

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/10630
IB/80476

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1989

INFECÇÃO MISTA DE *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)
(LEPIDOPTERA:PYRALIDAE) COM DOIS TIPOS DE BACULOVÍRUS

ALEJANDRA MARIA G. GARCIA-CANEDO

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

Orientador: Prof. Dr. OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA PAVAN

CAMPINAS - SP

1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

SSIF, I
CP. G165 i
EX
BO 10630
878

1B/80476
PAY 10630

Aos meus pais,

Gladys e Hugo G.,

Ondina e Hugo C.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan pela orientação oferecida.

A Jaque e Nancy pelos "inumeráveis" conselhos, críticas, opiniões e sobretudo pela paciência e disposição para resolver qualquer dificuldade enfrentada ao longo deste período de trabalho em equipe.

A Maria Sílvia, Néelson, Cris, Helena, Teresa, Andréa, Luciane e Guerreiro que, de diversas maneiras, participaram na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin pelo empréstimo de equipamento microscópico e fotográfico.

À Rosângela pela grande ajuda concedida na elaboração das fotos.

Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena pela ajuda prestada na análise estatística dos dados.

Aos Profs. Dra. Yoko B. Rosato, Dr. João S. Morgante e Dr. Aquiles E. Piedrabuena pelo exame prévio desta dissertação e importantes críticas e sugestões.

Ao tio Hugo pela disposição e interesse com que leu e corrigiu o manuscrito.

Ao Valter pelo empréstimo do computador e auxílio na parte gráfica.

À Sra. Anna Gagliardi pela organização bibliográfica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Considerações Gerais	1
1.2	Baculovírus	2
1.2.1	Vírus de Granulose de <i>Diatraea saccharalis</i> (VGDs)	6
1.2.2	Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>Anticarsia</i> <i>gemmatalis</i> (VPNAg)	7
1.3	Interação entre Baculovírus	10
1.3.1	Ocorrência Natural	11
1.3.2	Fatores que Influem na Infecção Mista	14
1.3.2.1	Tipo de Interação Viral	14
1.3.2.2	Competição por Sítios de Replicação	18
1.3.2.3	Sequência de Infecção	22
1.3.2.4	Efeito da Dosagem	24
1.3.2.5	Efeito da Idade Larval	25
2	OBJETIVOS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Material	29
3.1.1	Insetos	29
3.1.2	Vírus	29
3.2	Métodos	30
3.2.1	Purificação Viral	30
3.2.1.1	Purificação do VGDs	30
3.2.1.2	Purificação Simultânea do VGDs e VPNAg	32

3.2.2	Quantificação Viral	34
3.2.3	Bioensaios	35
3.2.3.1	Determinação da Dose Letal 50 (DL ₅₀) e do Tempo Letal 50 (TL ₅₀)	37
3.2.3.2	Determinação da Viabilidade Pupal	38
3.2.3.3	Determinação da Mortalidade Larval pela Infecção com VGDs e/ou VPNAg	38
3.2.3.4	Determinação do Efeito da Idade Larval na Infecção viral	41
3.2.3.5	Determinação da Produção de VGDs e VPNAg em <i>Diatraea saccharalis</i>	42
3.2.4	Análise de Tecidos de Lagartas Infectadas	43
3.2.5	Análises Estatísticas	44
4	RESULTADOS	46
4.1	Determinação da Dose Letal 50 (DL ₅₀) do Vírus de Granulose de <i>Diatraea saccharalis</i> (VGDs) em <i>D.</i> <i>saccharalis</i>	46
4.2	Determinação da Dose Letal 50 (DL ₅₀) do Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>Anticarsia gemmatilis</i> (VPNAg) em <i>D. saccharalis</i>	48
4.3	Determinação da Mortalidade Larval pela Infecção com VGDs e/ou VPNAg. Intervalo entre Inoculações 1 dia	50
4.4	Determinação da Mortalidade Larval pela Infecção com VGDs e/ou VPNAg. Intervalo entre Inoculações 3 dias	57

4.5	Determinação do Efeito da Idade Larval na Infecção Viral	63
4.6	Determinação da Produção de VGDs e VPNAg em <i>D. saccharalis</i>	69
4.7	Análise de Tecidos de Lagartas de <i>D. saccharalis</i> Infectadas com VGDs e VPNAg	73
5	DISCUSSÃO	86
5.1	Interação Viral	86
5.2	Competição por Sítio de Replicação	90
5.3	Sequência de Infecção	92
5.4	Efeito da Idade Larval na Infecção Viral	95
6	RESUMO E CONCLUSÕES	99
7	SUMMARY AND CONCLUSIONS	102
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nos insetos, as infecções não são produzidas exclusivamente pela ação de um único microrganismo, mas, quase sempre, ocasionadas pelos efeitos múltiplos de diversos patógenos (ODIER, 1977).

Alguns vírus, entre os quais encontram-se os baculovírus, têm sido objeto de estudo pelo seu potencial como bioinseticidas altamente seletivos, efetivos e seguros. Assim, a natureza desses vírus e os fatores que influem nas inter-relações patógeno-hospedeiro devem ser investigadas para obter-se uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela infecção viral.

Numerosos estudos laboratoriais têm sido feitos inoculando-se mais de um tipo de vírus na mesma larva com o intuito de se obter um conhecimento claro do potencial de aumento da atividade dos baculovírus utilizados como inseticidas microbianos. Algumas das informações importantes que puderam ser obtidas através desses trabalhos são: tipo de interação viral, existência de competição por sítios de replicação, sequência de infecção viral e influência da idade larval e da dosagem viral na infecção.

1.2 BACULOVÍRUS

Os baculovírus são vírus de artrópodos, principalmente insetos que foram isolados de lepidópteros, himenópteros, dípteros e coleópteros, sendo a grande maioria encontrada nos lepidópteros. Esses vírus, mesmo sendo conhecidos como vírus de inseto, também foram isolados de crustáceos e aracnídeos (LONGWORTH, 1983). Pertencem à família Baculoviridae, a qual se caracteriza por apresentar nucleocapsídeos em forma de bastão envoltos por um envelope ou membrana lipoprotéica. O nucleocapsídeo é constituído de um DNA circular de dupla hélice de 50 a 100 x 10⁶ daltons (HARRAP & PAYNE, 1979), envolto por um capsídeo formado, por sua vez, de pequenas unidades protéicas chamadas capsômeros. A estrutura formada pelo(s) nucleocapsídeo(s) e o envelope constitui a unidade infecciosa ou virion (MILLER e col., 1983).

