies em diferentes graus de susceptibilidade (HERNÁNDEZ-CRESPO et al., 2001).

2.3.4 OB/total

Para OB/total a interação entre os fatores foi significativa (p -value= 0,031) (Tabela 1), procedendo-se o desdobramento da análise fatorial (Tabela 2 e 3). Analisando-se o fator período de exposição dentro da densidade 50 lagartas/recipiente (R^2 0,94); $[Y=(-2,73 \times 10^8 + (7,43 \times 10^8 * X) - (3,43 \times 10^6 * (X^2)))]$ (Tabela 2) e o período de exposição

dentro da densidade de 100 lagartas/recipiente (R^2 0,81); $[Y = (-3,82 \times 10^{10} + (1,09 \times 10^7 * X) - (5,25 \times 10^6 * (X^2))]$ (Tabela 2) ambos ajustaram-se ao modelo quadrático (Figura 4). A densidade de 50 lagartas/recipiente apresentou um crescimento na produção de OB/total até a avaliação de 120 horas, posteriormente, na avaliação de 144 horas houve uma redução. Enquanto que essa queda na produção de OB/total para a densidade de 100 lagartas/recipiente foi observada a partir da avaliação de 120 horas (Figura 4).

Tabela 2. Desdobramento do fator período de exposição dentro de cada nível do fator densidade para os parâmetros de produção de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Período	GL ¹	OB/total ⁴		LE/ha ⁵		OB/100agarta	
		QM ²	p-value ³	QM	p-value	QM	p-value
Densidade 50 lagartas/recipiente	4	1,02E+20	0,000	9,99E+08	0,000	4,09E+20	0,000
Densidade 100 lagartas/recipiente	4	2,08E+20	0,000	4,49E+09	0,000	2,08E+20	0,000

¹Grau de liberdade; ²Quadrado médio; ³nível de significância (<0,05); ⁴OB Corpos de oclusão; ⁵LE Lagarta equivalente.

Tabela 3. Desdobramento do fator densidade dentro de cada nível do fator período de exposição para os parâmetros de produção de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas).

Densidade	GL ¹	OB/total ⁴		LE/ha ⁵		OB/100 lagartas	
		QM ²	p-value ³	QM	p-value	QM	p-value
Período 48 h	1	7,03E+14	0,994	3,11E+09	0,000	2,72E+17	0,906
Período 72 h	1	1,18E+20	0,003	7,81E+03	0,993	4,81E+18	0,620
Período 96 h	1	1,36E+20	0,002	3,99E+04	0,984	1,15E+19	0,445
Período 120 h	1	1,49E+18	0,717	3,54E+04	0,985	4,43E+20	0,000
Período 144 h	1	3,71E+19	0,078	1,22E+04	0,991	2,82E+19	0,235

¹Grau de liberdade; ²Quadrado médio; ³nível de significância (<0,05); ⁴OB Corpos de oclusão; ⁵LE Lagarta equivalente

