

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/6086
IB/80744

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1985

Este exemplar corresponde a Relatório
Final da Tese defendida pela Dra.
Helena Camarão Telles Ribeiro
e aprovada pela Comissão Seleção.

Comiss. Henrique C. Vaz
C. P.

22.01.85

SELEÇÃO GENÉTICA E INTERAÇÃO DE BACULOVÍRUS EM
Diatraea saccharalis (F, 1794).

HELENA CAMARÃO TELLES RIBEIRO

HELENA CAMARÃO TELLES RIBEIRO

SELEÇÃO GENÉTICA E INTERAÇÃO DE INCHUVÍPUS
EM *Diatraea saccharalis* (F., 1794).

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de mestre em Biologia.

Orientador: OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA PAVAN

CAMPINAS - SP

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

lassif. 7

nter R 354A

Ex.

ombo BC/ 6086/IB

3/ 612

1000 351464

10/ 80744

BC/ 6086

À

João Camarão Telles Ribeiro

e

Marie-Sophie Gulen Camarão Telles Ribeiro

meus pais,
com muito amor.

Aos

meus irmãos,
pelo apoio em
todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan, a quem devo a orientação desta tese, e, particularmente pela confiança, pelo estímulo e pela atenção amigável que me ofereceu.

A todo pessoal da Seção de Entomologia do IFA - PLANALSUCAR, pelo constante apoio e pelas facilidades concedidas.

Ao Dr. Crodowaldo Pavan, como Diretor do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo constante apoio e pelas concessões de materiais do Laboratório de Genética Animal utilizados neste trabalho.

Ao Dr. William José da Silva, do Laboratório de Genética Vegetal, pelas facilidades concedidas.

Ao Dr. Ivanhoê R. Baracho, como Chefe do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelas facilidades concedidas.

Ao:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Programa Integrado de Genética (PIG IV),

Fundação de Amparo à Pesquisas do Estado de São Paulo (FAPESP),

A Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério da Indústria e Comércio (MIC - STI),

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

pelo suporte financeiro concedido para a realização desse trabalho

A Anna Gagliardi, como Bibliotecário-Chefe do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela organização bibliográfica desta tese.

Ao Dr. Flávio Moscardi, pesquisador da EMBRAPA, por ter cedido gentilmente lagartas de *A. gementalis* utilizadas neste trabalho.

A Dr^a Gabriela Stangenhau, do Instituto de Matemática e Computação da UNICAMP, pelo auxílio prestado na análise estatística dos dados.

Aos colegas Angela Cristina Cavallaro, Edineiren P. Rodrigues, Vitor Warwar e Denise Madalena Palomari, pelo apoio e sugestões, e ao Carlos A. Corona pelos valiosos serviços técnicos.

A Cláudio G. Rocha, pelo valioso auxílio prestado na datilografia desta tese.

A Esmeralda Zanchetta Borghi e a Natália Camarão Telles Ribeiro, pelo auxílio na preparação de figuras.

A todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

0.1 PREÂMBULO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 Baculovírus.....	9
2.2 Vírus de Granulose (VG).....	10
2.2.1 Vírus de Granulose de <i>Diatraea saccharalis</i> (VGDs).....	11
2.3 Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN).....	12
2.3.1 Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>Anthonomus</i> <i>gemmatilis</i> (VPNAg).....	13
2.3.2 Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>Triplaxius</i> <i>ni</i> (VPNTn).....	14
2.4 Passagens Seriadas de Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) em insetos.....	15
2.5 Infecção envolvendo mais de um tipo de vírus de inseto.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 MATERIAL.....	25

3.1.1 Insetos.....	25
3.1.2 Isolados.....	25
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Procedimento de Bioensaio.....	26
3.2.2 Purificação e Quantificação dos cristais virais.....	27
3.2.3 Mortalidade Corrigida.....	28
3.2.4 Determinação da Dose Letal 50% (DL_{50}) e Tempo Letal 50% (TL_{50}).....	28
3.2.5 Passagem Seriada.....	29
3.2.6 Infecção Múltipla.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Passagens Seriadas do VPNAg na broca de cana, <i>D.</i> <i>saccharalis</i>	31
4.2 Comparação da atividade biológica de VPNAg submetido a dez passagens seriadas num hospedeiro alternativo e do VNAg original em lagartas de <i>A. gemmatilis</i>	41
4.3 Passagens Seriadas do VPNTn na broca de cana, <i>D.</i> <i>saccharalis</i>	43

4.4 Resposta das lagartas de <i>D. saccharalis</i> aos inóculos mistos de três Baculovírus.....	52
4.4.1 Tratamento simultâneo com o VPNAg e o VGDS.....	53
4.4.2 Tratamento simultâneo com o VPNTn e o VGDS.....	56
4.4.3 Tratamento simultâneo com o VPNAg e o VPNTn....	60
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1 Passagens Seriadas.....	65
5.2 Efeitos do três inóculos mistos nas lagartas de <i>D. saccharalis</i>	69
6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	74
7. SUMMARY.....	77
8. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^7 cristais/lagarta.....	32
TABELA II - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^6 cristais/lagarta.....	33
TABELA III - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^5 cristais/lagarta.....	34
TABELA IV - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^4 cristais/lagarta.....	35
TABELA V - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^3 cristais/lagarta.....	36
TABELA VI - Doses letais 50 (DL_{50}) do VPNAg nas dez passagens seriadas para lagartas de <i>D. saccharalis</i>	38

TABELA VII - Porcentagem de mortalidade induzida pelo isolado do VPNAg submetido a dez passagens seriadas num hospedeiro alternativo e do VPNAg parental nas lagartas de <i>A. gemmatilis</i> . Dose: 10^2 cristais/lagarta.....	42
TABELA VIII - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^7 cristais/lagarta.....	44
TABELA IX - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^6 cristais/lagarta.....	45
TABELA X - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^5 cristais/lagarta.....	46
TABELA XI - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^4 cristais/lagarta.....	47
TABELA XII - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de <i>D. saccharalis</i> . Dose: 10^3 cristais/lagarta.....	48

TABELA XIII - Doses Letais 50 (DL ₅₀) do VPNTn nas onze passagens seriadas para lagartas de <i>D. saccharalis</i>	49
TABELA XIV - Resposta das lagartas de <i>D. saccharalis</i> ao inóculo misto: VPNAg + VGDS.....	54
TABELA XV - Resposta das lagartas de <i>D. saccharalis</i> ao inóculo misto: VPNTn + VGDS.....	57
TABELA XVI - Resposta das lagartas de <i>D. saccharalis</i> ao inóculo misto: VPNAg + VPNTn.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a lagarta de <i>D. saccharalis</i> , inoculadas com diluições seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>A. gemmatalis</i> (VPNAg).....	39
FIGURA 1A - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a lagarta de <i>D. saccharalis</i> , inoculadas com diluições seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>A. gemmatalis</i> (VPNAg).....	40
FIGURA 2 - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a lagarta de <i>D. saccharalis</i> , inoculadas com diluições seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>T. ni</i> (VPNTn).....	50
FIGURA 2A - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a lagarta de <i>D. saccharalis</i> , inoculadas com diluições seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>T. ni</i> (VPNTn).....	51
FIGURA 3 - Porcentagem de mortalidade em função do tempo. Tratamento simultâneo com o Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>A. gemmatalis</i> (VPNAg) e o Vírus de Granulose de <i>D. saccharalis</i> (VGDS).....	55

FIGURA 4 - Porcentagem de mortalidade em função do tempo. Tratamento simultâneo com o Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn) e o Vírus de Granulose de *D. saccharalis* (VGDs).... 59

FIGURA 5 - Porcentagem de mortalidade em função do tempo. Tratamento simultâneo com o Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatilis* (VPNAg) e o Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn)..... 63

PREÂMBULO

A luta contra os insetos, que atacam as lavouras , constitui importante elemento no esforço global do homem em busca de uma melhor rentabilidade do solo, isto é, do aumento da produtividade e de uma concomitante redução dos custos de produção. A chamada "explosão demográfica" mundial, provocando a rápida suturação e o previsível esgotamento do ecúmeno , emprestam à conquista de constante incremento da produção agro-pecuária a relevância e a premência de luta pela sobrevivência da espécie. As imaginações candentes de muitos futurólogos chegam a divisar, na fímbria do horizonte, o desfile macabro dos Cavaleiros do Apocalipse, cujos ginetes metamorfosearam-se em mísseis com ogivas nucleares - ou, quiçá, numa horrenda paródia à natureza, mísseis carregados de agentes biológicos letais...

Pari passu com o preparo químico-físico do solo - adubação irrigação; drenagem, etc - assim como da seleção e hibridação dos cultivares, prossegue o combate aos parasitas e predadores da lavoura, cujos danos podem diminuir significativamente todo o exaustivo trabalho do lavrador.

Uma vez quebrado o equilíbrio de um ecossistema pela introdução da agricultura, os predadores e parasitas específicos respondem à súbita abundância de alimento por um acelerado crescimento numérico, o qual provoca, por seu turno , o aumento da quantidade dos seus próprios inimigos. A longo prazo o equilíbrio tenderia a voltar, provavelmente em condições antieconômicas para o agricultor. As roças itinerantes da agricultura primitiva, quando o ecúmeno ainda era rarefeitamente ocupado, oferece uma primeira resposta eficiente do

homem, simultaneamente à diminuição da fertilidade do solo e ao aumento local das pragas. A rotatividade das lavouras se impôs como outra solução parcial desses dois problemas.

Quando, nos últimos anos do Século Dezoito, Malthus lançou seu terrível repto aos incautos e aos otimistas, a população universal era pouco superior aos seiscentos milhões de habitantes. Argumentava esse economista inglês que o crescimento demográfico se dava em progressão geométrica, enquanto a produção de alimentos só podia aumentar em progressão aritmética. O equilíbrio entre esses dois processos díspares seria constante e automaticamente restabelecido pela ação em cadeia da miséria, da fome e das doenças que assolariam os menos privilegiados... Somente o controle voluntário da natalidade poderia aumentar a brutalidade desse destino.

Dois séculos após as antecipações de Malthus, a população da Terra praticamente decuplicará. E crescera ainda, proporcionalmente, a produção de alimentos, sem contar um sem número de produtos agrícolas destinados a outros fins. Tal abundância, inimaginável para os contemporâneos daquele precursor, deve-se ao vertiginoso progresso da Ciência moderna, ciência polimorfa que prescruta e desvenda, paulatinamente, os mais recônditos arcanos da natureza. Assim como de sua ancila, igualmente polimorfa, a tecnologia, que cuida das aplicações pragmáticas dos conhecimentos adquiridos.

Mas essas formidáveis conquistas da Ciência e da Tecnologia não cambiaram a essência das preocupações malthusianas. Postergaram seus efeitos mais imediatos, elevaram o patamar e a complexidade dos fenômenos envolvidos. Mudaram a escala da peleja do *Homo sapiens* pela sobrevivência da espécie.

Agora, nos últimos anos do Século Vinte, muitas das audaciosas especulações de Malthus já foram reduzidas a fa

tos cientificamente expressáveis, isto é, quantitativamente relacionáveis, como quer Lord Kelvin. E há conclusões hodiernas que afetam diretamente certas ilações do economista britânico. A Demografia, oferece pelo menos duas de tais proposições . Uma delas afirma que a população de uma nação desenvolvida tende para uma assíntota. Ao atingir o estágio de nação rica , sua população tenderia a decrescer, para em seguida estabilizar-se. (A República Federativa Alemã vem perdendo; na presente década, cerca de trezentos mil habitantes por ano, o que equivale, em termos demográficos, ao desaparecimento de uma cidade do talhe de Jundiá, anualmente. De acordo com a teoria, esse decréscimo aos poucos se anulará, estabilizando-se a população).

A outra proposição demográfica, de grande interesse para o planejamento sócio-econômico do Brasil de amanhã, consiste na previsão de um inevitável hiato, por inércia ou arrasto, nos efeitos estatisticamente significativos, da taxa de crescimento populacional de uma nação em desenvolvimento que opte por uma política positiva de controle da natalidade. De acordo com esse modelo de evolução demográfica, estabelecido por competente comissão das Nações Unidas para países de sua categoria, o Brasil deverá cruzar o umbral do Século XXI com 211 milhões de habitantes, atingindo o ano 2025 com cerca de 420 milhões, quando sua taxa de crescimento começará a diminuir, atingindo o ponto de equilíbrio estacionário por volta do ano 2075, com uma população da ordem de 850 milhões...

Por mais cético que se possa ser diante das estarecedoras projeções da Demografia moderna, por maior que seja a margem de erro que se lhes queira atribuir, não há dúvida de que a simples tomada de consciência da magnitude e gravidade do problema que se apresente diante do futuro imediato ,

implica a tomada de posição face um formidável desafio. Excepto se o devenir da Humanidade nesses próximos cem anos trouxer no seu bojo alguma hecatombe impensável, afigura-se magnífica e empolgante a tarefa que se impõe às Tecnologias Agrícolas, mas sobretudo ao feixe de ciências particulares que lhes dão respaldo e alicerce teórico. Até o mais modesto pesquisador no seu laboratório pode orgulhar-se como partícipe de grandiosa cruzada, na busca de adequada resposta ao mais provocante desafio jamais recebido pelo Homem, na sua longa caminhada através dos milênios. Resposta que demandará as mais legítimas qualidades tipicamente humanas, a inteligência e a força moral. Resposta que visará a salvar e não a destruir. Resposta que talvez constitua a única alternativa a uma concebível ameaça de que algum povo se julgue superior tente podar os excessos da explosão demográfica dos países do Terceiro Mundo mediante explosões nucleares. Ou quiçá, através de controle biológico.

O tempo urge em todos aqueles campos de atividade que venham a garantir alimentação qualitativa e quantitativamente satisfatória para toda a Humanidade, até que finalmente venha a estabilizar-se a população universal, em torno dos dez bilhões de habitantes, daqui a menos de um século.

Toda uma longa série de técnicas e de meios materiais contribui direta ou indiretamente nas diversas fases da produção e distribuição dos produtos agrícolas. Inserem-se nesse rol as técnicas e os meios de combate às pragas da lavoura.

Graças ao seu precoce desenvolvimento, a Química propiciou as primeiras vitórias importantes do homem sobre as pragas de suas plantações. Mas, apesar de grande eficiência específica de alguns defensivos agrícolas, seu emprego inten-

sivo e continuado acarreta percalços de diversas ordens. Médicos e ecólogos se unem para fazer oposição ao emprego de agrotóxicos, como passaram a ser denominados os inseticidas e os demais defensivos agrícolas, devido talvez ao seus propalados efeitos nocivos sobre seus manuseadores e aplicadores, assim como os futuros consumidores finais dos produtos "defendidos". Havendo ainda a considerar os danos cumulativos causados ao meio ambiente pela destruição indiscriminada de outros seres vivos não visados, assim como pela crescente poluição.

O avanço recente da ciências biológicas vem sugerindo uma nova forma de ataque às pragas, mais sintonizada com a forma de agir da própria Natureza. Trata-se do chamado "controle biológico", o que consiste em lançar contra os inimigos da lavoura seus próprios predadores, parasitas e patógenos naturais, devidamente selecionados de acordo com a capacidade exterminadora, com a facilidade do emprego e com a relativa inocuidade em relação ao biótipo.

De certa forma, o homem sempre empregou empiricamente algum tipo de "controle biológico". Gatos contra ratos e caramujos mantidos em aquários para o controle de algas. Mas um importante êxito conhecido do emprego planejado, em escala economicamente significativa, consta ter sido levado a efeito cerca de sessenta anos atrás, em Porto Rico. A lavoura de cana de açúcar ressentia-se pesadamente da ação devastadora de um inseto da Família Melonithidae, cujas larvas se alimentam das raízes da cana, tornando impraticável, graças ao seu grande número e insaciável voracidade, o aproveitamento das socas e ressocas. Com a introdução controlada de exemplares importados de sapos da espécie *Bufo marinus*, os estragos daquela praga deixaram de ter importância econômica.

O levantamento sistemático, exaustivo, dos pos-

síveis parasitos e predadores dos insetos nocivos prossegue pacientemente em milhares de laboratórios espalhados pelo mundo. Quando certos indicadores se afiguram favoráveis, a Tecnologia assume e busca desenvolver industrialmente a utilização do novo achado.

O progresso recente na biologia dos vírus parece abrir grandes possibilidades em termos de controle biológico de pragas. Nesse particular, vem sendo alvo de numerosas pesquisas os Baculovírus, vírus de insetos, que vem demonstrando resultados altamente promissores. Numerosas observações da ação desses microorganismos sobre diversos insetos evidenciou as possibilidades do seu emprego no controle biológico de determinadas pragas de cultivares de elevado valor econômico. Visa-se atualmente a uma mais ampla utilização dos Baculovírus para o controle biológico eficiente de insetos nocivos à agricultura.

1.0 INTRODUÇÃO

Os vírus de insetos do gênero *Baculovirus* constituem alvo de numerosas pesquisas devido ao seu interesse econômico. Os Baculovírus representaram durante muito tempo o único tipo de vírus conhecido entre os invertebrados (CROIZIER & VAGO, 1978), e, com as frequentes observações desses microorganismos em diversos insetos, notou-se a possibilidade da aplicação dos mesmos na luta biológica contra pragas de culturas de importância. Entretanto, o emprego desses vírus como inseticidas biológicos requer conhecimentos dos efeitos e dos mecanismos de ação em relação aos seus hospedeiros.

No presente trabalho, procurou-se, por meio de passagens seriadas, adaptar dois Baculovírus - Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (VPNAg) e Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn), para o hospedeiro alternativo, *Diatraea saccharalis*, (Lepidoptera: Pyralidae), espécie que assume hoje grande importância já que representa uma das principais pragas da cana-de-açúcar em toda América. (Bol. Tec. IAA/PLANALSUCAR, 1981)

Um outro aspecto analisado foi o efeito da inoculação simultânea de dois vírus sobre seu hospedeiro. Estudaram-se as seguintes combinações: VPNAg e VPNTn; VPNAg e Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs); VPNTn e VGDs - procurando-se detectar um possível sinergismo no processo infeccioso na broca da cana, *D. saccharalis*.

Estes estudos visaram obter através da análise dos isolados obtidos e das respostas do hospedeiro à infecção, alguns dados fundamentais sobre a possibilidade de obtenção de variantes genéticas e interações entre diferentes tipos de ví

rus que venham a indicar metodologia para a "manipulação genética" do sistema patógeno hospedeiro visando a maior utilização dos Baculovírus como agentes microbiológicos no combate a insetos pragas da agricultura.

2.0 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Baculovírus

Os baculovírus são vírus de insetos pertencentes à família Baculoviridae (WILDY, 1971; FENNER, 1976) que podem se apresentar sob duas formas: 1) inclusos em uma capa ou matriz proteica e 2) não inclusos. Dentre os Baculovírus inclusos há dois subgrupos de maior relevância: O Vírus de Polio-drose Nuclear (VPN) e os Vírus de Granulose (VG) (GRANADOS, 1980). Ambos se caracterizam por encerrar no interior de suas capas proteicas ou corpos de inclusão as unidades infectivas chamadas de virions. Esses virions com forma de bastonete possuem uma camada proteica denominada de capsídeo, composta de subunidades de proteína, os capsômeros que envolvem o ácido nucleico. O ácido nucleico é o ácido desoxirribonucleico (DNA) de aproximadamente $75 \text{ a } 100 \times 10^6$ daltons correspondentes a 114-150 Kb (SUMMERS, 1977). O conjunto do ácido nucleico e o capsídeo constitui o nucleocapsídeo que se encontra envolto por uma membrana interna e externa no interior do corpo de inclusão (DULBECO & GINSBERG, 1980).

Entre o VPN e o VG existe uma básica diferença no que concerne ao número de virions inclusos na capa ou matriz proteica. Os VG contêm apenas um, excepcionalmente dois virions, ao passo que os VPN tem vários virions por corpo de inclusão (GRANADOS, 1980).