O gênero Baculovirus (único gênero da família Baculoviridae) é subdividido em três sub-gêneros. O sub-gênero A consiste de Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN), cuja característica é a de vários virions estarem oclusos num poliedro, também chamado corpo de inclusão ou cristal protéico, cujo principal componente é a poliedrina. Existem dois sub-grupos morfológicamente diferentes: os Vírus de Poliedrose Nuclear Simples (VPN-S), no qual somente um nucleocapsídeo é encontrado por envelope, e o Vírus de Poliedrose Nuclear Múltiplo (VPN-M), em que vários nucleocapsídeos são envoltos por envelope. O sub-

gênero B consiste de Vírus de Granulose (VG) nos quais um único nucleocapsídeo é envolto pela membrana e, por sua vez, um único virion (excepcionalmente dois) é contido no corpo de inclusão, também chamado grânulo ou cristal viral, o qual tem um formato oval e é praticamente constituído pela proteína chamada granulina. Por último o sub-gênero C consiste de virions não oclusos em estruturas protéicas (NOV - do inglês "nonoccluded virus") (BILIMORIA, 1986). Este último vírus foi primeiramente isolado de *Oryctes rhinocerus* (Coleoptera) (daí o nome de Vírus de *Oryctes* pelo qual também é conhecido), sendo também capaz de infectar outras espécies de *Oryctes* e pelo menos uma espécie do gênero *Scapanes* (BEDFORD, 1981).

Representantes do sub-gênero A e B têm sido amplamente utilizados para controle biológico de insetos-praga pela sua alta especificidade com o hospedeiro e por não representarem risco para a saúde humana ou de outros animais (IGNOFFO, 1968; SUMMERS e col., 1975; CONSIGLI e col., 1983)

A maneira mais comum de entrada dos baculovírus no organismo do hospedeiro se dá pela ingestão do vírus durante a alimentação da larva. O cristal ingerido, que contém o(s) virion(s) (dependendo se for VG ou VPN), é rapidamente solubilizado no lúmen do intestino médio, liberando os virions. Nos Lepidópteros, o processo de dissolução é iniciado pela ação do pH do suco digestivo, o qual é muito alcalino (9.5 - 11.5), e acelerado por ação enzimática (GRANADOS, 1978; PRITCHETT e col.,

1984). Desta maneira, a liberação de proteases presentes no corpo de inclusão, ocasionada pelo alto pH é responsável pelo início da infecção promovendo a remoção do cristal protéico. Os virions assim liberados passam através de pequenos poros que provavelmente existem na membrana peritrófica (PASCHKE & SUMMERS, 1975) entrando em contato direto com as células colunares do intestino. O envelope do virion funde-se à membrana plasmática na região apical das microvilosidades permitindo assim a entrada do(s) nucleocapsídeo(s) dentro da célula (GRANADOS, 1978). Logo depois, estes seguem até o núcleo, podendo perder o capsídeo antes de entrar (SUMMERS, 1971; TANADA & HESS, 1976; GRANADOS, 1980), ou quando já dentro do núcleo (GRANADOS, 1978; GRANADOS & LAWLER, 1981). Desta maneira, o vírus replica-se ocasionando a infecção primária, sendo que alguns dos vírus aqui formados não possuem corpo de inclusão. Estes, saindo das células intestinais infectam as células da hemolinfa e outros tecidos, ocasionando a infecção secundária. A replicação viral nestes tecidos resulta tanto na formação de vírus não oclusos, que caem na hemolinfa sendo os responsáveis por propagar a infecção dentro do inseto, e de vírus oclusos, os quais, após a morte e desintegração do inseto, ficam livres no meio ambiente podendo infectar outros insetos, pela sua ingestão (MILLER e col., 1983; MILLER, 1988).

Em geral os VPN são poliorganotróficos, infectando, portanto, vários tecidos, enquanto a infecção pelo VG exhibe um tropismo limitado, podendo ser encontrado geralmente nos tecidos gorduroso, epidérmico e matriz traqueal, dos quais o primeiro é

preferencialmente atingido (HUGER, 1963).

A primeira mudança citopatológica induzida pela infecção com VPN e VG é a hipertrofia celular, causando aumento no tamanho do núcleo que leva a ocupar o volume total da célula (GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

A infecção pelo VPN é restrita ao núcleo celular. No caso do VG, esta começa no núcleo, o qual perde sua integridade estrutural no começo da infecção. Assim sendo, os componentes nucleares e citoplasmáticos se misturam, não afetando, no entanto, o desenvolvimento do VG (GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

Atualmente, o Laboratório de Virologia de Insetos do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, em convênio com o IAA/PLANALSUCAR, vem desenvolvendo uma área de pesquisa utilizando baculovírus para combater a principal praga da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* responsável por perdas de mais de cem milhões de dólares anuais somente no Estado de São Paulo (MACEDO & BOTELHO, 1988).

Na fase larva, este inseto abre galerias longitudinais e transversais na cana, provocando a morte das gemas, perda de peso da cana e seccionando o colmo o que leva ao tombamento da planta pelo vento. No entanto, os prejuízos indiretos, causados por este inseto ao abrir orifícios e galerias na cana são os mais consideráveis. Através destes, dois fungos diferentes,

Coletotrichum falcatum (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon), penetram no colmo causando a "podridão vermelha" que diminui a pureza do caldo, dando menor rendimento em açúcar (GALLO e col., 1978).

Dois tipos de baculovírus estão sendo utilizados para combater essa praga: Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* e um isolado selecionado de Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis*. Atualmente, esses dois vírus estão sendo produzidos em larga escala pela companhia AGROGGEN SA-BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA em convênio com a UNICAMP.

1.2.1 VÍRUS DE GRANULOSE DE *Diatraea saccharalis* (VGDs)

STEINHAUS & MARSH (1962) foram os primeiros a detectar vírus de granulose em larvas de *Diatraea saccharalis* criadas em laboratório. Posteriormente, larvas dessa mesma espécie coletadas no sul dos Estados Unidos apresentaram contaminação com esse mesmo vírus, o qual mostrou-se altamente virulento para a espécie (PAVAN e col., 1983).

Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que esse vírus é um representante típico de granulose. O tamanho médio do cristal viral é de aproximadamente 0.5 micrômetros (μm), podendo este se replicar no citoplasma da célula hospedeira, e tendo como principal tecido alvo o tecido gorduroso (PAVAN, 1983; PAVAN e

col., 1983).

Vários trabalhos têm sido feitos visando conhecer melhor certos aspectos do VGDs como por exemplo: forma de infecção, potencialidade como inseticida biológico, métodos de purificação, composição protéica, interação com outros vírus, existência de competição por sítios de replicação com outro vírus, temperatura de inativação viral e possibilidade de obtenção de insetos imunes a esse vírus (PAVAN, 1983; PAVAN e col., 1983; RIBEIRO, 1985 e 1989; CAVALLARO e col., 1986; CAVALLARO, 1988; GARCIA & PAVAN, 1988a,b).

1.2.2 VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE Anticarsia gemmatalis (VPNAg)

STEINHAUS (1957) foi o primeiro em detectar Vírus de Poliedrose Nuclear em larvas de Anticarsia gemmatalis (VPNAg) coletadas em plantações de alfafa no Peru. Nesse primeiro trabalho, ele o descreveu como um possível baculovírus do tipo VPN. Este diagnóstico foi posteriormente confirmado por STEINHAUS & MARSH (1962).