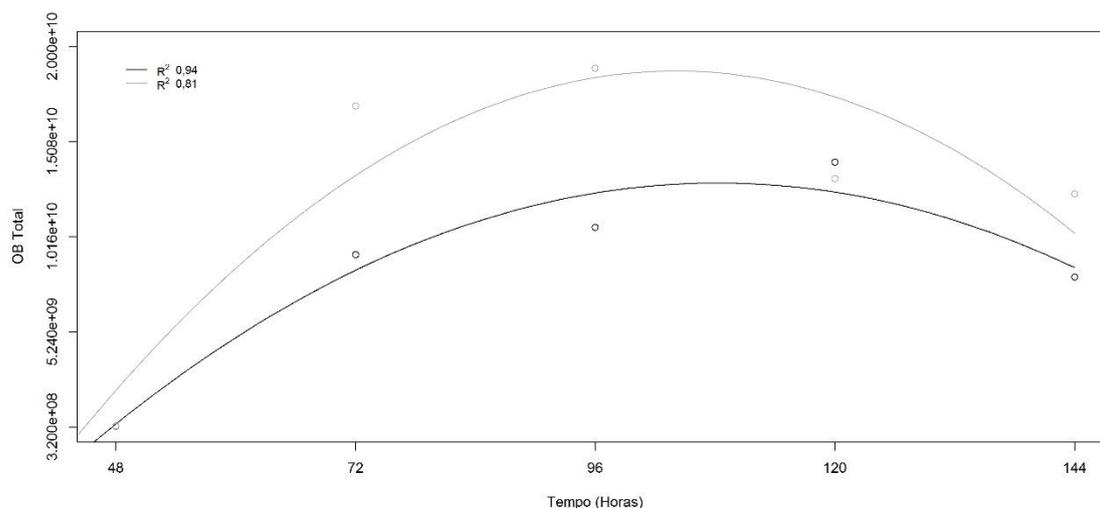


Figura 4. Produção de OB Total de lagartas de *Spodoptera frugiperda* coletadas com *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) ao longo do período de exposição (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas). Linha clara: Densidade de 100 lagartas/recipiente; Linha escura: Densidade de 50 lagartas/recipiente.

Para o fator densidade dentro de cada nível do fator período de exposição as médias das densidades de 50 lagartas/recipiente e 100 lagartas/recipiente não diferiram entre si na produção de OB/total na avaliação de 48 horas, apresentando um crescimento e diferindo-se nas avaliações de 72 e 96 horas, sendo os maiores valores obtidos na densidade de 100 lagartas/recipiente (Tabela 3 e Figura 4). Posteriormente nas avaliações de 120 e 144 horas as médias na densidade 100 lagartas/recipiente assemelhou-se as médias da densidade de 50 lagartas/recipiente (Tabela 3 e Figura 4). Estes resultados demonstram que, apesar do menor canibalismo e maior número de lagartas coletadas nas primeiras horas (48 horas), a produção de OB ainda é pequena para as densidades avaliadas, provavelmente pelo início da formação dos corpos de oclusão (OB) nos tecidos do hospedeiro (SLACK; ARIF, 2007).

Contudo, essa produção de OB total destaca-se nas 72 e 96 horas para a densidade de 100 lagartas/recipiente em relação a densidade de 50 lagartas/recipiente provavelmente por ter sido coletado um maior número de lagartas infectadas contribuindo para maior obtenção de OB total nesta densidade. Afinal, a produção

de cada lagarta contribuirá para a alíquota total do tratamento conforme a densidade (CHERRY et al., 1997).

2.3.5 LE/hectare

Para lagarta equivalente por hectare (LE/ha) a interação foi significativa (p-value=0,001) (Tabela 1), assim analisando-se o desdobramento dos fatores, o fator período de exposição dentro da densidade 50 lagartas/recipiente ($R^2 = 1$); $[Y = (1,06 \times 10^5 - 1,96 \times 10^3 \cdot X + 8,66 \cdot (X^2)) \cdot (X \leq -0,5 \cdot -1,96 \times 10^3 / 8,66) + (1,06 \times 10^5 + (1,96 \times 10^3 \cdot X + 8,66 \cdot (X^2)) \cdot (X > -0,5 \cdot -1,96 \times 10^3 / 8,66)) \cdot (X > -0,5 \cdot -1,96 \times 10^3 / 8,66)]$ (Tabela 2) e o período de exposição dentro da densidade de 100 lagartas/recipiente ($R^2 = 1$); $[Y = (2,24 \times 10^5 - 4,17 \times 10^3 \cdot x + 18,49 \cdot (x^2)) \cdot (x \leq -0,5 \cdot 4,17 \times 10^3 / 18,49) + (2,24 \times 10^5 + (4,17 \times 10^3 \cdot x + 18,49 \cdot (x^2)) \cdot (x > -0,5 \cdot 4,17 \times 10^3 / 18,49)) \cdot (x > -0,5 \cdot 4,17 \times 10^3 / 18,49)]$ (Tabela 2) ambos se ajustaram ao modelo quadrático segmentado com resposta platô (Figura 5a). Para mais detalhes, o intervalo entre 72 a 144 horas foi analisado com uma figura a parte (Figura 5b).