Foram descritos cerca de 284 VPN e 65 VG (GRANADOS, 1980) e esses são muito importantes do ponto de vista econômico visto que possuem um grande potencial no controle de insetos pragas (SUMMERS e cols, 1975). São vírus altamente viru-

lentos, relativamente seletivos e não representam risco para a saúde humana ou animal (CONSIGLI e cols 1983), uma vez que parecem ser restritos aos hospedeiros invertebrados (WILDY, 1971).

2.2 - Vírus de Granulose (VG)

O VG é um baculovírus que contém ADN de dupla fita com o peso molecular estimado entre 69 a 110 x 10⁶ daltons equivalentes a 104-168 Kb (TWEETEN e cols, 1980). Esses microorganismos se distinguem dos VPN, por apresentar em uma capa proteica de forma cilíndrica que foi denominada de "cápsula" por BERGOLD (1948). Nessas cápsulas estão os vírions ou partículas virais que são constituídos pelo nucleocapsídeo envolto por uma membrana externa e interna (SMITH, 1976). O VG se caracteriza por ser dotado de apenas um ou raramente dois vírions por membrana externa inclusa na capa proteica.

Os VG podem se desenvolver tanto no núcleo como no citoplasma da célula do hospedeiro. De um modo geral, o principal órgão atacado é o corpo gorduroso, contudo há uma exceção no caso do hospedeiro *Harpirana bellina* em que o principal local de infecção é o epitélio do intestino médio (SMITH, 1976). Em algumas espécies de lepidópteros outros tecidos em adição ao corpo gorduroso podem ser infectados tais como: epiderme, hemócitos, células da matriz traqueal e túbulos de Malpighi (CONSIGLI e cols, 1983).

Um grande número de espécies de lepidópteros são infectados pelo VG, e parece que esses vírus são específicos a essa ordem de insetos (DAVID, 1975).

2.2.1 Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs)

PAVAN, O.H.O. (comunicação pessoal) recentemente isolou um Vírus de Granulose de lagartas infectadas do lepidóptero, *D. saccharalis*, uma das pragas mais importantes da cana-de-açúcar, (BOL. TEC. IAA/PLANALSUCAR, 1981), coletadas no Sul dos Estados Unidos. Exames de laboratório demonstraram que esse vírus, testado em uma série de espécies de lepidópteros mostrou-se específico para aquele gênero (PAVAN e cols, 1983).

O Vírus de Granulose de *D. saccharalis* (VGDs) é dotado de uma cápsula que mede cerca de 0,5 (um) micrômetro de comprimento (PAVAN, 1983).

Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que esse vírus se replica no núcleo e no citoplasma da célula do hospedeiro e que o principal local atacado é o corpo gorduroso, apesar de que o VGDs pode ser encontrado em praticamente todos os outros tecidos da broca de cana, *D. saccharalis* (PAVAN e cols, 1983).

Os sintomas externos da broca de cana infectada com o VGDs são similares e esses descritos para outras lagartas de lepidópteros. Esse baculovírus infecta todos os estádios larvais da *D. saccharalis* e a mortalidade desses insetos é proporcional a dose (PAVAN e cols, 1983).

O VGDs é muito virulento para a *D. saccharalis* e representa importante agente microbiológico contra a broca de cana como constatado nos testes de laboratório (PAVAN e cols, 1983) e de campo (ALMEIDA e cols, 1984).

2.3 - Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN)

Os VPN podem ser considerados provavelmente um dos grupos de microorganismos mais complexos entre os vírus de animal. As investigações aumentam a medida que se demonstra o grande potencial econômico no emprego desse grupo de agente de controle biológico (VOLKMAN e cols, 1976).

Os Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) são constituídos de ADN de fita dupla com o peso molecular aproximado de 90 a 100 x 10⁶ daltons correspondentes a 136-151 Kb (SUMMERS & ANDERSON, 1972 e 1973). Esses baculovírus se caracterizam por se apresentarem inclusos em um poliedro ou cristal de 1 a 15 µm de diâmetro (GRANADOS, 1980) constituído de proteína não contendo lipídio (SMITH, 1976). Diversos estudos constataram que o cristal do VPN é limitado por uma membrana proteica (SUMMERS & ARNOTT, 1969; HARRAP, 1972a; FALCON & HESS, 1977 ; HESS & FALCON, 1978). No interior desses cristais encontram -se as partículas virais ou virions que são dotados de uma membrana interna (PONSEN e cols, 1964, 1965) e externa (HARRAP, 1972b). Em relação ao número de virions os VPN podem se apresentar sob duas formas: 1) com múltiplos virions por membrana externa (MEV em inglês) e 2) com apenas um virion por membrana externa (SEV em inglês) incluso no cristal de proteína . Os poliedros ou cristais protegem os virions das condições ambientais adversas e conseqüentemente a infectividade destes pode ser preservada durante muitos anos (STEINHAUS, 1960).

Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que esses vírus de insetos se replicam exclusivamente no núcleo da célula infectada e tem como principais locais de replicação a epiderme, as células sanguíneas, o corpo gorduroso, a traquéia e ocasionalmente as glândulas da seda (SMITH, 1976).

Foram descritos alguns VPNs nos insetos das ordens Orthoptera, Neuroptera, Trichoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera. Mas a maioria desses vírus (cerca de 240) foi isolada de espécies de lepidópteros que infestam culturas economicamente importantes (GRANADOS, 1980).

2.3.1 - Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg)

STEINHAUS E MARSH (1962), detectaram um Vírus de Poliedrose nuclear em lagartas infectada de *A. gemmatalis*, lepidóptero da família Noctuidae que ataca as leguminosas, coletadas nas plantações de alfafa no Peru.

Em 1972, no Brasil, transcorridos dez anos da descoberta daquele vírus, foi isolado e descrito um Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatalis* em culturas de soja na região de Campinas (ALLEN & KNELL, 1977), seguindo-se de constatações ulteriores da presença desse vírus em outras regiões do país (CARNER & TURNIPSEED, 1977; CORSO e cols, 1977; GATTI e cols, 1977).

Análises demonstraram que o VPNAg apresenta vários viriões por membrana externa (MEV), os quais se encontram incluídos em um poliedro ou cristal (ALLEN & KNELL, 1977).

Os poliedros ou cristais desses vírus ao serem ingeridos pela lagarta de *A. gemmatalis*, são imediatamente dissolvidos no intestino desse hospedeiro, propiciando assim a liberação dos viriões, os quais vão penetrar através da membrana da parede intestinal e atingir a hemolinfa, multiplicando-se posteriormente no núcleo das células de diferentes tecidos. A partir do 4º dia, as lagartas de *A. gemmatalis* infectadas com o VPNAg, mostram pouca mobilidade, perda de apetite e exibem

inicialmente uma descoloração na porção ventral do corpo que se prolonga em seguida por todo o organismo. O processo, do início da infecção até a morte da lagarta, dura em média cerca de seis a oito dias. De acordo com ALLEN & KNELL (1977), o desenvolvimento desses vírus é similar aos demais baculovírus descritos.

Quanto à especificidade, o VPNAg foi testado em nove espécies de Noctuidae, duas espécies de Pyralidae e uma espécie de Bombycidae e constatou-se que todos esses lepidópteros eram susceptíveis a esse vírus. PAVAN e cols (1981), mostraram que o VPNAg é infeccioso para lagartas de *D. saccharalis* e *D. grandiosella*. Lagartas de *A. gemmatilis*, hospedeiro natural, são altamente susceptíveis ao VPNAg (CARNER e cols, 1979; MOSCARDI & CORSO, 1981; PAVAN & BOUCIAS, 1981; PAVAN e cols, 1981).

2.3.2 - Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn)

O Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn) é um baculovírus de ADN circular de fita dupla (SUMMERS & ANDERSON, 1973), que foi originalmente isolado de lagartas infectadas de *T. ni*, inseto membro da ordem Lepidoptera, subfamília Plutellinae e da família Noctuidae (HEIMPEL & ADAMS, 1966). Esse vírus apresenta vários virions por membrana externa (tipo MW), incluídos em um poliedro ou cristal de proteína.

Verificou-se que o poliedro ou cristal do VPNTn forma-se primeiramente no núcleo das células epiteliais do intestino médio de seu hospedeiro, ao contrário do que ocorre nos outros tecidos onde esse processo é mais lento. Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que o VPNTn como os

demais VPNs, infectam principalmente o corpo gorduroso, a hipoderme, a traquéia e o intestino médio (HEIMPEL & ADAMS, 1966). KELLY e LESCOTT (1981) puderam constatar que o VPNTn nas células de cultura de *Spodoptera frugiperda* apresentava o desenvolvimento similar ao relatado para outros baculovírus.

SUMMERS e ARNOTT (1969), notaram que esse vírus apresentava uma particularidade interessante que era uma massa de material fibroso, a qual estava estritamente associada ao poliedro ou cristal desse vírus. Sugeriram que esse material representaria um estágio de formação inicial do cristal. Contudo, aqueles autores acreditam que serão necessários outros estudos para confirmar tal hipótese.

O VPNTn dotado de viriões com cerca de 300 x 30 nanômetros (nm) (SCOTT e cols, 1971) é conhecido também pela sua estreita semelhança com o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) (IGNOFFO e cols, 1974; HARPER, 1976; KNUDSON & BUCLEY, 1977; MILLER & DAWES, 1978; SINGH e cols, 1979). No entanto foram detectados algumas diferenças entre esses dois vírus no que concerne aos mapas de proteína do poliedro ou cristal (BENTON e cols, 1973; CIBULSKY e cols, 1977). Todavia, apesar dessas diferenças, esses vírus são intimamente relacionados e desde que o VPNAc é um forte candidato como pesticida biológico, o VPNTn provavelmente também o será de acordo com esses autores.

2.4 - Passagens Seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) em insetos

Como já tinha sido mencionado anteriormente, o VPN pode se apresentar sob duas formas: 1) com vários viriões por membrana externa (MEV) e 2) com apenas um viriões por membrana

externa (SEV) incluso no cristal de proteína (GRANADOS, 1980). Foi constatado que há diferenças de infectividade entre esses dois tipos de VPN. Verificou-se que o MEV, além de ser responsável por uma maior mortalidade possui uma maior gama de hospedeiros do que o tipo SEV (VAIL e cols, 1971; HARPER, 1976; TOMPKINS e cols, 1981). VAIL e cols (1971), sugeriram que essa diferença na infectividade poderia ser resultado da diferença do número de virions incluídos no poliedro ou cristais dos dois tipos de VPN.

Nos primeiros trabalhos sobre especificidade, descrevia-se os VPN como específicos em relação aos hospedeiros, isto é, cada VPN seria capaz de infectar apenas a espécie de inseto do qual havia sido isolado (BERGOLD, 1958). Essa interpretação pode ser devida ao uso de doses inadequadas como demonstrado por PAVAN e cols (1981). Contudo, estudos tem demonstrado que alguns desses vírus são capazes de infectar e replicar em numerosas espécies de hospedeiros (IGNOFFO, 1968; HURPIN, 1970). O Vírus do Poliedrose Nuclear de *Antographa californica* (VPNAC), por exemplo, pode infectar muitas espécies em diferentes gêneros e famílias (VAIL e cols, 1970; VAIL & JAY, 1973; STAIRS & LYNN, 1974). Contudo de modo geral, esses baculovírus não infectam outros invertebrados além dos insetos (IGNOFFO, 1968). Desse modo, o fato de que os VPN sejam específicos para os insetos oferece sem dúvida uma vantagem incontestável na aplicação destes na luta biológica contra pragas de cultura (MALEKI-MILANI, 1978).

ORLOVSKAYA (1975), mencionou a possibilidade de adaptar esses vírus a novos hospedeiros e evidenciou igualmente o grande interesse dessas adaptações artificiais para o controle biológico de insetos devastadores de culturas. Deste modo, esse autor revelou a importância de se realizarem pas-

sagens seriadas, método de adaptação artificial ou de seleção genética, a fim de aumentar a gama de atividade dos VPN sobre um número maior de hospedeiros.

AIZAWA (1975) pôde mostrar que um VPN de um determinado inseto é susceptível de modificar a sua virulência após várias passagens seriadas em hospedeiros alternativos.

STAIRS e cols (1981), constataram que o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Choristoneura fumiferana* (VPNCf) do tipo MEV teve sua virulência muito aumentada depois de ter sido submetido a apenas uma passagem nos lepidópteros, *Trichoplusia ni* (Noctuidae) e *Galleria mellonella* (Pyralidae). Os autores especularam que esse aumento na patogenicidade seria resultado da ingestão oral de altas doses do cristal do VPNCf, o qual proveu uma alta população de virions, cujos genótipos foram selecionados efetivamente nesses lepidópteros de famílias diferentes. Apesar do VPNCf ter sido sujeito a passagem naqueles hospedeiros alternativos, verificou-se também que ele foi capaz de manter sua infectividade para seu hospedeiro original, *Choristoneura fumiferana* (Lep: Tortricidae).

JÁ, SMIRNOFF (1963) verificou que o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichiocampus viminalis* (VPNTv) adaptado pelo método de passagens seriadas ao inseto *Trichiocampus irregularis*, (Hymenoptera, Tenthredinidae), não alcançou no entanto o grau de virulência manifestado no seu hospedeiro original, *T. viminalis*. Esse resultado, contudo, está de acordo com o relatado por BURGERJON (1977), que indicou que o vírus proveniente da espécie de inseto da qual foi isolado é mais ativo do que o vírus isolado de hospedeiro alternativo.

SHAPIRO e cols (1982) realizaram experimentos nos quais puderam demonstrar que três VPN (Vírus de Poliedrose Nuclear de *Lymantria dispar* (VPNLd) e Vírus de Poliedrose Nuclear

de *Choristoneura fumiferana* (VPNCf) do tipo MEV, tiveram a sua virulência aumentada após diversas passagens seriadas no lepidóptero, *Estigmene acrea* (Arctiidae). Segundo esses autores, o VPNOp apresentou uma melhora de quatro vezes na sua infectividade em relação a obtida no seu hospedeiro original. Fato interessante, já que HUGUES (1976), tinha determinado que o VPNOp só era patogênico para insetos do gênero *Orgyia*.

Afora esses, outros estudos constataram que por meio de passagens seriadas era possível obter seleção de isolados mais virulentos de VPN em hospedeiros alternativos (VEBER, 1962; SHAPIRO & IGNOFFO, 1970; ORLOVSKAYA, 1975).

No que concerne a propagação de VPN em culturas de tecido, WEISS e cols (1981), relataram que esse processo tem a vantagem de ser um sistema cuja produção de vírus é relativamente livre de microorganismos contaminantes e pode ser conservado por longos períodos. Todavia, a desvantagem ou o obstáculo para seu uso tem sido a baixa produção de vírus e o custo muito oneroso ou não competitivo com a produção de vírus em insetos "(in vivo)".

MACKINNON e cols (1974), asseveraram que foram realizados poucos experimentos para verificar o potencial do VPN em repetidas passagens seriadas in vitro. De prévias tentativas descritas na literatura, apenas quatro, até a presente data, obtiveram sucesso na passagem seriada de VPN in vitro (FAULKNER & HENDERSON, 1972; SOHI & CUNNINGHAM, 1972; VAIL e cols, 1973; WEISS e cols, 1981) e esses trabalhos contudo não excederam a doze passagens seriadas. Apesar desses casos de adaptação positiva mencionados acima, nem sempre observa-se esse fenômeno (MALEKI-MILANI, 1978).

Já em culturas de tecido, estudos constataram que os VPN em geral, diminuíam sua virulência após a 15ª passagem

seriada (MACKINNON e cols, 1974; HIRUMI e cols, 1975; YAMADA e cols, 1982). Especulou-se que a passagem seriada prolongada de VPN in vitro, alteraria o genoma da população desses vírus quando estes possuíam vários viriões por membrana externa (BURAND & SUMMERS, 1982).

Por outro lado, alguns autores observaram que durante ou após várias passagens seriadas de VPN em insetos hospedeiros ocorria uma modificação na forma ou tamanho do cristal desses vírus. WATANABE e cols (1975), por exemplo, notaram que o cristal de forma icosaédrica do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Bombyx mori* (VPNBm) apresentava forma cubóide, tetragonal e outras formas diferentes daquela original icosaédrica, após várias passagens seriadas num hospedeiro alternativo. Esses autores interpretam que o desenvolvimento de forma do cristal diferente da do vírus original, resultaria da presença de pequena quantidade de cristal de forma variante misturada no vírus, que seria então selecionado, após várias passagens devido a sua elevada adaptabilidade no hospedeiro alternativo, maior do que no seu próprio hospedeiro original.

Outros estudos constataram esse mesmo fenômeno, ou seja, o aparecimento de formas anormais e mudanças de tamanho de cristais de VPN submetidos a passagens seriadas em hospedeiros alternativos (GERSHENSON, 1955a, 1955b, 1956, 1959, 1960; AIZAWA, 1961; STAIRS, 1964; CUNNINGHAM, 1970; HUNTER e cols, 1973; VAIL e cols, 1973; TOMPKINS e cols, 1981).

Além da alteração que pode ocorrer na forma ou tamanho do cristal nas passagens seriadas de VPN, muitos autores constataram a manifestação de um vírus "oculto" no hospedeiro alternativo, quando submetido a contaminação de um vírus estranho (VAGO, 1951; STEINHAUS, 1958; SMITH & RIVERS, 1956; ARUGA, 1963; SMITH, 1963, 1964, 1967; CROIZIER, 1978; JURKOVICOVA,

1979; LONGWORTH & CUNNINGHAM, 1968; MALEKI-MILANI, 1978; PAVAN e cols, 1981). Segundo MALEKI-MILANI (1978), as passagens seriadas de um vírus estranho permite ao vírus "oculto" do hospedeiro alternativo se revelar, transformando assim uma doença latente em uma infecção caracterizada. GRACE, (1962) e LONGWORTH & CUNNINGHAM (1968), especulam que o que induz a ativação do vírus "oculto" nas passagens seriadas é a proteína do cristal do vírus estranho, contudo, afirmam esses autores, não se tem uma explicação plausível do porque a proteína do cristal teria o papel de ativar o vírus "oculto".

De modo geral, esses autores concordam sobre a importância da passagem seriada de VPN para ampliar a atividade desses baculovírus sobre um número maior de hospedeiros, visto o seu grande interesse econômico no controle de pragas.

2.5 - Infecção envolvendo mais de um tipo de vírus de inseto

As interações de patógenos diferentes em uma determinada espécie de inseto apresentam um papel fundamental no controle microbiológico desses organismos (VAGO, 1956, 1963 ; TANADA, 1967, 1976). Recentemente, vem se constatando que nos insetos, as infecções não são produzidas exclusivamente pela ação de um microorganismo, mas quase sempre são ocasionadas pelos efeitos múltiplos de diversos patógenos (ODIER, 1977) . STEINHAUS (1963), verificou que em certas ocasiões diversos vírus podem infectar simultaneamente um único inseto. HESS e cols (1978), observaram, no entanto, que a infecção de mais de um tipo de vírus tem sido estudado em geral com vírus de vertebrados e consequentemente poucos trabalhos relatam as interações de vírus diferentes em insetos.