Posteriormente, em 1972, larvas dessa mesma espécie foram coletadas em culturas de soja na região de Campinas, as quais novamente apresentaram-se infectadas com VPN (ALLEN & KNELL, 1977). Outros autores também relataram a presença desse

vírus em larvas de *A. gemmatalis* coletadas em várias regiões do Brasil (CARNER & TURNIPSEED, 1977; CORSO e col., 1977; GATTI e col., 1977).

ALLEN & KNELL (1977) fizeram um estudo mais detalhado sobre a estrutura do VPNAg e a sua infecção no hospedeiro original. Eles comunicaram que, assim como todos os VPN, sua replicação é restrita ao núcleo, sendo os tecidos gorduroso e a epidermico infectados mais rapidamente.

Estudos ao microscópio eletrônico revelaram que o VPNAg é do tipo múltiplo (VPN-M), apresentando, no entanto, uma quantidade de virions contendo um só nucleocapsídeo que varia de 25% (ALLEN & KNELL, 1977) até 43% (CARNER & TURNIPSEED, 1977).

O tamanho do cristal do VPNAg, obtido de larvas de *D. saccharalis* coletadas em Santa Catarina, apresentou ter uma variação de 1.17 a 1.54 μm (CARNER & TURNIPSEED, 1977).

A infecção de hospedeiros alternativos com VPNAg pode ser conseguida utilizando-se altas concentrações de inóculo viral. PAVAN e col. (1981) infectaram seis espécies de Noctuidae e verificaram que a virulência foi significativamente menor que aquela encontrada para larvas de *A. gemmatalis*. Esses mesmos autores observaram que duas espécies de *Diatraea*, *saccharalis* (Fabricius) e *grandiosella* (Dijar), também eram susceptíveis somente a altas doses de VPNAg. Larvas de *A. gemmatalis*, no

entanto, são altamente susceptíveis a esse vírus (CARNER & TURNIPSEED, 1977; PAVAN e col., 1981; MOSCARDI, 1983).

Através do processo de passagens seriadas em larvas de *Diatraea saccharalis*, foi possível aumentar gradualmente a patogenicidade desse vírus a mais de 100 e 1000 vezes após 10 e 20 passagens, respectivamente. Mesmo sabendo que o que determina o grau de virulência de um baculovírus, submetido ao processo de passagens seriadas em um hospedeiro alternativo, são as inter-relações produzidas pelo sistema hospedeiro-patógeno, esses vírus selecionados não perderam a sua capacidade de infectar o seu hospedeiro original (PAVAN e col., 1981; RIBEIRO, 1985 e 1989).

Outros estudos feitos no Laboratório de Virologia de Insetos da UNICAMP, tanto com o VPNAg como com mutantes selecionados deste vírus, demonstraram que são capazes de infectar tecidos de *D. saccharalis* de maneira mais eficiente que outros vírus de poliedrose testados como por exemplo Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn) e Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) (M.T. MARIANI, comunicação pessoal).

A temperatura de inativação, temperatura ideal para o desenvolvimento da infecção viral e produção de imunidade por parte dos insetos ao vírus foram também investigados (RIBEIRO, 1989).

1.3 INTERAÇÃO ENTRE BACULOVÍRUS

À medida que a patologia de insetos tem-se desenvolvido ao longo deste século, muitos exemplos mostrando a infecção de um indivíduo por dois ou mais vírus foram apresentados.

A recombinação gênica, de uma maneira geral, tem sido amplamente investigada em infecções mistas entre dois vírus, relacionados ou não, que infectem a mesma célula. Nessas condições, ocasionalmente aparecem novas linhagens com propriedades aparentemente híbridas entre a progênie viral. Exemplos de recombinação genética têm sido relatados para vírus de plantas, vírus de animais e fagos (LURIA e col., 1978).

Recombinação em baculovírus já foi sugerida por ISHIKAWA & ASAYAMA (1961) (apud MAZZONE, 1985), os quais encontraram um terceiro tipo de poliedro, morfologicamente diferente aos dois originalmente inoculados. Alterações morfológicas, numéricas ou na infectividade viral, após indução de infecção mista em insetos (SMITH & SUMMERS, 1980 VAIL e col., 1982) ou em cultura de tecidos (SUMMERS e col., 1980), são indicativos de uma provável recombinação gênica.

CROIZIER e col. (1980) detectaram o aparecimento de um novo tipo viral através de análise do DNA do vírus. Recombinação gênica também pode ser conseguida utilizando-se fragmentos do genoma viral em vez do vírus total (CROIZIER e col., 1988)

A seguir serão mostrados com prioridade casos de interações entre baculovírus e também alguns exemplos de interação entre estes e outros vírus de insetos.

1.3.1 OCORRÊNCIA NATURAL

A ocorrência natural de infecções múltiplas de baculovírus é conhecida há muitos anos, sendo que hoje já foi descrita em praticamente todos os grupos entomopatogênicos (HARPER, 1986).

PAILLOT (1936) foi o primeiro a relatar a presença simultânea de Vírus de Poliedrose Nuclear e de Vírus de Granulose em lagartas de *Euxoa segetum* (Schiff). Posteriormente SMITH & RIVERS (1956) comunicaram a presença de um Vírus de Poliedrose Citoplasmática (VPC) nesse mesmo inseto e descreveram a presença do VPC em três insetos nos quais a infecção pelo VPN já era conhecida.

O segundo caso de infecção com VPN e VG na mesma espécie de inseto foi descrito para *Choristoneura fumiferana* (Clem). BERGOLD (1951a) detectou a presença de VPN e pouco depois (BERGOLD, 1951b) encontrou VG infectando estas mesmas larvas. Posteriormente, BIRD & WHALEN (1954) descreveram a infecção por VPC nesse mesmo inseto.

Outro caso de infecção natural por VG e VPN encontrou-se em *Pieris rapae* (Linn.). A infecção deste inseto por um VG foi primeiramente descrita por THOMPSON (1951). TANADA (1953) encontrou esse vírus infectando insetos de três regiões dos Estados Unidos (EUA) e fez um estudo detalhado da infecção, sendo que, pouco tempo depois, encontrou um VPN nesse mesmo hospedeiro (TANADA, 1954).

A susceptibilidade de *Pseudaletia unipuncta* (Haw.) ao VPN foi descrita por CHAPMAN & GLASER em 1915. TANADA (1956) comunicou, pela primeira vez, a presença de VG em uma larva coletada na mesma área das que apresentaram infecção pelo VPN. Posteriormente, foram encontradas larvas mortas, coletadas de dez diferentes localidades dos Estados Unidos (EUA), apresentando uma infecção simultânea de VPN e VG (TANADA & CHANG, 1962).