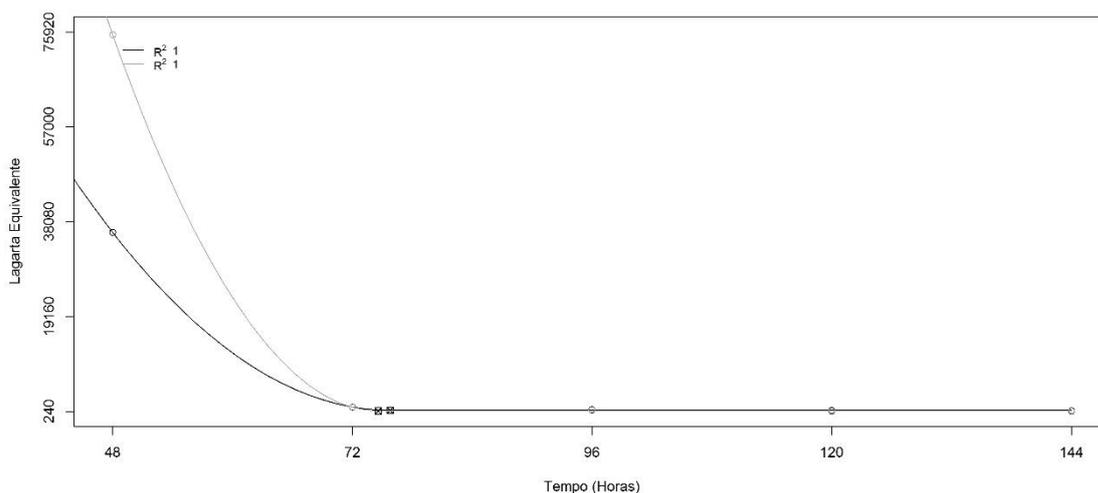


Figura 5a. Produção de Lagarta equivalente por hectare (LE/ha) de *Spodoptera frugiperda* coletadas com *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) ao longo do período de exposição (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas). Linha clara: Densidade de 100 lagartas/recipiente; Linha escura: Densidade de 50 lagartas/recipiente.