A interação entre dois vírus de insetos tem sido descrita como uma infecção mista que pode manifestar de duas maneiras: 1) em um determinado tecido do inseto, no qual os vírions se replicariam em células separadas ou adjacentes (BIRD, 1959; GERSHENSON, 1959; LOWE & PASCHKE, 1968a e b; TANAKA & ARUGA, 1967; WATANABE & KOBAYASHI, 1970), 2) situados em uma mesma célula, sendo que um dos vírus apresentaria um desenvolvimento intranuclear enquanto que o outro citoplasmático (AMARGIER e cols, 1968; GARZON & KURSTAK, 1972; KURSTAK & GARZON, 1975; KIMURA & Mc INTOSH, 1976; KURSTAK e cols, 1972; ODIER, 1974, 1975). TANADA, em 1971, menciona que há três tipos descritos de interações para os vírus de insetos: a interferência, a coexistência independente e o sinergismo. Por conseguinte, parece que entre os Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) as interações que se conhecem pertencem àquelas duas primeiras categorias (ARUGA e cols, 1961; GERSHENSON, 1959; RITTER & TANADA, 1978; TANADA e cols, 1969). Já RITTER & TANADA (1978), asseveraram que entre os baculovírus, nos quais estão incluídos os Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) e Vírus de Granulose (VG), há um número muito reduzido de estudos tratando sobre a interação do tipo interferência, apesar dessa interferência ou antagonismo ocorrer tanto em nível celular como de órgão, (BIRD, 1959; TANADA e cols, 1969; TARASEVICH e cols, 1977; WATANABE & KOBAYASHI, 1970; WHITLOCK, 1977).

Em relação à interferência, foi verificado que duas linhagens de Vírus de Poliedrose Citoplasmática (VPC) de *Bombyx mori*, quando eram inoculadas juntas, interferiam uma com a outra (ARUGA e cols, 1961). Da mesma forma, demonstrou-se que na utilização de duas linhagens de VPC, uma com poliedro ou cristal icosaédrico e outra com cristal hexaédrico, baixas doses de VPC icosaédrico ou a inativação desse vírus poderia pre-

venir a ocorrência do segundo vírus subsequentemente administrado em larvas de *Bombyx mori* (ARUGA e cols, 1963a). Para ARUGA e cols, (1963b) o estágio da lagarta e o tempo de infecção apresentam um importante papel no desenvolvimento desses vírus.

ARUGA & YOSHITAKE (1964), realizaram vários experimentos nos quais constataram que algumas interferências entre os VPCs poderiam apresentar resultados diferentes se as lagartas de *B. mori* fossem tratadas com EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) ou formalina fria e posteriormente então com aqueles respectivos vírus, produzindo assim um aumento na infecção mista. Sugeriram que esse aumento na infecção da lagarta, poderia ser devido ao fato de que a formalina ou EDTA alteraria as características de certos tecidos e células, facilitando assim a penetração dos VPCs não apenas nas células receptoras como nas demais células.

Lagartas de *Heliothis amigera* podem ser infectadas simultaneamente por quatro vírus, porém, segundo WHITLOCK (1977), nenhum estudo foi realizado para estabelecer que tipo de relação dar-se-ia entre alguns daqueles vírus. Já TANADA & CHANG (1964), investigaram o tipo de interação que poderia ocorrer entre o VPC de *Colias eurythema* e o VPC de *B. mori* em três espécies de insetos, e constataram que as interações entre aqueles dois vírus variava de acordo com a espécie de hospedeiro, o estágio da lagarta, a dose do vírus e o intervalo de tempo da inoculação entre cada vírus pelo mesmo inseto.

Interações bem mais complexas do que as que foram mencionadas, parecem, todavia ocorrer entre os VPNs e os VGs. Assim de acordo com BIRD (1959), vários fatores ou efeitos podem influenciar na combinação entre esses dois vírus: 1) a competição para o mesmo local de replicação, 2) o tempo de vantagem para infectar o inseto primeiro, 3) o desenvolvimento mais

rápido de um vírus em relação ao outro. Esse autor, verificou, por exemplo, que as lagartas de *Choristoneura fumiferana* apesar de serem susceptíveis aos VPNs e VGs, quando estes eram inoculados simultaneamente um vírus interferia com o outro. E, muitos outros trabalhos como este não constataram nenhum aumento na relação entre esses vírus, quando administrados ao mesmo tempo (SHVETSOVA & TS'AI, 1962; LOWE & PASCHKE, 1968a e b; HUKUHARA e cols, 1969). Ao contrário dos autores acima, TANADA (1956), observou a ocorrência de sinergismo entre o VPN e VG específicos de lagartas de *Pseudaletia unipuncta*. Análises posteriores demonstraram que o VG era sinérgico ou ativador na associação dos dois vírus e que a capacidade do VG em aumentar a infecção do VPN era mantida por aquele vírus mesmo quando inativado (TANADA, 1959).

Em relatos preliminares, TANADA (1968), sugeriu que o fator sinérgico do VG poderia estar presente no viriôn ou partícula viral. Foi confirmado ulteriormente que esse fator sinérgico responsável pela reação sinérgica dos dois vírus estava presente no poliedro ou cristal do VG (TANADA & HUKUHARA, 1971; TANADA & WATANABE, 1971; TANADA e cols, 1973). Esse fator, em seguida, foi isolado, purificado e análises revelaram que ele agia como uma enzima (TANADA & HARA, 1975). Contudo, esses autores indicam que outros estudos deverão ser realizados para investigar qual seria o mecanismo que causa esse aumento de infecção, já que o aumento ou a intensificação na interação de um vírus de inseto por outro é um processo pouco observado (TANADA & HUKUHARA, 1971). Através de análises eletroforéticas de proteína do cristal do VG e pela técnica de imunodifusão, foi possível detectar uma outra linhagem proveniente do Oregon (E.U.A.), que ao contrário da linhagem havaiana, não era sinérgica ou não aumentava a infecção do VPN nas lagartas de *P. unipuncta*.

(TANADA & HUKUHARA, 1968; TANADA & WATANABE, 1971).

Por outro lado, HESS e cols (1978), propuseram que as possíveis consequências de infecção mista ou interações de vírus de insetos diferentes são: a recombinação genética, a interferência e o sinergismo. Quanto a recombinação genética parece que ela é um fenômeno frequente na multiplicação dos baculovírus nas células de lepidópteros, como acabam de aventar duas recentes publicações (LEE & MILLER, 1979; BROWN e cols, 1979).

Foi demonstrado, recentemente, que a infecção mista com baculovírus ou outros vírus de insetos produz recombinantes e esses podem ser utilizados no melhoramento genético dos vírus, contribuindo assim no desenvolvimento de inseticidas biológicos a base de vírus (SUMMERS e cols, 1980).

3.0 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Insetos

As lagartas de *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae) foram obtidas a partir de populações de laboratório da Seção de Entomologia do IAA/PLANALSUCAR, COSUL, Araras, São Paulo. Essa colaboração faz parte de um convênio entre esta Seção e o Laboratório de Virologia de Insetos do Departamento de Genética, IB, UNICAMP. Esses insetos utilizados foram mantidos em dieta artificial, segundo o método descrito por HENSLEY & HAMMOND (1968), e modificado posteriormente por DEGASPARI e cols (1981). Esses insetos foram fornecidos em tubos contendo dieta artificial, na qual a formalina foi sempre excluída devido a sua atividade antiviral (VAIL e cols, 1968).

As lagartas de *A. gemmatilis* Hubner (Lepidoptera : Noctuidae) foram fornecidas pelo Dr. Flávio Moscardi, pesquisador da EMBRAPA. Esses lepidópteros foram mantidos em dieta artificial, segundo o método de GREENE e cols (1976) com modificações. Nesse trabalho, apenas se utilizaram lagartas de aproximadamente 10 dias de idade, cuja a grande maioria se encontrava no 3º instar.

3.1.2 Isolados

Os seguintes vírus foram empregados nesse estudo:

- a) vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (VPNAg) do tipo (MEV)-vários viriões por membrana externa incluso no cristal de proteína.

- b) Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn) do tipo MEV. Fornecido pelo Dr. Drion G. Boucias, do Departamento de Entomologia da Universidade da Flórida, E.U.A.
- c) Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs). Isolado de larvas infestadas de *D. saccharalis* no Sul dos Estados Unidos, em 1978.

Esse vírus fazem parte da coleção de vírus de insetos do Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan, no Laboratório de Virologia de Insetos do Departamento de Genética e Evolução IB, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Procedimento de Bioensaio

O método de bioensaio utilizado é o descrito por PAVAN e cols (1981) com modificações.

Lagartas do 3º estágio foram colocadas individualmente em placas de acrílico contendo pequenos discos de dieta artificial (3.0 X 0.5 mm). Cada placa contém vinte e quatro cavidades, nas quais foram adicionadas um disco de dieta por cavidade. Os discos de dieta foram cortados por um furador e seccionados por lâminas. Com um micro-aplicador semi-automático inoculou-se uma gota de 2.7 microlitros (μ l) de uma dose conhecida de vírus sobre cada disco de dieta artificial. As lagartas foram expostas a esses discos de dieta contaminadas que estavam no interior das placas. As placas foram colocadas em câmaras úmidas e foram mantidas em temperatura constante ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Após 24 horas, as lagartas que haviam consumido todo o disco de

dieta e portanto ingerido todo o vírus inoculado foram transferidas das placas de acrílico para tubos contendo dieta não contaminada. Esses tubos foram levados para uma câmara de temperatura constante ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). A mortalidade foi verificada diariamente e a presença do vírus foi confirmada pela observação de amostras representativas de tecidos de lagartas infectadas em microscópio de contraste de fase. As lagartas infectadas foram mantidas a -20°C para posterior utilização.

3.2.2 Purificação e Quantificação dos cristais virais

O procedimento utilizado para purificação dos cristais de VPN e VG é basicamente o mesmo descrito por PAVAN e cols (1981) e PAVAN e cols (1983).

Lagartas infectadas foram maceradas num homogenizador, contendo água destilada e 0.1M de SDS (sódio duodecilsulfato). O homogenado foi filtrado por duas vezes em quatro camadas de gaze. Para extração dos poliedros ou cristais virais utilizou-se o processo de centrifugação diferencial que emprega ciclos alternados de baixa e alta velocidade em centrífuga Beckman, Modelo J2-21, rotor JA-20. Usando o ciclo de baixa velocidade o material filtrado foi centrifugado a 500g por 2 minutos. Suspendeu-se o precipitado resultante em água destilada e centrifugou-se em alta velocidade (10.000g por 20 minutos). O sobrenadante foi transferido para novo tubo e submetido a centrifugação em alta velocidade (10.000g por 30 minutos). O precipitado final foi ressuspenso em água destilada e mantido a -20°C para posterior uso. Esse processo foi repetido por duas ou três vezes até a limpeza do material.

Devido ao tamanho do cristal, a quantificação dos poliedros virais do material purificado pode ser feita usando

o hematímetro de Neubauer em microscópio de contraste de fase. Após o processo de quantificação foram determinadas as doses ajustadas para 2.7 microlitros (μ l) empregando diluições seriadas. Esse material foi mantido a -20°C para uso posterior.

3.2.3 Mortalidade Corrigida

Nesse trabalho as respostas de mortalidade foram corrigidas empregando a fórmula de ABBOTT (1925), com modificação.

MORTALIDADE CORRIGIDA - M.C

$$\text{M.C} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de larvas mortas por vírus}}{(\text{N}^{\circ} \text{ total de larvas} - \text{larvas mortas por outras causas})} \times 100$$

3.2.4 Determinação da Dose Letal 50% (DL_{50}) e Tempo Letal 50% (TL_{50})

A DL_{50} é a dose capaz de matar 50% dos indivíduos que a recebem e é utilizada frequentemente na determinação da potencialidade de uma substância ou estímulo ou na avaliação de toxicidade de um produto ativo (TREVAN, 1927). Para o cálculo de DL_{50} foi empregado o método Probit de acordo com BLISS, (1935a e b) e FINNEY, (1947).

O TL_{50} é o tempo letal que mata 50% dos indivíduos testados e foi analisado pelo método de Probit.

Os valores de DL_{50} e TL_{50} foram determinados com auxílio de um micro-computador TK-82 micro-digital (16K).

3.2.5 Passagem seriada

A passagem seriada é um método de seleção genética que consiste na inoculação de um isolado específico de um vírus em um determinado hospedeiro, sua recuperação e reinoculação durante várias gerações. O isolado original é inoculado e o vírus obtido das lagartas infectadas é purificado, quantificado e inoculado em lagartas da mesma espécie. Esse processo é repetido no transcurso de vários ciclos de experimentos. O processo de passagem seriada visa a obtenção do vírus que melhor se desenvolve na população na qual é inoculada.

Foram realizados dois grupos de experimentos de passagens seriadas, um com o VPNAg e outro com o VPNTn. Efetuaram-se dez passagens seriadas do VPNAg e onze passagens do VPNTn sobre o hospedeiro alternativo *D. saccharalis*. Lagartas do 3º estágio foram inoculadas com cinco doses conhecidas (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cristais/lagarta) de cada um desses vírus, e, para cada dosagem foram inoculadas cerca de 120 lagartas, o que perfazia aproximadamente um total de 600 lagartas para cada passagem seriada. Com a não utilização das lagartas que não ingeriram toda a dieta procurou-se obter cerca de 100 lagartas para análise em cada dose. Em todos os experimentos manteve-se um grupo controle de cerca de 30 lagartas, as quais foram tratadas com água destilada nas dietas artificiais.

Utilizaram-se os valores de DL_{50} e TI_{50} como parâmetro para verificar possíveis alterações na virulência de cada passagem seriada daqueles respectivos vírus.

O isolado de VPNAg obtido após dez passagens seriadas no hospedeiro alternativo, *D. saccharalis*, foi comparado com o isolado original, em lagartas do 3º estágio de *A. gemmatilis*. O mesmo teste não pode ser feito para os isolados de

VPNTn nas larvas de 3º estágio de *T. ni*, devido a não se dispor de populações de laboratório desta espécie.

3.2.6 Infecção Múltipla

Foram realizados experimentos para verificar a interação entre dois vírus simultaneamente inoculados. Usaram-se três tipos de inóculos mistos:

- a) Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatilis* (VPNAg) e Vírus de Granulose de *D. saccharalis* (VGDS).
- b) Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn) e Vírus de Granulose de *D. saccharalis* (VGDS).
- c) Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatilis* (VPNAg) e Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn).

Os três tipos diferentes de inóculos mistos foram aplicados por via oral às lagartas do 3º estágio de *D. saccharalis*. Efetuaram-se 19 experimentos para o inóculo VPNAg + VGDS, 13 para o inóculo VPNTn + VGDS e 10 para o inóculo misto VPNAg + VPNTn. Foram inoculados cerca de 120 insetos para cada experimento com variações nas doses. Para cada tipo de inóculo misto os insetos foram divididos em três grupos: o primeiro grupo foi exposto a um dos vírus, o segundo ao outro e o terceiro a mistura de ambos os vírus. Manteve-se sempre um grupo controle de aproximadamente 30 insetos não tratados com vírus.

Para examinar o processo de interação entre dois vírus simultaneamente inoculados, comparou-se a mortalidade produzida pelos dois vírus isoladamente aplicados com a mistura de ambos os vírus (vírus A + vírus B) de cada inóculo misto.

4.0 - RESULTADOS

4.1 Passagens Seriadas do VPNAg na broca de cana, *D. saccharalis*

De modo geral, as lagartas de *D. saccharalis* infectadas com o VPNAg se caracterizaram inicialmente por pouca mobilidade e falta de "apetite". Com a evolução da infecção as brocas se tornaram flácidas e demonstraram uma coloração esbranquiçada na parte ventral do corpo que posteriormente se estendia por todo o organismo. Comumente, após o 5º - 8º dia de tratamento, as lagartas começavam a morrer e o exame destas sob o microscópio de contraste de fase confirmava a presença do vírus. Os poliedros ou cristais do VPNAg observados ao microscópio de contraste de fase, não apresentaram qualquer modificação no decorrer das passagens seriadas.

As tabelas I, II, III, IV e V apresentam os dados de mortalidade corrigida das lagartas de *D. saccharalis* às cinco diferentes doses (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cristais/lagarta) de VPNAg nas dez passagens seriadas a que se procede.

Nota-se nas tabelas I, II, III, IV e V, que a resposta de mortalidade corrigida das lagartas de *D. saccharalis* ao VPNAg está diretamente relacionada a dose. Os resultados apresentados indicam que ocorreu uma certa tendência de aumento especialmente nas doses mais baixas na mortalidade no decorrer das passagens seriadas do VPNAg nas brocas de cana.

Nas tabelas acima mencionadas constam ainda os valores de TL_{50} com seus respectivos coeficientes de correlação. Pode-se observar que os valores de TL_{50} em geral diminuíram com o aumento da dose, isto é, quanto maior a dose menor foi

TABELA I - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNaq nas várias passagens seriadas em lagartas de *C. arcuana*. Dose: 10^7 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	103	86.4	15.0	0.75	***
2ª	103	97.1	15.2	0.92	***
3ª	97	91.7	10.3	0.83	***
4ª	113	98.2	10.7	0.94	***
5ª	100	100	10.6	0.97	***
6ª	100	100	12.1	0.98	***
7ª	100	94.0	15.3	0.97	***
8ª	99	96.0	15.6	0.93	***
9ª	100	99.0	11.2	0.98	***
10ª	100	100	9.0	0.98	***

*r - Coeficiente de Correlação

*** - Valor de *r altamente significativo

TABELA II - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em lagartas de *D. saccharalis*. Dose: 10^5 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	98	42.6	-----	-----	----
2ª	103	59.2	21.2	0.92	***
3ª	100	56.0	21.3	0.71	***
4ª	115	74.7	14.0	0.92	***
5ª	100	93.0	18.0	0.76	***
6ª	90	78.0	14.6	0.79	***
7ª	100	89.0	17.0	0.98	***
8ª	93	98.0	17.5	0.94	***
9ª	100	97.8	11.5	0.99	***
10ª	100	93.7	10.6	0.78	***

*r - Coeficiente de Correlação

*** - Valor de *r altamente significativo

TABELA III - Porcentagem de mortalidade induzida pelo vírus nas várias passagens seriadas em lagartas de *D. sublineator*. Dose: 10^5 unidades letais.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	97	22.9	----	----	---
2ª	102	24.3	----	----	---
3ª	95	36.3	----	----	---
4ª	112	47.3	----	----	---
5ª	100	62.0	19.6	0.84	***
6ª	100	67.0	15.9	0.73	***
7ª	100	40.0	----	----	---
8ª	90	71.0	21.1	0.71	***
9ª	100	72.3	18.6	0.79	***
10ª	100	67.3	17.7	0.78	***

*r - Coeficiente de Correlação

*** - Valor de *r alcance significativo

TABELA IV - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPMV nas várias passagens seriadas em lagartas de *D. saccharalis*. Dose: 10^4 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	Tempo (Dias)	r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	100	10.0	----	----	----
2ª	104	11.5	----	----	----
3ª	103	32.0	----	----	----
4ª	113	12.3	----	----	----
5ª	100	21.0	----	----	----
6ª	100	23.0	----	----	----
7ª	100	40.0	----	----	----
8ª	100	47.0	----	----	----
9ª	100	41.3	----	----	----
10ª	100	51.3	27.8	0.74	***

*r - Coeficiente de Correlação

*** - Valor de r altamente significativo

TABELA V - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNAg nas várias passagens seriadas em lagartas de *D. saccharalis*. Dose: 10^3 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	110	5.3	----	----	---
2ª	102	6.9	----	----	---
3ª	85	8.3	----	----	---
4ª	113	9.7	----	----	---
5ª	100	7.0	----	----	---
6ª	100	17.0	----	----	---
7ª	100	6.0	----	----	---
8ª	100	11.0	----	----	---
9ª	100	31.9	----	----	---
10ª	100	37.7	----	----	---

*r - Coeficiente de Correlação

o Tempo Letal necessário para matar 50% da população de broca de cana. Os valores de TL_{50} variaram muito no transcorrer das passagens seriadas do VPNAg nas lagartas de *D. saccharalis*, não mostrando nenhuma tendência de aumento ou de diminuição.

Pode se verificar que os coeficientes de correlação variaram entre os valores de 0.75 a 0.98, os quais são altamente significativos.

Para avaliar as alterações na virulência do VPNAg submetido ao processo de seleção genética, foram calculados os valores de DL_{50} de cada passagem seriada desses vírus nas lagartas de *D. saccharalis*.

