

7037

**BC/13707**  
**IB/80338**



**ANÁLISE DA MULTIPLICAÇÃO DE VIRUS ENTOMOPATOGÊNICOS  
NO HOSPEDEIRO Diatraea saccharalis  
(Lepidoptera:Pyralidae)**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

*Este exemplar corresponde a redação final de  
tese defendida pela  
candidata Nancy de Castro Stoppe e aprovada  
pelo Conselho Julgador*

NANCY DE CASTRO STOPPE <sup>JK</sup>

*OPC*

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas.  
Área de Concentração: Genética

*Campinas, 22. de  
março de 1991.*

*o.c.d.*

ORIENTADOR: Octavio Henrique de Oliveira Pavan <sup>JK</sup>

*7037*

T/UNICAMP  
St73<sub>a</sub>

1991  
CAMPINAS SP

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

CLASSIF.	T
AUTOR	St 73 a
V.	EX.
TOMBO BCI	13707 IB

C M000 10750-4

ANÁLISE DA MULTIPLICAÇÃO DE VIRUS ENTOMOPATOGÊNICOS  
NO HOSPEDEIRO *Diatraea saccharalis*  
(LEPIDOPTERA : PYRALIDAE)

Nancy de Castro Stoppe

Dissertação apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas.  
Area de Concentração : Genética.

ORIENTADOR : OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA PAVAN

CAMPINAS - SP

1991

Aos meus pais:  
Carlos e Deyse, por tudo  
que fizeram e tem feito por mim.

Ao Alberto:  
Por ser a pessoa que  
mais acredita em mim.

## AGRADECIMENTOS

A Octavio Henrique de Oliveira Pavan pela orientação oferecida.

A Ana Maria Azeredo Espin, William José da Silva e Yoko Bomura Rosato pelas facilidades concedidas.

A Jorge Vega pelo auxílio no uso do Microscópio Eletrônico.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

A Rosângela pelo auxílio na confecção das fotos.

A Dra. Ana Maria A. Espin, Dr. João Stenghel Morgante e Dr. José Osmar Gaspar pela leitura prévia.

A Carmen Silvia Umbuzeiro pela datilografia deste trabalho.

A Ale, Ciça, Cris (as duas), Helena, Jaque, Laura, Lu, Rose e Teresa pelo estímulo e amizade, dentro e fora do Barracão. Os anos vividos em Campinas me deram boas amigas e não teriam sido tão incríveis sem vocês. Cresci muito, pessoal e profissionalmente graças a vocês.

A Debby e Gisela pelo apoio e colaboração nesta última e tão difícil fase.

A Alberto que sempre esteve ao meu lado.

# Í N D I C E

1 - INTRODUÇÃO .....	01
1.1- Considerações gerais .....	01
1.2- <u>Diatraea saccharalis</u> .....	02
1.3- Baculovirus .....	04
1.3.1- Estrutura morfológica .....	05
1.3.2- Diversidade e classificação .....	09
1.3.3- Multiplicação <u>in vivo</u> .....	10
1.3.4- Virus de Poliedrose Nuclear de <u>Anticarsia gemmatalis</u> .....	11
1.3.5- Hospedeiros alternativos de Baculovirus .....	13
1.4- Virus de Densonucleose (VDN) .....	16
1.5- Inativação térmica .....	18
1.6- Latência viral .....	21
1.7- Infecção mista .....	23
1.8- Objetivos .....	15
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.1- Material .....	26
2.1.1- Lagartas de <u>Diatraea</u> <u>saccharalis</u> .....	26
2.1.2- Virus de Poliedrose Nuclear de <u>Anticarsia gemmatalis</u> .....	27
2.2- Métodos .....	28
2.2.1- Purificação dos cristais virais .....	28
2.2.2- Quantificação dos cristais virais ....	31
2.2.3- Preparação do inóculo .....	31
2.2.4- Bioensaio .....	32
2.2.5- Passagens seriadas dos virus .....	33
2.2.6- Inativação térmica .....	34
2.2.7- Avaliação da temperatura de 80°C nos isolados virais .....	35

2.2.8-	Passagens seriadas dos virus submetidos a tratamento térmico de 80°C ...	36
2.2.9-	Avaliação da mortalidade provocada pelos isolados virais .....	38
2.2.10-	Avaliação da produção de virus .....	39
2.2.11-	Análise ao microscópio eletrônico ....	40
2.2.12-	Análise estatística dos resultados ...	40
3 -	RESULTADOS .....	41
3.1-	Passagens seriadas .....	41
3.2-	Inativação térmica .....	42
3.3-	Avaliação da temperatura de 80°C nos isolados virais .....	44
3.4-	Passagens seriadas dos virus submetidos ao tratamento térmico de 80°C .....	45
3.5-	Avaliação da mortalidade provocada pelos isolados virais .....	46
3.6-	Avaliação da produção de virus .....	50
3.7-	Aparecimento do Virus de Densonucleose .....	56
4 -	DISCUSSÃO .....	58
5 -	RESUMO E CONCLUSÕES .....	67
6 -	SUMMARY AND CONCLUSIONS .....	69
7 -	BIBLIOGRAFIA .....	71

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os insetos e principalmente os lepidópteros são atacados por uma grande diversidade de vírus patogênicos. A ocorrência natural de infecções mistas em insetos é um fenômeno comum, porém de modo geral ocorre a predominância de um dos patógenos. Os fatores determinantes da multiplicação efetiva no hospedeiro são muito complexos, sendo muito difícil a individualização de cada um desses fatores. A obtenção de dados mais conclusivos sobre competição entre patógenos, padrões de infecção e multiplicação diferencial fornecem informações sobre a relação patógeno-hospedeiro.

Pressão seletiva no processo de competição, como por exemplo, a passagem de um vírus em hospedeiro alternativo ou fatores abióticos como a inativação térmica, provocam alterações no processo normal de infecção e permitem observações adicionais na interação patógeno-patógeno e patógeno-hospedeiro. Esses estudos colaboram, assim, na elucidação dos mecanismos de multiplicação viral importantes para os diferentes usos dos vírus de inseto tais como, agentes de controle biológico e vetores de expressão gênica (AIZAWA, 1975; WHITLOCK, 1977; KELLY, 1980; PAVAN *et al.*, 1981; JAQUES, 1985; GRONER, 1986; RIBEIRO, 1989).



## 1.2 - Diatraea saccharalis

Dentre as culturas de destaque no Brasil está o cultivo da cana-de-açúcar. Esta apresenta uma grande importância econômico-social, pois são gerados cerca de 1.700.000 empregos na produção de seus derivados e na indústria de manutenção e reposição (MACEDO & BOTELHO, 1988).

Os derivados da cana-de-açúcar, o álcool e principalmente o açúcar, apresentam interesse muito grande no mercado econômico exterior e interior. Com o incentivo governamental às atividades de exportação, os agricultores estimulados geram extensas regiões de monocultura. Isto cria condição para um aumento assustador do número de pragas nessas regiões.

Uma das mais sérias pragas da cana-de-açúcar na América é o lepidoptero Diatraea saccharalis (Fabr., 1794), vulgarmente conhecida como broca da cana-de-açúcar. A fase larval deste inseto é a responsável por danos na cana, pois causa prejuízos diretos e indiretos.

Os prejuízos diretos principais são a abertura de galerias que ocasionam perda de peso da cana, provocando a morte das gemas e subsequentes falhas na germinação. Quando a broca faz galerias circulares, seccionando o colmo, provoca o tombamento da cana pelo

vento. Nas plantas jovens provocam o secamento dos ponteiros, fato conhecido, popularmente, como coração morto. Indiretamente, os prejuízos são mais expressivos, pois através dos orifícios e galerias provocados pela broca há penetração dos fungos, Colletotrichium falcatum e Fusarium moniliforme que causam a podridão vermelha que ocasiona a inversão da sacarose, diminuindo a pureza do caldo e dando menor rendimento em açúcar (GALLO et al, 1978; MACEDO & BOTELHO, 1988).

Devido às lagartas da broca terem a maior parte do seu desenvolvimento no interior dos colmos, é notável a dificuldade do controle químico destes insetos. Este dado é bastante relevante na busca de inimigos naturais eficientes no controle populacional destes insetos. A utilização de inseticidas biológicos tem a vantagem adicional de não serem tóxicos aos animais não praga (IGNOFFO, 1968; SUMMERS et al, 1975; CONSIGLI et al, 1983).

Têm-se utilizado no Brasil como agentes no controle biológico da Diatraea saccharalis, o microhimenóptero Apanteles flaviceps e dois dípteros, Metagonistilum minense e Paratheresia claripalpis, que são parasitas da fase larval da broca da cana (DEGASPARI et al, 1981).

Na tentativa de otimizar o controle biológico da broca, patógenos vêm sendo estudados. Dentre estes, destacam-se os baculovírus (PAVAN et al, 1981; PAVAN, 1983; PAVAN et al, 1983; PAVAN & ALMEIDA,

1984; RIBEIRO, 1985, 1989; CAVALLARO, 1988; GARCIA-CANEDO, 1989; PAVAN & RIBEIRO, 1989; RODRIGUES, 1989; RODRIGUES & PAVAN, 1990).

1.3- BACULOVIRUS

Os baculovirus, segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de vírus pertencem à família Baculoviridae (MATTHEWS, 1985), e se constituem, principalmente, em patógenos de insetos, sendo um dos mais bem conhecidos e bem estudados grupos de vírus (STAIRS, 1965; MILLER & DAWES, 1978).

Epizootia natural de baculovirus é conhecida desde 1920, tanto na Europa como nos Estados Unidos (STEINHAUS, 1949). Estes estudos iniciaram ou provocaram, no mínimo, um interesse maior pelos baculovirus como agentes potenciais no controle biológico de pragas agrícolas, devido a sua ação patogênica sobre estas pragas.

A necessidade de melhoramento destes vírus como agentes no controle biológico foi objeto de estudo de vários pesquisadores em várias áreas. O avanço de técnicas na década de 80, tais como cultura de células e biologia molecular contribuiu para o desenvolvimento destes vírus (MILLER & MILLER, 1982).

Atualmente, os baculovirus são alvo de estudos em biologia molecular, sendo utilizados, por exemplo, como vetores de expressão gênica em células eucarióticas. Os baculovirus possuem um gene estrutural não essencial a sua duplicação, codificador da proteína poliedrina, que possui um gene promotor muito forte. O gene da poliedrina pode em parte sofrer uma deleção e uma sequência gênica desejada pode ser inserida (SMITH et al., 1983; MILLER, 1988).

### 1.3.1- Estrutura morfológica

A identificação de baculovirus tem gerado muita confusão em relação aos termos utilizados e neste trabalho usaremos a seguinte nomenclatura:

- capsídeo : capa proteica que envolve o DNA;
- nucleocapsídeo : capsídeo + DNA;
- envelope : membrana lipoproteica que envolve o nucleocapsídeo. Pode envolver mais de um nucleocapsídeo;
- virion : unidade infectiva, nucleocapsídeo + envelope;
- corpo de inclusão : matriz proteica que envolve os virions
- vírus ou cristal viral : é a unidade viral natural. Consiste do corpo de inclusão contendo os virions em seu interior.

A família Baculoviridae é caracterizada por possuir nucleocapsídeo em forma de bastão. Contém em seu interior DNA circular de dupla fita de 50 a 100 x 10<sup>6</sup> d. O nucleocapsídeo é envolto em um envelope lipoproteico (BURGESS, 1977; SMITH & SUMMERS, 1978; COCHRAN et al., 1986). Possui apenas um gênero, Baculovirus, que está subdividido em três sub-grupos (BILIMORIA, 1986) (FIGURA 1).

- **SUB-GRUPO A** : são os Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN). Possui como característica a presença de vários virions oclusos na matriz proteica. O corpo de inclusão deste sub-grupo apresenta formato poliédrico e é denominado poliedro, que têm como componente principal a poliedrina. Há dois grupos morfológicos: aqueles em que vários nucleocapsídeos estão dentro de um mesmo envelope (Vírus de Poliedrose Nuclear Múltiplo: VPN-M) ou os que tem apenas um nucleocapsídeo dentro de cada envelope (Vírus de Poliedrose Nuclear Simples: VPN-S).

- **SUB-GRUPO B** : são os Vírus de Granulose (VG). Apresentam um único nucleocapsídeo envelopado que está ocluído numa matriz proteica. O corpo de inclusão apresenta estrutura oval e é denominado de grânulo, que têm como componente principal uma proteína denominada granulina.

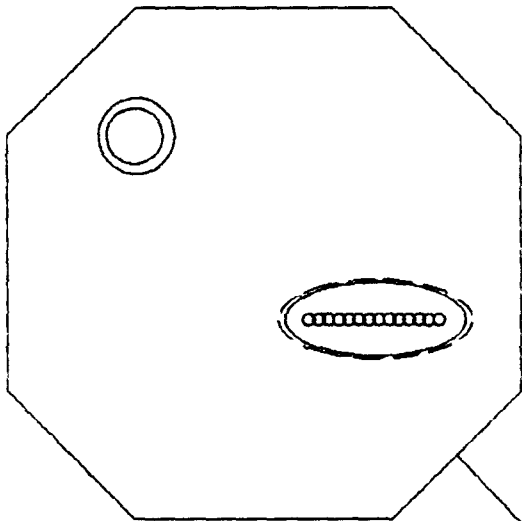
- **SUB-GRUPO C** : este sub-grupo consiste de virions não oclusos em matriz proteica e são denominados de Vírus não Oclusos (VNO). Estes vírus são também denominados de Vírus de Oryctes, pois foram primeiramente isolados em Oryctes rhinoceros (BEDFORD, 1981).

A quantidade das proteínas que compõem os critais proteicos dos sub-grupos A e B, poliedrina e granulina, respectivamente, é bastante grande. No caso dos VPN constitui mais de 95% (noventa e cinco por cento) da massa total (CARSTENS *et al.*, 1987). Os poliedros apresentam um diâmetro variando de 1 a 15  $\mu\text{m}$  e os grânulos, diâmetro médio de 0,5  $\mu\text{m}$ . Estes tamanhos permitem que este grupo de vírus seja visualizado em microscópio óptico. Os nucleocapsídeos presentes no interior dos corpos de inclusão apresentam tamanhos de 70 a 160 nm de largura e 230 a 290 nm de comprimento (BILIMORIA, 1986). No caso do VPN encontra-se até 200 nucleocapsídeos por poliedro (ACKERMANN & SMIRNOFF, 1983).

Para o emprego no controle biológico, são os vírus dos sub-grupos A e B os mais utilizados (CONSIGLI *et al.*, 1983).

VIRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR (VPN)

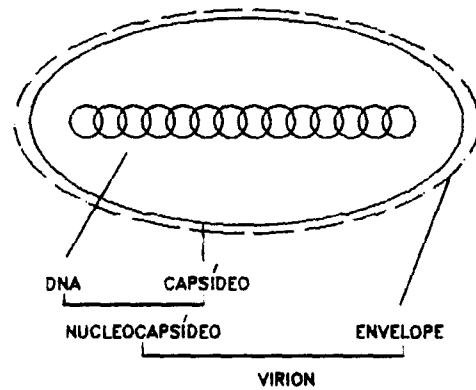
Sub-grupo A



Tipo Simples (VPN-S)

VIRUS NÃO OCLUSO (VNO)

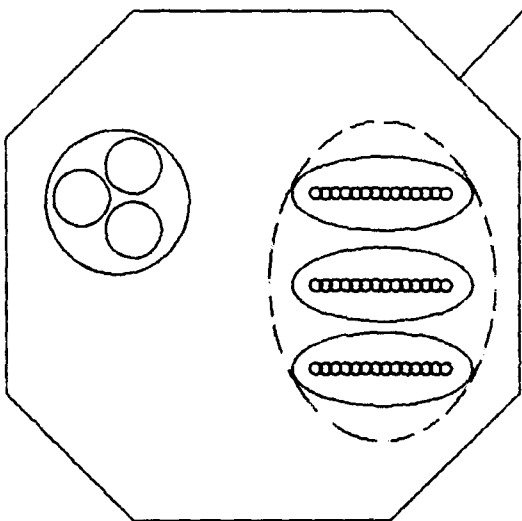
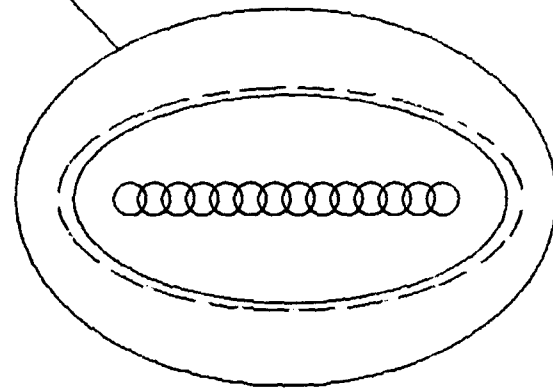
Sub-grupo C



CORPO DE  
INCLUSÃO

VIRUS DE GRANULOSE (VG)

Sub-grupo B



Tipo Múltiplo (VPN-M)

**FIGURA 1:** Representação esquemática da estrutura morfológica dos Baculovirus. Não desenhado em escala (retirado de BILIMORIA, 1986).

### 1.3.2- Diversidade e classificação

Baculoviridae é uma das famílias de vírus de maior diversidade. Foram descritas até hoje mais de 500 (quinhentas) espécies encontradas somente no filo Arthropoda. Na classe Crustacea, Decapoda, 2 VPN. Na classe Insecta, Trichoptera: 1 VPN-S; Hymenoptera: 26 VPN-S; Diptera: 22 VPN-S; Coleoptera: 16 VPN-S e Lepidoptera: 335 VPN (S e M), 113 VG e 2 VNO (ROHRMANN, 1986). Assim, as espécies deste grupo de vírus infectam preferencialmente Lepidoptera, sendo que os VPN-M e VG são encontrados somente nesta ordem (MAZZONE, 1985).

A denominação dos baculovirus é dada pelo sub-grupo no qual ele pertence e pelo hospedeiro do qual foi primeiramente isolado. Por exemplo, o Vírus de Poliedrose Nuclear de Autographa californica possui este nome por pertencer ao sub-grupo A (VPN) e por ter sido primeiramente isolado em lagartas de Autographa californica; a abreviatura deste vírus é então, VPNAc. Esta nomenclatura foi sugerida, por supor-se que os baculovirus eram espécie-específicos (BERGOLD, 1958).

Realmente, os baculovirus têm um número limitado de hospedeiros, principal vantagem de seu uso no controle biológico. São diferentes dos demais vírus de insetos, como por exemplo o Vírus de Poliedrose Citoplasmática da família Reoviridae e Vírus Entomopox da família Poxviridae, que são capazes de infectar outros organismos, como plantas e vertebrados (VLAK & ROHRMANN, 1985).



### 1.3.3- Multiplicação in vivo

A forma natural e mais comum da entrada dos baculovirus no hospedeiro é através da ingestão oral pela lagarta. O cristal proteico é dissolvido na luz do intestino médio pela ação de pH alcalino (9,5 a 11,5) e catalisado por enzimas liberadas pelo vírus (protease alcalina). A infecção primária ocorre quando os virions liberados entram em contacto com as microvilosidades das células intestinais através do envelope lipoproteico, que se fundindo com a membrana plasmática permite a entrada dos nucleocapsídeos para dentro da célula do hospedeiro. Os nucleocapsídeos seguem até o núcleo, podendo perder o capsídeo antes de atingi-lo ou no seu interior. Neste local se dá a multiplicação do DNA viral e a formação de novos virions, alguns oclusos e outros não. Os virions não-occlusos saem da célula intestinal através da membrana basal, passam à cavidade hemocélica e, através da hemolinfa atingem vários tecidos larvais. Ocorre, assim, a infecção secundária, com a formação de corpos de inclusão (MAZZONE, 1985; VAUGHN & DOUGHERTY, 1985; GRANADOS & WILLIAMS, 1986; MASKEL & DICAPUA, 1988).

Ao nível citológico pode-se observar a primeira mudança no hospedeiro, uma hipertrofia dos núcleos, que podem chegar a ocupar totalmente o volume celular, muitas vezes rompendo a membrana da célula. Os VPN são restritos ao núcleo, enquanto os VG inicialmente atacam o núcleo provocando a perda de integridade deste; no entanto, a multiplicação viral continua nesta mistura celular (DA CUNHA *et al.*, 1972; GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

O tropismo histológico é distinto para os sub-grupos. Os VPN são mais versáteis, sendo capazes de infectar praticamente todos os tecidos. VG, preferencialmente, ataca o corpo gorduroso (HUGER, 1963).

No processo de infecção das lagartas desenvolve-se uma doença denominada poliedrose ou granulose, se infectadas com VPN ou VG, respectivamente. As lagartas tornam-se esbranquiçadas, têm o crescimento reduzido e perdem o tônus muscular (sintomatologia grosseira). Quando as lagartas morrem, a flacidez e a fragilidade consequentes da infecção facilitam o rompimento do corpo do inseto provocando a liberação dos vírus e permitindo a dispersão destes no meio ambiente (HOSTETTER & BELL, 1985).

#### 1.3.4- **Virus de Poliedrose Nuclear** **de Anticarsia gemmatalis**

Este vírus foi relatado pela primeira vez por STEINHAUS (1957) em uma mistura de lagartas desintegradas de **Anticarsia gemmatalis** e **Xyloges** sp, provindas de plantação de alfafa no Peru. Foi descrita como um possível baculovirus do tipo VPN. Posteriormente, em 1962, STEINHAUS & MARSH confirmaram o diagnóstico de um VPN em lagartas de **Anticarsia gemmatalis**.

Em 1972, em uma coleta de lagartas de Anticarsia gemmatalis de uma cultura de soja na região de Campinas, SP, verificou-se que estas apresentavam-se infectadas com um VPN. Vários outros relatos também mostraram a infecção de Anticarsia gemmatalis por um VPN em outras regiões do Brasil (CARNER & TURNISPEED, 1977; CORSO *et al.*, 1977; GATTI *et al.*, 1977).

Uma descrição mais detalhada deste vírus foi realizada em 1977 por ALLEN & KNELL e CARNER & TURNISPEED, a partir de lagartas doentes coletadas de uma plantação de soja, aqui no Brasil. Verificou-se que os sintomas externos eram similares aos descritos para outras lagartas infectadas por VPN. Ao nível celular, como nos demais VPN, a infecção foi observada somente no núcleo e, histologicamente, os tecidos mais atingidos foram o gorduroso e o epidérmico. A ultra-estrutura mostra serem VPN do tipo múltiplo, apresentando no entanto alguns virions com apenas um nucleocapsídeo numa proporção variando de 25 a 43%.

O Vírus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis apresenta por ser do tipo M um potencial em técnicas de manipulação genética e uma ampla gama de hospedeiros (GRONER, 1986; MARUNIAK, 1989).

### 1.3.5- Hospedeiros alternativos de Baculovirus

O fato dos baculovirus infectarem apenas os artropódes, em especial os insetos, estimulou estudos que os avaliaram como agentes efetivos ao controle populacional de mais de uma praga. Em termos práticos, sendo altamente específicos, são desvantajosos e de alto custo. Vários trabalhos foram e têm sido desenvolvidos para avaliar a potencialidade de baculovirus como vírus polivalentes. Alguns baculovirus são capazes de infectar hospedeiros alternativos, principalmente em espécies correlatas (TANADA & IWAI, 1974).

HUNTER et al (1976) utilizando um VPN de Cadra cautella obteve uma resposta positiva à infecção em lagartas de Plodia interpunctella. No entanto, o processo de infecção foi lento e apenas ocorreu em lagartas neonatas. Outros VPN foram descritos como infecciosos em numerosas espécies. VPNAc, por exemplo, é capaz de infectar pelo menos 32 (trinta e duas) espécies em 12 (doze) famílias (LEWIS et al, 1977; BEER, 1980; MARTIGNONI et al, 1982; GRANADOS & WILLIAMS, 1986; RODRIGUES, 1989; RODRIGUES & PAVAN, 1990).

O procedimento de passagens seriadas em hospedeiro alternativo causa aumento de virulência, principalmente em Virus de Poliedrose Nuclear. Em alguns casos, a passagem do vírus pelo novo hospedeiro produz uma linhagem mais virulenta ou uma produção in vivo mais eficaz (AIZAWA, 1975).

O uso de doses inadequadas pode ser a razão pela qual os vírus não se torna infeccioso a hospedeiros alternativos (PAVAN *et al.*, 1981).

Foram relatados casos em que a passagem dos vírus em um hospedeiro alternativo causou diminuição da virulência no hospedeiro original e casos nos quais a infectividade original foi mantida (SMIRNOFF, 1963; STAIRS *et al.*, 1981; TOMPKINS *et al.*, 1981; RIBEIRO, 1985; MARTIGNONI & IWAI, 1986). A falta de modificação na virulência de alguns vírus após passagem seriada também foi relatada (MALEKI-MILANI, 1978; PAVAN *et al.*, 1981; McINTOSH & IGNOFFO, 1986).

Dentre as principais contribuições de estudos brasileiros nessa área, o Laboratório de Virologia de Insetos do Departamento de Genética e Evolução do IB-UNICAMP tem desenvolvido pesquisas utilizando vários baculovírus no combate a principal praga da cana-de-açúcar, Diatraea saccharalis. RIBEIRO (1985) demonstrou que aumento de virulência era obtido quando o Vírus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis e/ou Vírus de Poliedrose Nuclear de Trichoplusia ni eram inoculados em Diatraea saccharalis. Após dez passagens seriadas do VPNAg e onze do VPNTn, houve aumento, respectivamente, de 100 e 800 vezes, na virulência para as lagartas de Diatraea saccharalis. O inóculo inicial proveniente de população natural, ou seja, obtido de isolados dos respectivos hospedeiros originais, tratando-se, portanto, de uma população heterogênea. Foi sugerido que como se tratava de população heterogênea, um ou mais virions com virulência maior foram selecionados.

O acréscimo de dez passagens seriadas do VPNAg em Diatraea saccharalis mostrou aumento da virulência proporcionalmente menor, apenas 12,6 vezes nas dez últimas passagens seriadas em contraste com as 100 vezes obtidas nas dez primeiras. Para VPNTn, a redução foi mais drástica, não havendo aumento significativo da virulência. O aumento da virulência foi baseado na redução da DL<sub>50</sub> nas lagartas. Provavelmente uma estabilidade viral foi obtida (RIBEIRO, 1989).

O procedimento de passagens seriadas utilizando VPNAg mostra que ocorre uma boa multiplicação deste vírus no hospedeiro Diatraea saccharalis. A confirmação deste vírus ser o agente infeccioso é ratificada pela falta de baculovirus do tipo VPN natural neste hospedeiro.

RODRIGUES (1989) estudando o Vírus de Poliedrose Nuclear de Autographa californica no hospedeiro alternativo, Diatraea saccharalis observou um aumento de virulência surpreendentemente maior que os obtidos por RIBEIRO (1985) com o VPNAg. Após somente cinco passagens seriadas do vírus em Diatraea saccharalis obteve-se aumento de 1000 (mil) vezes. O inóculo inicial tratava-se, neste caso, de uma variante, E2, selecionada em cultura de células, portanto uma população geneticamente homogênea. Neste trabalho sugere-se que alterações tenham ocorrido no material genético da E2 na 1ª e/ou 2ª passagem do vírus pelo hospedeiro alternativo. Como, por exemplo, aumento da patogenicidade e velocidade de ação do vírus sobre o

hospedeiro alternativo. Tratando-se agora de uma população heterogênea, os virions mais virulentos foram possivelmente selecionados e/ou novas alterações gênicas ocorreram.

#### 1.4- VIRUS DE DENSONUCLEOSE (VDN)

Densovirus é um gênero de vírus da família Parvoviridae. Estes vírus contém uma única cadeia de DNA linear de  $1,9 \times 10^6$  a  $2,2 \times 10^6$  d, envoltas por um capsídeo de 10 a 24 nm. Os membros desta família são comumente denominados Vírus de Densonucleose (VDN). Este nome é dado, devido ao fato de durante o processo de infecção, os núcleos da célula do hospedeiro serem infectados e tornarem-se hipertrofiados, mostrando-se ao microscópio eletrônico como estruturas densas (KELLY et al, 1977; KAWASE, 1985). Estudos em géis de poliacrilamida das partículas virais de VDN mostram a presença de quatro proteínas estruturais (TIJSSSEN et al, 1976).

O primeiro VDN descrito foi isolado a partir de Galleria mellonella, por MEYNADIER et al (1964). Posteriormente, vários vírus semelhantes foram descritos e a classe Insecta parece ser a única atingida, em Lepidoptera, Diptera, Orthoptera, Blattaria e Odonata (KAWASE, 1985).

A histopatologia é bastante variada, VDN de Galleria mellonella não infecta o intestino médio, sendo que o tecido gorduroso, células nervosas, glândula da seda, membrana muscular, túbulos de Malpighi e gônadas são bastante susceptíveis (AMARGIER et al, 1965). Por outro lado, Vírus de Densonucleose de Bombyx mori multiplicam-se nos núcleos das células colunares do epitélio do intestino médio, sendo que nos demais tecidos nenhuma mudança histológica é observado (WATANABE et al, 1976).

Em 1977, MEYNADIER et al descreveram um Vírus de Densonucleose em lagartas de Diatraea saccharalis. Este vírus, afeta principalmente o tecido gorduroso, a hipoderme e as glândulas da seda, tornando as lagartas com coloração branco-acinzentadas e com perda do tônus muscular. Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que estes vírus possuem nucleocapsídeos de 22 nm e que se agrupam formando cristais. O processo de infecção deste VDN é mais lento que os descritos para outros Densovirus.

O mecanismo de multiplicação dos VDN não está completamente esclarecido e mais estudos são necessários em outros VDN além dos já realizados, com os vírus de Galleria mellonella e Bombyx mori (KAWASE, 1985).