HALL (1953) encontrou lagartas de *Autographa californica* (Speyer), coletadas de várias localidades da Califórnia, infectadas com VG e VPN. TANADA & OMI (1974), estudando a epizootia da infecção viral nessa mesma região, observaram que, a maioria das larvas de *A. californica* estavam infectadas com VG e só algumas com VPN e VPC. No mesmo trabalho, eles coletaram larvas de *Spodoptera exigua* as quais eram comumente infectadas com VPN e VG, sendo que a predominância de cada vírus variava com a localidade específica e ano de coleta.

STEINHAUS (1957) listou sete espécies de insetos infectadas pelo VPN e VG. Destas, somente *Nephelodes emmedonia* (Cram), apresentou infecção simultânea dos dois vírus.

Entre outros exemplos de infecções naturais com VG e VPN, temos aqueles comunicados por PASCHKE & HAMM (1962) em larvas de *Trichoplusia ni* (Hueb.), por STEINHAUS & MARSH (1962) em *Laphygme frugiperda* e por KELLEN & HOFFMAN (1984) em *Cadra figulilella*.

XEROS (1954) reportou a presença de um vírus não incluso no citoplasma de células gordurosas de *Tipula paludosa* (Meigen), espécie na qual tinha sido previamente encontrado VPN (SMITH & XEROS, 1954).

Larvas de *T. ni* obtidas de diferentes áreas geográficas apresentaram infecção com dois tipos morfológicamente diferentes de VPN (HEIMPEL & ADAMS, 1966).

Vários outros insetos foram encontrados infectados pelo VPN e VPC (SMITH & XEROS, 1953; SMITH e col., 1953; VAGO & VASILJEVIC, 1958; TANADA & OMI, 1974).

HESS e col. (1978) reportaram a presença simultânea de quatro tipos de vírus diferentes em lagartas de *A. californica* e *T. ni*.

1.3.2 FATORES QUE INFLUEM NA INFECÇÃO MISTA

1.3.2.1 TIPO DE INTERAÇÃO VIRAL

A infecção viral por dois ou mais vírus concomitantemente pode ter efeitos antagônicos, sinérgicos ou independentes, resultantes das interações que ocorrerem entre os vírus ou entre eles e o hospedeiro. Se não existe interação entre os dois patógenos, um efeito aditivo é esperado, isto é, a combinação da metade da dose letal 50 (DL₅₀) de cada componente deveria produzir o mesmo efeito que a DL₅₀ de cada um. Um efeito significativamente menor que o aditivo indica antagonismo e um maior indica sinérgismo (BENZ, 1971).

O primeiro a reportar o aparecimento de interferência na infecção com VG e VPN foi BIRD (1959) em lagartas de *Choristoneura fumiferana*. Esse mesmo autor, posteriormente, utilizando essas mesmas larvas juntamente com larvas de *Malacosoma disstria* (Hubner) para inoculá-las com VPN e VPC, verificou que o VPC interferiu e retardou o desenvolvimento do VPN (BIRD, 1969).

TANADA e col. (1969) tentando determinar se existia alguma supressão ou aumento na virulência ou, então, simplesmente uma coexistência mutualística entre duas linhagens diferentes de VPN, verificaram que, quando larvas de *P. unipuncta* eram

inoculadas com a mesma dose dessas duas linhagens, os sintomas de infecção próprios da linhagem chamada de "típica" eram os únicos que apareciam. Posteriormente, a interferência causada pela linhagem VPNT (típica) sobre a linhagem VPNH (hipertrófica) foi estudada mais detalhadamente por RITTER & TANADA (1978).

WHITLOCK (1977a) encontrou interferência entre VPN e VG inoculados simultaneamente em larvas de *Heliothis armigera*. No entanto, um pré-tratamento com vírus inativados pelo calor não afetou a ação dos vírus, o que o levou a concluir que o fator de interferência não fazia parte da cápsula protéica mas sim da região infectiva do vírus.

BOUCIAS & NORDIN (1978) infectaram larvas de *Hyphantria cunea* com VPN e dois tipos de VG: o VG original (VGHC) e um outro obtido de *Diacrisia virginica* (VGD). Eles encontraram uma interferência do VGD sobre o efeito viral de VGHC, aumentando o Tempo Letal 50 (TL₅₀) de 9 para mais de 20 dias. Esse efeito não foi observado quando o segundo inóculo foi o VPN.

Uma outra prova de interferência foi relatada por HESS e col. (1978) utilizando larvas de *A. californica* e *T. ni*. Quando estas eram tratadas com um vírus icosaédrico referido como SV₁ e um VPN, a quantidade de VPN presente no núcleo das células infectadas era menor que aquela encontrada nos núcleos dos indivíduos infectados somente com VPN.

Uma série de experimentos quantitativos levou KELLY (1980) a concluir, pela primeira vez, que a replicação de vírus iridescente interferiu com a replicação de baculovírus. Além disso, desde que os vírus inativados pelo tratamento térmico tiveram um efeito inibitório menor do que os vírus ativos, foi proposto que a replicação viral, e não a partícula viral em si, seria a responsável pelo efeito inibitório, apoiando assim aquilo anteriormente proposto por WHITLOCK (1977a).

Em contrapartida, um fator muito importante que afetou a susceptibilidade de *P. unipuncta* à infecção com VG e VPN foi o efeito sinérgico que resultou no aumento de virulência dos dois vírus quando estes foram inoculados simultaneamente (TANADA 1956). Posteriormente, foi comprovado que esse aumento na virulência era causado pelo VG através de experimentos em que este foi inoculado 3 e 5 dias antes e depois do VPN. O aumento de infecção por parte do VPN aparecia somente quando o VG era pré-inoculado. Além disso, a utilização de VG inativo aumentou a infectividade do VPN indicando que não era o nucleocapsídeo o responsável pelo efeito sinérgico, mas alguma substância na matriz protéica ou no envelope (TANADA, 1959; TANADA e col., 1973; HARA e col., 1976). Esta associação de sinérgismo também aconteceu quando esse VG foi inoculado com uma outra linhagem de VPN (TANADA e col., 1969). No entanto, quando um outro isolado geográfico de VG obtido de Oregon foi utilizado, não se encontrou efeito sinérgico (TANADA & HUKUHARA, 1968).

A continuidade das pesquisas com o VG sinérgico levou a isolar uma fração protéica que aumentava a atividade viral do VPN, tanto *in vivo* como *in vitro*, a qual foi chamada de Fator Sinérgico (FS) (TANADA & HUKUHARA, 1971; TANADA e col., 1973; HARA e col., 1976; OHBA & TANADA, 1984). O sítio de ação do FS resultou ser ao nível de membrana plasmática das microvilosidades das células intestinais. O FS aumenta a taxa de fusão do envelope do virion com a membrana plasmática, agindo, portanto, como uma enzima (TANADA & HARA, 1975; TANADA e col., 1975; TANADA e col., 1980). Trabalhos recentes sugerem a existência de receptores em sítios específicos das células para ligação com o FS e os virions (NAKAGAKI e col., 1987). STODDARD (1980)(apud TANADA, 1985) trabalhando com um VG isolado de outro hospedeiro encontrou um fator similar ao FS, concluindo que os VG de outras espécies também poderiam ter fatores semelhantes.