Constata-se na tabela VI que ocorreu uma modificação na virulência do VPNAg durante as passagens seriadas nas lagartas de *D. saccharalis*.

Face a esses resultados, pode-se verificar então que a virulência do VPNAg não se manteve a mesma no transcorrer das passagens no hospedeiro alternativo, havendo um aumento de patogenicidade desse baculovírus em relação às lagartas de *D. saccharalis*. Na 1ª passagem do VPNAg o DL_{50} é de 7.37×10^5 cristais/lagarta ao passo que na 10ª passagem apenas 6.65×10^3 ou 6650 cristais/lagarta desses vírus são necessários para matar 50% da população das lagartas do 3º estágio de *D. saccharalis*.

O Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (VPNAg) após ter sido submetido a dez passagens seriadas tornou-se mais de cem vezes mais virulento para um total de 5040 lagartas de *D. saccharalis* analisadas.

Nas figuras 1A e 1B que mostram os gráficos com as equações de regressão, pode-se verificar da mesma forma a ocorrência de aumento na virulência do VPNAg através do deslocamento da linha tracejada para a esquerda que indica a redu-

TABELA VI - Doses letais 50 (DL_{50}) do VPNAg nas dez passagens seriadas para lagartas de *D. saccharalis*.

Passagem seriada	Número de indivíduos analisados	DL_{50} (cristais/lagarta)	Intervalo de confiança (95%)	
			L. inferior	L. superior
1ª	508	7.89×10^5	1.18×10^5	5.23×10^6
2ª	514	4.51×10^5	1.91×10^5	1.06×10^6
3ª	480	1.63×10^5	6.38×10^3	4.19×10^6
4ª	565	1.20×10^5	5.64×10^4	3.39×10^5
5ª	500	5.02×10^4	2.15×10^4	1.17×10^5
6ª	490	4.89×10^4	4.13×10^3	5.80×10^5
7ª	500	4.77×10^4	2.65×10^3	8.61×10^5
8ª	482	1.28×10^4	2.38×10^3	1.79×10^5
9ª	500	9.45×10^3	1.12×10^3	7.99×10^4
10ª	500	6.64×10^3	7.20×10^2	6.11×10^4
TOTAL	5040			

FIG. 1 - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a lagarta de *B. mori*, inoculadas com diluições seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de *B. mori* (*VPNAg*).

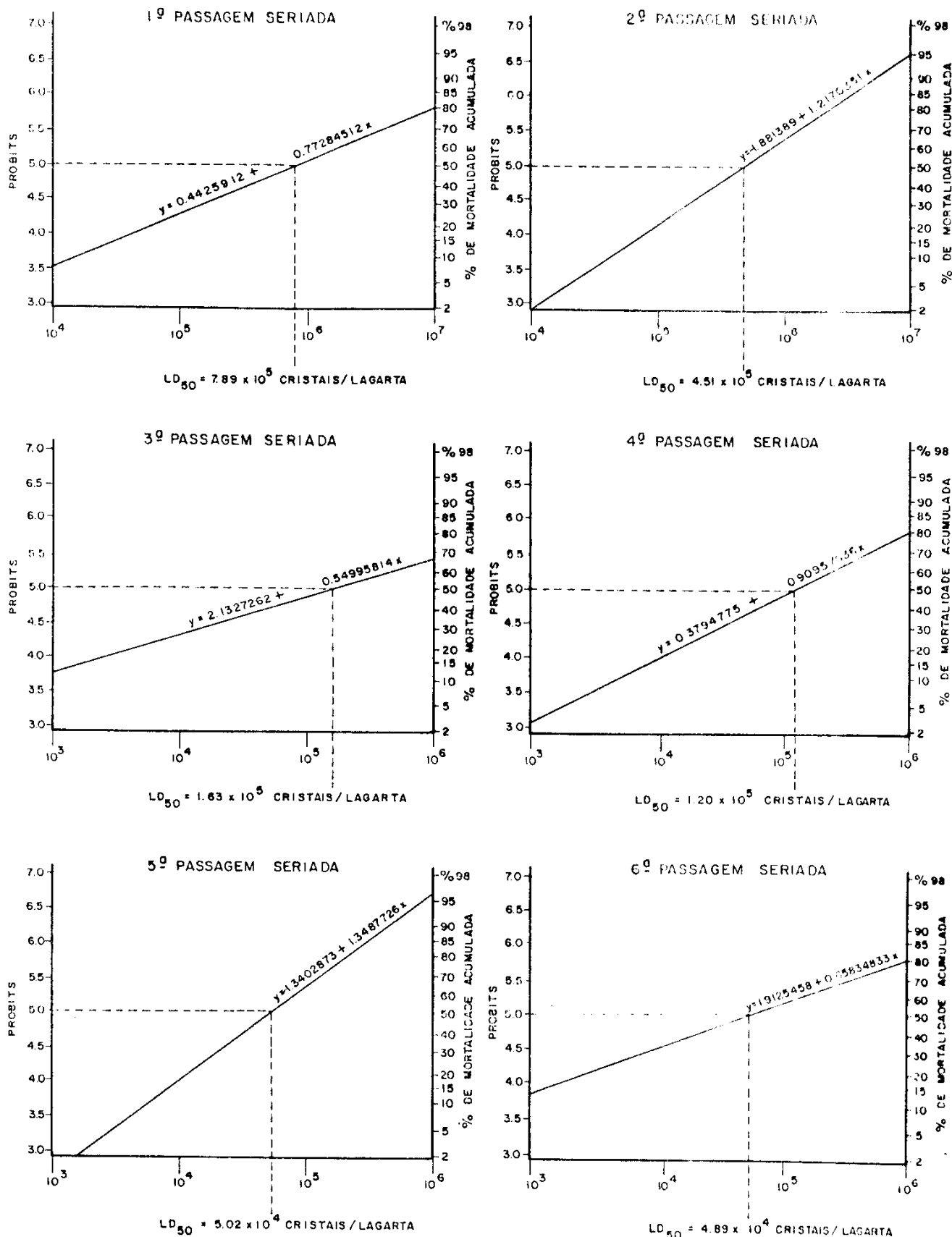
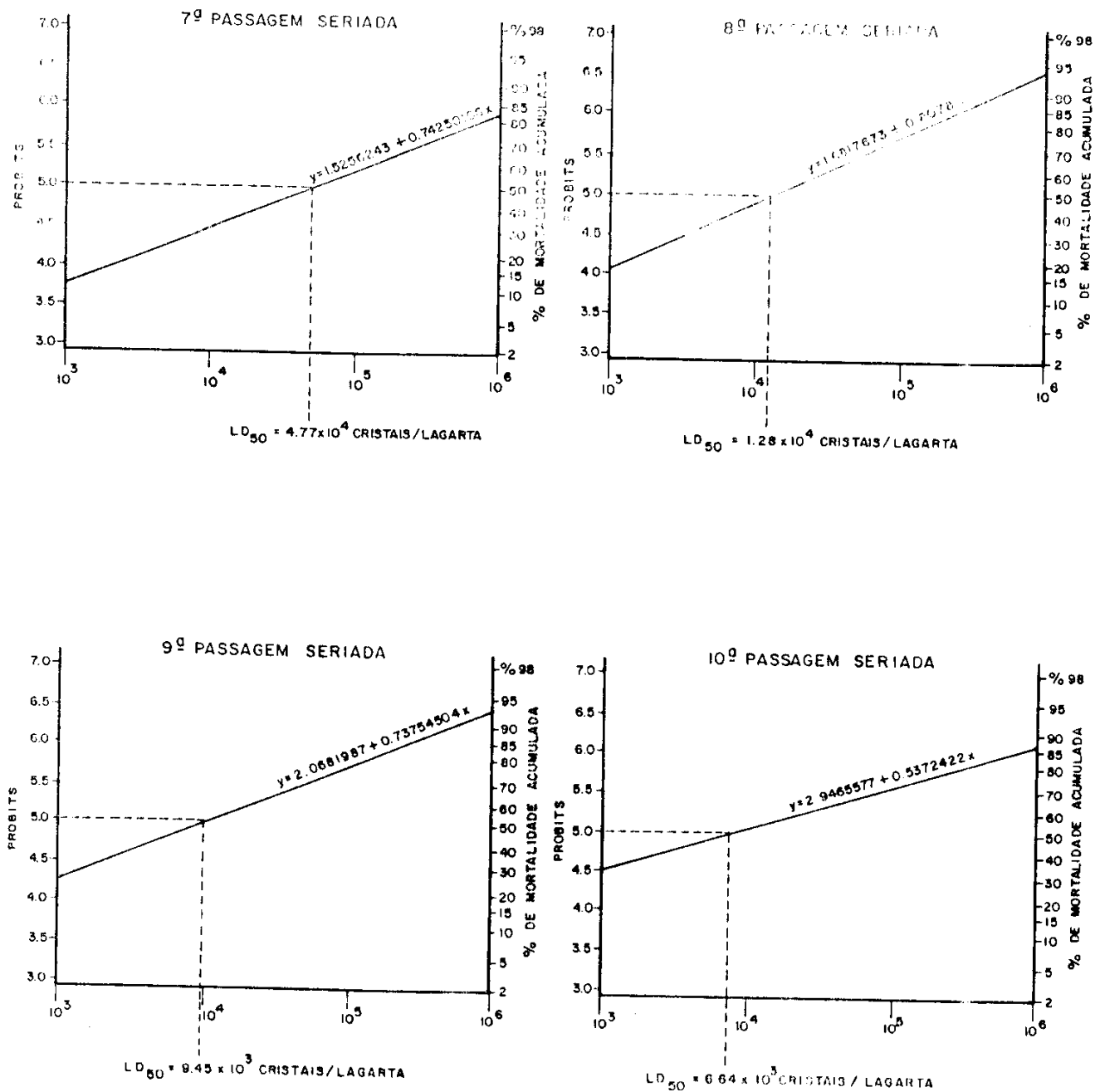


FIG. 1A - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a pagarta de *S. maritima*, inoculadas com diluições seriadas do Vírus de Poliedro Nuclear de *S. maritima* (VPNAg).



ção do valor de DL_{50} ao longo das dez passagens seriadas desse baculovírus nas lagartas de *D. saccharalis*.

4.2 Comparação da atividade biológica do VPNAg submetido a dez passagens seriadas num hospedeiro alternativo e do VPNAg original em lagartas de *A. gemmatilis*.

Para verificar se o VPNAg foi alterado após dez passagens seriadas nas lagartas de *D. saccharalis* inoculou-se esse isolado no seu hospedeiro original, *A. gemmatilis*, e os resultados desse experimento foram comparados aos obtidos pelo isolado do VPNAg original naqueles mesmos insetos.

Pode-se notar na tabela VII que na dose de 10^2 cristais/lagarta, o isolado de VPNAg original foi responsável por uma maior mortalidade do seu hospedeiro original do que o isolado do VPNAg submetido a dez passagens seriadas nas lagartas de *D. saccharalis* e esse isolado causou mais rapidamente a mortalidade das lagartas de *A. gemmatilis*. Verifica-se então que a atividade biológica do isolado de VPNAg após dez passagens seriadas num hospedeiro alternativo é um pouco diferente da do mesmo vírus que não foi submetido a passagens seriadas. O isolado de VPNAg sujeito a dez passagens seriadas nas lagartas de *D. saccharalis* não alcançou o grau de patogenicidade no seu hospedeiro original mostrado pelo isolado do VPNAg original. Todavia, devido a disponibilidade de um pequeno número de lagartas para esse experimento, testes mais completos necessitam ser realizados para confirmar essas observações.

TABELA VII - Porcentagem de mortalidade induzida pelo isolado do VPNAg submetido a dez passagens seriadas num hospedeiro alternativo e do VPNAg original nas lagartas de *A. gemmatilis*. Dose: 10^2 crisais/lagarta.

Isolados inoculados	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
VPNAg (P)	20	75.0	10.3	0.92	***
VPNAg (109)	20	65.0	11.9	0.95	***

*r - Coeficiente de Correlação

*** - Valor de *r altamente significativo

VPNAg (P) - Isolado do VPNAg original, não sujeito a passagens seriadas num hospedeiro alternativo
 VPNAg (109) - Isolado do VPNAg submetido a dez passagens seriadas em lagartas de *A. gemmatilis*

4.3 Passagens Seriadas do VPNTn na broca de cana, *D. saccharalis*

As lagartas de *D. saccharalis* infectadas com o VPNTn se apresentavam em geral com tamanho reduzido devido a falta de apetite e o tegumento externo exibia uma coloração esbranquiçada. Com o progresso da infecção, os corpos destas lagartas se tornaram completamente liquefeitos, morrendo as primeiras lagartas após o 3º dia da inoculação do vírus. Esses sintomas externos característicos das lagartas de *D. saccharalis* infectadas com o VPNTn apresentaram-se inalterados em todas as passagens seriadas. Através do exame de amostras do tecido gorduroso em microscópio de contraste de fase pode-se constatar a presença de VPNTn nesses insetos. Os cristais ou poliedros observados nessas amostras de tecido gorduroso não demonstraram qualquer modificação na forma ou tamanho no decorrer das passagens seriadas.

Nas tabelas VIII, IX, X, XI e XII apresentam os dados concernentes a mortalidade corrigida das lagartas de *D. saccharalis* às cinco diferentes doses (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 cristais/lagarta) do VPNTn nas onze passagens seriadas.

Verifica-se nas tabelas VIII, IX, X, XI e XII que em todas as passagens seriadas a mortalidade corrigida das lagartas de *D. saccharalis* aumentava com a dose. Os resultados apresentados indicam que ocorreu uma tendência de aumento, especialmente nas doses mais baixas, na mortalidade no transcurso das passagens seriadas do VPNTn nas brocas de cana.

Na tabelas mencionadas constam ainda os TL_{50} com seus respectivos coeficientes de correlação que se mostram altamente significativos. Pode-se observar nessas tabelas que os valores de TL_{50} de modo geral foram inversamente proporcio

TABELA VIII - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de *D. zea*. Dose: 10^7 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	111	98.2	10.0	0.93	***
2ª	110	92.7	13.5	0.89	***
3ª	100	99.0	5.0	0.99	***
4ª	100	91.0	11.2	0.97	***
5ª	89	100	7.1	0.98	***
6ª	72	98.6	9.8	0.96	***
7ª	100	98.7	5.0	0.95	***
8ª	100	99.8	6.3	0.97	***
9ª	89	100	5.0	0.80	***
10ª	100	100	7.0	0.98	***
11ª	100	99.7	5.0	0.90	***

TABELA IX - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de *D. saccharalis*. Dose: 10^6 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	111	81.9	12.0	0.91	***
2ª	113	75.2	15.5	0.91	***
3ª	98	94.8	5.8	0.84	***
4ª	100	77.7	14.7	0.94	***
5ª	100	87.0	23.5	0.79	***
6ª	72	98.6	14.5	0.72	***
7ª	80	81.2	15.0	0.91	***
8ª	100	99.0	7.5	0.87	***
9ª	100	91.0	20.0	0.93	***
10ª	100	100	17.5	0.83	***
11ª	95	98.9	5.2	0.81	***

TABLE X - Percentagem de mortalidade induzida pelo VPM na várias passagens seriadas em lagartas de *D. zebra*. Dose: 10^5 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1º	113	38.7	25.3	----	----
2º	109	56.0	25.3	0.85	***
3º	100	63.0	8.0	0.91	***
4º	100	61.0	18.9	0.93	***
5º	97	60.8	39.1	0.83	***
6º	77	97.4	23.9	0.85	***
7º	90	73.4	40.5	0.97	***
8º	100	84.0	36.4	0.93	***
9º	85	87.1	50.9	0.97	***
10º	100	88.8	27.3	0.78	***
11º	98	93.8	21.5	0.97	***

TABELA XI - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPNTn nas várias passagens seriadas em lagartas de 2.ª instar. Dose: 10^4 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	90	32.2	----	----	---
2ª	110	27.3	----	----	---
3ª	100	29.0	----	----	---
4ª	100	38.0	----	----	---
5ª	100	47.0	----	----	---
6ª	64	79.7	48.3	0.96	***
7ª	80	66.2	47.1	0.98	***
8ª	100	79.0	41.2	0.98	***
9ª	82	65.8	69.5	0.97	***
10ª	100	80.0	47.8	0.99	***
11ª	96	86.5	37.1	0.97	***

TABELA XII - Porcentagem de mortalidade induzida pelo VPV1n nas várias passagens seriadas em lagartas de *J. saccharalis*. Dose: 10^3 cristais/lagarta.

Passagens seriadas	Número de indivíduos analisados	Mortalidade corrigida (%)	TL ₅₀ (Dias)	*r	Significância do teste ($\alpha = 0.01$)
1ª	100	15.8	----	----	---
2ª	114	16.7	----	----	---
3ª	100	14.0	----	----	---
4ª	100	33.0	----	----	---
5ª	100	25.2	----	----	---
6ª	87	31.1	----	----	---
7ª	85	47.0	----	----	---
8ª	100	45.0	----	----	---
9ª	100	49.0	----	----	---
10ª	100	57.0	62.4	0.99	***
11ª	100	64.0	40.3	0.96	***

TABELA XIII - Doses Letais 50 (DL_{50}) do VPNTn nas onze passagens seriadas para lagartas de *C. saccharalis*.

Passagem seriada	Número de indivíduos analisados	DL_{50} (cristais/lagarta)	Intervalo de confiança (95%)	
			L. inferior	L. superior
1º	525	9.68×10^4	1.25×10^4	7.47×10^5
2º	556	7.41×10^4	4.21×10^4	1.30×10^5
3º	498	2.93×10^4	8.21×10^3	1.04×10^5
4º	500	2.22×10^4	2.22×10^3	1.53×10^5
5º	486	1.66×10^4	4.51×10^3	6.13×10^4
6º	392	2.29×10^3	6.07×10^2	8.65×10^3
7º	435	1.65×10^3	2.80×10^1	9.69×10^4
8º	500	1.27×10^3	1.84×10^2	8.76×10^3
9º	456	1.12×10^3	1.54×10^2	8.18×10^3
10º	500	8.77×10^2	3.26×10^1	2.36×10^4
11º	489	1.20×10^2	1.40×10^1	9.92×10^2
TOTAL	5537			

FIG. 2 - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a lagarta de *B. mori*, inoculadas com diluições seriadas de Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn).