O uso destes vírus como agentes no controle biológico apresenta duas desvantagens: a ausência de uma matriz proteica, o que impede sua estabilidade no campo e o fato destes vírus serem capazes de crescer em cultura



de células de mamíferos, sugerindo avaliação de sua patogenicidade a vertebrados (KAWASE, 1985; GRONER, 1986).

### 1.5- INATIVACAO TÉRMICA

A pouca persistência no campo constitui um sério problema na aplicação dos vírus como agentes no controle biológico (BULLOCK, 1967). Aumento da persistência tanto no campo como na população de insetos, incrementa-os como agentes efetivos no combate às pragas, incluindo facilidade de estocagem (JAQUES, 1985).

Vários fatores afetam a estabilidade viral, como a luz ultra-violeta, luz solar e temperaturas elevadas (GUDAUSKAS & CANERDAY, 1968; BULLOCK et al, 1970; MORRIS, 1971; McLEOD et al, 1977).

Temperaturas anormalmente altas têm um efeito danoso para a maioria dos patógenos (JAQUES, 1978). Apesar de temperaturas altas o suficiente para inativar vírus entomopatogênicos serem raras na natureza, alguns estudos vêm sendo realizados a esse respeito (LATHIKA & JACOB, 1974; McLEOD et al, 1977; WITT & HINK, 1979; ALI & SIKOROWSKI, 1986; CASTRO et al, 1989).

A estabilidade dos entomovirus que possuem estruturas cristalinas é bastante alta em temperaturas baixas (TANADA, 1953; DAVID & GARDINER, 1967). No entanto, a exposição a altas temperaturas parece denaturar a estrutura nucleoproteica (JAQUES, 1985). Já os vírus desprovidos de matriz proteica parecem tolerar melhor a ação de temperaturas elevadas (KELLY, 1980).

Exposição a altas temperaturas por períodos curtos de tempo são suficientes para inativar quase completamente, ou completamente os vírus. Temperaturas entre 75 e 80°C inativam a população viral em 15 minutos (DAVID & GARDINER, 1967; GUDAUSKAS & CANERDAY, 1968; JAQUES, 1978, 1985; RIBEIRO & PAVAN, 1985; RIBEIRO, 1989). Alguns vírus no entanto, fogem deste limite. Por exemplo, o Vírus de Poliedrose Nuclear de Trichoplusia ni só é inativado à 88°C por dez minutos, retendo alguma atividade mesmo depois de submetido à 93,3°C por trinta minutos (GUDAUSKAS & CANERDAY, 1968; STUERMERJR. & BULLOCK, 1968). O ponto de inativação térmica do VPN de Spodoptera mauritia e Spodoptera littoralis é 95°C por dez minutos (LATHIKA & JACOB, 1974; HARPAZ & RACCAH, 1975).

MARTIGNONI & IWAI (1977) utilizando dois VPN de Orgyia pseudotsugata, um do tipo múltiplo e outro simples observaram uma maior estabilidade para o VPN-M. O VPN-M é inativado à 65°C em 4,5 h., enquanto o VPN-S à 60°C em 4 h.

RIBEIRO (1989) estudando dois VPN, Anticarsia gemmatalis e Trichoplusia ni no hospedeiro alternativo Diatraea saccharalis, notou que a estabilidade térmica não se alterou com o decorrer das passagens seriadas.

WITT & HINK (1979) utilizando cultura de tecidos de Trichoplusia ni tentaram em vão, após cinco passagens, obter mutantes de VPNAc resistentes a radiação térmica.

As diferenças de resistência a temperatura parecem estar relacionadas com a composição proteica das cápsulas virais. A resistência das proteínas a inativação térmica depende da composição de aminoácidos, mas, no entanto, quase todas são inativadas ou denaturadas à 100°C (KLIBANOV & AHERN, 1987).

Outros vírus entomopatogênicos também apresentam resistência à temperatura. A termo-resistência dos Vírus de Densonucleose é alta, sendo capazes de manter atividade após à exposição a temperaturas de 56 a 80°C por 10 minutos (BOEMARE et al, 1970; KURSTAK, 1972).

### 1.6- LATÊNCIA VIRAL

Um dos aspectos mais interessantes da Virologia é o fenômeno da latência viral. Este fenômeno é bastante comum em todos os organismos e em especial nos insetos (SMITH, 1976). A ativação de vírus latentes é causada por estressores. Nos insetos, os principais agentes causadores de estresse seriam: super-população, exposição a raios-X e inoculação oral com um vírus estranho (KRIEG, 1957; STEINHAUS, 1958).

LONGWORTH & CUNNINGHAM (1968) mostraram que um poliedro estranho ativava um vírus latente em lagartas de Aglais urticae e Porthetria dispar. Inoculando VPN de Porthetria dispar em lagartas de Aglais urticae e VPN de Aglais urticae em lagartas de Porthetria dispar, observaram uma alta mortalidade das lagartas por infecção viral, provocadas no entanto pela ativação de vírus latente. Esta conclusão foi possível, pois estes dois VPN são distintos morfológica e sorologicamente, sendo o poliedro estranho o agente ativador.

Um trabalho semelhante de ativação de vírus oculto com a inoculação de VPN recíproco foi realizado por JURKOVIKOVA (1979) utilizando lagartas e vírus de Adoxophyes orana e Brathria brassicae. Os resultados sugerem que o fator de ativação não deve ser, neste caso, devido a um componente do poliedro estranho e sim a substância(s) de lagartas sadias.

McKINLEY et al (1981) estudando VPN de três espécies de Spodoptera e uma espécie de Heliothis submetidos a bioensaios em infectividade cruzada, observaram que a ativação de vírus latente é muito mais comum que a infectividade cruzada. No entanto, não sugerem qual seria o mecanismo de ativação.

KELLY et al (1981) observaram a indução de um baculovirus não ocluso (baculovirus X) presente persistentemente em cultura de células. Alguns baculovirus eram capazes de induzir o baculovirus X: VPN-S de Heliothis zea e Heliothis armigera e VPN-M de Trichoplusia ni, Spodoptera frugiperda e Spodoptera littoralis. Utilizando inibidores metabólicos e vírus indutores inativados, mostrou-se que, provavelmente uma proteína do vírus indutor é responsável pela ativação do baculovirus X.

MALEKI-MILANI (1978) e PAVAN et al (1981) sugerem que o efeito de passagens seriadas de um vírus estranho permitem a um vírus oculto do hospedeiro alternativo se revelar, manifestando assim o processo de infecção.

GRONER(1986) propôs dois requisitos básicos para minimizar os efeitos estressantes provocados pelo vírus estranho em um hospedeiro alternativo. Primeiro, que os insetos provenham de populações sadias e que as larvas tenham sido criadas a partir de ovos desinfetados e sob condições que evitem contaminação com

outros vírus. O outro requisito necessário é que os vírus a serem utilizados sejam bem caracterizados e com as propriedades bioquímicas bem conhecidas e que sejam confirmados como o agente causador da morte das larvas.

Infecções latentes ativadas por vírus do hospedeiro original também foram narrados.

AMARGIER et al (1968) detectaram Vírus de Densonucleose em lagartas de Galleria mellonella que haviam sido inoculadas com VPNGm. A caracterização morfológica e proteica do vírus detectado levou ao VDN de Galleria mellonella.

No procedimento de purificação de vírus a partir de lagartas de Diatraea saccharalis que haviam sido inoculadas com um Vírus de Granulose de Diatraea saccharalis e que aparentemente, por sintomatologia grosseira e análise ao microscópio óptico morreram de infecção com VG, encontrou-se partículas que foram sugeridas serem de Vírus de Densonucleose (CAVALLARO, 1988).

### 1.7- INFECCÃO MISTA

Nos insetos, as infecções geralmente não são produzidas exclusivamente pela ação de um único microrganismo, e sim ocasionada pelos efeitos múltiplos de diversos patógenos (ODIER, 1977).

Os resultados obtidos através de infecções mistas com vírus demonstram que os insetos podem ser infectados simultaneamente por mais de um vírus, mas que os sítios específicos de duplicação são divididos entre os patógenos envolvidos.

A infecção mista entre dois vírus de inseto pode manifestar-se de duas maneiras: 1) a duplicação dos virions em células de tecidos diferentes ou em células do mesmo tecido, mas adjacentes e 2) duplicação na mesma célula, mas em organelas diferentes (LOWE & PASCHKE, 1968; TANADA *et al.*, 1969; KURSTAK & GARZON, 1975; ODIER, 1977; GARCIA-CANEDO, 1989).

Na infecção mista envolvendo baculovírus e densovirus, dois casos são relatados. KURSTAK & GARZON (1975) estudando Galleria mellonella submetida a infecção com VPN, VDN e um vírus iridescente; mostrou que estes três vírus podem se multiplicar simultaneamente no mesmo hospedeiro. Na infecção envolvendo dois destes vírus, VPN e VDN, foi observada a presença deles em um mesmo tecido, mas em células adjacentes e nunca na mesma célula. Isto é facilmente explicável, pois ambos são agentes infecciosos do núcleo celular. Quando o VPN era inoculada de 24 a 36 h. antes do VDN, havia uma certa interferência na infecção do Densovirus. Foi sugerido que uma substância do tipo interferon seria a responsável, ou que a interferência viral não seria mediada por um fator químico mas sim, pela competição ao nível da integridade nucleolar. Afinal, o VDN depende do nucléolo no processo de infecção e este é rapidamente destruído durante multiplicação do VPN.

Já ODIER (1977), num estudo de infecção mista utilizando estes mesmos vírus, não observou efeito de interferência. Considerando a infecção no hospedeiro, obteve resultados semelhantes aos de KURSTAK & GARZON (1975).

O efeito da interferência viral entre vírus iridescente e baculovirus foi observado por WHITLOCK (1977) e KELLY (1980) em cultura de células. Em ambos os casos, a inativação dos vírus pelo calor inibiu a ação da interferência mostrando que é a duplicação viral o fator de inibição e não a simples presença da partícula viral.

#### 1.8- OBJETIVOS

Teve-se como objetivo neste trabalho estudar o efeito de passagens seriadas e interação entre passagens seriadas e tratamento térmico no Vírus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis no hospedeiro Diatraea saccharalis. Para isso, os isolados virais foram testados em duas condições experimentais, a primeira onde o vírus é inoculado ativo e a segunda na qual o vírus é inativado parcialmente por tratamento térmico.

A avaliação dos resultados foi realizada através da mortalidade larval consequente da infecção e a produção de vírus nas lagartas infectadas.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAL

#### 2.1.1- Lagartas de Diatraea saccharalis

As lagartas foram obtidas de populações de laboratório da secção de Entomologia do IAA/PLANALSUCAR, Araras, São Paulo, enviadas semanalmente.

Estas lagartas foram mantidas em tubos contendo dieta artificial preparada segundo o método descrito por HENSLEY & HAMMOND (1968) com as modificações introduzidas por DEGASPARI et al (1981). Da composição da dieta foi excluído o formol devido à sua ação antiviral (VAIL et al, 1968).

Os ovos dos quais eclodiram as lagartas foram inicialmente desinfectados com solução de sulfato de cobre e posteriormente colocados nos tubos contendo a dieta devidamente esterilizada e enviados ao laboratório para os ensaios. Os ensaios biológicos foram realizados em lagartas de 11 (onze) dias (3<sup>o</sup> instar). Este instar foi escolhido pelas facilidades técnicas.

2.1.2- Virus de Poliedrose Nuclear  
de Anticarsia gemmatalis  
(VPNAg)

Os Vírus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis foram inicialmente obtidos de cadáveres de lagartas de Anticarsia gemmatalis infectadas pelo vírus. As lagartas foram cedidas pelo pesquisador João Batista, do Instituto Biológico de Campinas, São Paulo. Posteriormente, foram multiplicados em Diatraea saccharalis em passagens seriadas segundo o método descrito por RIBEIRO (1985).

Estes vírus fazem parte da coleção do Laboratório de Vírus de Inseto do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP e são estocadas à - 20° C.

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1- Purificação dos cristais virais

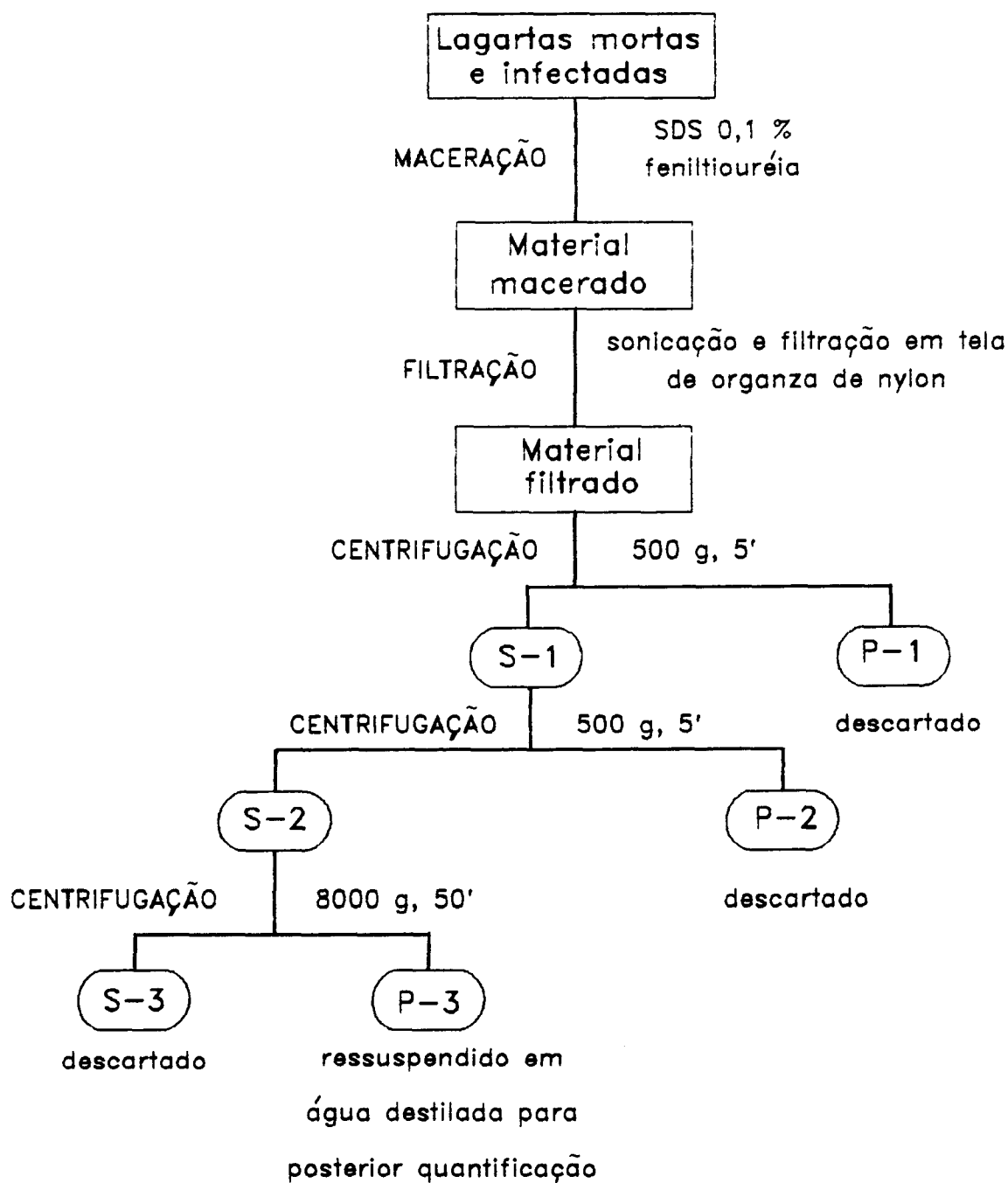
A purificação é feita segundo o procedimento descrito por PAVAN et al (1983) com modificações (Esquema 1).