A ausência de uma interação do tipo sinérgica ou antagônica foi relatada por VAGO (1959)(apud SHVETSOVA & TSAI, 1962) infectando um mesmo hospedeiro com VPC e VG, os quais se desenvolveram de maneira típica em tecidos diferentes. A mesma afirmação foi feita por SHVETSOVA & TSAI (1962) infectando com VG e VPN dois hospedeiros diferentes.

LOWE & PASCHKE (1968a) concluíram que a mortalidade obtida quando inocularam VG e VPN juntos em larvas de *T. ni* não diferiu significativamente daquela esperada quando a mesma dose de qualquer um dos dois vírus tivesse sido inoculada duas vezes,

separadamente. Portanto, o aumento na mortalidade larval, causada quando o inóculo foi misto, se deu por efeito aditivo e não por um real efeito sinérgico. Trabalhos anteriores foram criticados por não se ter o cuidado de verificar as doses inoculadas a cada indivíduo, podendo, portanto, gerar uma má interpretação sobre o tipo real de interação viral (LOWE & PASCHKE, 1968a; PASCHKE e col., 1968).

A multiplicação de maneira independente tanto do VG como do VPN inoculados em larvas de *Diatraea saccharalis*, demonstrou, de maneira preliminar, a existência de uma coinfecção típica sem interferência na produção de qualquer um dos dois vírus (GARCIA & PAVAN, 1988a).

1.3.2.2 COMPETIÇÃO POR SÍTIO DE REPLICAÇÃO

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

Larvas de *P. unipuncta* inoculadas simultaneamente com dois VPN nunca apresentaram sintomas característicos dos dois tipos virais no mesmo hospedeiro. No entanto, se essas duas linhagens virais eram inoculadas separadamente, infectavam alguns

tecidos comuns e outros diferentes, mostrando uma especificidade diferencial pelos tecidos da mesma larva. (TANADA e col., 1969).

HUGHES (1972) tentando produzir infecção mista com dois VPN em larvas de *Hemerocampa pseudotsugata* e examinando tecidos observou larvas infectadas com um ou outro vírus, porém, nenhuma infectada por ambos os vírus.

VAGO (1959), estudando a patogenicidade de VG e VPC, observou que cada um deles infectava diferentes tecidos no inseto. O VPC se replicava em células epiteliais, enquanto o VG o fazia no tecido gorduroso.

A determinação de sítios específicos de replicação também pode-se dar a nível celular dentro de um mesmo tecido, como é o caso de larvas de *P. unipuncta* inoculadas com uma mistura de VG e VPN, as quais, apesar de apresentarem sintomas externos típicos do VPN, apareciam com alguns tecidos contendo tanto poliedros quanto grânulos (TANADA, 1956). Uma observação semelhante foi feita por SHVETSOVA & TSAI (1962) em *Agrotis segetum* e *Hyphantria cunea*.

Larvas de *T. ni* coletadas do campo apresentaram infecção por dois tipos diferentes de VPN, os quais não só diferiam morfológicamente como também apresentaram diferenças no que se refere à preferência por algum tecido para sua replicação. No entanto, a presença dos dois vírus nas células dos tecidos

utilizados em comum, nunca se deu na mesma célula mas sim ocupando núcleos de células diferentes (HEIMPEL & ADAMS, 1966).

RITTER & TANADA (1978) continuando os estudos com as duas linhagens de VPN que infectam *P. unipuncta* observaram que, no caso de células da traquéia, tecido este utilizado por ambas as linhagens para sua replicação, cada um dos vírus infectava certas áreas específicas do tecido e não células ao acaso.

Larvas de *T. ni* inoculadas simultaneamente com VG e VPN apresentaram infecção com os dois vírus em células adjacentes do tecido gorduroso, porém nunca foi observado uma dupla infecção numa mesma célula (LOWE & PASCHKE, 1968b). O mesmo foi observado por WATANABE & KOBAYASHI (1970), e muito antes por BIRD (1959) em *H. cunea* e *C. fumiferana* respectivamente.

Galleria mellonella submetida à infecção com VPN, Vírus de Densonucleose (DNU - do inglês "Densonucleosis virus") e um Vírus Iridescente (TIV - do inglês "Tipula Iridescent Virus"), mostrou que esses vírus podem replicar-se simultaneamente no mesmo hospedeiro. Quando a infecção foi com VPN e DNU (ambos se replicando no núcleo celular), obteve-se a infecção pelos dois vírus em células adjacentes. Entretanto, quando a infecção implicava na presença do TIV, podiam ser encontradas células com TIV no citoplasma e DNU ou VPN no núcleo (KURSTAK & GARZON, 1975). Uma situação semelhante foi apresentada por ODIER (1977), que observou esses três vírus multiplicando-se simultaneamente em

diversas células do mesmo tecido, bem como em diferentes compartimentos de uma mesma célula.

Células de *Spodoptera frugiperda* infectadas tanto com vírus iridescente como com VPN mostraram que, mesmo com algumas modificações experimentais, como por exemplo temperatura ou combinações do inóculo, evidências de dupla replicação, na mesma célula, não foram observadas (KELLY, 1980).

Já KIMURA & McINTOSH (1976) comunicaram a presença de dois vírus de DNA numa mesma célula. Eles trabalharam com cultura de células de *T. ni* e encontraram VPN no núcleo, enquanto o Vírus Iridescente de Chilo (CIV - do inglês "Chilo Iridescent Virus") aparecia no citoplasma.

O caso de infecção viral mista mais complexo já documentado em inseto foi comunicado por HESS e col.(1978) utilizando larvas de *A. californica* e *T.ni*. Eles encontraram quatro tipos diferentes de vírus infectando células intestinais: dois icosaédricos não oclusos (SV_1 e SV_2), um VPN e um VPC. O VPN e o SV_1 foram encontrados no núcleo, enquanto os outros dois se replicaram no citoplasma. Uma quinta partícula viral podia ser observada ocasionalmente no citoplasma.

1.3.2.3 SEQUÊNCIA DE INFECÇÃO

A ordem das inoculações virais e o tempo de intervalo entre as mesmas podem ter um papel fundamental na sequência de infecção viral. BIRD (1959) sugeriu que a competição por sítios infectivos causaria interferência entre vírus. Ele percebeu que o VG precisava de certa vantagem com respeito ao VPN no que se refere a tempo de inoculação (1 ou 2 dias) para poder-se produzir a infecção mista em larvas de *Choristoneura fumiferana*. Posteriormente, confirmou o fato, verificando que para poder conseguir infecção mista de VPC e VPN, precisaria inocular o segundo com certo tempo de antecedência (BIRD, 1969).