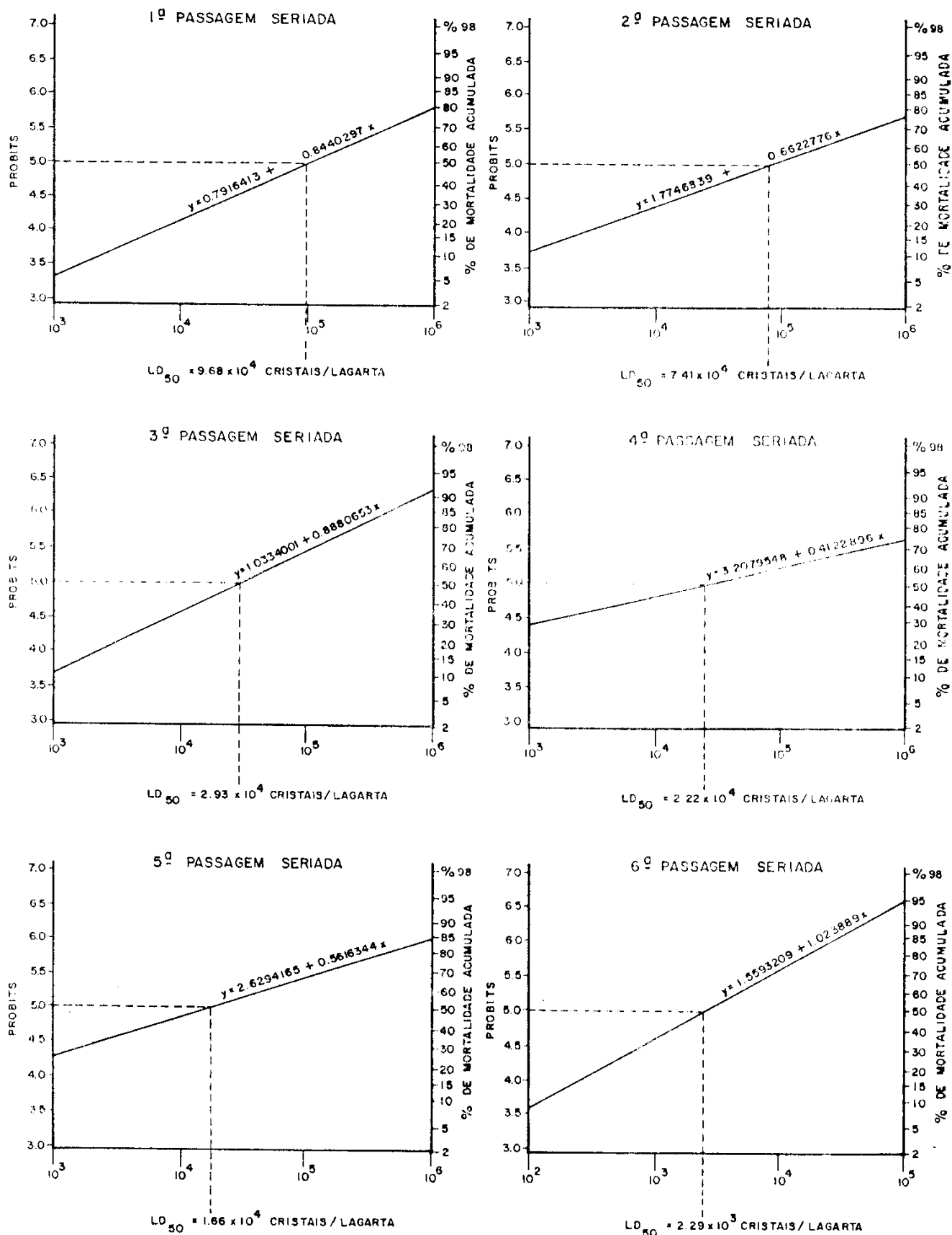
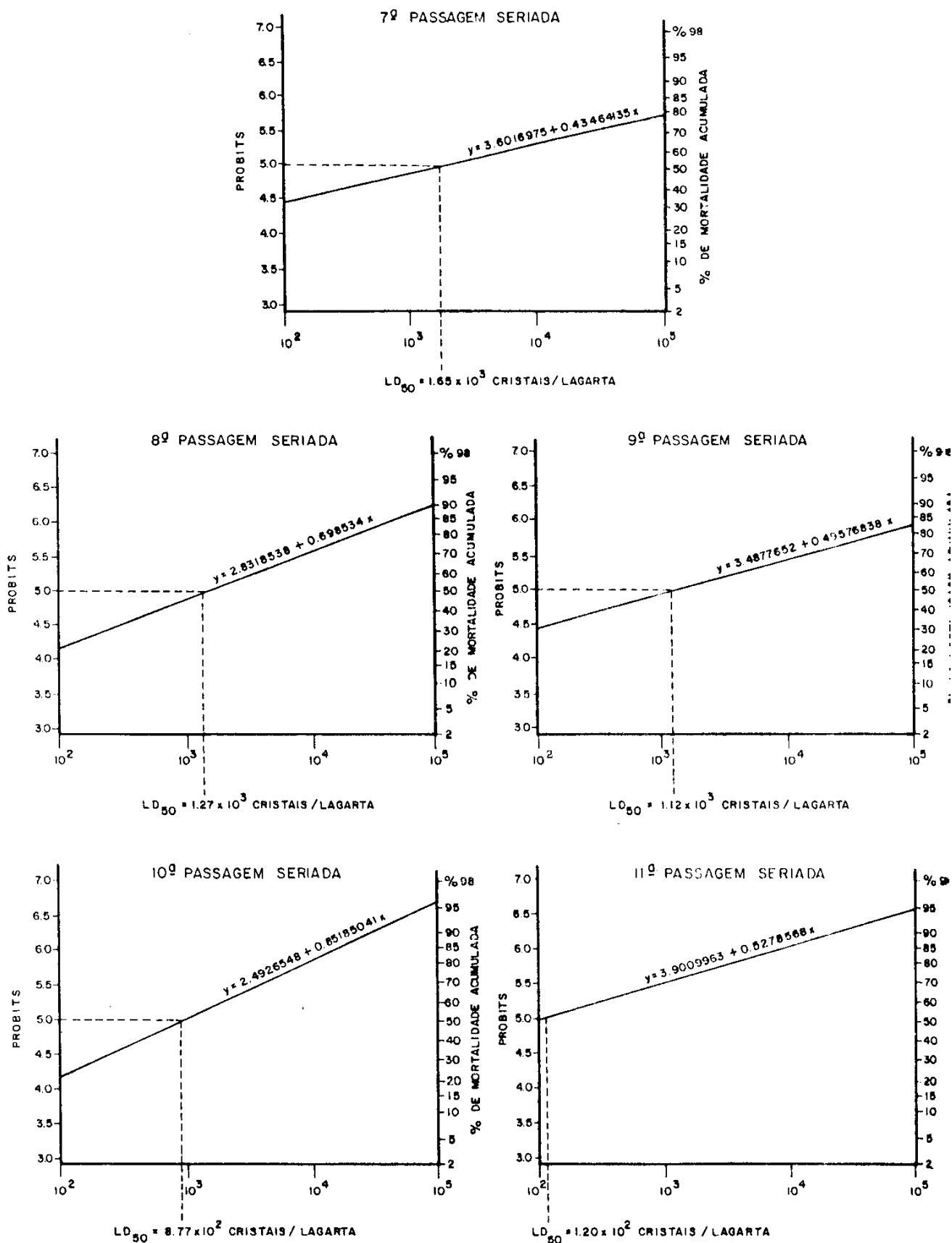


FIG. 2A - Equação de regressão da mortalidade em função da dose, para a lagarta de *D. saccharalis*, inoculadas com diluições seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn).



nais as doses utilizadas. Observa-se, outrossim, que os valores de TI_{50} variaram muito no transcorrer das passagens seriadas do VPNTn nas lagartas de *D. saccharalis*, não mostrando nenhuma tendência de aumento ou de diminuição.

Para avaliar a ocorrência de qualquer variação na patogenicidade do VPNTn submetido a onze passagens seriadas nas lagartas de *D. saccharalis* foram calculados os valores de DL_{50} que estão expostos na tabela XII.

Constata-se na tabela XIII que ocorreu uma modificação na virulência do VPNTn no decorrer das passagens seriadas nas lagartas de *D. saccharalis*.

Pode-se observar nessa referida tabela que na 1ª passagem o DL_{50} é de 9.68×10^4 cristais/lagarta enquanto na 11ª passagem seriada o DL_{50} é de 1.20×10^2 ou 120 cristais/lagarta, indicando a ocorrência de um aumento substancial na virulência do VPNTn em relação às lagartas de *D. saccharalis*.

O Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn) após ter sido submetido a onze passagens seriadas tornou-se cerca de oitocentas vezes mais virulento para um total de 5337 lagartas de *D. saccharalis* analisadas.

Nas figuras 1A e 2B que mostram os gráficos com as equações de regressão, pode-se verificar igualmente a ocorrência de aumento na patogenicidade do VPNTn através do deslocamento da linha tracejada para a esquerda que indica a redução do valor de DL_{50} ao longo das onze passagens seriadas desse baculovírus nas lagartas de *D. saccharalis*.

4.4 Resposta das lagartas de *D. saccharalis* aos inóculos mistos de três baculovírus

4.4.1 Tratamento simultâneo com o VPNAg e o VGDS

Os resultados dos experimentos nos quais as lagartas de *D. saccharalis* foram expostas ao tratamento simultâneo do VPNAg e VGDS estão apresentados na tabela XIV.

Na tabela XIV, verifica-se que nas várias doses utilizadas (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 cristais/lagarta) o inóculo simples VGDS causou uma maior mortalidade das brocas de cana do que o inóculo simples VPNAg.

Outrossim se observa nessa tabela que a mortalidade produzida pelos dois vírus simultaneamente inoculados ou pelo inóculo misto é menor do que a de um dos inóculos simples.

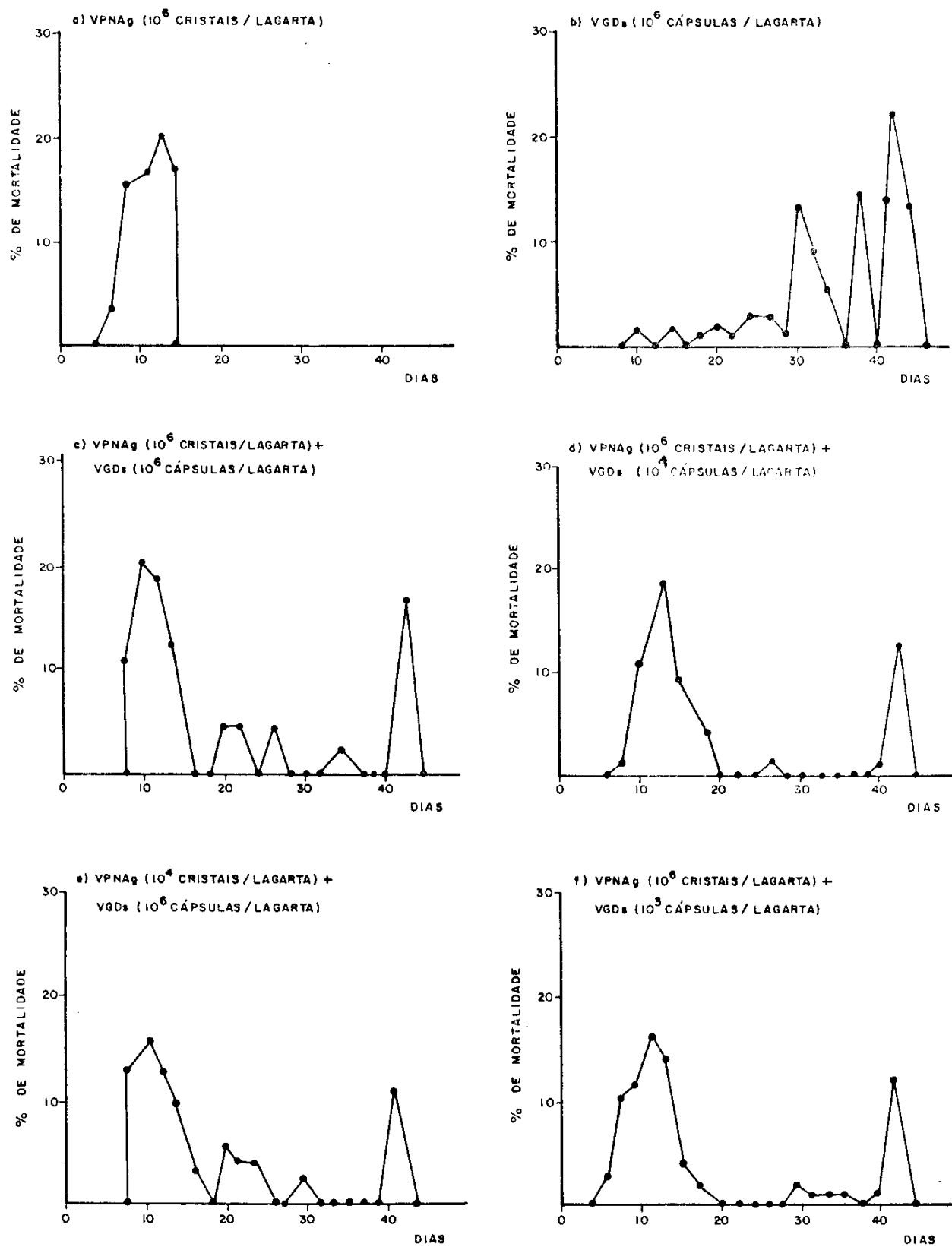
Comparando os experimentos de nº 11, 12, 13 e 14 aos de nº 16, 17, 18 e 19 da tabela XIV, nota-se que ocorreram diferenças nas respostas de mortalidade produzidas pelas variações nas doses do inóculo misto.

No experimento de nº 12, por exemplo, foi inoculado uma dose de 10^2 cristais/lagarta do VPNAg e uma dose de 10^6 cristais/lagarta do VGDS e o inóculo misto resultante da combinação desses dois vírus produziu uma mortalidade de 87.9%, todavia, quando foram invertidas as doses deste mesmo inóculo misto pode-se observar no experimento nº 17 que este produziu uma menor mortalidade, ou seja, de 63.1% das lagartas de *D. saccharalis*. Pode-se sugerir que isso se deve ao fato de que em uma determinada dose, o inóculo simples VGDS ocasiona maior mortalidade das brocas de cana do que o inóculo simples VPNAg e exerce então maior patogenicidade do que este vírus quando associado a ele.

TABELA XIV - Resposta das lagartas de *D. saccharalis* ao inócu
lo misto: VPNAg + VGDs.

Experi mento	Número de indivíduos analisados	Dose (cristais/lagarta)			Mortalidade corrigida (%)
		VPNAg	+	VGDs	
1	68	10^1			2.0
2	68	10^2			2.7
3	113	10^3			9.7
4	113	10^4			12.3
5	98	10^6			42.8
6	90			10^1	32.9
7	100			10^2	57.0
8	95			10^3	81.5
9	90			10^4	93.0
10	100			10^6	96.0
11	68	10^1	+	10^6	73.5
12	58	10^2	+	10^6	87.9
13	68	10^3	+	10^6	83.8
14	68	10^4	+	10^6	87.3
15	48	10^6	+	10^6	93.7
16	95	10^6	+	10^1	65.5
17	90	10^6	+	10^2	63.1
18	90	10^6	+	10^3	82.2
19	95	10^6	+	10^4	66.3
TOTAL	1615				

FIG. 3 - Porcentagem de mortalidade em função do tempo. Tratamento simultâneo com o Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatilis* (VPNAg) e o Vírus de Granulose de *D. saccharalis* (VGDs).



Comparando-se com os inóculos mistos, nota-se ainda naquela referida tabela que a resposta de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis* não apresenta o mesmo padrão de linearidade dos inóculos simples.

Parece evidente diante desses resultados que a inoculação simultânea do VPNAg e VGDS é menos eficiente do que a inoculação de um deles para um total de 1615 lagartas analisadas.

Na figura 3 está evidenciado o processo resultante da interação desses dois vírus.

Comparando o gráfico (a) e (b) da figura 3, nota-se que o inóculo simples VPNAg apresenta um pico de mortalidade ao redor de 10 dias enquanto que o inóculo simples VGDS mostra que a grande parte dos insetos morrem por volta de 30 a 40 dias.

Verifica-se nos gráficos (c), (d), (e) e (f) que o inóculo misto resultante da combinação desses dois vírus apresenta em qualquer que seja a dose inoculada um nítido pico de mortalidade aos 10 dias e um pico por volta de 40 dias. Diante desse fato, pode-se relacionar o primeiro pico ao efeito do VPNAg e o segundo provavelmente ao efeito do VGDS.

As lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com a mistura desses dois vírus desenvolveram os dois tipos de infecção em células diferentes como constatado pelo exame de amostras de tecido desses insetos no microscópio de contraste de fase.

4.4.2 Tratamento simultâneo com o VPNTn e o VGDS

Os resultados dos experimentos nos quais as lagartas de *D. saccharalis* foram expostas ao tratamento simultâneo

TABELA XV - Resposta das lagartas de *B. mori* ao inóculo misto: VPNTn e VGDS

Experimentos	Números de indivíduos analisados	Dose (cristais/lagarta) VPNTn	+	VGDS	Mortalidade corrigida (%)
1	100			1 X 10 ²	58.0
2	100			5 X 10 ²	75.6
3	100			1 X 10 ³	85.0
4	60			5 X 10 ³	89.0
5	62			1 X 10 ⁶	98.3
6	60	5 X 10 ³			38.0
7	90	1 X 10 ⁴			44.0
8	100	1 X 10 ⁶			87.0
9	84	5 X 10 ³	+	5 X 10 ²	73.8
10	86	5 X 10 ³	+	5 X 10 ³	62.8
11	80	1 X 10 ⁴	+	1 X 10 ⁶	94.7
12	60	1 X 10 ⁶	+	1 X 10 ²	86.6
13	100	1 X 10 ⁶	+	1 X 10 ³	88.3

do VPNTn e VGDs estão apresentados na tabela XV.

Na tabela XV, verifica-se que nas doses 5×10^3 e 1×10^6 cristais/lagarta o inóculo simples VGDs produziu uma maior mortalidade das brocas de cana do que o inóculo simples VPNTn.

Nessa tabela se constata igualmente que quando foi inoculado uma dose de 5×10^3 cristais/lagarta do VPNTn e do VGDs resultou respectivamente em uma mortalidade de 38.0% e 89.0%, ao passo que a combinação destes vírus ($5 \times 10^3 + 5 \times 10^3$ cristais/lagarta) produziu uma mortalidade de apenas 62.8% das lagartas de *D. saccharalis*. Portanto a mortalidade corrigida que se observou da combinação desses dois baculovírus não ultrapassou essa esperada pelo efeito de dose dupla naqueles insetos.

Outrossim se observa nos experimentos de nº 9 a 13 da tabela XV, que a resposta de mortalidade corrigida das lagartas de *D. saccharalis* produzida pelo inóculo misto não apresenta o mesmo padrão de linearidade dos inóculos simples.

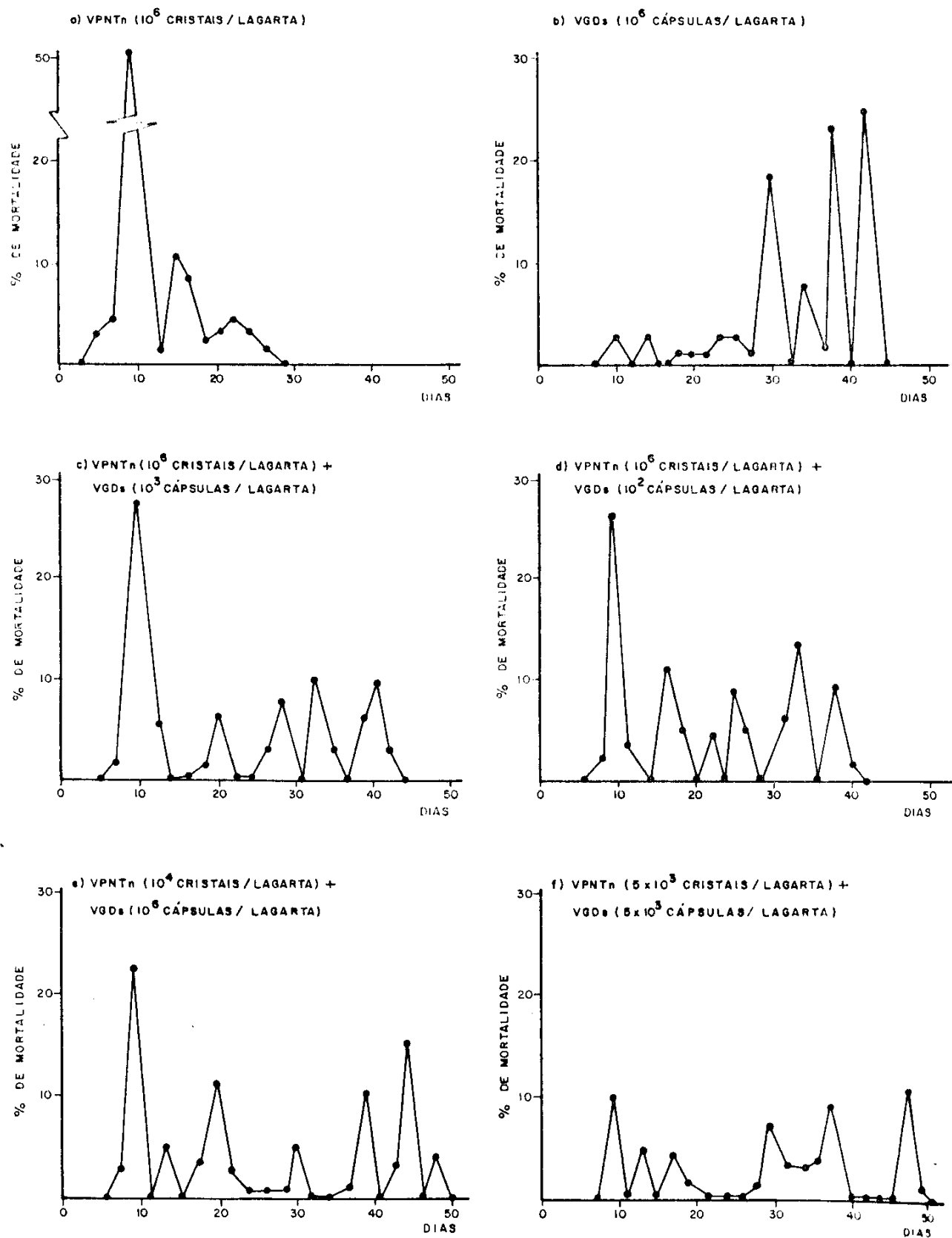
Analisando os resultados de um total de 1082 lagartas de *D. saccharalis* testadas, verifica-se que a mortalidade ocasionada pelo inóculo misto é bem inferior a esta causada por um dos dois baculovírus isoladamente inoculado.