Lagartas mortas por infecção viral são maceradas com dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% e alguns cristais de feniltiouréia, na proporção de 1 g de lagarta para 10 ml de SDS 0,1%. O SDS é um detergente iônico que rompe as células e reduz material contaminante, não possuindo efeitos danosos nem na estrutura nem na infectividade dos vírus (MARUNIAK, 1986). A feniltiouréia previne a melanização dos tecidos larvais (PAVAN et al, 1983).

O macerado é sonicado e filtrado em uma tela de organza de nylon. A sonicação favorece uma boa homogeneização do material e permite a remoção de restos celulares maiores.

O filtrado é submetido à centrifugação diferencial, em ciclos alternados de baixa e alta velocidade, em centrífuga refrigerada Beckman J2-21, com rotor JA-20 à 4° C. O ciclo de baixa velocidade consiste de centrifugação a 500 g por 5 minutos, que é feito duas vezes. O precipitado, que contém restos celulares e partículas maiores, é descartado e o sobrenadante centrifugado a 8000 g por 50 minutos. O ciclo de alta velocidade precipita os cristais virais e no sobrenadante, que é desprezado, são encontrados poucos cristais e gordura provenientes das lagartas. O precipitado é ressuspenso em água destilada e preparado para quantificação.

ESQUEMA 1: Processo de purificação do VPNAg a partir de lagartas de Diatraea saccharalis mortas pela infecção com o vírus.



### 2.2.2. Quantificação dos cristais virais

A solução purificada é homogeneizada, sonicada e submetida a diluição seriada.

A quantificação é feita utilizando o hematímetro de Neubauer em microscópio de contraste de fase LEITZ (DIALUX 20), num aumento de 400 vezes. A contagem é feita pela regra de Neubauer, pelos 4 quadrantes dos cantos e no quadrante central.

As soluções são estocadas à  $-20^{\circ}$  C em frascos de vidro de 10 ml contendo 5 ml de solução viral.

Este método permite a dosagem viral. Esta é feita para um volume de 2,7  $\mu$ l. Este foi escolhido, pois corresponde ao volume de solução viral graduado pelo microaplicador a qual é inoculada nas dietas.

### 2.2.3. Preparação do inóculo

Após a quantificação, as soluções virais foram diluídas em água destilada e mantidas em solução estoque numa concentração de  $10^7$  cristais/2,7  $\mu$ l.

As soluções virais utilizadas nos bioensaios foram preparadas a partir de diluição da solução estoque até chegar a concentração de  $10^6$  cristais/2,7  $\mu$ l, que equivalem a dose  $10^6$  cristais/larva.

#### 2.2.4- Bioensaio

O método foi descrito por PAVAN *et al* (1981), onde se utiliza placas de acrílico com 24 cavidades contendo cada uma, um pequeno disco de dieta artificial (3 mm de diâmetro x 1 mm de espessura). Em cada disco é inoculada uma gota de suspensão viral de dose conhecida com auxílio de um microaplicador. Para esta etapa foi utilizado um sonicador para homogeneizar as soluções virais e seringas descartáveis para a aplicação do inóculo.

Em cada cavidade é colocada uma lagarta de Diatraea saccharalis de 11 dias (3<sup>o</sup> instar) e as placas são fechadas de modo que cada cavidade fique isolada. As placas são então, colocadas em caixas plásticas que simulam uma câmara úmida, para evitar ressecamento da dieta, por 24 h à  $28 \pm 2^{\circ}$  C num fotoperíodo de 12 horas.

Após esse período as lagartas que consumiram toda a dieta são transferidas individualmente, a tubos de dieta esterilizada. São levadas a câmaras de  $28 \pm 2^{\circ}$  C com fotoperíodo de 12 horas e observadas em dias alternados até a morte. As lagartas são consideradas mortas devido à infecção viral observando-se a sintomatologia grosseira. Algumas destas, ao acaso, têm o tecido gorduroso analisado em microscópio de contraste de fase para a confirmação do diagnóstico.

As lagartas mortas são estocadas à  $-20^{\circ}$  C para posterior purificação.

Os bioensaios foram realizados para determinar a mortalidade larval e a produção de vírus nas lagartas infectadas.

#### 2.2.5- Passagens seriadas dos vírus

A seleção genética através deste método, descrito por RIBEIRO (1985,1989) e RODRIGUES (1989), consiste em inocular o vírus no hospedeiro alternativo em uma concentração que permita sua multiplicação. A recuperação do material viral é feita através de purificação das lagartas mortas pela infecção e a posterior inoculação do então material purificado em hospedeiros procedentes da mesma população. Uma das vantagens do processo é a possibilidade de realizar-se inúmeras repetições.



Os estudos foram realizados inicialmente com o Vírus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis adaptado às lagartas de Diatraea saccharalis após duas passagens seriadas (VPNAgF2). Com este inóculo, obteve-se através da multiplicação dos vírus em Diatraea saccharalis a população viral denominada VPNAgF3.

Este procedimento foi repetido mais 2 (duas) vezes, obtendo-se assim os isolados designados por VPNAgF4 e VPNAgF5 (Esquema 2, grupo I).

#### 2.2.6- Inativação térmica

Soluções virais (2 ml) de VPNAgF2 com dose suficiente para matar 100% das lagartas ( $10^6$  cristais/2,7  $\mu$ l ) foram colocadas separadamente em temperaturas constantes de 60, 70, 80 e  $90 \pm 1^\circ\text{C}$  por 5 minutos em banho-maria. Após este tempo eram retiradas do banho-maria e então, aguardava-se que atingissem a temperatura ambiente e na sequência procedeu-se a quantificação dos cristais virais (item 2.2.2). As soluções foram então, individualmente inoculadas nos discos de dieta e foi realizado o procedimento de bioensaio utilizando-se 60 lagartas para cada temperatura. Os resultados definiram a temperatura que reduzisse em cerca de 95% (noventa e cinco por cento) a atividade da população viral.

A medida de redução da atividade viral foi feita indiretamente, através da mortalidade larval. Portanto, 5% (cinco por cento) de lagartas mortas por infecção viral representam 95% (noventa e cinco por cento) de redução de atividade viral ( estas lagartas sobrevivem até o período de pupa).

A temperatura capaz de reduzir a atividade em 95% (noventa e cinco por cento) da população viral do VPNAgF2 foi utilizada também para as demais gerações estudadas.

#### 2.2.7- Avaliação da temperatura de 80° C nos isolados virais

Foi avaliado o efeito da temperatura de 80° C por 5 minutos nos inóculos obtidos no item 2.2.5: VPNAgF2, VPNAgF3, VPNAgF4 e VPNAgF5. Após a incubação os inóculos foram retirados e então, procedeu-se como no item 2.2.4. A denominação dos inóculos submetidos a temperatura foi alterada para VPNAgF2T, VPNAgF3T, VPNAgF4T e VPNAgF5T (Esquema 2, grupo II).

### 2.2.8- Passagens seriadas dos virus submetido ao tratamento térmico de 80°C

O procedimento é basicamente o mesmo utilizado no item 2.2.4., mas neste caso os virus são submetidos à ação da temperatura, antes da realização do bioensaio.

A denominação dos virus obtidos também é modificada. O VPNAgF2 submetido a temperatura é designado por VPNAgF2T. Com este inóculo obteve-se através da multiplicação dos virus em Diatraea saccharalis a população viral denominada VPNAgF3RT.

Este procedimento foi repetido mais 2 (duas) vezes obtendo-se assim, os isolados designados por VPNAgF4RT e VPNAgF5RT (Esquema 2, grupo III).

Esquema 2. Processo de obtenção dos isolados virais

VIRUS INOCULADO	TRATAMENTO	HOSPEDEIRO	VIRUS OBTIDO	
VPNAg	----	<u>A. gemmatalis</u>	VPNAg	
VPNAg	----	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF1	
VPNAgF1	----	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF2	
VPNAgF2	----	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF3	GRUPO I
VPNAgF3	----	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF4	
VPNAgF4	----	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF5	
VPNAgF5	----	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF6	
VPNAgF2T	80°C, 5'	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF3RT	
VPNAgF3T	80°C, 5'	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF4(80°C)	GRUPO II
VPNAgF4T	80°C, 5'	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF5(80°C)	
VPNAgF5T	80°C, 5'	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF6(80°C)	
VPNAgF2T	80°C, 5'	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF3RT	
VPNAgF3RT	80°C, 5'	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF4RT	GRUPO III
VPNAgF4RT	80°C, 5'	<u>D. saccharalis</u>	VPNAgF5RT	

### 2.2.9- Avaliação da mortalidade provocada pelos isolados virais

Foram realizados bioensaios para a verificação da mortalidade larval sob ação viral.

Três grupos experimentais foram analisados, os vírus obtidos nos itens 2.2.5, 2.2.7 e 2.2.8.

Para as diferentes gerações de cada tratamento:

- GRUPO I : VPNAgF2, VPNAgF3, VPNAgF4 e VPNAgF5.
- GRUPO II : VPNAg2T, VPNAgF3T, VPNAgF4T e VPNAgF5T.
- GRUPO III : VPNAg2T, VPNAgF3RT e VPNAgF4RT.

foram preparadas 5 (cinco) placas de acrílico conforme item 2.2.4 e inoculadas 120 (cento e vinte) lagartas de Diatraea saccharalis. Das 5 (cinco) placas inoculadas foram escolhidas 3 (três) de tal forma que totalizasse 60 (sessenta) lagartas de cada geração e tratamento para análise da mortalidade.

Foi realizado também um grupo controle de 60 (sessenta) lagartas que ingeriram dieta inoculada com água destilada.

#### 2.2.10- Avaliação da produção de vírus

Foi avaliada a quantidade de cristais produzidos, por grama de peso larval e por lagarta, a partir de cada um dos isolados inoculados em Diatraea saccharalis.

As lagartas mortas por infecção foram pesadas e a partir delas os vírus foram purificados, quantificados e calculou-se a produção de cristais virais por grama de peso larval. O cálculo da produção por lagarta foi realizado baseado no número de lagartas mortas utilizadas para a purificação viral. Assim, por exemplo, inoculando-se VPNAgF2 calculou-se quanto foi produzido de VPNAgF3 por grama de peso larval ou por lagarta.

### 2.2.11- Análise ao Microscópio Eletrônico

As soluções virais obtidas nos itens 2.2.5 e 2.2.8 foram colocadas individualmente sobre telinhas de microscopia eletrônica e observadas em Microscópio Eletrônico ZEISS EM-10 após contrastação negativa com ácido fosfotúngstico (PTA) 2% numa magnificação de 32000 vezes.

### 2.2.12- Análise estatística dos resultados

Para verificação da significância estatística da mortalidade entre os diferentes tratamentos e entre as diferentes gerações de cada tratamento foi realizada análise de variância. As produções médias de cada um dos isolados de VPNAg foram comparadas através do teste t-Student (STEEL & TORRIE, 1980).

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1- PASSAGENS SERIADAS

Os dados de mortalidade dos isolados VPNAgF2, VPNAgF3, VPNAgF4 e VPNAgF5 encontram-se na tabela I, onde são mostrados o número de lagartas analisadas, o número de indivíduos mortos e a porcentagem de lagartas mortas para cada isolado viral. A mortalidade observada foi de 100% (cem por cento) para todos os isolados.

**TABELA I** : MORTALIDADE LARVAL CAUSADA POR VNPag SUBMETIDOS A PASSAGENS SERIADAS EM D. saccharalis (N) número total de lagartas analisadas; (M) número de lagartas mortas; (%) taxa de mortalidade larval. Dose:  $10^6$  cristais/larva.

VIRUS INOCULADO *	N	M	%
VPNAgF2	100	100	100
VPNAgF3	98	98	100
VPNAgF4	100	100	100
VPNAgF5	100	100	100

\* As abreviações se referem ao Esquema 2.



### 3.2 - INATIVAÇÃO TÉRMICA

A tabela II mostra o efeito das temperaturas de 60, 70, 80 e 90° C no vírus VPNAgF2 durante 5 minutos. É mostrado também o número de indivíduos analisados, o número de indivíduos mortos, a porcentagem de mortalidade larval e a porcentagem de redução de atividade viral, que foi considerada igual a redução da mortalidade larval.

Na figura 2 é apresentado o gráfico da porcentagem de mortalidade larval provocada pelo vírus sob efeito das temperaturas de 60 a 90° C. A regressão linear mostra que a mortalidade larval de 5% (cinco por cento) é obtida quando os vírus são submetidos a temperatura de 80,25 °C.

**TABELA II** : EFEITO DAS TEMPERATURAS DE 60, 70, 80 E 90° C POR 5 MINUTOS EM VPNAgF2 (VPNAgF2T), NA MORTALIDADE DE D. saccharalis NUMA DOSE DE 10<sup>6</sup> CRISTAIS/LARVA (N) número total de lagartas analisadas; (M) número de lagartas mortas; ML(%) taxa de mortalidade larval; IV(%) : taxa de redução da atividade viral.