LOWE & PASCHKE (1968b), estudando a infecção de *T. ni* com VG e VPN, propuseram a existência de um fator o qual não permitiria a invasão viral de uma célula já infectada por um outro vírus. Foram mais adiante propondo a existência de uma substância "tipo interferon" produzida pelo inseto, a qual não permitiria a invasão pelo segundo vírus. Isto foi sugerido já que larvas tratadas com VG 5 a 7 dias antes da inoculação com VPN não apresentavam infecção pelo VPN enquanto a inoculação mista resultava na infecção dupla.

A idéia dessa substância "tipo interferon" foi apoiada por KURSTAK & GARZON (1975), os quais perceberam uma certa interferência na infecção pelo densovirus quando o VPN foi inoculado de 24 a 36 horas antes. No entanto, os resultados que

eles obtiveram através do microscópio eletrônico permitiram que levantassem uma segunda hipótese segundo a qual a interferência viral não seria necessariamente mediada por um fator químico, mas por competição a nível de integridade nucleolar. Isto foi proposto, já que a replicação do densovirus depende do nucléolo, o qual é rapidamente destruído durante a replicação do VPN.

RITTER & TANADA (1978), infectando larvas de *P. unipuncta* com dois VPN que tinham infectividade diferente, perceberam que, para conseguir infecção mista no mesmo hospedeiro, era necessário inocular o vírus menos virulento um ou dois dias antes do outro. A partir desses resultados, eles propuseram que um dos vírus deveria entrar numa certa célula mais rapidamente, transformando-a de maneira a deixá-la incapaz de aceitar ou permitir a entrada de um segundo vírus.

Vários outros autores relataram a importância de oferecer vantagem, em tempo, para o vírus menos virulento quando se quer obter infecção mista com dois vírus cujas infectividades diferem (SHVETSOVA & TSAI, 1962; BOUCIAS & NORDIN, 1978; HUGHES, 1979). Resultados semelhantes foram obtidos infectando-se cultura de células (KIMURA & McINTOSH, 1976; KELLY, 1980).

INJAC (1973) (apud HARPER, 1986) concluiu que a intensidade de infecção de *Hyphantria cunea* pelo VG ou VPN dependia diretamente de qual dos vírus tivesse sido inoculado primeiro.

1.3.2.4 EFEITO DE DOSAGEM

Um outro fator importante a ser abordado quando se estuda o efeito de inoculações múltiplas está relacionado com a dosagem do patógeno. BIRD (1959) constatou que, para se obter infecção mista com o VG e VPN em larvas de *C. fumiferana*, o VG tinha que ser inoculado em maior quantidade, acontecendo o mesmo com o VPN em relação ao VPC (BIRD, 1969).

Trabalhos feitos com *P. unipuncta* inoculada com duas linhagens diferentes de VPN demonstraram que, quando a concentração de ambas foi a mesma, a infecção de uma das linhagens era suprimida pela segunda, efeito que ficava reduzido quando a diferença nas concentrações dos dois vírus era de 10 vezes (TANADA e col., 1969). Para se obter, no entanto, 50% de infecção por cada vírus, a diferença nas concentrações virais teve que ser de mais de 1000 vezes (RITTER & TANADA 1978).

Várias experiências de aplicações simultâneas de dois ou mais tipos de vírus mostram que os resultados podem variar dependendo da proporção de cada vírus inoculado, podendo aquele menos infeccioso se impor sobre o outro se a dose for suficientemente superior (ODIER, 1977; BOUCIAS & NORDIN, 1978; HUGHES, 1979; RIBEIRO, 1985).

KURSTAK & GARZON (1975) foram mais adiante, indicando que o tipo de interação viral (interferência ou sinergismo)

poderia estar dependendo da dosagem e tempo de inoculação entre cada vírus envolvido.

1.3.2.5 EFEITO DA IDADE LARVAL

A diferença na susceptibilidade de larvas de diferentes idades à infecção viral é amplamente conhecida. BERGOLD (1943) foi o primeiro a perceber esse fenômeno em três insetos, entre eles *Bombyx mori*, e refutar o comunicado de GLASER (1928), segundo quem as larvas mais velhas de *B. mori* eram mais facilmente infectadas do que as jovens. TANADA (1953) constatou uma alta susceptibilidade de *Pieris rapae* ao VG nos cinco instares larvais, havendo, no entanto, diferença no período de infecção, o qual aumentou com a maturidade larval. Esse mesmo autor comunicou mais tarde que a resistência de *P. unipuncta*, tanto ao VPN como ao VG, aumentava diretamente com a idade da larva e que este aumento na resistência, associado com o crescimento larval, é o que se conhece por "imunidade de maturação" (TANADA, 1959).

Larvas de *C. fumiferana* e *M. disstria* representam outro exemplo no qual a resistência, tanto ao VPN como ao VPC, aumenta a medida em que as larvas crescem. Porém, o desenvolvimento dessa resistência é mais rápida e acentuada para o VPN (BIRD, 1969).

A diferença de susceptibilidade larval nos diversos instares larvais pode variar enormemente, dependendo do hospedeiro e do vírus. Alguns valores apresentados mostraram uma diminuição na susceptibilidade de 48 até aproximadamente 400000 vezes em lagartas com três ou quatro instares de diferença (STAIRS, 1965; EVANS, 1981; PAYNE e col., 1981; MOSCARDI, 1983; SHAPIRO e col., 1986).

SHEPPARD & STAIRS (1977) encontraram uma grande variação na resposta aos vírus comparando lagartas de dois instares diferentes. Verificaram diferença de apenas 10 vezes na DL₅₀ entre indivíduos do 1º e 5º instar, porém essa diferença subiu para aproximadamente 130 vezes para obter-se os valores de DL₇₀ nos dois instares.

WHITLOCK (1977b) encontrou uma relação inversa entre mortalidade e idade larval quando inoculou larvas com VPN. Atribuiu este efeito à já mencionada "imunidade de maturação". No entanto, ele também mencionou que a aparente resistência das larvas mais velhas pode estar relacionada com o fato destas empuparem antes que o vírus pudesse exercer sua influência.

BOUCIAS & NORDIN (1977), estudando a susceptibilidade de *H. cunea* ao VG e VPN nos diferentes instares, verificaram que esta diminuía com o aumento da idade larval. No entanto, perceberam que a susceptibilidade das larvas mais velhas ao VG foi significativamente menor que o encontrado para o VPN.

Larvas de *Anticarsia gemmatalis* de diferentes instares apresentaram também graus de susceptibilidade diferentes, quando inoculados com seu VPN original, VPNAg. No entanto, a diferença na susceptibilidade entre os indivíduos mais sensíveis e mais resistentes foi significativamente menor que aquela calculada para outros vírus (BOUCIAS e col., 1980; MOSCARDI, 1983).