Na figura nº 4 está evidenciado o processo resultante da interação do VPNTn e VGDs.

Verifica-se no gráfico (a) da figura 4, que o inóculo simples VPNTn exibe um pico de mortalidade ao redor de 10 dias e dois picos menores por volta de 20 dias. No gráfico (b), observa-se que o inóculo simples VGDs mostra que a maior parte dos insetos morrem por volta de 30 a 40 dias.

Analisando os gráficos (c), (d), (e) e (f) da figura 4, nota-se que o inóculo misto resultante da combinação

FIG. 4 - Porcentagem de mortalidade em função do tempo. Tratamento simultâneo com o Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn) e o Vírus de Granulose de *B. mori* (VGDs).



desses dois vírus apresenta em qualquer que seja a dose inoculada um nítido pico de mortalidade aos 19 dias e picos menores por volta de 30 a 40 dias. Face a esses resultados, pode-se relacionar o primeiro pico ao efeito do VPNTn e os picos após 20 dias provavelmente ao efeito do VGDS.

No gráfico (e) e (f), constata-se que o inóculo misto apresenta picos de mortalidade por volta de 50 dias com característico retardo desses respectivos picos. No gráfico (f), esse atraso aplica-se possivelmente a inoculação de baixa dose da mistura de VPNTn e VGDS. Já no gráfico (e) deve-se a inoculação de uma dose mais elevada do VGDS em relação ao VPNTn daquele inóculo misto.

As lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com a combinação desses dois vírus desenvolveram os dois tipos de infecção em células diferentes como constatado pelo exame de amostras de tecido desses insetos no microscópio de contraste de fase.

4.4.3 Tratamento simultâneo com o VPNAg e o VPNTn

Os resultados dos experimentos nos quais as lagartas de *D. saccharalis* foram expostos ao tratamento simultâneo do VPNTn e VPNAg estão apresentados na tabela XVI.

Nos experimentos de nº 1 a 6 da tabela XVI, nota-se que nas várias doses utilizadas (5×10^1 , 5×10^4 e 5×10^5 cristais/lagarta) o inóculo simples VPNTn causou uma maior mortalidade das brocas de cana do que o inóculo simples VPNAg.

Constata-se nessa tabela que na inoculação da dose de 5×10^4 cristais/lagarta o VPNTn e o VPNAg produziram respectivamente uma mortalidade de 60% e 26%, ao passo que a combinação desses vírus produziu apenas uma mortalidade de 62.6%,

TABELA XVI - Resposta das lagartas de *D. saccharalis* ao inóculo misto: VPNAg + VPNTn

Experimentos	Número de indivíduos analisados	Dose (cristais/lagarta) VPNAg + VPNTn	Mortalidade corrigida (%)
1	80	5×10^1	2.1
2	80	5×10^4	26.1
3	80	5×10^5	48.0
4	90	5×10^1	9.0
5	100	5×10^4	60.0
6	80	5×10^5	79.0
7	80	$5 \times 10^1 + 5 \times 10^4$	45.0
8	90	$5 \times 10^4 + 5 \times 10^1$	31.1
9	100	$5 \times 10^4 + 5 \times 10^4$	62.6
10	100	$5 \times 10^5 + 5 \times 10^5$	86.0
TOTAL	880		

não atingindo aquela esperada pelo efeito de dose dupla. Da mesma forma, se obteve esses resultados no experimento com a dose conhecida de 5×10^5 cristais/lagarta.

Analisando os experimentos nº 7 e 8 da tabela XVI, verifica-se que ocorreram diferenças nas respostas de mortalidade produzidas pelas variações nas doses desse inóculo misto. Observa-se no experimento nº 7 que na ocasião em que a dose do VPNTn foi mais elevada do que a do VPNAg o inóculo misto resultante da combinação desses dois vírus produziu uma maior mortalidade das lagartas de *D. saccharalis* do que no experimento de nº 8 onde as doses foram invertidas. Como o VPNTn, em uma determinada dose, é responsável por ocasionar uma maior mortalidade das brocas de cana do que o VPNAg, quando associado a este vírus exerce então uma maior patogenicidade nas lagartas de *D. saccharalis*.

Naquela referida tabela nota-se ainda que a resposta de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis* produzida pelo inóculo misto não apresenta o mesmo padrão de linearidade dos inóculos simples.

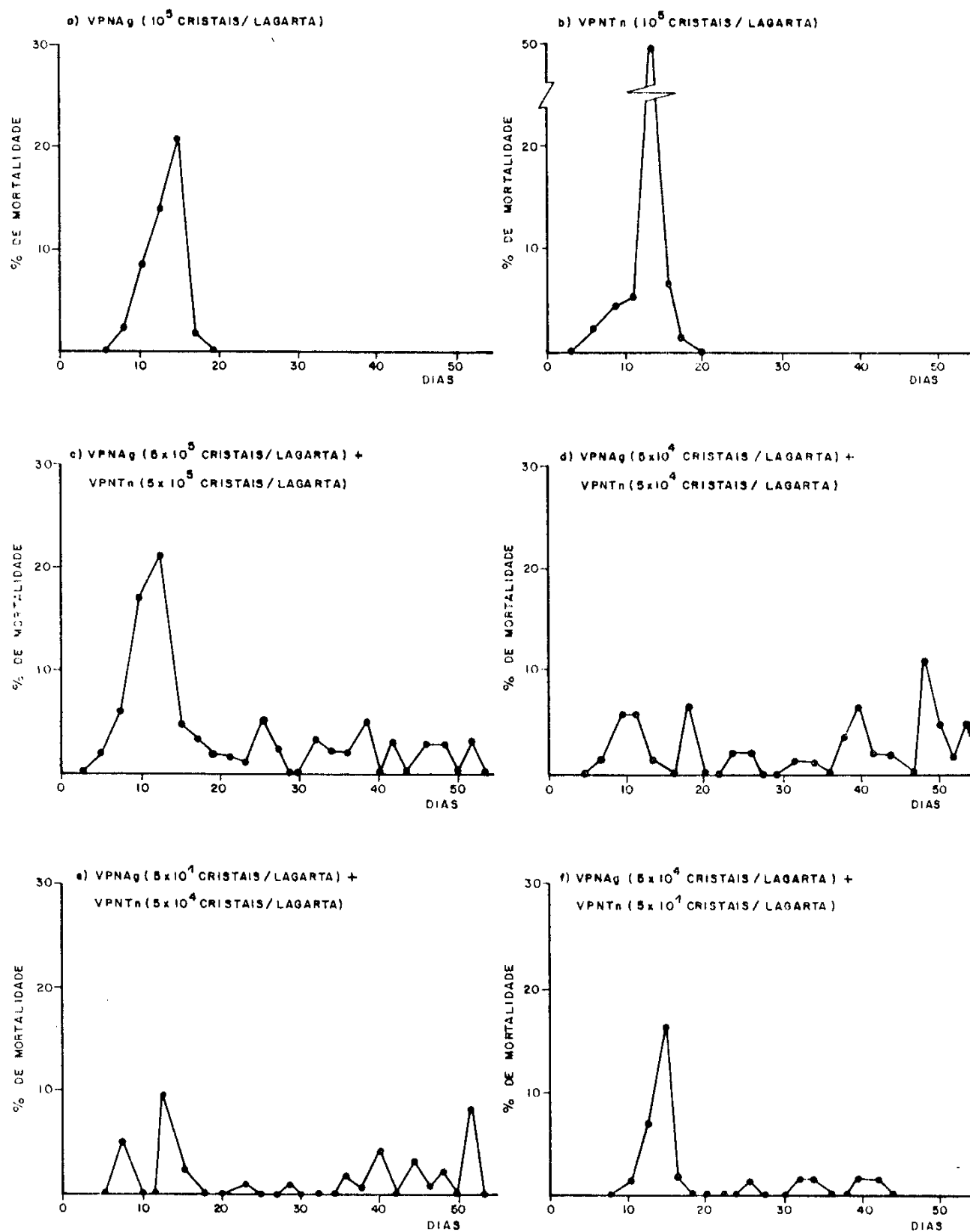
Parece evidente que a inoculação simultânea do VPNAg e VPNTn é menos eficiente do que a inoculação de um deles para um total de 880 lagartas analisadas.

Na figura 5 está evidenciado o processo resultante da interação desses dois vírus.

Analisando o gráfico (a) e (b) da figura 5, nota-se que tanto o inóculo simples VPNAg como o inóculo simples VPNTn mostram picos de mortalidade ao redor de 10 dias.

Verifica-se nos gráficos (c), (d) e (e) que o inóculo misto resultante da combinação desses dois vírus apresenta uma dispersão nos picos de mortalidade por volta de 10 a 50 dias.

FIG. 5 - Porcentagem de mortalidade em função do tempo. Tratamento simultâneo com o Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatilis* (VPNAg) e o Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn).



Na ocasião em que se aplicou uma dose baixa do inó-lo misto nota-se no gráfico (d) em comparação ao gráfico (c) que este exibe um aumento de dispersão dos picos de mortalidade ao longo do tempo.

Quando se inoculou uma dose mais elevada do VPNAg em relação ao VPNTn pode-se observar que o gráfico (f) em comparação ao gráfico (e) apresenta uma menor dispersão dos picos de mortalidade ao longo do tempo apesar de apresentar uma menor mortalidade.

Não se pode afirmar que as lagartas de *D. saccharalis* inoculadas com a mistura de VPNAg e VPNTn desenvolveram os dois tipos de infecção nas células desses insetos uma vez que estes vírus são morfologicamente semelhantes.

5.0 DISCUSSÃO

5.1 Passagens Seriadas

No presente trabalho realizaram-se dez passagens seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de *A. gemmatilis* (VPNAg) e onze passagens seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de *T. ni* (VPNTn) com a finalidade de tentar adaptar esses vírus a um hospedeiro alternativo, *D. saccharalis*. Os resultados desse estudo demonstraram nitidamente que ocorreu um aumento substancial na virulência desses dois vírus submetidos ao processo de passagens seriadas nas brocas de cana.

O aumento de patogenicidade pode ser constatado através dos valores de DL_{50} do VPNAg e do VPNTn que diminuíram gradualmente no decorrer das passagens seriadas de cada um desses patógenos nas lagartas de *D. saccharalis*.

Com efeito, na 1ª passagem seriada do VPNAg o DL_{50} foi de $7,87 \times 10^5$ cristais/lagarta enquanto que na 10ª passagem seriada apenas $6,65 \times 10^3$ ou 6650 cristais/lagarta foram necessários para matar 50% da população das lagartas de *D. saccharalis*.

Já na 1ª passagem seriada do VPNTn o DL_{50} foi de $9,68 \times 10^4$ cristais/lagarta ao passo que na 11ª passagem seriada o DL_{50} , foi reduzido à $1,20 \times 10^2$ ou 120 cristais/lagarta.

Os dados indicam que o VPNAg após ter sido submetido a dez passagens seriadas tornou-se cerca de cem vezes mais virulento para as lagartas de *D. saccharalis* e o VPNTn após onze passagens nesses insetos teve suas virulência aumentada em cerca de oitocentas vezes.

Outros autores também obtiveram VPN mais virulentos após várias passagens seriadas em um hospedeiro alternativo (VEBER, 1962; SMIRNOFF, 1963, SHAPIRO & IGNOFFO, 1970 ; ORLOVSKAYA, 1975; STAIRS e cols, 1981; SHAPIRO e cols, 1982).

Contudo, comparando-se os nossos dados aos resultados desses autores, verifica-se que os aumentos obtidos por esses foram muito inferiores aos observados neste trabalho . Por exemplo, SHAPIRO & IGNOFFO (1970), analisando a atividade de 34 isolados geográficos do Vírus de Poliedrose de *Heliothis* (VPNH) puderam observar que apenas um isolado aumentou em cerca de 80% a sua virulência após várias passagens seriadas em lagartas de *Heliothis zea*. SHAPIRO e cols (1982), verificaram que a virulência do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Orgyia pseudotsugata* (VPNOp) aumentou em cerca de quatro vezes após várias passagens seriadas nas lagartas de *Estigmene acrea*.

Considerando tais pontos pode-se sugerir que o que determina o grau de virulência de um baculovírus submetido ao processo de passagens seriadas em um hospedeiro alternativo são as inter-relações produzidas pelo sistema hospedeiro-patógeno em estudo.

As lagartas de *D. saccharalis* durante o seu desenvolvimento larval se caracterizam por escavar galerias ou túneis no interior dos colmos da cana-de-açúcar, onde são mantidas e protegidas contra patógenos e condições adversas do meio ambiente, de modo que quando expostas a esses patógenos mostram-se pouco resistentes.

O aumento na atividade do VPNAg ou do VPNTn pode ser atribuído ao processo de passagens seriadas que selecionou um isolado mais virulento em uma população heterogênea de isolados. Essa hipótese já vem sendo ventilada por vários autores como VEBER (1962), SHAPIRO & IGNOFFO (1970) e STAIRS e

cols (1981).

Os resultados aqui apresentados não representam o limite das possibilidades de seleção destes vírus mas demonstram claramente seu potencial e a necessidade de continuação destes estudos visando uma melhor compreensão do problema.

Por outro lado, observando as respostas de mortalidade pelos valores de DL e de TL do VPNAg e do VPNTn, nota-se que o VPNTn é mais patogênico e causa mais rapidamente a mortalidade das brocas de cana do que o VPNAg. Desse modo, pode-se dizer que as lagartas de *P. saccharalis* são mais susceptíveis ao VPNTn do que ao VPNAg.

Verificou-se que o isolado do VPNAg submetido a dez passagens seriadas nas lagartas de *P. saccharalis*, quando reinoculado no seu hospedeiro original, *Anticarsia gemmatilis*, não alcançou o grau de patogenicidade mostrado pelo isolado do VPNAg obtido a partir de *A. gemmatilis*. Pode-se sugerir que o processo de passagens seriadas selecionou o isolado mais virulento do VPNAg para *P. saccharalis*, porém esse isolado não apresenta a mesma virulência do isolado original para *A. gemmatilis* e seria de se esperar que um isolado mais eficiente para lagartas de outra família não fosse tão eficiente para o hospedeiro natural. SHAPIRO & IGNOFFO (1970) analisando as diferenças na atividade de 34 isolados geográficos de um mesmo vírus (Vírus de Poliedrose Nuclear de Heliothis - VPNH) verificaram que apenas um isolado aumentou sua virulência em cerca de 80% após várias passagens seriadas nas lagartas de *Heliothis zea*. Esses dados demonstram a importância do uso de altas doses do vírus em estudo, em experimentos de seleção, que se justifica pelo fato de aumentar a possibilidade da presença de formas ou isolados genéticos diferentes.

Já o isolado do VPNTn submetido a onze passagens

seriadas nas brocas de cana, não pôde ser testado contra seu hospedeiro original, *Trichoplusia ni*, devido a falta de material adequado.

No que diz respeito as respostas de mortalidade produzidas pelo VPNAg ou pelo VPNTn, verifica-se a importância de se definir a dose utilizada para uma melhor análise da susceptibilidade do hospedeiro alternativo. Por exemplo, CARNER e cols (1979), relataram que as lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com $2,5 \times 10^6$ cristais/lagarta não eram susceptíveis ao VPNAg. Todavia, PAVAN e cols (1981), demonstraram que essa espécie é susceptível a altas doses do VPNAg como a de $12,5 \times 10^6$ cristais/lagarta.

As Lagartas de *B. saccharalis* foram infectadas por altas doses de VPNAg, mas a susceptibilidade desses piralídeos foi aumentada através do processo de passagens seriadas do VPNAg que se tornou mais eficiente. Em vista disso, verifica-se que é apenas necessário se constatar que o hospedeiro é susceptível ao vírus inoculado para representar uma possibilidade de adaptação por vários métodos.

Torna-se importante ainda determinar o estágio do hospedeiro, visto que autores (SHEPPARD & STAIRS, 1977) notaram diferenças na variabilidade das respostas de mortalidade produzidas por um baculovírus inoculado em diferentes estádios de uma mesma espécie de hospedeiro.

HARPER (1976), mencionou que os vírus que possuem vários virions por corpo de inclusão ou cristal de proteína (MEV) possuem uma maior gama de hospedeiros do que os baculovírus que tem apenas um virion por membrana (SEV). O Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn) e o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (VPNAg) são do tipo (MEV) e fato de serem capazes de se replicar em um hospedeiro

alternativo de uma outra família está de acordo com o sugerido na literatura.

Face aos resultados do presente trabalho pode-se sugerir que os dois baculovírus - VPNAg e VPNTn - são candidatos em potencial A inseticidas biológicos de amplo espectro.

O método de passagem seriada vem demonstrar que os vírus como sistemas biológicos possuem uma capacidade de adaptação e que através desse método pode-se manipular suas características genéticas e que essa manipulação pode ser efetuada em curto prazo já que o ciclo de desenvolvimento destes vírus é da ordem de uma semana.

5.2 Efeitos dos três inóculos mistos nas lagartas de *D. saccharalis*

Os resultados do presente trabalho mostram de modo quantitativo que ocorreu o fenômeno de interferência ou antagonismo nos três tipos de inóculos mistos utilizados. Entre os baculovírus nos quais incluídos os Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) e os Vírus de Granulose (VG) há um número muito reduzido de trabalhos tratando sobre o fenômeno de interferência (RITTER & TANADA, 1978). Na maioria desses trabalhos tal fenômeno não foi estudado quantitativamente levantando assim certas dúvidas se a interferência ou antagonismo realmente se dá entre esses vírus de insetos (LOWE & PASCHKE, 1968a, b).

O fenômeno de interferência ou antagonismo pode ser constatado nesse estudo através das respostas de mortalidade resultante dos inóculos mistos que não foi maior do que essa produzida pela ação de um só vírus nas lagartas de *D. saccharalis*.

Os dados indicam que os inóculos simples foram mais

efetivos do que os inóculos mistos para as lagartas de *D. saccharalis*.

Analisando os resultados observa-se que nas várias doses utilizadas os 3 inóculos mistos mostraram uma oscilação nas respostas de mortalidade não apresentando o mesmo padrão de linearidade que os inóculos simples.

Um dos fatos que se pode observar é que os três vírus não agem igualmente quando associados.