TEMPERATURA (° C)	N	M	ML(%)	IV(%)
60	60	59	98,3	1,7
70	60	8	13,3	86,7
80	60	3	5,0	95,0
90	59	0	0,0	100,0

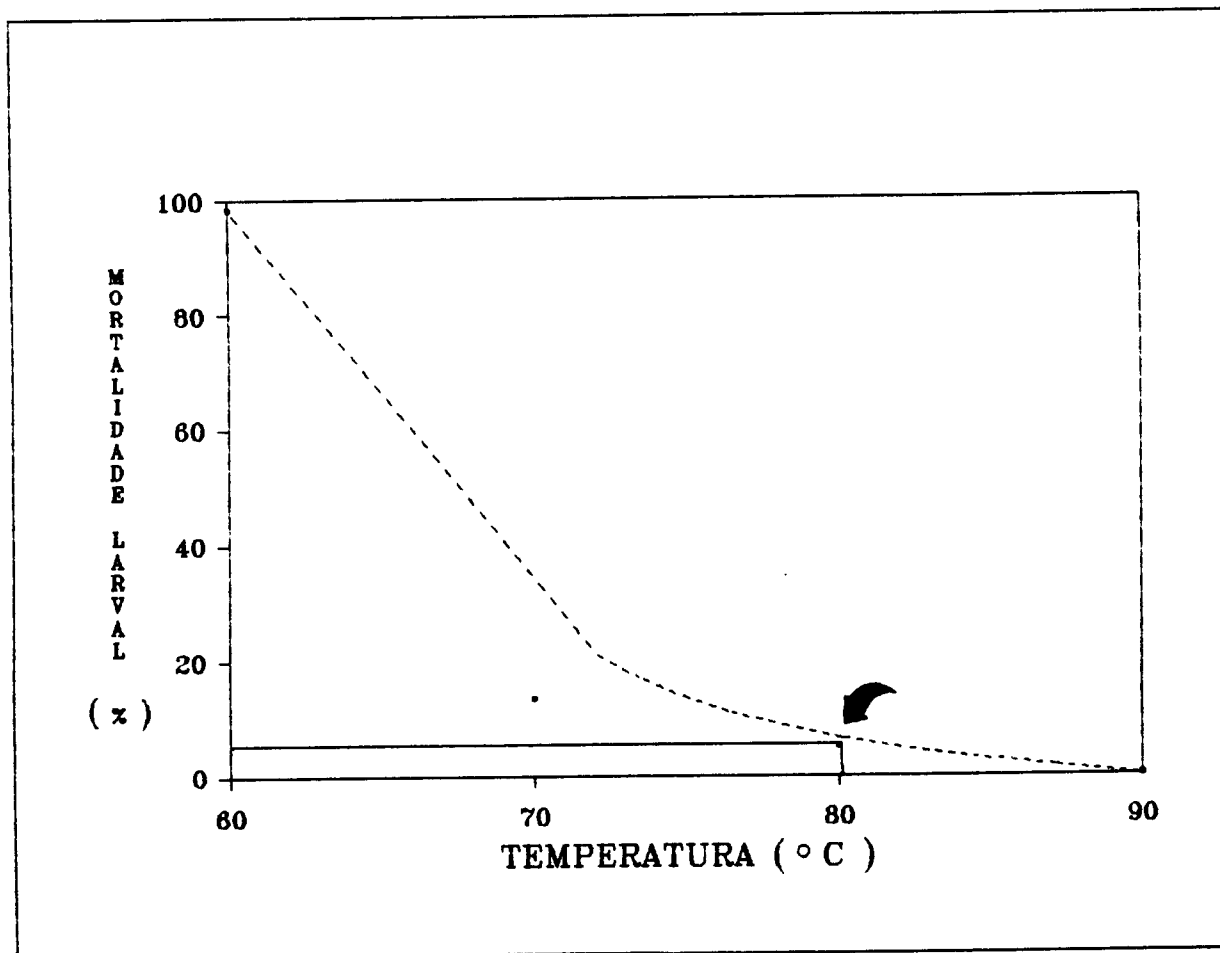


FIGURA 2: Efeito da temperatura de 60 a 90°C por 5 minutos no vírus VPNAgF2 na mortalidade de Diatraea saccharalis. Na projeção com a linha determina-se a temperatura capaz de reduzir 95% da atividade viral ou 5% de mortalidade larval (a seta mostra a intersecção da mortalidade x temperatura).

### 3.3- AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE 80°C NOS ISOLADOS VIRAIS

A tabela III revela os dados da mortalidade larval causada pelos inóculos virais: VPNAgF2T, VPNAgF3T, VPNAgF4T e VPNAgF5T, que são os inóculos submetidos a 80°C por 5 minutos (Esquema 2). Este grupo experimental foi utilizado como controle da ação da temperatura sobre as diferentes gerações virais, para verificar se a seleção genética por si só não causaria uma alteração na resposta do tratamento termico. A análise dos resultados revela que não há diferença estatística significativa da mortalidade larval entre as diferentes gerações.

**TABELA III** : MORTALIDADE LARVAL CAUSADA PELOS INÓCULOS VPNAgF2T, VPNAgF3T, VPNAgF4T e VPNAgF5T, NUMA DOSE DE 10<sup>6</sup> CRISTAIS/LARVA. (N) número total de lagartas analisadas; (M) número de lagartas mortas; ML(%) taxa de mortalidade larval.

VIRUS SUBMETIDOS * A 80°C POR 5 MIN.	N	M	ML(%)
VPNAgF2T	60	3	5,0
VPNAgF3T	60	2	3,3
VPNAgF4T	60	4	6,7
VPNAgF5T	60	3	5,0

\* As abreviações se referem ao Esquema 2.

### 3.4- PASSAGENS SERIADAS DOS VIRUS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO TÉRMICO DE 80°C

A Tabela IV mostra os dados dos vírus submetidos às passagens seriadas e temperatura, com o número de lagartas analisadas, o número de lagartas mortas e a porcentagem de mortalidade larval.

Estas passagens seriadas foram realizadas com um número maior de repetições (10 a 20) devido a baixa mortalidade larval. Isto foi necessário para permitir a obtenção de quantidades suficiente de inóculos para as passagens seriadas subsequentes e para a avaliação da mortalidade total.

Observou-se um aumento na mortalidade larval no decorrer das passagens seriadas. As lagartas mortas após a inoculação do VPNAgF4RT não apresentaram poliedros. A observação do material obtido das lagartas ao Microscópio Eletrônico não revelou a presença nem de poliedros nem de nucleocapsídeos característicos de Baculovirus.

**TABELA IV** : MORTALIDADE LARVAL CAUSADA PELO VPNAg NUMA DOSE DE  $10^6$  CRISTAIS/LARVA, SUBMETIDOS A PASSAGENS SERIADAS E TRATAMENTO TÉRMICO. (N) número total de lagartas analisadas; (M) número de lagartas mortas; ML(%) taxa de mortalidade larval.

VIRUS * INOCULADO	N	M	ML(%)
VPNAgF2T	769	31	4,03
VPNAgF3RT	390	26	6,67
VPNAgF4RT	1238	101	8,16

\* As abreviações se referem ao Esquema 2.

### 3.5- AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE PROVO- CADA PELOS ISOLADOS VIRAIS

A avaliação da mortalidade provocada pelos diferentes isolados virais foi realizada em blocos ao acaso. A Tabela V mostra o número de lagartas analisadas, o número de lagartas mortas e a porcentagem de mortalidade larval.

As lagartas infectadas com os vírus submetidos a passagens seriadas: VPNAgF2, VPNAgF3, VPNAgF4 e VPNAgF5; apresentaram os sintomas típicos de poliedrose, ou seja, pouca mobilidade, flacidez, falta de apetite e coloração esbranquiçada e verificou-se que começavam a morrer entre o 6º e 8º dia após o tratamento.

Quando estes isolados foram submetidos à ação da temperatura: VPNAgF2T, VPNAgF3T, VPNAgF4T e VPNAgF5T (dados já mostrados na tabela III); as lagartas infectadas apresentavam sintomatologia semelhante ao 1º grupo, mas a mortalidade iniciou entre o 7º e 10º dia.

No último grupo, vírus submetidos a passagens seriadas e ao tratamento térmico: VPNAgF2T, VPNAgF3RT e VPNAgF4RT observou-se como nos demais, mortalidade larval com os sintomas típicos de poliedrose e como no segundo grupo, o período entre a infecção e a morte era maior, entre o 8º e 10º dia. As lagartas, no entanto, rapidamente apresentavam melanização após a morte, dificultando a purificação e a quantificação dos cristais virais.

Verificou-se ainda que os dois últimos grupos exigiram um tempo maior (em dias) de observação, uma vez que as lagartas demoravam mais para empupar ou morrer.

Não se observou mortalidade das lagartas do grupo controle, nos quais havia sido inoculado água destilada, todas atingindo a fase de pupa.

A partir dos dados da tabela 5 observa-se a maior mortalidade para as lagartas infectadas com os virus submetidos a passagens seriadas. Os outros dois grupos provocaram mortalidade semelhantes. A partir dos dados dessa tabela foi feita a análise de variância e notou-se que só o primeiro grupo se diferenciou dos demais, mostrando uma ação efetiva de temperatura sobre a infectividade dos virus.

Os virus submetidos simultaneamente a passagem seriada e temperatura provocaram mortalidades progressivamente maiores, o que poderia levar a população mais resistentes a altas temperaturas. No entanto, este aumento não é significativo estatisticamente quando analisados em blocos ao acaso. Muitas vezes, apesar das lagartas apresentarem sintomas de poliedrose elas empupavam e sofriam metamorfose até mariposas (dados não mostrados).

**TABELA V** : MORTALIDADE LARVAL DE D. saccharalis CAUSADA PELOS INÓCULOS DOS GRUPOS I, II E III, NUMA DOSE DE  $10^6$  CRISTAIS/LARVA. (N) número total de lagartas analisadas; (M) número de lagartas mortas e ML(%) taxa de mortalidade larval.

VIRUS * INOCULADO	N	M	ML(%)
VPNAgF2	59	59	100,0
VPNAgF3	60	60	100,0
VPNAgF4	58	58	100,0
VPNAgF5	60	60	100,0

VPNAgF2T	60	3	5,0
VPNAgF3T	60	2	3,3
VPNAgF4T	60	4	6,7
VPNAgF5T	60	3	5,0

VPNAgF2T	60	3	5,0
VPNAgF3RT	60	4	6,7
VPNAgF4RT	60	5	8,3

H <sub>2</sub> O	60	0	0,0
------------------	----	---	-----

\* As abreviações se referem ao Esquema 2.



### 3.6- AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VIRUS

A tabela VI mostra a produção de cristais virais nas lagartas mortas por infecção com VPNAg nas diferentes gerações, submetidas a passagens seriadas e a passagens seriadas e tratamento térmico.

Os dados (tabela VI) mostram que houve diminuição da produção de cristais virais por peso larval (g) dos vírus submetidos a passagens seriadas e temperatura: VPNAg2T, VPNAgF3RT e VPNAgF4RT, quando comparados com os não submetidos ao tratamento térmico: VPNAgF2, VPNAgF3 e VPNAgF4.

A produção foi realizada utilizando uma única dose. No entanto, no grupo submetido ao tratamento térmico não foi considerado a porcentagem da redução da atividade viral.

O inóculo de VPNAgF2 resultou numa produção média (de VPNAgF3) de  $1,7 \times 10^9$  cristais/g de peso larval, enquanto VPNAgF2T resultou numa produção média (de VPNAgF3RT) de  $2,2 \times 10^9$  cristais/g de peso larval, ou seja, cerca de 8 vezes menor.

O inóculo de VPNAgF3 resultou numa produção média (de VPNAgF4) de  $1,6 \times 10^9$  cristais/g de peso larval, enquanto VPNAgF3RT resultou numa produção média (de VPNAgF4RT) de  $1,0 \times 10^9$ , ou seja, 16 vezes menor.

O inóculo de VPNAgF4 resultou numa produção média (de VPNAgF5) de  $1,4 \times 10^9$  cristais/g de peso larval, enquanto que a avaliação da produção de VPNAgF5RT a partir de lagartas infectadas com VPNAgF4RT não foi possível. As lagartas que morriam apresentavam sintomas típicos de poliedrose. Embora a análise dos tecidos larvais e da hemolinfa dessas lagartas ao microscópio óptico não tenham revelado a presença de poliedros em seu interior, as células não possuíam aspecto normal, encontrando-se na maioria das vezes, destruídas.

Outra diferença observada entre os dois grupos experimentais foi em relação a remoção de contaminantes (restos celulares, bactérias, etc.) através do processo de centrifugação diferencial. Este procedimento foi bastante eficiente para o grupo experimental submetido a passagens seriadas, pois a observação ao microscópio óptico revelou a presença de cristais virais purificados (FIGURA 3). Para o grupo submetido a passagens seriadas e tratamento térmico o processo de remoção por centrifugação não resultou na limpeza do material. A observação ao microscópio óptico revela isto para os isolados VPNAgF3RT e VPNAgF4RT (FIGURAS 4 e 5).

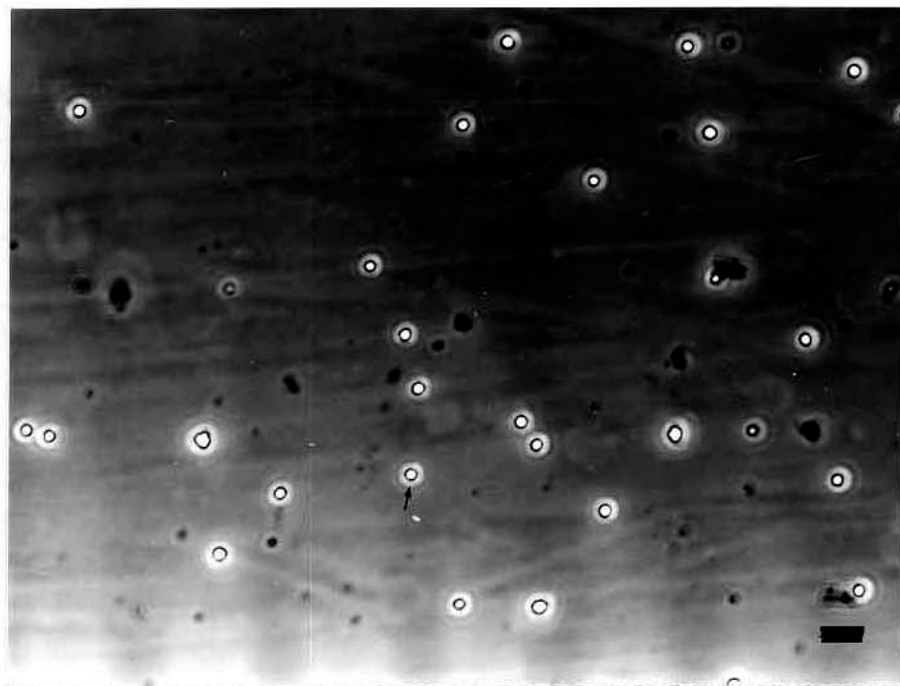
Os vírus submetidos ao tratamento térmico e passagens seriadas provocam mortalidade larval num tempo maior que os submetidos a passagens seriadas: o que obviamente resulta em lagartas maiores e mais pesadas, no entanto, o número de lagartas mortas por infecção viral é bem menor em relação ao segundo grupo.

Uma avaliação da produção de cristais virais por grama de peso larval, apresenta diferença estatística significativa entre os dois grupos experimentais. Por outro lado, pelos motivos acima expostos, a produção por lagarta infectada não apresenta diferenças estatísticas significantes (TABELA VI).