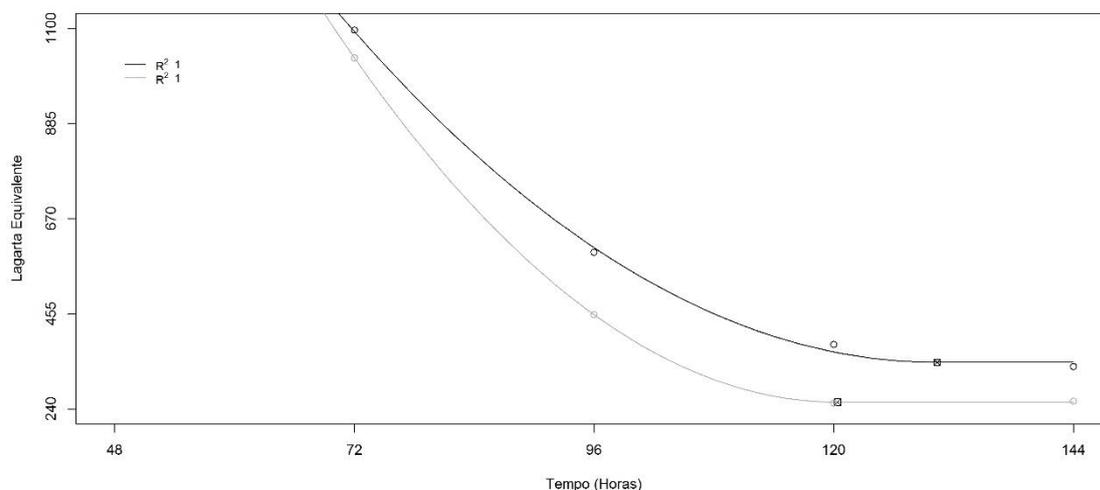


Figura 5b. Produção de Lagarta equivalente por hectare (LE/ha) de *Spodoptera frugiperda* coletadas com *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) ao longo do período de exposição (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas). Linha clara: Densidade de 100 lagartas/recipiente; Linha escura: Densidade de 50 lagartas/recipiente.

Observa-se dessa forma, ao longo dos intervalos de avaliação para ambas as densidades, que há uma diminuição do número de lagartas necessárias para obter uma dose/ha (3×10^{11} OB/ha), atingindo um ponto em que se estabiliza (Figuras 5a e 5b). Esta redução do número de lagarta equivalente por hectare (LE/ha) é importante, pois diminui o custo para a produção por dose.

Analisando-se o fator densidade dentro de cada nível do fator período de exposição, pode-se perceber que na avaliação de 48 horas na densidade de 100 lagartas/recipiente eram necessárias em torno de 75 mil lagartas para produzir uma dose/hectare (3×10^{11} OB), diferindo-se da densidade de 50 lagartas/recipiente que obteve uma média de aproximadamente 36 mil lagartas (Tabela 3 e Figura 5a). Este resultado pode estar relacionado com uma menor produção de OB total no período de exposição de 48 horas e um número maior de lagartas coletadas na densidade 100 lagartas/recipiente em relação a densidade 50 lagartas/recipiente (Figuras 4).

Posteriormente, independentemente do período de exposição, as médias das densidades não diferiram entre si, reduzindo o número de lagartas necessárias para produzir uma dose/hectare (3×10^{11} OB/ha), apresentando uma média de 335 e 257 lagartas para as densidades de 50 e 100 lagartas/recipiente, respectivamente, no período de exposição de 144 horas (Tabela 3 e Figura 5b).

Outro fator que diminui LE/ha é a idade de exposição das lagartas, à medida que a idade aumenta há uma redução do número de lagartas necessárias para obter uma dose/ha, em torno de 408 LE/ha com lagartas de 5 dias de idade reduzindo para aproximadamente 79 LE/ha quando inoculadas com 7 dias de idade (VALICENTE et al., 2013).

2.3.6 OB/100 lagartas

Em relação ao parâmetro OB/100 lagartas a interação entre os fatores (densidade x período de exposição) foi significativa (p-value= 0,012) (Tabela 1), analisando o desdobramento desta interação, o fator período de exposição dentro da densidade 50 lagartas/recipiente (R^2 0,94); $[Y = (-3,894,17 \times 10^{10} + (9,104,17 \times 10^8 \cdot X) - (3,99,17 \times 10^5 \cdot X^2) - (2,244,17 \times 10^4 \cdot X^3))]$ (Tabela 2) e o período de exposição dentro da densidade de 100 lagartas/recipiente (R^2 0,99); $[Y = (-1,204,17 \times 10^{11} + (4,124,17 \times 10^9 \cdot X) - (3,9194,17 \times 10^7 \cdot X^2) + (1,174,17 \times 10^5 \cdot X^3))]$ (Tabela 2) ambos ajustaram-se ao modelo cúbico (Figura 8). A densidade de 50 lagartas/recipiente apresentou-se crescente até a avaliação de 120 horas, diminuindo posteriormente. Comportamento semelhante da produção de OB/100 lagartas foi observado para a densidade 100 lagartas/recipiente, porém essa redução foi observada desde a avaliação de 120 horas (Figura 8).