Verifica-se, em qualquer que seja a intensidade da dose que o inóculo de VGDS foi mais virulento do que o inóculo de VPNTn que por sua vez mais virulento do que o inóculo de VPNAg para as lagartas de *D. saccharalis*. Mesmo quando em associação essa ordem de patogenicidade foi mantida de modo que o vírus mais virulento exerceu maior influência na mortalidade das lagartas de *D. saccharalis*.

O fato de ter variado as doses de ambos os vírus de um mesmo inóculo misto permitiu observar que na ocasião em que o vírus mais patogênico foi inoculado em dose mais elevada, o inóculo misto resultante da mistura desses dois vírus ocasionou maior mortalidade das lagartas de *D. saccharalis* do que quando se inoculou em dose maior o vírus menos patogênico.

Tais observações mencionadas acima esclarecem talvez o porque de um mesmo inóculo misto produzir diferentes respostas de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis*.

Esses dados demonstram a importância de se definir as doses e estabelecer a ordem de patogenicidade de ambos os vírus de um mesmo inóculo misto para um determinado hospedeiro.

Por outro lado, um aspecto interessante desse estudo é o que se refere as diferenças de comportamento biológico entre os dois inóculos mistos resultantes da associação de um

VPN e um VG (VPNAg + VGDS e VPNTn + VGDS) e o inóculo misto resultante da associação de dois VPN (VPNAg + VPNTn).

Não obstante o VPNAg e o VPNTn isoladamente inoculados terem exibido picos de mortalidade apenas ao redor de 10 dias, em qualquer que fosse a intensidade da dose, o inóculo misto resultante da mistura desses dois vírus (VPNAg + VPNTn) mostrou uma ostensiva dispersão que se apresentou por volta de 10 a 50 dias.

A interferência entre o VPNAg e o VPNTn é muito nítida nesse caso, uma vez que o inóculo misto em relação aos inóculos simples desses dois respectivos patógenos, além de produzir uma baixa mortalidade das lagartas de *B. saccharalis* também mostrou um aumento substancial no período de mortalidade das brocas de cana.

Já os dois inóculos mistos resultantes da associação de um VPN e um VG (VPNAg + VGDS e VPNTn + VGDS) apresentaram um nítido pico de mortalidade ao redor de 10 dias e picos menores após 20 dias. O primeiro pico pode ser relacionado ao efeito do VPNAg e do VPNTn e os picos de mortalidade após 20 dias ao efeito do VGDS. Desse modo, os dois inóculos mistos mostraram um longo e lento período de mortalidade das brocas de cana graças ao efeito do VGDS que têm ação mais rápida dos dois VPN (VPNAg e VPNTn).

Comparando-se os dois inóculos mistos resultantes da associação de um VPN e um VG (VPNAg + VGDS e VPNTn + VGDS) com o inóculo misto resultante da associação de dois VPN (VPNAg + VPNTn) verifica-se que este inóculo mostra o processo de interferência bem mais acentuado devido ao fato de serem ambos VPN e apresentarem o mesmo tropismo de tecidos (SMITH, 1976).

BIRD (1959), analisando a interferência produzida pe

la inoculação simultânea de um VPN e um VG nas lagartas de *Choristoneura fumiferana*, concluiu que o VPN de ação mais rápida pode evitar a infecção do VG de ação mais lenta naqueles insetos.

Os resultados demonstram que tal inferência não foi observada para os dois inóculos mistos (VPNAg + VGDS e VPNTb + VGDS) utilizados no presente trabalho, pois, embora o VGDS quando isoladamente inoculado tenha produzido maior mortalidade das brocas de cana, a infecção produzida por esse vírus quando associado ao VPNAg ou ao VPNTn não foi evitada.

TANADA (1956), estudando os efeitos da inoculação simultânea de um VPN e um VG, constatou uma associação sinérgica entre esses vírus nas lagartas de *Pseudaletia unipuncta*. E estudos posteriores de TANADA & HUKUHARA (1971), confirmaram que o VG era sinérgico ou era responsável por aumentar a infecção quando associado a um VPN.

Todavia, ao contrário do observado por aqueles autores, todas as evidências mencionadas acima demonstram claramente que o VG (VGDS) não aumentou a infecção do VPN quando associado a esse vírus nos dois inóculos mistos resultantes da associação de um VPN e um VG (VPNAg + VGDS e VPNTn + VGDS) ministrados as lagartas de *D. saccharalis*.

Muitos outros trabalhos em consonância com os resultados desse estudo não constataram aumento de infecção do VPN quando associado ao VG no mesmo inóculo misto (BIRD, 1959; SHVETSOVA & TS'AI 1962; LOWE & PASCHKE, 1968a, b; HUKUHARA e cols, 1969; WHITLOCK, 1977).

TANADA & HUKUHARA (1971) demonstraram que não ocorre uma associação sinérgica entre o VPN e o VG quando esse vírus não é dotado de fator de aumento em sua cápsula e consequentemente o aumento de infecção de um vírus por outro vírus

de inseto não é um fenômeno comum. WHITLOCK (1977), valendo -
-se dessa alegação sugeriu que os vírus que não possuem fator
sinérgico não deveriam ser utilizados em inóculos para
fins práticos.

De fato, considerando que os baculovírus são empregados atualmente no controle biológico de determinadas pragas de cultura, deve-se atentar para o risco de uma possível contaminação de um inseticida biológico a base de um desses patógenos por outro vírus de inseto, que poderia causar problemas na interpretação dos dados obtidos nos experimentos realizados no campo.

Quanto a interferência ou antagonismo entre os vírus de inseto, não se conhece bem até o presente momento os efeitos produzidos por esse processo, WHITLOCK (1977), propôs que tal fenômeno poderia ser ocasionado por um fator de interferência presente em um ou em ambos os vírus de um mesmo inóculo misto.

No entanto, outros estudos quantitativos deveriam ser realizados com o propósito de verificar os mecanismos que atuam na interferência ou antagonismo produzidos por determinados baculovírus.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Neste estudo verificaram-se os efeitos de passagens seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (VPNAg) e do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn) sobre o hospedeiro alternativo, *Diatraea saccharalis*, uma das principais pragas da cana-de-açúcar em toda a América. Para cada um desses experimentos foram analisadas individualmente mais de 5000 lagartas de *D. saccharalis*.

Pode-se observar através dos valores de DL_{50} que ocorreu um aumento substancial na virulência destes dois baculovírus após terem sido submetidos ao processo de passagem seriada nas brocas de cana.

Na 1ª passagem seriada do VPNAg o valor de DL_{50} foi de $7,87 \times 10^5$ cristais/lagarta enquanto que na 10ª passagem esse valor foi reduzido a $6,65 \times 10^3$ cristais/lagarta mostrando que o vírus após ter sido submetido a dez passagens seriadas tornou-se cerca de cem vezes mais virulento para esses insetos.

O VPNTn apresentou na 1ª passagem seriada o valor de DL_{50} de $9,68 \times 10^4$ cristais/lagarta ao passo que na 11ª passagem seriada o valor de DL_{50} foi reduzido a $1,20 \times 10^2$ cristais/lagarta. Após onze passagens seriadas o VPNTn teve sua virulência aumentada em cerca de oitocentas vezes para as lagartas de *D. saccharalis*.

Verificou-se que o isolado do VPNAg adaptado ao novo hospedeiro exibiu uma redução da virulência no hospedeiro original, *Anticarsia gemmatilis*.

Os resultados do presente trabalho não representam o limite das possibilidades de seleção desses vírus

(VPNAg e VPNTn) mas demonstraram claramente seu potencial e a necessidade de continuação destes estudos visando uma melhor compreensão do problema.

O VPNAg e o VPNTn melhoraram significativamente a sua eficiência através do método de passagem seriada que além de ser um método simples apresenta um baixo custo.

Por outro lado, verificou-se ainda nesse trabalho o efeito da inoculação do Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) associado aos dois VPN acima referidos. Foram utilizados três tipos de inóculos mistos: 1) VPNAg + VPNAg 2) VPNAg + VGDs e 3) VPNTn + VGDs nas lagartas de *D. saccharalis*. Para esses experimentos foram usadas mais de 3500 lagartas de *D. saccharalis*.

Observou-se que apesar do VPNAg e do VPNTn isoladamente inoculados terem exibidos picos de mortalidade ao redor de 10 dias, o inóculo misto resultante da mistura desses dois vírus (VPNAg + VPNTn) mostrou uma nítida dispersão por volta de 10 a 50 dias.

Os dois inóculos mistos resultantes da associação de um VPN e um VG (VPNAg + VGDs e VPNTn + VGDs) apresentaram um nítido pico de mortalidade ao redor de 10 dias e picos menores após 20 dias, com picos principais em torno de 30 e 40 dias. O primeiro pico pode ser relacionado ao efeito do VPNAg e do VPNTn e os picos de mortalidade após 20 dias ao efeito do VGDs.

Pode-se observar que o inóculo de VGDs foi mais virulento do que o inóculo de VPNTn que por sua vez foi mais virulento do que o inóculo de VPNAg para as lagartas de *D. saccharalis* e verificou-se que o mesmo quando em associação essa ordem de patogenicidade foi mantida.

Os resultados desse estudo demonstraram de modo

quantitativo que ocorreu o fenômeno de interferência ou antagonismo nos três tipos de inóculos mistos, visto que, nas várias doses utilizadas, a resposta de mortalidade resultante dos inóculos mistos não foi maior do que essa produzida pela ação de um só vírus nas lagartas de *D. saccharalis*. Esses dados mostram que o VPNAg, VPNTn e o VGDS não podem ser consorciados em um mesmo inóculo misto para fins práticos.

De modo geral observamos que os Baculovírus aqui analisados podem ser manipulados geneticamente e que ao serem associados há uma interferência recíproca como se estivessem competindo por mesmos tecidos e recursos no inseto. Essa interferência indicaria uma homologia de sistemas que se manifesta com vírus diferentes e procedentes de hospedeiros de famílias diferentes.

Podemos concluir que nossos dados sugerem haver uma homologia muito grande nesse grupo de vírus de insetos e que através de métodos relativamente simples tais como de passagem seriada podemos manipular geneticamente estes importantes patógenos.

SUMMARY

The effects of serial passages of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Anticarsia gemmatilis* (AgNPV) and the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Trichoplusia ni* (TnNPV) through the alternate host, *Diatraea saccharalis*, one of the main pests of sugar cane throughout America, was studied.

For each of these experiments more than 5000 larvae of *D. saccharalis* were individually analysed.

It was noted through the reduction of DL_{50} values that a substantial increase in the virulence of these two baculovirus occurred after being submitted to serial passages through the *D. saccharalis*.

On the first serial passage of the AgNPV the LD_{50} value was $7,87 \times 10^5$ PIBs/larva whereas on the tenth passage that value was reduced to $6,65 \times 10^3$ PIBs/larva showing that the virus became about one hundred times more virulent to these insects after being submitted to ten serial passages.

The TnNPV presented in the first serial passage the LD_{50} value of $9,68 \times 10^4$ PIBs/larva whereas in the eleventh serial passage this value was reduced to $1,20 \times 10^2$ PIBs/larva. Thus, after eleven serial passages the TnNPV had its virulence increased about eight hundred times when compared to the original isolate.

It was noted that the isolate of the AgNPV adapted to the new host exhibited a reduction of its virulence to the original host, *Anticarsia gemmatilis*. The isolate of the TnNPV was not tested against its original host, *Trichoplusia ni*.

The results of the present work do not represent

the limit of possibilities of selection of these virus (AgNPV and TnNPV), in fact they gave clear evidence of their potential and of the necessity of continuation of these studies aiming a better comprehension of the subject.

The AgNPV and the TnNPV had an expressive improvement of its efficiency by the serial passage method, which represents a simple and low cost method.

A study of the effect of the inoculation of the Granulosis Virus of *Diatraea saccharalis* (DsGV) associated to both NPV above mentioned was also object of this work. Three types of mixed inocula were used: 1) AgNPV + TnNPV 2) AgNPV + DsGV and 3) TnNPV + DsGV on *D. saccharalis* larvae. For these experiments more than 3500 larvae of *D. saccharalis* were individually analysed.

It was observed that, when individually inoculated AgNPV and TnNPV exhibited peaks at around 10 days after ingestion. The inoculum resulting from association of these two viruses (AgNPV + TnNPV) showed a clear dispersion of these peaks from 10 to 50 days after the inoculation.

The two mixed inocula resulting from the association of one NPV and one GV (AgNPV + DsGV and TnNPV + DsGV) presented a clear mortality peak at around 10 days, and other peaks after 20 days with main peaks present at around 30 and 40 days after inoculation. The first mortality peak can be related to the effect of the AgNPV and TnNPV, and the peaks after 20 days of inoculation to the effect of DsGV.

It was observed that the DsGV is more virulent than TnNPV which, in turn, is more virulent to the larvae of *D. saccharalis* than the AgNPV; and it was verified that even when in association this pathogenicity order was maintained.

The results of this study demonstrated in a quantitative manner that the interference or antagonism phenomenon occurred in the three types of mixed inocula. For the various combinations of virus and dosagens the resulting mortality response from the associated virus was not higher than that produced on the larvae of *D. saccharalis* from the action of a single virus. This demonstrates that for practical purposes the AgNPV, TnNPV and the DsGV should not be associated for this type of pest control.

Our results showed that the baculovirus here analysed can be genetically manipulated and once associated they show a reciprocal interference as if they were competing for the same tissues and resources of the insect. This interference indicates a homology of systems manifesting in different viruses originated from hosts coming from different Families.

In conclusion, our data suggest the existence of great homology in this insect virus group, and that probably due to this fact we can genetically manipulate these important pathogens through relatively simple methods.

8.0 BIBLIOGRAFIA

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Ent.*, 18: 265-7, 1925.

AIZAWA, K. Change in the shape of silkworm polyhedra by means of passage through chick embryo. *Entomophaga*, 3: 197-201, 1961.

— — — — — Selection and strain improvement of insect pathogenic microorganisms for microbial control. *Jap. Int. Biol. Prog.*, 7: 99-105, 1975.

ALLEN, G.E. & KNELL, J.D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatilis*: Ultrastructure, replication and pathogenicity. *Fla Ent.*, 60: 233-40, 1977.

ALMEIDA, L.C.; DEGASPARI, N.; PAVAN, O.H.O.; BOTELHO, P.S.M. & COLETI, J.T. Vírus de Granulose da broca de cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr.): avaliação de um bioinseticida em potencial. *III Congresso da STAB*, 1984 (no prelo).

AMARGIER, A.; MEYNADIER, G. & VAGO, C. Un complexe de viroses: polyhedrie nucleaire et denonuclease chez le lepidoptère, *Galleria mellonella*. *Mikroskopie*, 23: 245-51, 1968.

ARUGA, H.; HUKUHARA, T.; YOSHITAKE, N. & AYUDHYA, I.N. Interference and latent infection in the cytoplasmic polyhedrosis of the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus).

- Induction of virus infection. In: Steinhaus, E.A., ed. *Insect Pathology and Advanced Treatise*. New York, Academic, 1963, p. 499-530.
- ; YOSHITAKE, N. & WATANABE, H. Interference between cytoplasmic polyhedrosis viruses in *Bombyx mori*. *J. Insect Pathol.*, 5: 1-10, 1963a.
- ; HUKUHARA, T.; FUKUDA, S. & HASHIMOTO, Y. Interference between cytoplasmic polyhedrosis viruses of the silkworm *Bombyx mori*, and of pine caterpillar *Dendrolimus spectabilis*, *J. Insect Pathol.*, 5: 415-21, 1963b.
- ; YOSHITAKE, N. Interaction between cytoplasmic polyhedrosis viruses in *Bombyx mori* (Linnaeus) under certain condition. *J. serie. Sci.*, 33: 345-52, 1964.
- BENTON, C.V.; REICHELDERFER, C.F. & HETRICK, F.M. Differentiation of *Trichoplusia ni* (MEV) and *Autographa californica* (MEV) by macrophage migration inhibition tests. *J. invertebr. Pathol.*, 22: 42-9, 1973.
- BERGOLD, G.H. Über die Kapselvirus Krankheit. *Z. Naturf.*, 3: 338-42, 1948.
- Viruses of Insects. In: Hallauer, C. and Meyer, K.F., eds. *Handbuch der Virus for chung*. Viena, Springer, 1958. v.4, p.60-142.

BIRD, F.T. Polyhedrosis and granulosis viruses causing single and double infection in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clemens). *J. Insect Pathol.*, 1: 406-30, 1959.

BLISS, C.I. The calculation of the dosage mortality curve. *Ann. appl. Biol.*, 22: 134-67, 1935a.

— — — — — The comparison of dosage mortality data. *Ann. appl. Biol.*, 22: 307-33, 1935b.

BOLETIM TÉCNICO PLANALSUCAR Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região Centro Sul do Brasil. 3: (6), 1-16, 1981.

BROWN, M., CRAWFORD, A.M. & FAULKNER, P. Genetic analysis of a Baculovirus, *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis. *J. Virol.*, 31: 190-8, 1979.

BURAND, P.J. & SUMMERS, M.D. Alteration of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus DNA upon serial passage in cell culture. *Virology*, 119: 223-9, 1982.

BURGERJON, A. Use of specificity difference indices for the identification of nuclear polyhedrosis viruses (Baculovirus) of insects. *Entomophaga*, 22: 187-92, 1977.

CARNER, G.E. & TURNIPSEED, S.G. Potential of a nucleopolyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *J. econ. Ent.*, 70: 608-10, 1977.

Pathol., 18: 299-300, 1970.

- DAVID, W.A.L.; HUDSON, J.S. & BARNET, O.W. The infectivity of a nuclear polyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar for eight Noctuidae hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 33: 211-16, 1979.
- DETELMO, P.S.M. & MACEDO, N. Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região
- CIBULSKY, R.J.; HARPER, J.D. & GUDAUSKAS, R.T. Biochemical comparison of polyhedral protein from five NPVs infecting Plusiinae larvae (Lepidoptera; Noctuida). *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 182-91, 1977. *Microbiologia. In: Davis, B. D. et alii, eds. 1980, v.3.*
- CONSIGLI, R.A.; TWEETEN, K.A.; ANDERSON, D.K. & BULLA, L.A. Granulosis Viruses, with emphasis on the GV of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Adv. Virus. Res.*, 28: 141-169, 1983. *he Virol.*, 58: 169-76, 1977.
- CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. & GATTI, I.H. Ocorrência de poliedrose nuclear em *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818, na região Sul do Brasil. *Anais Soc. Ent. Bras.*, 6: 312-4, 1977. 1972.
- CROIZIER, G. Substitution of viral types during Baculovirus infections in lepidoptera. *A. Mtg. Soc. Invert. Pathol.*, Prague, 41-2, 1978. *in Madrid. Virology*, 71: 371-8 1976.
- ____ & VAGO, C. Considérations sur l'extension actuelle et la diversification du groupe des Baculovirus. *Entomophaga*, 23: 3-8, 1978.
- CUNNINGHAM, J.C. Strains of nuclear polyhedrosis viruses displaying different inclusion body shapes. *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 299-300, 1970. *irasant de Tipule (TIV) C. et Acad. Sci., Paris*, 276: 507-9, 1972.

DAVID, W.A.L. The status of viruses pathogenic for insect and mites. *in* *A. Rev. Entomol.*, 20: 97-117, 1975.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P.S.M. & MACEDO, N. Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região Centro Sul do Brasil. *Bol. Tec. IAA/PLANALSUCAR*, 3: 1-16, 1981.

DULBEGO, R. & GINSBERG, S.H. Microbiologia. *In*: Davis, B. D. et alii, eds. 1980, v.3.

FALCON, L.A. & HESS, R.T. Electron microscope observations of the membrane surrounding polyhedral inclusion bodies of insects. *Archs Virol.*, 56: 169-76, 1977.

FAULKNER, P. & HENDERSON, J.F. Serial passage of a nuclear polyhedrosis disease virus of the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) in a continuous tissue culture cell line. *Virology*, 50: 920-4, 1972.