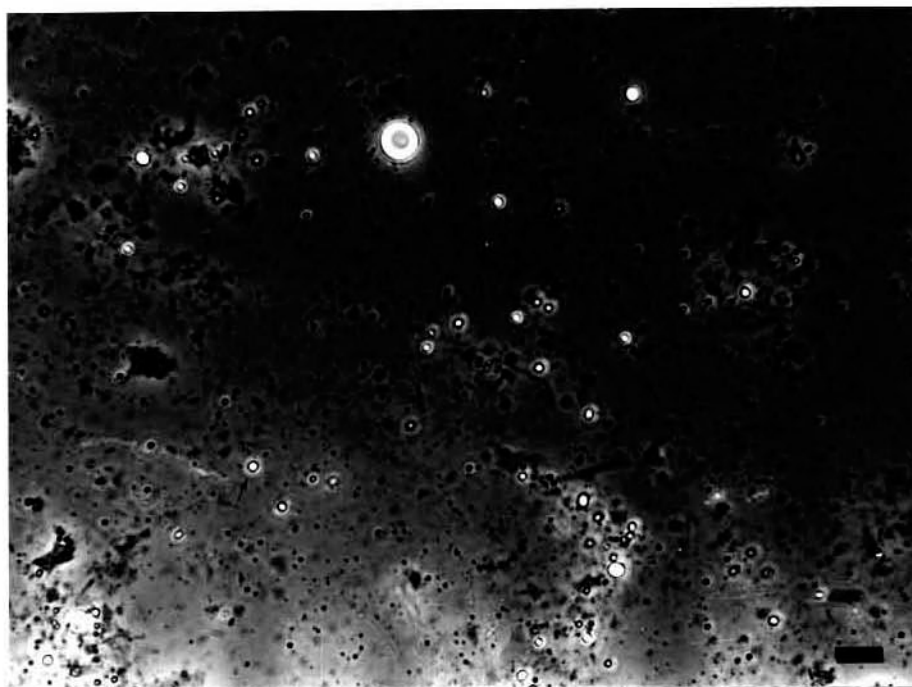
**TABELA VI** : PRODUÇÃO MÉDIA DE CRISTAIS VIRAIS, POR GRAMA DE PESO LARVAL E POR LAGARTA MORTA POR INFECÇÃO DOS ISOLADOS DE VPNAg EM D. saccharalis.

VIRUS INOCULADO	VIRUS OBTIDO	PRODUÇÃO DE CRISTAIS VIRAIS	
		GRAMA DE PESO LARVAL t	LAGARTA MORTA t*
VPNAgF2	VPNAgF3	1,7 x 10 <sup>9</sup> a	3,5 x 10 <sup>7</sup> c
VPNAgF3	VPNAgF4	1,6 x 10 <sup>9</sup> a	4,1 x 10 <sup>7</sup> c
VPNAgF4	VPNAgF5	1,4 x 10 <sup>9</sup> a	3,8 x 10 <sup>7</sup> c
VPNAgF2T	VPNAgF3RT	2,2 x 10 <sup>8</sup> b	2,5 x 10 <sup>7</sup> c
VPNAgF3RT	VPNAgF4RT	1,0 x 10 <sup>8</sup> b	2,5 x 10 <sup>7</sup> c
VPNAgF4RT	VPNAgF5RT	-----	-----

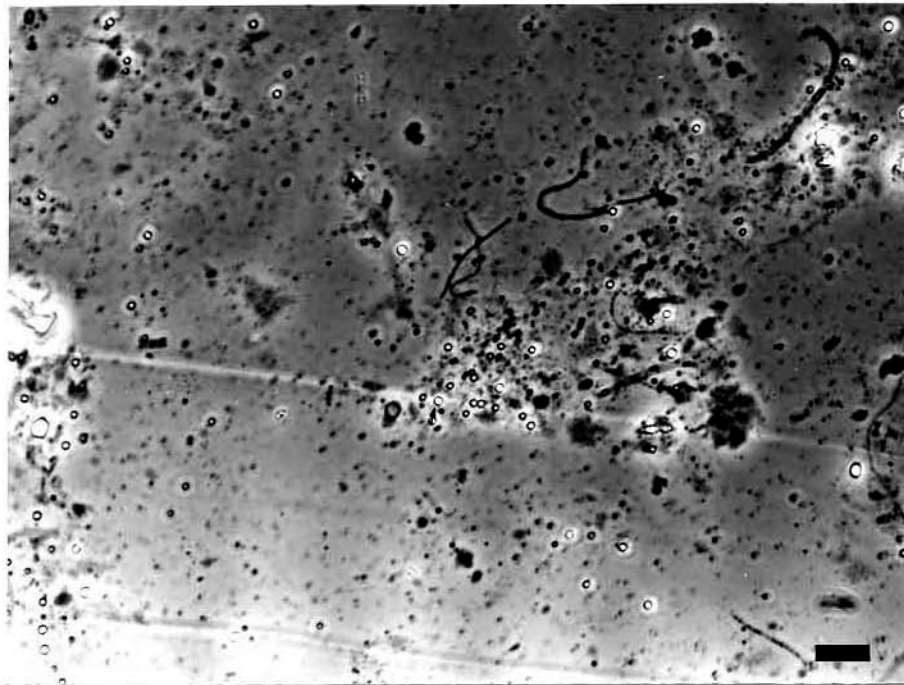
\* letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05) de acordo com o teste t-Student.



**FIGURA 3:** Micrografia do isolado VPNAgF2 (barra = 5  $\mu\text{m}$ ).  
A seta indica um cristal viral.



**FIGURA 4:** Micrografia do isolado VPNAgF3RT (barra = 5  $\mu$ m).  
A seta indica um cristal viral.

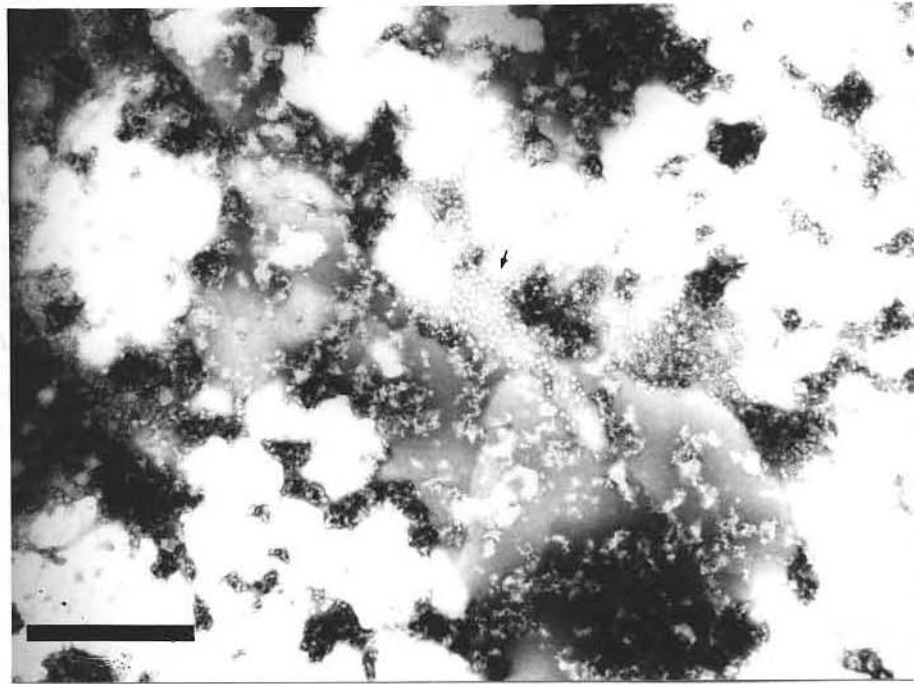


**FIGURA 5:** Micrografia do isolado VPNAgF4RT (barra =5  $\mu$ m).  
A seta indica um cristal viral.

### 3.7 - APARECIMENTO DO VIRUS DE DENSONUCLEOSE

Observações das soluções virais ao microscópio eletrônico revelaram a presença de outras partículas virais que por características morfológicas foram classificadas como Densovirus.

As soluções virais utilizadas nas passagens seriadas, submetidas ou não ao tratamento térmico foram avaliadas e as partículas de Densovirus foram detectadas em todos os inóculos. Estas partículas não foram detectadas na solução viral de VPNAg obtida das lagartas de Anticarsia gemmatalis. Na solução obtida após a terceira passagem seriada e submetidos ao tratamento térmico (VPNAgF5RT), encontrou-se apenas partículas de Densovirus sendo que nem poliedros nem nucleocapsídeos característicos foram observados (FIGURA 6).



**FIGURA 6** : Micrografia eletrônica do material obtido após purificação das lagartas submetidas a 3ª passagem seriada e ao tratamento térmico (barra =  $0,5 \mu\text{m}$ ). A seta indica partículas semelhantes a Densovirus.



#### 4 - DISCUSSÃO

A mortalidade larval provocada pelos isolados VPNAgF2, VPNAgF3, VPNAgF4 e VPNAgF5 difere das encontradas por RIBEIRO (1985). Com uma dose viral de  $10^6$  cristais/larva, RIBEIRO (1985) encontrou mortalidades larvais crescentes, no decorrer das passagens seriadas, que variaram de 59,2% a 93% enquanto no presente trabalho a mortalidade foi 100% em todos os casos. Tanto neste trabalho como no de RIBEIRO (1985) a população original de VPNAg foi obtida de lagartas de Anticarsia gemmatalis infectadas com este vírus, tratando-se portanto de populações virais geneticamente heterogêneas. Populações heterogêneas caracterizam-se por apresentar alguns nucleocapsídeos com sequências gênicas distintas. No caso do VPNAg há vários tipos de nucleocapsídeos, que apesar de não apresentarem variação geográfica, formam durante o processo de infecção várias combinações e produzem produtos finais distintos geneticamente (MARUNIAK, 1989). Uma vez que as populações virais aqui utilizadas diferem das utilizadas por RIBEIRO (1985), possivelmente a usada neste trabalho é mais eficaz para provocar mortalidade em Diatraea saccharalis. Esta suposição é reforçada pelos dados de mortalidade larval obtidos por GARCIA-CANEDO (1989) que usou em seu trabalho a mesma população viral deste e também relatou resultados com mortalidades larvais mais elevadas que os obtidos por RIBEIRO (1985). Uma vez que nos 3 (três) trabalhos foi utilizada a mesma população de insetos parece improvável que esta tenha se tornado mais susceptível ao vírus, já que alterações genéticas em eucariotos são mais complexas.

A exposição de entomovirus, que possuem estruturas cristalinas a temperaturas elevadas por poucos minutos provoca sua inativação (JAQUES, 1985). A temperatura de 80° C por 5 minutos no inóculo VPNAgF2 mostrou alguma retenção da atividade viral, parecendo ser a temperatura que causa redução da atividade viral entre 90 e 95% nos Virus de Poliedrose Nuclear (GUDAUSKAS & CANNERDAY, 1968; STUERMER & BULLOCK 1968; RIBEIRO & PAVAN 1985; RIBEIRO, 1989).

Outro fator que pode prejudicar a virulência é o aquecimento e resfriamento rápido dos virus. A queda até a temperatura ambiente ocorreu num período aproximado de 10 minutos, bem mais brusca da que ocorreria naturalmente no campo.

O efeito da temperatura de 80° C por 5 minutos nos isolados VPNAgF2, VPNAgF3, VPNAgF4 e VPNAgF5 provocou inativação com níveis semelhantes, mostrando que as modificações biológicas sofridas durante as passagens não causaram alteração significativa na tolerância à temperatura, como os resultados obtidos por RIBEIRO (1989).

O grupo experimental de virus submetido a passagens seriadas e ao tratamento térmico também não mostrou aumento significativo na mortalidade larval. A pressão seletiva da temperatura não selecionou virus termoresistentes. A obtenção de virus resistentes a temperaturas elevadas é difícil, pois são necessárias

mudanças no complexo enzimático e na sequência de aminoácidos das proteínas estruturais (WITT & HINK, 1979; KLIBANOV & AHERN, 1987).

Quando se compara o tempo (em dias) necessário para observar a mortalidade dos insetos entre os dois grupos experimentais, virus submetidos a passagens seriadas e virus submetidos a passagens seriadas e ao tratamento térmico, nota-se que para o último grupo era maior. Doses reduzidas aumentam o tempo de mortalidade larval (RIBEIRO, 1985, 1989; RODRIGUES, 1989). A quantificação do material após a exposição ao tratamento térmico não mostrou diminuição significativa dos cristais virais, portanto o número de poliedros inoculados nas lagartas não se diferenciou do grupo controle. No entanto, provavelmente o número de partículas virais realmente infectivas era menor que o número de partículas quantificadas, representando portanto, uma dose menor. Além disso, muitas lagartas que apresentaram sintomas de poliedrose acabaram empupando e somente algumas sofreram metamorfose até mariposas, mostrando que os virus submetidos ao tratamento térmico, conseguiam desenvolver o processo de infecção, mas não suficiente para provocar mortalidade larval. Porém, um número menor de emergências de adultos corrobora dados de mortalidade pupal característicos da inoculação de doses menores (GARCIA-CANEDO, 1989).

O processo de purificação levou a resultados distintos nos diferentes grupos experimentais mostrando que a centrifugação diferencial foi mais eficiente para remoção de contaminantes no grupo de vírus submetidos a passagens seriadas. O outro grupo apresentou uma maior concentração de contaminantes mesmo após a centrifugação. A eficiência deve ter sido menor devido a concentração maior de contaminantes deste grupo. Esta concentração maior pode estar relacionada com o tempo necessário para os vírus provocarem a mortalidade larval. O processo mais lento facilitaria a ação de patógenos oportunistas, devido a fragilidade das lagartas decorrente da infecção viral. A ausência destes contaminantes no isolado VPNAgF2T pode ser explicado, pois ele foi obtido a partir do isolado VPNAgF2 submetido ao tratamento térmico.

Para a comparação da produção de vírus, o mais adequado é escolher doses que provoquem mortalidades semelhantes permitindo assim uma padronização dos efeitos de cada isolado, a fim de evitar as discrepâncias causadas pela diferença no tempo de mortalidade larval (RODRIGUES, 1989). Entretanto, neste trabalho foi utilizada uma única dose ( $10^6$  cristais/larva) para os diferentes isolados e que provocaram mortalidades distintas devida a diferença dos tratamentos (submetidos ou não ao tratamento térmico). Como o objetivo foi observar o efeito da temperatura, a avaliação da produção de cristais do vírus inoculado foi feita utilizando-se uma única dose.

Assim, observa-se nos resultados que a produção de vírus, quando avaliada por grama de peso larval mostrou ser mais eficiente no grupo submetido a passagens seriadas e semelhante em ambos os grupos, quando avaliadas por número de lagartas.

A grande diferença de peso das lagartas mortas por infecção viral nos dois grupos mostra claramente um grau menor de infecção do grupo de vírus submetidos a passagens seriadas e tratamento térmico; assim a avaliação de produção de cristais virais por grama de lagarta é uma medida mais apropriada do desenvolvimento da infecção.

Uma outra observação da produção de cristais virais foi a tendência à diminuição no grupo de vírus submetidos a passagens seriadas e tratamento térmico. Esta diminuição chegou ao extremo, quando a inoculação de VPNAgF4RT não produziu poliedros. No entanto, a inoculação deste vírus provocou mortalidade larval com sintomatologia externa típica de poliedrose, porém nem na análise dos tecidos larvais ao microscópio óptico nem no processo de purificação foram observados poliedros. Resultados semelhantes foram obtidos por RODRIGUES (1989) pois após 5 passagens seriadas do VPNAc no hospedeiro alternativo, Diatraea saccharalis, notou que poliedros não podiam ser mais encontrados.