2 OBJETIVOS

Objetivou-se com o presente trabalho analisar os seguintes aspectos:

- a) Desenvolvimento da infecção por cada vírus individualmente e comparação da mesma com a infecção mista ou dupla.
- b) Interação dos patógenos no desenvolvimento da infecção mista.
- c) Competição pelos sítios de replicação nos tecidos larvais.
- d) Efeito da idade larval na infecção viral.
- e) Capacidade de produção de corpos de inclusão em infecções simples e mistas.
- f) Efeito da sequência de inoculação.

Assim se procedeu com a finalidade de melhor conhecer os mecanismos de infecção viral, as interações vírus-inseto e os fatores determinantes de especificidade e de virulência de um baculovírus.

Procurou-se estudar, num sistema composto por um hospedeiro e dois tipos de baculovírus, os efeitos da infecção mista, utilizando-se o Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) e o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg), o qual, apesar de ser originário de outro hospedeiro, mostrou-se capaz de desenvolver-se e, através de seleção, apresentar isolados altamente virulentos para *D. saccharalis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 INSETOS

Os insetos utilizados em todos os experimentos realizados foram lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae), comumente conhecidas como broca da cana-de-açúcar. Essas lagartas foram obtidas a partir de populações de laboratório da Seção de Entomologia do Instituto de Açúcar e do Alcool-IAA/PLANALSUCAR, Cosul, Araras, São Paulo. Foram criadas em tubos contendo dieta artificial, preparada segundo o método descrito por HENSLEY & HAMMOND (1968) e modificada por DEGASPARI e col. (1981).

3.1.2 VÍRUS

a) Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) obtidos originalmente no Sul dos Estados Unidos em 1978, a partir de lagartas de *D. saccharalis* infectadas com esse vírus. A sua produção no laboratório, se deu *in vivo* utilizando-se lagartas de *D. saccharalis*. As suspensões virais foram guardadas a -20°C .

b) Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) obtidos a partir de lagartas infectadas de *A. gemmatalis*, cedidas pelo do Instituto Biológico de Campinas, S.P. Esses vírus fazem parte da coleção de vírus do Laboratório de Insetos do Departamento de Genética e Evolução, I.B., UNICAMP.

3.2 MÉTODOS

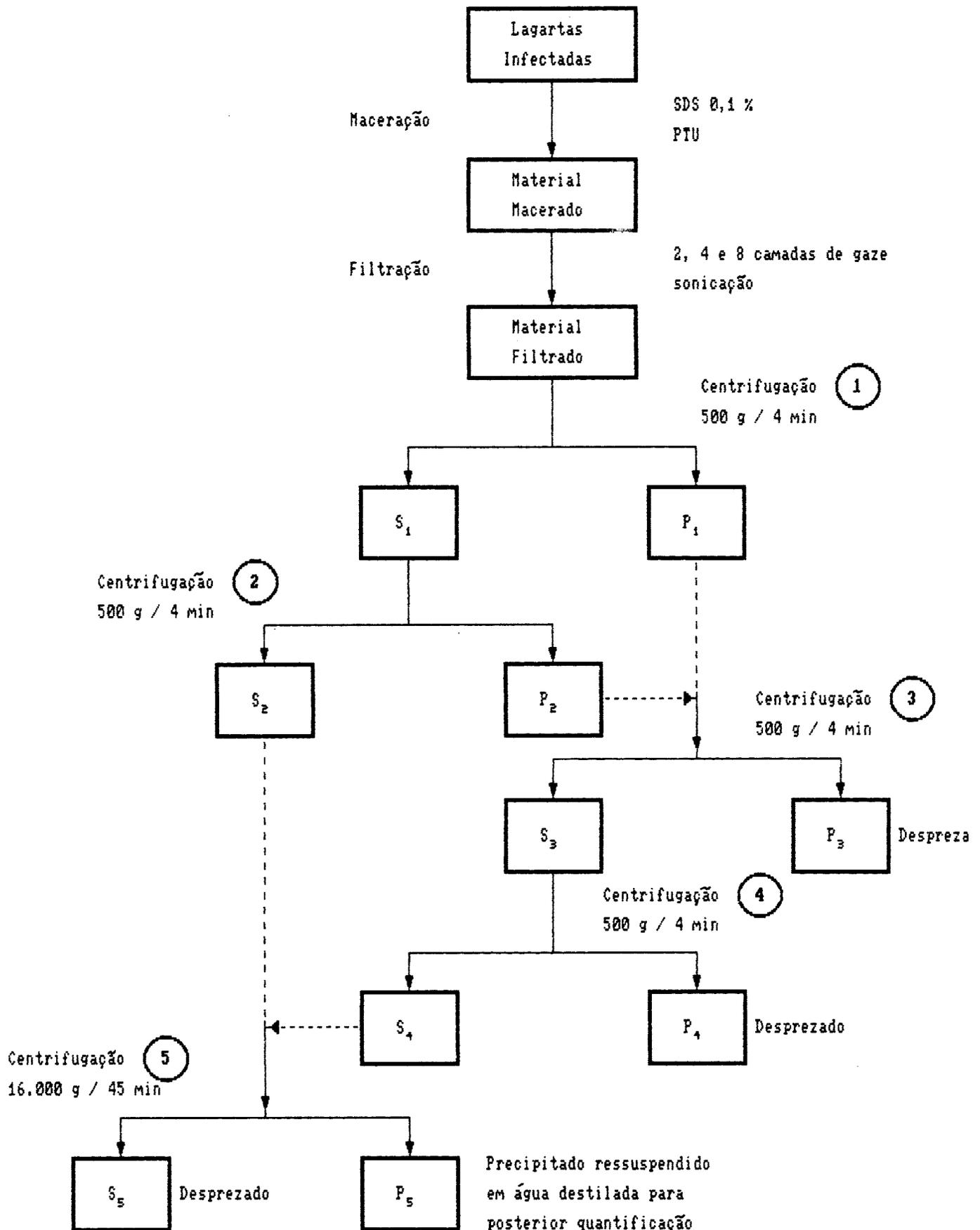
3.2.1 PURIFICAÇÃO VIRAL

3.2.1.1 PURIFICAÇÃO DO VGDs

O método adotado foi aquele descrito por PAVAN e col. (1983) com modificações (Esquema 1).

Lagartas de *D. saccharalis* mortas pela infecção com VGDs foram maceradas em liquidificador comum contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 0.1%, na proporção de 1 grama de lagarta para 10 ml de solução. O SDS facilita o rompimento das células sem afetar a estrutura ou infectividade do vírus (MARUNIAK, 1986). Adicionaram-se vários cristais de feniltiouréia (PTU) para prevenir a melanização do material. Filtrou-se a seguir o macerado em 2, 4 e 8 camadas de gaze, sonicando-se sempre o mesmo após cada filtragem, de maneira a retirar os maiores restos de tecido animal e a homogeneizar bem o material.