FENNER, F. The classification and nomenclature of viruses : Summary of Meetings of the International Committee on Taxonomy of viruses in Madrid. *Virology*, 71: 371-8, 1976.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. Cambridge University, London, 1947.

GARZON, S. & KURSTAK, E. Infection double inhabituelle de cellules d'un arthropode par le virus de la polyhédrie nucléaire (VPN) et le virus irisant de Tipule (TIV). *C. r. Acad. Sci.*, Paris, 275: 507-9, 1972.

- GATTI, I.M.; SILVA, D.M. & CORSO, I.C. Polyhedrosis occurrence in caterpillars of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) in the south of Brazil. *Infect. Dis.*, 5: 136, 1977.
- GERSHENZON, S.M. On the species specificity of viruses of the polyhedral disease of insects. *Mikrobiologiya*, 24: 90-8, 1955a. *Pathol.*
- On the nature of intranuclear inclusions of the polyhedral disease of insects. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 104: 925-8, 1955b.
- The mechanism of infection of cells with polyhedral viruses in the light of observations on the size and shape of polyhedra. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 109: 1191-201, 1956.
- Mutation of polyhedrosis viruses. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 128: 1959.
- A study on a mutant strain of nuclear polyhedrosis virus of oak silkworm. *Probl. Virol SSSR*, 6: 720-5, 1960.
- GRACE, T.D.C. The development of a cytoplasmic polyhedrosis in insect cells grown in vitro. *Virology*, 18: 33-42, 1962.
- GRANADOS, R.R. Infectivity and mode of action of Baculoviruses. *Biotechnol. Bioeng.*, 22: 1377-405, 1980.

- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C. & DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *J. econ. Entomol.*, 69: 487-488, 1976.
- HARPER, J.D. Cross-infectivity of six plusiine nuclear polyhedrosis virus isolates to plusiine hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 27: 275-7, 1976.
- HARRAP, K.A. The structure of nuclear polyhedrosis viruses: The inclusion body. *Virology*, 50: 114-23, 1972a.
- — — — — The structure of a nuclear polyhedrosis viruses: The virus particle. *Virology*, 50: 124-32, 1972b.
- HEIMPEL, A.M. & ADAMS, J.R. A new polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 340-6, 1966.
- HENSLEY, S.D. & HAMMOND, J.R.A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. econ. Entomol.*, 61: 1742-4, 1968.
- HESS, R.T. & FALCON, L.A. Electron microscope observations of the membrane surrounding polyhedral inclusion bodies of insects. *Archs Virol.*, 56: 169-76, 1978.
- — — — —; SUMMERS, M.D. & FALCON, L.A. A mixed virus infection midgut cells of *Autographa californica* and *Trichoplusia ni* larvae. *J. Ultrastruct. Res.*, 65: 253-65, 1978.

- HIRUMI, H.; HIRUMI, K. & MC INTOSH, A.H. Morphogenesis of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper cell line. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 266: 302-26, 1975.
- HUGHES, K.M. Notes on the nuclear polyhedrosis viruses of tussock moths of the genus *Orgyia* (Lepidoptera). *Can. Entomol.*, 108: 479-84, 1976.
- HUKUHARA, T.; ARUGA, H. & KOBAYASHI, M. On the granulosis of *Hyphantria cunea* Drury. *Jap. J. appl. Ent. Zool.*, 13: 1-4, 1969.
- HUNTER, D.K.; HOFFMAN, D.F. & COLLIER, S.J. Crossinfection of a nuclear polyhedrosis virus of the almond moth to the Indian meal moth. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 186-92, 1973.
- HURPIN, B. La lutte microbiologique contre les insectes ravageurs en agriculture. *A. Zool. Ecol. Anim.*, 2: 639-52, 1970.
- IGNOFFO, C.M. Specificity of insect viruses. *Bull. ent. Soc. Am.*, 14: 265-8, 1968.
- ; HOSTETTER, D.L. & SHAPIRO, M. Efficacy of insect viruses propagated in vivo and in vivo. *J. Invertebr. Pathol.*, 24: 184-7, 1974.
- JURKOVICOVA, M. Activation of latent virus infections in larvae of *Adoxophyes orana* and *Barathra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by foreign polyhera. *J. Invertebr. Pathol.*, 34: 213-23, 1979.

- KELLY, D.C. & LESCOTT, T. Baculovirus replication: protein synthesis in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *Microbiologia*, 4: 35-57, 1981.
- KIMURA, M. & MC INTOSH, A.H. Invertebrate tissue culture. In: Kurstak, E. and Maramorosch, K., 1976, 391p.
- KNUDSON, D.L. & BUCLEY, M.S. Invertebrate cell culture methods for the study of invertebrate associated animal viruses. *Meth. Virol.*, 6: 323-91, 1977.
- KURSTAK, E.; GARZON, D. & ONJI, P.A. Réplication simultanée de deux virus à DNA, microscopie à fluorescence et électronique. *Arch. gén. Virologie*, 60: 324-34, 1972.
- — — — —; — — — — — Multiple infections of invertebrate cells by viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 268: 232-40, 1975.
- LEE, H.H. & MILLER, L.K. Isolation, complementation and initial characterization of temperature sensitive mutants of the Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Virol.*, 31: 240-52, 1979.
- LONGWORTH, J.F. & CUNNINGHAM, J.C. The activation of occult nuclear polyhedra. *J. Invertebr. Pathol.*, 10: 361-7, 1968.
- LOWE, R.E. & PASCHKE, J.D. Simultaneous infection with the nucleopolyhedrosis and granulosis viruses of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 86-92, 1968a.

_____ & _____ Pathology of a double
infection of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 12:
438-43, 1968b.

MACKINNON, E.A.; HENDERSON, J.F.; STOLTZ, D.B. & FAULKNER ,
P. Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under
conditions of prolonged passage in vitro. *J. Ultrastruct.
Res.*, 49: 419-35, 1974.

MALEKI-MILANI, H. Influence de passage répétés du virus de
la polyhedrose nucléaire de *Autographa californica* chez
Spodoptera littoralis (Lepidoptere : Noctuidae) .
Entomophaga, 23: 217-24, 1978.

MILLER, L.K. & DAWES, K.P. Restriction endonuclease analysis
to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis
viruses: *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni*
MNPV. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 1206-10, 1978.

MOSCARDI, F. & CORSO, I.C. Ação de Baculovirus anticarsia
sobre a lagarta da soja, (*Anticarsia gemmatilis*), Hubner ,
1818, e outros lepidópteros. In: *Seminário Nacional de
Pesquisa de soja*, 2, Brasília, DF, 1981, p. 51-7, *Anais* .
Londrina, EMBRAPA/CNPS.

ODIER, F. Recherches sur les interactions et les complexes
de maladies à des viroses de type denonucléase chez les
lépidoptères. Thèse. Univ. Montpellier, 1974, 257p.

_____ Les complexes de viroses: entités pathologiques
transmissibles chez les invertébrés. *C. r. Acad. Sci.* ,
Paris, 280: 2227-80, 1975.

— — — — — · Mise en évidence et étude d'un complexe de
maladies à Parvovirus, Baculovirus et Iridovirus .
Entomophaga, 22: 397-404, 1977.

ORLOVSKAYA, E.V. Adaptation des virus de la polyhedrose
nucléaire à d'autres hôtes étrangers. *Trudy Vses.
Nauch. Issled Inst. Zashch. Rast.*, 42: 45-54, 1975.

PAVAN, O.H.O. & BOUCIAS, D.G. Vírus de Poliedrose Nuclear
de *Anticarsia gemmatilis*: métodos de inoculação e especifici-
dade. In: Seminário Nacional de Pesquisa de soja, 2 ,
Brasília, DF, 1981, *Anais*. Londrina, EMBRAPA/CNPS, p.
191-7.

— — — — — ; — — — — — & PENDLAND, J.C. The
effects of serial passage of a nucleopolyhedrosis virus
through an alternate host system. *Entomophaga*, 26: 99-
-108, 1981.

— — — — — O Vírus de Granulose de *Diatraea sacchara-
lis* Fabricius (broca de cana-de-açúcar). *Saccharum*, 25:
27-9, 1983.

— — — — — ; BOUCIAS, D.G.; ALMEIDA, L.C.; GASPAR, J.O. ;
BOTELHO, P.S.M. & DEGASPARI, N. A Granulosis Virus of
Diatraea saccharalis Fabr. I. Pathogenicity, Replication
and Ultrastructure. In: *International Congress ISSCT* ,
18. Cuba, 1983, v.2, p.644-59.

PONSEN, M.B.; HENSTRA, S. & VANDERSCHEER, C. Electron
microscope observations on nuclear polyhedra from
Malacossoma neustria. *Neth. J. Pl. Pathol.*, 70: 101-4 ,

— — — — —; — — — — —; — — — — — Electron
microscope observations of membranes nuclear polyhedral
viruses. *Neth. J. Pl. Pathol.*, 71: 20-4, 1965.

RITTER, S.K. & TANADA, Y. Interference between two nuclear
polyhedrosis viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*
(Lep: Noctuidae). *Entomophaga*, 23: 349-59, 1978.

SCOTT, H.A.; YOUNG, S.Y. & MC MASTERS, J.A. Isolation and
some properties of components of nuclear polyhedrosis from
the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*,
18: 177-82, 1971.

SHAPIRO, M. & IGNOFFO, C.M. Nucleopolyhedrosis of *Heliothis*.
Activity of isolates from *Heliothis zea*. *J. Invertebr.*
Pathol., 16: 107-11, 1970.

— — — — —; MARTIGNONI, M.E. & CUNNINGHAM, J.C. Potential
use of the saltmarsh caterpillar as a production host for
Nucleopolyhedrosis viruses. *J. Econ. Ent.*, 75: 69-71,
1982.

SHEPPARD, F.R. & STAIRS, R.G. Dosage-Mortality and Time-
Mortality studies of a Granulosis Virus in a Laboratory
strain of the codling moth, *Carpocapsa pomonella*. *J.*
Invertebr. Pathol., 29: 216-21, 1977.

SHVETSOVA, O.I. & TS'AI, A. Virus disease of *Agrotis*
segetum Schiffond and *Hadena sordida* Bkth (Lepidoptera,
Noctuidae) under conditions of simultaneous infection
with granulosis and polyhedral disease. *Ent. Rev.*, 41:
486-9, 1962.

- SINGH, S.P.; GUDAUSKAS, R.T. & HARPER, J.D. Serological comparison of polyedron protein and virions from four nuclear polyhedrosis viruses of Plusiine larva (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 33: 19-30, 1979.
- SMIRNOFF, W.A. Adaptation of a nuclear polyhedrosis virus of *Trichiocampus viminalis* Fallen to larvae of *Trichiocampus irregularis* Dyar. *J. Insect Pathol.*, 6: 104-10, 1963.
- SMITH, K.M. & RIVERS, C.F. Some viruses affecting insects of economic importance. *Parasitology*, 46: 235-42, 1956.
- — — — — The cytoplasmic virus disease. In: Steinhaus, E.A., ed. *Insect Pathology, an Advanced Treatise*. New York, Academic, 1963, v.1, p.457-97.
- — — — — Virus disease of arthropods. In: Steinhaus, E.A., ed. *Plant Virology*. Gainesville, Univ. of Florida, Pr. 1964, p. 430-56.
- — — — — Insect Pathogenic Viruses. In: Maramorosch, K. and Koprowski, E.A. eds. *Methods in Virology*. New York, Academic, 1967, p. 411-47.
- — — — — Virus insect relationship. Londres, Logman, 1976, 291p.
- SOHI, S.S. & CUNNINGHAM, J.C. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in serially transferred insect hemocyte cultures. *J. Invertebr. Pathol.*, 19: 51-61, 1972.

STAIRS, G.R. Selection of a strain of insect granulosis virus producing inclusion bodies. *Virology*, 24: 520-1, 1964.

____ & LYNN, D.E. Infection of the hickory tussock moth, *Halisidota caryae*, by a nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* grown in *Trichoplusia ni* cells cultures. *J. Invertebr. Pathol.*, 24: 376-7, 1974.

____; FRASER, T. & FRASER, M. Changes in growth and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from *Choristoneura fumiferana* after passage in *Trichoplusia ni* and *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 32: 230-5, 1981.

STEINHAUS, E.A. Stress as a factor in insect disease. In: *Congr. Entomol.* 10, Montreal, 1958, v. 4, p. 725-30.

____ The duration of viability and infectivity of certain insect pathogens. *J. Insect Pathol.*, 2: 225-9, 1960.

____ & MARSH, G.A. Report of diagnosis of diseased insects. *Hilgardia*, 33: 349-90, 1962.

____ The nature of Infections caused by Nuclear-Polyhedrosis Viruses. In: Steinhaus, E.A., ed. III *Insect Pathology: An Advanced Treatise*. New York, Academic, 1963, v. 1.

SUMMERS, M.D. & ARNOTT, H.J. Ultrastructural studies on inclusion formation and virus occlusion in nuclear polyhedrosis and granulosis virus infected cells of *Trichoplusia ni* Hubner. *J. Ultrastruct. Res.*, 28: 462-480, 1969.

— — — — — & ANDERSON, D.L. Characterization of deoxyribonucleic acid, isolated from granulosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* Hubner and the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Virology*, 50: 459, 71, 1972.

— — — — — & — — — — — Characterization of nuclear polyhedrosis virus DNAs. *J. Virology*, 12: 1336-46, 1973.

— — — — —; ENGLER, R.; FALCON, L.A. & VALL, P. Baculovirus for insect pest control: safety considerations. *Am. Soc. Microbiol.*, 186p, 1975.

— — — — — Deoxyribonucleic acids of baculoviruses. In: Romberger, J.A., ed., *Virology in Agriculture*, N.J., 1977, p. 233-46.

— — — — —; SMITH, E.G.; KNELL, J.D. & BURAND, P.J. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* Nuclear Polyhedrosis Virus Recombinants. *J. Virol.*, 34: 693-703, 1980.

TANADA, Y. Some factors affecting the susceptibility of the armyworm to virus infections. *J. econ. Ent.*, 49: 52-7, 1956.

- — — — — Synergism between two viruses of the
armyworm *Pseudaletia unipuncta* Haworth (Lepidoptera :
Noctuidae). *J. Insect Pathol.*, 1: 215-31, 1959.
- — — — — & CHANG, G.Y. Interactions of to
cytoplasmic polyhedrosis viruses in three insect species.
J. Insect Pathol., 6: 500-16, 1964.
- — — — — Microbial Pesticides. In: Kilgore, W.W.
& Doutt, R.H., eds. III. *Pest Control Biological, Physical
and Selected Chemical Methods*. New York, Academic, 1967,
p.31-8.
- — — — — The roles of viruses in the regulation of
the population of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*
Haworth. In: *Japan Seminar on Microbial Control of Insect
Pests*, Fukuda, 1968, p.25-31.
- — — — — & HUKUHARA, T. A non synergistic strain of
a granulosis virus of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*
Haworth. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 263-8, 1968.
- — — — —; — — — — — & CHANG, G.Y. A strain of
a nuclear polyhedrosis causing extensive cellular
hypertrophy. *J. Invertebr. Pathol.*, 13: 394-409, 1969.
- — — — — Interactions of insect viruses, with
special emphasis on interference. In: Aruga, H. & Tanada,
Y., eds., *Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses of the silkworm*,
Tokyo, Tokyo Univ., Pr., 1971, p. 185-200.

- — — — — & HUKUHARA, T. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 116-26, 1971.
- — — — — & WATANABE, H. Disc eletrophoretic and serological studies of the capsule proteins obtained from two strains of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 307-12, 1971.
- — — — —; HIMENO, M. & OMI, E.M. Isolation of a factor from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear polyhedrosis virus of the armyworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 21: 31-40, 1973.
- — — — — & HARA, S. Enzyme synergistic for insect viruses. *Nature*, 328-9, 1975.
- — — — — Ecology of insect viruses. In: Anderson, J.F. & Kaya, H.K., eds, *Perspectives in forest entomology*, New York, Academic, 1976, p.265-85.
- TANAKA, S. & ARUGA, H. Interference between the midgut nuclear polyhedrosis viruses and the cytoplasmic polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* (Linnaeus). *J. seric. Sci.*, 36: 169-76, 1967.
- TARASEVICH, L.M.; KOZHUKHAROVA, M.I.; OBHODOVA, T.A. On the influence of alien virus on specific viral infections of insect-host. *Izv. Akad. Nauk SSSR*, 1: 125-31, 1977.

TOMPKINS, J.G.; VAUGHN, J.L.; ADAMS, J.R. & REICHELDERFER, C.P. Effects of propagating *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and its *Trichoplusia ni* variant in different hosts. *Envir. Ent.*, 10: 801-6, 1981.

TREVAN, J.W. The error of determination of toxicity. *Proc. R. Soc.*, 101: 433-514, 1927.

TWEETEN, A.K.; BULLA, A.L. & CONSIGLI, R.A. Restriction enzyme analysis of the genomes of *Plodia interpunctella* and *Pieris rapae* Granulosis viruses. *Virology*, 104: 514-19, 1980.

VAGO, C. Phénomènes de lantentia dans une maladie à ultravirus d'insectes. *Rev. Can. Biol.*, 10: 299-309, 1951.

— — — — — L'enchaînement des maladies chez les insectes. *Annls. Epiphyt.*, 181 p, 1956.

— — — — — Predispositions and interrelations in insect disease. In: Steinhaus, E.A., ed, *Insect Pathology, an Advanced Treatise*, New York, Academic, 1965, v.1, p. 339-79.

VAIL, P.V.; HENNEBERRY, T.J.; KISHABA, A.N. & ARAKAWA, K.I. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr., Pathol.*, 10: 84-93, 1968.

- _____; JAY, D.L. & HUNTER, D.K. Crossinfectivity of a nuclear polyhedrosis virus isolated from the alfalfa looper, *Autographa californica*. In: *International Colloquium on Insect Pathology*, Maryland, Park College, 1970.
- _____; SUTTER, G.; JAY, D.L. & GOUGH, D. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper and alfalfa looper. *J. Invertebr. Pathol.*, 17: 383-8, 1971.
- _____ & JAY, D.L. Pathology of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 21: 198-204, 1973.
- _____; _____ & HINK, W.F. Replication and infectivity of the nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper, *Autographa californica* produced in cells grown in vitro. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 231-7, 1973.
- VEBER, J. Virulence of an insect virus increased by repeated passages. *Colloq. Int. Pathol. Insect*, 2, Paris, 403-5, 1962.
- VOLKMAN, L.E.; SUMMERS, M.D. & HSIEH-CHING, H. Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in *Trichoplusia ni*: Comparative neutralization, comparative infectivity and in vitro growth studies. *J. Virol.*, 19: 820-32, 1976.

WATANABE, H. & KOBAYASHI, M. Histopathology of a granulosis in the larva of the webworm, *Hyphantria cunea*. *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 71-9, 1970.

— — — — —; ARATAKE, Y. & KAYAMURA, T. Serial passage of a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*, in larvae of rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 25: 11-7, 1975.

WEISS, S.A.; SMITH, G.C.; KALTER, S.S.; VAUGHN, J.L. & DOUGHERTY, E. Improved replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in roller bottles: Characterization of the progeny virus. *Intervirology*, 15: 213-22, 1981.

WHITLOCK, V.H. Simultaneous treatments of *Heliothis armigera* with a nuclear polyhedrosis and granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 297-303, 1977.

WILDY, P. Classification and Nomenclature of viruses. In: Karger, B.S., ed, *Monographs in virology*, 1971, 85p.

YAMADA, K.I.; SHERMAN, K.E. & MARAMOROSCH, K. Serial passage of *Heliothis zea* singly embedded nuclear polyhedrosis virus in a homologous cell line. *J. Invertebr. Pathol.*, 39: 185-91, 1982.