A diminuição da produção de cristais virais no decorrer das passagens seriadas em hospedeiro alternativo e tratamento térmico como agentes seletivos, poderiam resultar na diminuição da capacidade dos vírus em realizar seu ciclo bifásico de crescimento ou seja, produção de vírus não-occlusos seguida pelos vírus oclusos ou poliedros dentro do núcleo da célula hospedeira (infecção primária e secundária, respectivamente). Os vírus não oclusos passariam a ser o principal produto da multiplicação. Isto já foi observado em relação a passagens seriadas de VPNs em cultura de células por MILLER & MILLER (1982). Com vírus não oclusos como principal produto da multiplicação, a desvantagem destes como inseticidas biológicos é clara, pois sendo a matriz proteica do poliedro um agente maior de proteção ao ambiente externo, inúmeros problemas ocorreriam, principalmente elevação de custo do bioinseticida (MILLER, 1988).

O número reduzido de cristais virais pode estar relacionado com os mutantes espontâneos que produzem poucos poliedros (FP - do inglês "few polyhedra") como resultado de contínuas passagens seriadas quando inocula-se vírus do tipo MP (do inglês "many polyhedra"). Isto já foi descrito por muitos autores em culturas de células e o aparecimento destes mutantes (FP) parece estar relacionado com a inserção de um elemento genético transponível do tipo "copia-like" proveniente das células hospedeiras (BURAND & SUMMERS, 1982; MILLER & MILLER, 1982; BEAMES & SUMMERS, 1988). A observação do material obtido das lagartas inoculadas com

VPNAgF4RT em microscópio eletrônico não mostrou a presença de nucleocapsídeos típicos de Baculovirus descartando assim, a possibilidade de tratar-se de mutantes semelhantes a FP.

Outra razão para diminuição de produção de cristais poderia ser a ativação de um vírus oculto que resulte na inibição da multiplicação dos vírus inoculados. O processo de passagens seriadas com um vírus estranho permite ao vírus oculto se desenvolver, transformando-se numa infecção característica. O fator capaz de ativar o vírus latente poderia ser uma proteína do vírus estranho ou alguma(s) substância(s) do hospedeiro (MALEKI-MILANI, 1978; JURKOVICOVA, 1979; PAVAN *et al.*, 1981; KELLY *et al.*, 1981). O tratamento térmico provoca a redução da atividade viral, no entanto não ocorreu diminuição da quantidade de proteínas. A baixa concentração de VPN ativo facilitaria eliminação deste vírus num processo tipicamente competitivo.

Análise ao microscópio eletrônico revelou a presença de partículas nas soluções virais que por morfologia característica foram identificadas como Virus de Densonucleose (VDN). Estas partículas foram observadas nas soluções virais de VPNAg obtidas após as passagens seriadas, submetidas ou não ao tratamento térmico.

Parece tratar-se, portanto, de ativação de um vírus latente (VDN) provocada pela inoculação no hospedeiro de um vírus estranho (VNPAg), incrementada pelo efeito das passagens seriadas (KRIEG, 1957; LONGWORTH & CUNNINGHAM, 1968; MAKELI-MILANI, 1978; JURKOVICOVA, 1979; KELLY *et al.*, 1981; McKINLEY *et al.*, 1981; PAVAN *et al.*, 1981).

Entretanto, CAVALLARO (1988) também detectou partículas de VDN durante o processo de purificação de lagartas de *Diatraea saccharalis* que haviam sido inoculadas com VGDS, tratando-se portanto de ativação de vírus oculto, provavelmente provocada por vírus do próprio hospedeiro.

Apesar de ter-se usado uma população de insetos na qual as lagartas eclodiram a partir de ovos desinfetados, evitando a contaminação com outros vírus (GRONER, 1986), a inoculação oral de vírus, estranhos ou não as lagartas, parece ter favorecido a ativação de um vírus oculto. Trabalhos utilizando a mesma população de insetos corroboram a hipótese da presença de vírus latente na população aqui utilizada (CAVALLARO, 1988; RODRIGUES, dados não publicados; RIBEIRO, dados não publicados).

Uma vez que caracterização mais detalhada do VDN aqui encontrado não foi realizada, poder-se-ia pensar que o próprio vírus original (VPNAg) proveniente de uma população de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* contivesse o VDN. Porém a ausência destes em observação ao microscópio eletrônico descarta esta hipótese.



A presença simultânea dos dois vírus, VDN e VPNAg nos inóculos evidencia uma infecção mista nas lagartas de Diatraea saccharalis.

Quando as populações virais de VPNAg foram submetidas a passagens seriadas, a infecção mista entre VDN e VPNAg parece ter apresentado o fenômeno de interferência favorecendo a multiplicação do VPNAg. O processo de multiplicação dos VPN é mais rápido que o de VDN e sendo ambos agentes infecciosos do núcleo celular a competição por esta estrutura favorece o primeiro. Além disso, durante o desenvolvimento da infecção viral dos VPN, os nucléolos das células hospedeiras são rapidamente destruídos e estes são essenciais à multiplicação dos VDN (KURSTAK & GARZON, 1975).

Já, quando VPNAg foi submetido a passagens seriadas e tratamento térmico, os VDN parecem ter ganho a competição. A ação do tratamento térmico talvez seja o fator de diferença, porque vírus sem estruturas de matriz proteica, como são os VDN, toleram melhor a ação de temperaturas elevadas (KELLY, 1980). A inativação pelo calor de soluções virais realmente reduz a ação de interferência favorecendo o desenvolvimento dos VDN e prejudicando os VPN (WHITLOCK, 1977; KELLY, 1980).

Parece, portanto, que o VDN, durante o processo de infecção mista com VPN, foi menos eficiente. No entanto, quando os inóculos foram submetidos ao tratamento térmico ocorreu uma vantagem para os VDN evidenciando uma maior termoresistência.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Foi analisada a multiplicação de vírus patogênicos de inseto no hospedeiro Diatraea saccharalis, sendo um deles inoculado e o outro latente.

O Vírus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis foi inoculado no hospedeiro alternativo Diatraea saccharalis e apresentou bom desenvolvimento neste inseto. No entanto, os VPNAg induziram a ativação de um vírus latente, VDN, estabelecendo uma infecção mista.

A inoculação do VPNAg foi realizada em duas condições experimentais: a) vírus ativo e b) vírus parcialmente inativado por tratamento térmico.

Primeiramente, foi definido experimentalmente o tempo de tratamento térmico que reduzisse a atividade dos vírus inoculados ao nível desejado. Esses vírus foram passados por três gerações em lagartas de Diatraea saccharalis, analisando-se a mortalidade para verificar possíveis alterações da resistência térmica. Analisou-se ainda, a produção de cristais virais pelos hospedeiros infectados para medida dos níveis de infecção. Foi realizada também, a observação em microscópio eletrônico dos isolados obtidos, verificando-se a possível presença de outros patógenos.

Os dados de mortalidade larval revelaram que o grupo inoculado com vírus apresentou mortalidade elevada com alta produção de VPNAg.

No segundo grupo não foi observado aumento da resistência do VPN ao tratamento térmico, medido através da mortalidade larval, ao longo das passagens seriadas. Sob este tratamento, ocorreu uma redução gradual da produção dos cristais virais, chegando a ausência após a terceira passagem seriada.

A análise dos isolados virais ao microscópio eletrônico mostrou a presença de Densovirus e VPN no grupo inoculado com vírus ativo. O grupo no qual os vírus foram parcialmente inativados por tratamento térmico apresentou resultados semelhantes, com exceção do material obtido após a terceira passagem seriada, o qual mostrou apenas a presença de Densovirus. Neste caso, também não foram observados nucleocapsídeos característicos de Baculovirus.

Estes resultados levaram às seguintes conclusões:

- a) A infecção por VPNAg mostrou-se eficiente durante as passagens seriadas por Diatraea saccharalis:
- b) O tratamento térmico evidenciou uma maior termoresistência do VDN, quando em infecção mista com VPN.

## 6. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The development of two pathogenic entomoviruses was analysed in the host Diatraea saccharalis being one inoculated and the other latent.

Anticarsia gemmatalis Nuclear Polyhedrosis Virus was inoculated in the alternate host Diatraea saccharalis and presented normal development in this insect. However, AgNPV induced activation of a latent virus, DNV, setting up a double infection.

AgNPV inoculation was carried out in two experimental approaches: a) active virus; b) partially inactivated virus by thermal treatment.

Initially, the time of thermal treatment was defined experimentally in order to reduce the activity of inoculated viruses into the desired level. These viruses were passed through three generations of Diatraea saccharalis larvae being the mortality analysed to verify possible alterations of thermal resistance. The production of viruses by infected hosts was also analysed to measure infection levels. The observation in electron microscope was performed to observe the possible presence of other pathogens.

Mortality data revealed that the group inoculated with active virus presented high mortality with high production of AgNPV.

In the second group it was not observed an increase of resistance of NPV along the serial passages. Under this treatment occurred a gradual decrease of production of viruses until absence after the third serial passage.

The analysis of viruses in electron microscope showed the presence of Densovirus and NPV in the group inoculated with active virus. The group in which the viruses were partially inactivated by thermal treatment presented similar results, except for the material obtained after the third serial passage which showed just the presence of Densovirus. In this case it was not observed typical nucleocapsides of Baculovirus.

These results brought about the following conclusions:

- a) the serial passages by Diatraea saccharalis show to be efficiency of infection by AgNPV;
- b) the thermal treatment showed a higher thermoresistance of DNV, when in double infection with NPV.

## 7 - BIBLIOGRAFIA

ACKERMAN, H. W. & SMIRNOFF, W. A. (1983): A morphological investigation of 23 baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 41 : 269-280.

AIZAWA, K. (1975): Selection and strain improvement of insect pathogenic microorganisms for microbial control *Jaq. Int. Biol. Prog.*, 7 : 99-105.

ALI, S. & SIKOROVSKI, P.P. (1986): Effect of sunlight, cotton - foliage , surface and temperature on the infectivity of cytoplasmic polyhedrosis virus to Heliothis virescens larvae (Lep.: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 79 : 364-367.

ALLEN, G.E. & KNELL, J. D. (1977): A nuclear polyhedrosis virus of Anticarsia gemmatalis I. Ultrastructure, replication and pathogenicity. *Florida Entomol.*, 60 : 233-240.

AMARGIER, A.; VAGO, C. & MEYNADIER, G. (1965): étude histopathologique d'un nouveau type de virose mis en évidence chez le lépidoptère Galleria mellonella. **Arch. Ges. Virusforsch**, 15 : 659-667.

----- (1968) : Un complexe de viroses : polyédrie nucléaire et densonucléose chez le lépidoptère Galleria mellonella. **Mikroskopie**, 23 : 245-251.

BEAMES, B. & SUMMERS, M.D. (1988): Comparison of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants. **Virology**, 162 : 206-220.

BEDFORD, G. O. (1981) : Control of the Rhinoceros beetle by baculovirus. In : BURGESS, H. D. (ed.) : **Microbial control of insects, mites and plant diseases**, London, Acad. Press., cap. 20.

BEER, C. P. (1980) : On the origin of polyhedral protein of the nuclear polyhedrosis virus of Autographa californica. PhD : Thesis, Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Netherland.

- BERGOLD, G.H. (1958) : Viruses of insects. In: HALLAVER, & MEYER, K.F. (ed.) : **Handbuck der virus for chung**, Viena, Springer, V.4, p. 60-142.
- BILIMORIA, S. L. (1986) : Taxonomy and identification of baculoviruses. In GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (ed.) : op. cit. , v.1, p. 37-59.
- BOEMARE, N. ; CROIZIER, G. & VEYRUNES, J. C. (1970): Contribution a la connaissance des proprietes du virus de la denonucléose. **Entomophaga**, 15 : 327-332.
- BULLOCK, H. R. (1967) : Persistence of Heliothis Nuclear Polyhedrosis Virus on cotton foliage. **J. Invertebr. Pathol.**, 9 : 434-436.
- ; HOLLINGESWORTH, J. P. & HARTSACK JR., A. W. (1970) : Virulence of Heliothis Nuclear Polyhedrosis Virus exposed to monochromatic ultraviolet irradiation. **J. Invertebr. Pathol.**, 16 : 419-422.
- BURAND, J. P. & SUMMERS, M. D. (1982) : Alteration of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus DNA upon serial passage in cell culture. **Virology**, 119 : 223-229.



BURGESS, S. (1977) : Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNAs : derivation by electron microscopy. *J. Gen. Virol.*, 37 : 501-510.

CARNER, G. E. & TURNISPEED, S. G. (1977) : Potential of a nucleopolyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *J. Econ. Ent.*, 70 : 608-610.

CARSTENS, E. B. ; LIN-BAI, Y. & FAULKNER, P. (1987) : A point mutation in the polyhedrin gene of a baculovirus Autographa californica MNPV, prevents crystallization of occlusion bodies. *J. Gen. Virol.*, 68 : 901-905.

CASTRO, N.; PAVAN, O. H. O. & RODRIGUES, J. J. S. (1989): Efeito de temperatura no Vírus de Poliedrose Nuclear de Anticarsia gemmatalis no hospedeiro alternativo, Diatraea saccharalis. *Ciência e Cultura*, 41 : 771.

CAVALLARO, A. C. (1988) : Método de Purificação do vírus de Granulose de Diatraea saccharalis (Fabr., 1794) : VGDs e caracterização proteica de seu principal componente proteico, Campinas, Tese(Mestrado), UNICAMP, IB.

COCHRAN, M. A.; BROWN, S. E. & KNUDSON, D. L. (1986) :  
Organization and expression of the baculovirus genome.  
In : GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (ed) : op.  
cit., V1, p. 239-258.

CONSIGLI, R. A.; TWEETEN, K. A.; ANDERSON, D. K. & BULLA,  
A. (1983) : Granulosis viruses, with emphasis on  
the GV of the indian meal moth, Plodia interpunctella.  
Adv. Virus Res., 28 : 141-173.

CORSO, I.C. ; GARZON , D. L., OLIVEIRA, E. B. & GATTI,  
I. M. (1977) : Ocorrência de poliedrose nuclear em  
Anticarsia gemmatalis Hubner, 1818 na região sul do  
Brasil. Anais Soc. Ent. Bras., 6 : 312-314.

DA CUNHA, A. B. ; PAVAN, C.; BIESELE, J.J.; RIESS, R. W.  
& SIMÕES, L.C.G. (1972): An ultrastructural study of  
the development of a nuclear polyhedrosis with effects  
on giant polythene chromosomes. Univ. Texas Publ.  
Apud: MORGANTE, J.S. (1972) : Rhynchosciara angelae:  
Aspectos da Ecologia e da Patologia Celular induzida  
por virus de poliedrose nuclear. Tese de doutoramento  
Depto. de Biologia IB/USP, São Paulo, 105p.

DAVID, W. A. L. & GARDINER, B. O. C. (1967) : The effect of heat, cold, and prolonged storage on a granulosis virus of Pieris brassicae. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 555-562.

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

GALLO, D., NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, T. R. P.; ZUCCHI, R. A. & ALVES, S.B. (1978) : **Manual de Entomologia Agrícola**, São Paulo, Ed. Agronômica Ceres Ltda., 531 p.

GARCIA - CANEDO, A. M. G. (1989) : **Infeção mista em Diatraea saccharalis (Fabr., 1794) (Lep.: Pyralidae) com dois Baculovirus.** Dissertação de Mestrado, UNICAMP, IB.