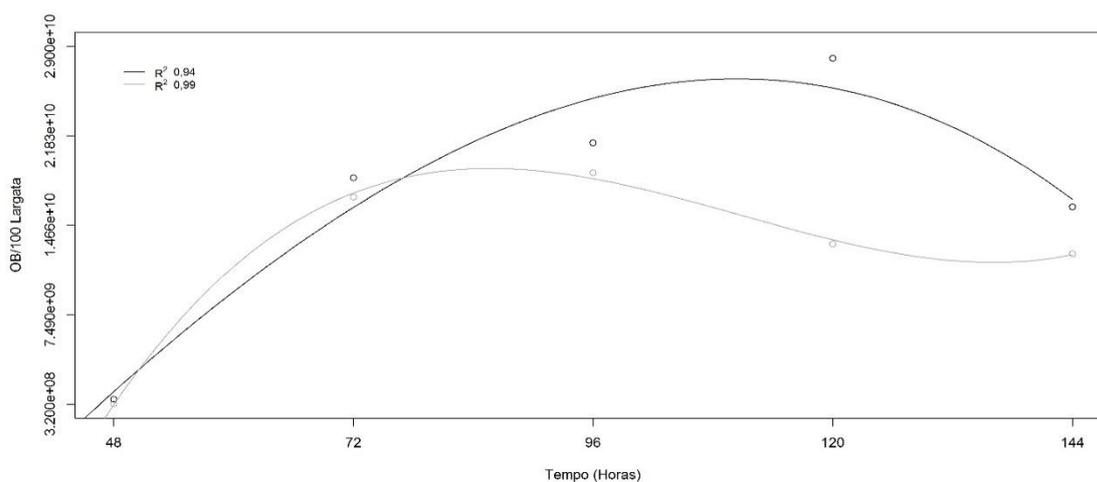


Figura 8. Produção OB/100 Lagartas de *Spodoptera frugiperda* coletadas com *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) ao longo do período de exposição (Temp. 31 ± 2 °C, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas). Linha clara: Densidade de 100 lagartas/recipiente; Linha escura: Densidade de 50 lagartas/recipiente.

Analisando-se o fator densidade dentro de cada nível do fator período de exposição, as médias de OB/100 lagartas das densidades de 50 e 100 lagartas/recipiente mantiveram-se semelhantes ao longo do período de exposição, exceto para a avaliação de 120 horas, cujo a média foi de $2,80 \times 10^{10}$ e $1,31 \times 10^{10}$ OB/100 Lagartas, respectivamente (Tabela 3). Como esse parâmetro leva em consideração a percentagem de mortalidade (quantidade de lagartas mortas, considerando que fossem 100 lagartas inoculadas), essa diferença no período de exposição de 120 horas pode estar relacionada com um maior número de lagartas coletadas na densidade de 50 lagartas/recipiente. Este parâmetro é importante pois leva em consideração a percentagem de mortalidade do lote, estimando-se a produção obtida a partir do mesmo.

2.3.7 Estimativa do número máximo de ciclos/ano e produtividade/ano

Com base nos parâmetros avaliados construiu-se a tabela abaixo (Tabela 4) analisando em particular cada parâmetro e a contribuição para produção de OB

segundo a análise estatística. Excluiu-se o período de 48 horas devido à baixa produção de OB; e o período de 120 e 144 horas pela redução da produção de OB.

Tabela 4. Análise individual dos parâmetros conforme a contribuição para a produção de corpos de oclusão (OB) segundo a análise estatística (observações).