GATTI, I. H.; SILVA, D. M. & CORSO, I. C. (1977): Polyhedrosis occurrence in caterpillars of Anticarsia gemmatalis (Hubner) in the south of Brazil. *Infect. Dis.*, 5 : 136-138.

GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (1986) : **The biology of baculoviruses**, Florida, CRC Press, 2 vol.

----- & WILLIAMS, K. A. (1986): **In vivo infection and replication of baculoviruses**. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (ed.): op. cit., v. 1, p. 89-100.

GRONER, A. (1986): Specificity and safety of baculoviruses  
In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (ed) : op. cit.,  
vol. 1, p. 177-202.

GUDAUSKAS, R. T. & CANERDAY, D. (1968) : The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration, and ultra-violet light on the infectivity of Heliothis and Trichoplusia Nuclear Polyhedrosis Viruses. J. Invertebr. Pathol., 12 : 405-411.

HARPAZ, I. & RACCAH, B. (1975) : Nucleopolyhedrosis virus (NPV) of the egyptian cotton-worm, Spodoptera littoralis (Lep.: Noctuidae) : temperature and pH relations, host range and synergism. J. Invertebr. Pathol. 32 : 368-372.

HENSLEY, S. D. & HAMMOND, J. R. A. M. (1968) : Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **J. Econ. Entomol.** 61 : 1742-1743.

HOSTETTER, D. L. & BELL, M. R. (1985) : Natural dispersal of baculoviruses in the environment. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. E. : *op. cit.*, p. 249-284.

HUGER, A. (1963) : Granulosis of insects. In: STEINHAUS, E. A. (ed.) : **Insect Pathology and advanced treatise**, New York, Acad. Press, V. 1, cap. 16.

HUNTER, D. K.; HOFFMANN, D. F. & COLLIER, S. J. (1976) : Cross infection of a nuclear polyhedrosis virus of the almond moth to the indian meal moth. **J. Invertebr. Pathol.**, 22 : 186-192.

IGNOFFO, C. M. (1968) : Specificity of insect viruses. **Bull. Ent. Soc. Am.** 14 : 265-268.

JQUES, R. P. (1978) : Manipulation of the environment and the increase of effectiveness of microbial agents. In: ALLEN, G. E.: IGNOFFO, C. M. & JQUES, R. P.(ed.): **Microbial Control of Insect Pests : Future strategies in pest management systems**, Gainesville, National Science Foundation, p. 72-85.

\_\_\_\_\_ (1985) : Stability of insect virus in the environment. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E. (ed.) op. cit., p. 285-360.

JURKOVIKOVA, M. (1979) : Activation of latent virus infections in larvae of Adoxophyes orana (Lep.: Tortricidae ) and Brathria brassicae (Lep. : Noctuidae) by foreign polyhedra. *J. Invertebr. Pathol.* 34 : 213-223.

KAWASE , S. (1985) : Pathology associated with densovirus. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. E. (ed); op. cit., p. 197-232.

KELLY, D. C.; BARWISE, A. H. & WALKER, J. O. (1977): DNA contained by two densovirus. *J. Virol.*, 81 : 396-407.

----- (1980) : Suppression of baculovirus and iridescent virus replication in dually infected cells. **Microbiologica**, 3 : 177-201.

----- : LESCOTT, T. ; AYRES, M. D. ; CAREY, D. ; COUTTS, A. & HARRAP, K. A. (1981) : Induction of a nonoccluded baculovirus persistently infecting Heliothis zea cells by Heliothis armigera and Trichoplusia ni Nuclear Polyhedrosis Viruses. **Virology**, 112 : 174-189.

KLIBANOV, A. M. & AHERN, T. J. (1987) : Thermal stability of proteins. In : LISS, H. R. (ed) : **Protein engineering**. New York, Acad. Press, p. 213-218.

KRIEG, A. (1957) : "Tholeranzphanomen" und latenzproblem. **Arch. Ges. Virusforsch**, 7 : 212-219.

KURSTAK, E. (1972) : Small DNA denonucleosis virus (DNV) **Adv. Virus Res.**, 17 : 207-241.

----- & GARZON, S. (1975) : Multiple infections of invertebrate cells by viruses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 266 : 232-240.

- LATHIKA, D. & JACOB, A. (1974) : Effect of temperature and sunlight on the infectivity of a Nuclear Polyhedrosis Virus of Spodoptera mauritia (Boisduval). *Curr. Sci.*, 43 : 587-588.
- LEWIS, L. C.; LINCH, R. E. & JACKSON, J. J. (1977) : Pathology of a baculovirus of the alfalfa looper, Autographa californica, in the European corn borer, Ostrinia ubilalis. *Environ. Entomol.*, 6 : 535-540.
- LONGWORTH, J. F. & CUNNINGHAM, J. C. (1968): The activation for occult nuclear polyhedrosis viruses by foreign polyhedra. *J. Invertebr. Pathol.*, 10 : 361-367.
- LOWE, R. E. & PASCHKE, J. D. (1968) : Pathology of a double viral infection of Trichoplusia ni. *J. Invertebr. Pathol.*, 12 : 438-443.
- MACEDO, N. & BOTELHO, P. S. M. (1988) : Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, Diatraea saccharalis (Fabr., 1794). (Lep.: Pyralidae). *Brasil Açucareiro*, 106 : 2-12.



MALEKI - MILANI, H. (1978): Influence de passages répétés du virus de la polyhedrose nucléaire de Autographa californica chez Spodoptera littoralis (Lep.: Noctuidae). **Entomophaga**, 23 : 217-224.

MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. E. (1985) : **Viral insecticides for biological control**. Orlando, Acad. Press. 809 p.

MARTIGNONI, M.E. & IWAI, P.J. (1977): Thermal inactivation characteristics of two strains of Nuclear Polyhedrosis Virus (Baculovirus sub-group A) pathogenic for Orgyia pseudotsugata. **J. Invertebr. Pathol.**, 30 : 255-262.

-----; STELLER, M. J. & IWAI, P. J. (1982) : Baculovirus of Autographa californica (Lep.: Noctuidae) a candidate of biological control agent of Douglas-fir tussock moth (Lep.: Lymantriidae). **J. Econ. Entomol.**, 75 : 1120-1122.

-----; IWAI, J. P. (1986) : Propagation of multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus of Orgyia pseudotsygata in larvae of Trichoplusia ni. **J. Invertebr. Pathol.**, 47 : 32-41.

MARUNIAK, J. E. (1986) : Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. (ed) : op. cit., V. 1, p. 129-146.

----- (1989) : Molecular biology of Anticarsia gemmatalis baculovirus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84 : 107-111.

MASKEL, S. M. & DiCAPUA, R. A. (1988) : Comparision of protease activity of four Nuclear Polyhedrosis Viruses **J. Invertebr. Pathol.**, 52 : 447-452.

MATTHEWS, R. E. F. (1985) : Viral taxonomy for the nonvirologist. **Ann. Rev. Microbiol**, 39 : 451-474.

MAZZONE, A. M. (1985) : Pathology associated with baculovirus infection. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. E. (ed) : op. cit., p. 81-120.

McINTOSH, A. H. & IGNOFFO, C. M. (1986) : Restriction endonuclease cleavage patterns of commercial and serially passaged isolates of Heliothis baculovirus. **Intervirology**, 25 : 172-176.

McKINLEY, D. J.; BROWN, D. A.; PAYNER, C. C. & HARRAP, K. A. (1981) : Cross infectivity and activation studies with four baculoviruses. **Entomophoga**, 26 : 79-90.

McLEOD, P. J.; YEARIAN, W. C. & YOUNG III, S. Y. (1977) : Inactivation of baculovirus Heliothis by ultraviolet irradiation, dew and temperature. **J. Invertebr. Pathol.** 30 : 237-241.

MEYNADIER, G.; VAGO C.; PLANTEVIN, G. & ATGER, P. (1964): Virose d'un type inhabituel chez le lepidoptere Galleria mellonella L. **Rev. Zool. Agric. Appl.**, 63: 207-208.

----- ; GALICHET, P.F.; VEYRUNES, J. C. & AMARGIER A. (1977) : Mise en évidence d'une denonucléose chez Diatraea saccharalis (Lep.: Pyralidae). **Entomophoga**, 22 : 115-120.

MILLER, D.W. & MILLER, L. K. (1982) : A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. **Nature**, 299 : 562-564.

MILLER, L. K. & DAWES, K. P. (1978) : Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related Nuclear Polyhedrosis Viruses : Autographa californica MNPV and Trichoplusia ni MNPV. **Appl. Environ. Microbiol.**, 35 : 1206-1210.

-----, (1988) : Baculoviruses as gene expression vectors. **Ann. Rev. Microbiol.**, 42:177-199.

MORRIS, O. N. (1971): The effect of sunlight, ultraviolet and gamma radiations and temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus. **J. Invertebr. Pathol.**, 18 : 292-294.

ODIER, F. (1977) : Mise en évidence et étude d'un complexe de maladies a Parvovirus, Baculovirus et Iridovirus. **Entomophaga**, 22: 397-404.

PAVAN, O. H. O. ; BOUCIAS, P.D. & PENDLAND, T. C. (1981):  
The effects of a serial passages of a nuclear polyhe-  
drosis virus through an alternate host system.  
*Entomophaga*, 26 : 99-108.

----- (1983):O vírus de granulose da Diatraea  
saccharalis Fabr. (broca da cana-de-açúcar).  
*Saccharum*, 28 : 27-29.

----- ; BOUCIAS, D. G. ; ALMEIDA, L. C.; GAS-  
PAR, J. O. ; BOTELHO, P. S. M. & DEGASPARI, N. (1983):  
A granulosis virus of Diatraea saccharalis (Fabr.  
1794), I. Pathogenicity, replication and ultrastructu-  
re. In: *Congress of ISSCT*, 18, v.2, p. 644-659.

----- & ALMEIDA, L. C. (1984) : Produção indus-  
trial do vírus de granulose de Diatraea saccharalis:  
seleção genética e controle de qualidade. In: *Reunião*  
*Anual de Genética de Microrganismos*, 11, Londrina. A-  
nais.

----- & RIBEIRO, H. C. T. (1989) : Selection of  
a baculovirus strain with a bivalent inseticidae  
activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84 : 63-65.

RIBEIRO, H. C. T. (1985): **Seleção genética e interação de baculovirus em Diatraea saccharalis (Fabr., 1794)**. Tese de Mestrado, UNICAMP, IB.

----- & PAVAN, O. H. O. (1985): Inativação térmica de baculovirus. In: **Encontro de Pós-graduação em Ciências Biológicas**, 2, Campinas, UNICAMP, p. 44.

----- (1989) : **Estudo comparativo de cinco isolados de baculovirus em Diatraea saccharalis**. Tese de Doutorado, UNICAMP, IB.

RODRIGUES, J. J. S. (1989) : **Seleção genética do Virus de Poliedrose Nuclear (Baculoviridae) de Autographa californica no hospedeiro alternativo, Diatraea saccharalis (Fabr., 1794) (Lep. Pyralidae)**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, IB.

----- & PAVAN, O. H. O. (1990) : Alterations in the virulence of Autographa californica NPV serially passaged in the alternate host, Diatraea saccharalis. **J. Invertebr. Pathol.** (in press).

ROHRMANN, G. F. (1986) : Evolution of occluded baculoviruses. In : GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A.: op. cit. , v. 1, p. 203-215.

SMIRNOFF, W. A. (1963) : Adaptation of a Nuclear Polyhedrosis Virus of Trichiocampus irregularis Dyar. *J. Insect. Pathol.*, 5 : 104-110.

SMITH, G. E. & SUMMERS, M. D. (1978) : Analysis of baculovirus genes with restriction endonucleases. *Virology*, 89 : 517-527.

----- : FRASER, M. J. & SUMMERS, M. P. (1983): Molecular engineering of the Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus genome: deletion mutation within the polyhedrin gene. *J. Virol.*, 46 : 584-593.

SMITH, K. M. (1976) ; *Virus-insect relationship*, London, Longman, p. 172-176.

STAIRS, G. R. (1965): Quantitative differences in susceptibility to a Nuclear Polyhedrosis Virus among larval instars of the forest tent caterpillar., Malacosoma disstria (Hubner). *J. Invertebr. Pathol.*, 7: 427-430.

----- ; FRASER, T. & FRASER, M. (1981) : Changes in growth and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from Chrosistoneura fumiferana after passage in Trichoplusia ni and Galleria mellonella. J. Invertebr. Pathol., 38 : 230-235.

STEEL, R. G. D. & TORRIE, J. H. (1980) : Principles and Procedures of Statistics, 2ed, New York, McGraw-Hill , 633p.

STEINHAUS, E. A. (1949) : Principles of Insect Pathology, New York, McGraw-Hill. 200p.

----- (1957) : New records of insect virus disease. Hilgardia, 26 : 417-425.

----- (1958) : Stress as a factor in insect disease. Proc. Intern. Congr. Entomol., 10 : 725-730.

----- & MARSCH, G. (1962) : Report of diagnosis of diseased insects 1951-1961. Hilgardia, 33: 349-427



STUERMER JR.; C. S. & BULLOCK, H. R. (1968) : Thermal inactivation of Heliothis Polyhedrosis Virus. J. Invertebr. Pathol., 12 : 473-474.

SUMMERS, M. D. ; ENGLER, R.; FALCON, L. A. & VAIL, P. (1975) : Baculovirus for insect pest control : safety considerations, Washington, D. C., Am. Soc. Microbiol. 186 p.

TANADA, Y. (1953) : Description and characteristics of a granulosis virus of the imported cabbageworm. Proc. Haw. Entomol. Soc., 15 : 235-260.

----- : HUKUHARA, T. & CHANG, G. Y. (1969) : A strain of nuclear polyhedrosis virus causing extensive cellular hypertrophy. J. Invertebr. Pathol., 13: 394-409.

----- & IWAI, E. M. (1974) : Persistence of insect viruses in field populations of alfalfa insects. J. Invertebr. Pathol.. 23 : 360-365.

TIJSSSEN, P.; van den HURK, J. & KURSTAK, E. (1976) : Biochemical, biophysical and biological properties of densovirus. I. Structural proteins. J. Virol., 17 : 686-691.

TOMPKINS, G. J. ; VAUGHN, J. L. ; ADAMS, J. R. & REICHELDERFER, C. F. (1981) : Effects of propagating Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus and its Trichoplusia ni variant in different hosts. Environ. Entomol., 10 : 801-806.

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

VAUGHN, J. L. & DOUGHERTY, E. M. (1985) : The replication of baculoviruses. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E. (ed) : op. cit., p. 569-633.

VLAK, J. M. & ROHRMANN, G. F. (1985) : The nature of polyhedrin. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. E. (ed) op. cit.; p. 489-542.

WATANABE, H. ; MAEDA, S.; MATSUI, M. & SHIMIZU, T. (1976) Histopathology of the midgut epithelium of the silkworm Bombyx mori, infected with a newly-isolated virus from the flacherie diseased larvae J.Sericult. Sci. Japan, 45 : 29-34.

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

WITT, D. J. & HINK, W. F. (1979): Selection of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus for resistance to inactivation by near ultraviolet, far ultraviolet and thermal radiation. *J. Invertebr. Pathol.*, 33 : 222-232.