Períodos:	72 horas	96 horas	Observações
Densidades:	50 100	50 100	
Canibalismo	X		Menor período e densidade: menor canibalismo
OB/lagarta ¹		X	Maior densidade e período: maior OB/lagarta
OB/g		X X	Densidade não diferiu, maior período maior OB/g
OB/total		X	Conclusão da interação
LE/ha ²		X X	Menor com o aumento do período e a densidade não difere
OB/100lagartas		X X	Maior com o período e a densidade não difere

¹OB Corpos de oclusão; ²LE Lagarta equivalente

Desta forma, pode-se perceber que o período de exposição de 96 horas destacou-se em relação ao de 72 horas. A densidade de 100 lagartas/recipiente obteve maior valor de OB total e OB/lagarta, porém ambas densidades não se diferiram quanto a OB/100 lagartas. Assim, estimando hipoteticamente o número máximo de ciclos de produção anual (Fórmula 1) e a produtividade/ano (Fórmula 2) com a suposição de que 1.000 larvas são inoculadas por ciclo de produção. Temos:

Fórmula 1: Número máximo de ciclos/ano: $((365 \times 24)/96)$: aproximadamente 91 ciclos/ano.

Fórmula 2: Produtividade/ano (com a suposição de que 1.000 larvas são inoculadas por ciclo de produção):

Para 50 lagartas/recipiente no período de exposição 96 horas, considerando OB/100 Lagarta = $2,12 \times 10^{10}$

Produtividade/ano: $((365 \times 24 \times 2,12 \times 10^{10} \times 10) / 96) = 1,93 \times 10^{13}$ OB/ano

Para 100 lagartas/recipiente, considerando OB/100 lagartas = $1,88 \times 10^{10}$

Produtividade/ano: $((365 \times 24 \times 1,88 \times 10^{10} \times 10) / 96) = 1,71 \times 10^{13}$ OB/ano

Com base nestes resultados de produção de OB/ano, seria possível obter cerca de 64 e 57 doses/ha anualmente para as densidades de 50 e 100 lagartas/recipiente,

respectivamente em 91 ciclos/ano com 1.000 lagartas inoculadas/ciclo. E ainda, como foram consideradas hipoteticamente 1.000 lagartas inoculadas por ciclo de produção, seriam necessários 20 e 10 recipientes de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm), respectivamente para as densidades 50 e 100 lagartas/recipiente, isto contribui para uma otimização do espaço físico no layout de uma biofábrica. Contudo, é válido ressaltar que mesmo a densidade de 50 lagartas/recipiente obtenha um saldo de 7 doses anuais em relação a densidade de 100 lagartas/recipiente, podemos perceber que são utilizados o dobro de recipientes e de dieta artificial. Desta forma, em termos de rendimento de doses anuais, considerando 1.000 lagartas inoculadas/ciclo, temos:

Densidade: 50 lagartas/recipiente = 20 recipientes/ciclo*91 ciclos anual = 1820 recipientes, correspondendo a produção de 64 doses/ha anual.

Densidade: 100 lagartas/recipiente = 10 recipientes/ciclo*91 ciclos anual = 910 recipientes. Correspondendo a produção de 57 doses/ha anual.

Realizando um levantamento do custo da dieta por recipiente obteve-se aproximadamente o valor de R\$ 0,24/recipiente contendo 60 mL de dieta. Podemos verificar que a densidade de 100 lagartas/recipiente para o período de exposição de 96 horas apresenta ser uma opção mais econômica neste quesito (dieta) para a produção de SfMNPV. É importante, no entanto, estabelecer uma criação massal de *S. frugiperda* que atenda a demanda para a inoculação nesta densidade, sabendo-se que em caso de redução na população da criação a densidade de 50 lagartas/recipiente pode ser uma alternativa. Sendo assim, sugere-se uma análise de custo da criação massal de *S. frugiperda* dentro dos padrões próprios de produção dos laboratórios e biofábricas para definir a melhor opção de densidade (50 ou 100 lagartas/recipiente) que viabilize economicamente a fabricação do bioinseticida.

Com o aperfeiçoamento do método, o processo de individualização das lagartas posterior a inoculação seria evitado e minimizaria o custo de mão-de-obra dessa etapa, bem como a necessidade da criação de um hospedeiro alternativo, visto que foi possível realizar a produção Baculovírus sobre lagartas de *S. frugiperda* em alta densidade (em torno de 2,42 lagarta/cm² e 1,21 lagarta/cm²). Além disso, não necessitaria de um congelamento prévio, pois o tegumento com 96 horas de

exposição não rompe com tanta facilidade, o que permite uma eficiência de rendimentos de OB durante o recolhimento das lagartas. E evitaria a demanda por folhas *in natura* para exposição, pois a mesma seria realizada somente em dieta artificial.

2.4 CONCLUSÃO

Nas condições avaliadas, a densidade de 100 lagartas/recipiente no período de exposição de 96 horas é o método mais adequado para a produção *in vivo* do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *S. frugiperda*.

2.5 REFERÊNCIAS

ALI, A.; YOUNG, S.Y. Influence of larval age and temperature on effectiveness of a nuclear polyhedrosis virus in the soybean looper, *Pseudoplusia includes* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean. **Biological Control**, v.1, n.4, p.334-338, 1991.

CHAPMAN, J.W.; WILLIAMS, T.; ESCRIBANO, A.; CABALLERO, P.; CAVE, R.D.; GOULSON, D. Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Behavioral Ecology**, v.10, n.3, p. 298-303, 1999.

CHERRY, A.J.; PARNELL, M.A.; GRZYWACZ, D. JONES, K. The optimization of *in vivo* nuclear polyhedrosis virus production in *Spodoptera exempta* (Walker) and *Spodoptera exigua* (Hübner). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.70, n.1, p.50-58, 1997.

ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Journal of economic entomology**, v.103, n.3, p. 577-582, 2010.

GUPTA, R.K.; RAINA, J.C.; ARORA, R.K.; BALI, K. Selection and field effectiveness of nucleopolyhedrovirus risolates against *Helicoverpa armigera* (Hubner). **International Journal of Virology**, v.3, n.2, p. 45-59, 2007.

HASHIMOTO, Y.; HAYASHI, K.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; SHIMOJO, E.I.; KONDO, A.; MIYASONO, M.; SANO, Y.; MATSUMOTO, T.; GRANADOS, R.R. Physical map of a *Plutella xylostella* granulovirus genome. **Applied Entomology and Zoology**, v.35, n.1, p.45-51, 2000.

HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; SAIT, S.M.; HAILS, R.S; CORY, J.S. Behavior of a recombinant baculovirus in lepidopteran hosts with different susceptibilities. **Applied and environmental microbiology**, v.67, n.3, p.1140-1146, 2001.

LACEY, L.A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D.I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v.132, p.1-41, 2015.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Instrução Normativa Conjunta, nº 1, de 6 de fevereiro de 2015**. Publicado no Diário Oficial da União (DOU-Seção 1) ISSN 1677-7042. Disponível em:< <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>>. Acesso em: 20 jun 2016.

RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 481-508.

SLACK, J. M.; ARIF, B. M. The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99-165, 2007.

SOUZA, A.M.L.; ÁVILA, C.J; PARRA, J.R.P. Food intake and utilization by *Diatraea saccharalis* (Fabr.)(Lepidoptera: Pyralidae), *Heliothis virescens* (Fabr.) and *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) at two different temperatures. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p. 11-17, 2001.

STINGUEL, Priscila. **Estudo biológico e comportamental de lagartas de *Spodoptera frugiperda* visando à produção de *Baculovirus spodoptera***. 2016. 68f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2016.

SUBRAMANIAN, S.; SANTHARAM, G.; SATHIAH, N.; KENNEDY, J.S.; RABINDRA, R.J. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v.37, n.3, p. 367-374, 2006.

VALICENTE, F.H.; TUELHER, E.S.; PENA, R.C.; ANDREAZZA, R.; GUIMARÃES, M.R.F. Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with *Baculovirus spodoptera*. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 191-199, 2013.

VALICENTE, F.H.; TULHER, E.S.; BARROS, E.C. **Processo de produção comercial de baculovírus em grande escala**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010. 6p. (Circular Técnica, 157).