Esquema 1: Processo de purificação do UGDs a partir de larvas de *Diatraea saccharalis* mortas pela infecção com UGDs



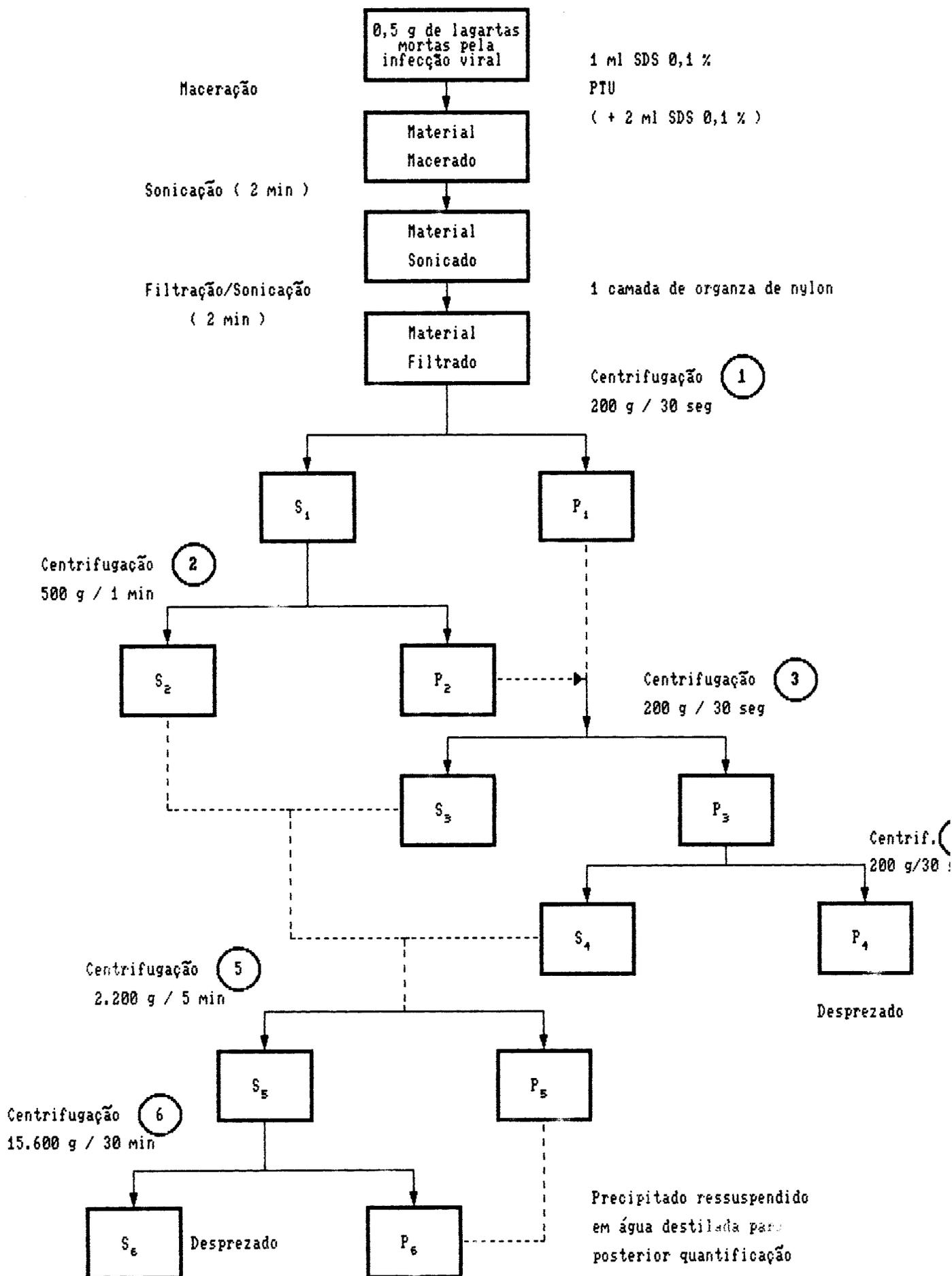
Prosseguiu-se, então, o processo de purificação por centrifugação diferencial (ciclos alternados de baixa e alta velocidade) em centrífuga BECKMAN, Modelo J2-21, Rotor JA-20. O ciclo de baixa velocidade consistiu na centrifugação do material a 500 g por 4 minutos onde foram precipitados principalmente os "debris" celulares. O ciclo de alta velocidade, com 16000 g por 45 minutos, precipitou os cristais virais do material previamente limpo pelos vários ciclos de baixa velocidade a que foram submetidos como mostra o Esquema 1. O sobrenadante final contendo muito poucos cristais virais e bastante gordura foi desprezado. O precipitado final, onde os cristais encontraram-se concentrados, foi ressuspendido num volume mínimo de água destilada para subsequente quantificação e diluição.

3.2.1.2 PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DO VGDs e VPNAg

As mesmas lagartas mortas, obtidas do experimento montado para determinação da produção viral (item 3.2.3.5), foram utilizadas para obtenção de vírus purificados simultaneamente (Esquema 2). O procedimento adotado está descrito a seguir:

Foi macerada 0.5 grama de lagarta em homogeneizador manual, juntamente com 1 ml de solução de SDS 0.1% e alguns cristais de PTU. O material foi sonicado por dois minutos e filtrado através de uma camada de organza de nylon. O homogeneizado foi lavado com mais 2 ml de SDS 0.1%, de modo a

Esquema 2: Processo de purificação diferencial de VGDs e UPNAg a partir de larvas de *Diatraea saccharalis* mortas pela infecção com VGDs e/ou UPNAg.



evitar perda de material, e filtrado na mesma camada. O filtrado foi novamente sonificado por dois minutos para dissociar qualquer acúmulo de vírus e restos celulares, e centrifugado em centrífuga de mesa FANEM-EXCELSA BABY, Modelo 208 N com cruzeta horizontal para oito tubos de 15 ml a aproximadamente 200g por 30 segundos. As velocidades baixas utilizadas serviram para precipitar restos de tecidos e células animais. O precipitado da primeira centrifugação foi ressuspenso para ser submetido a uma nova centrifugação e o sobrenadante foi centrifugado a aproximadamente 500g por 1 minuto para obter-se um sobrenadante mais limpo. Este segundo precipitado foi ressuspenso em 0.5 ml de SDS 0.1%, juntamente com o precipitado anterior, e submetido a novo ciclo de limpeza. Os sobrenadantes assim obtidos, foram centrifugados a 2200g por cinco minutos. Neste precipitado obtido já se encontraram cristais de VPNAg, devido à grande diferença existente no tamanho desta partícula viral com relação ao VGDs. O sobrenadante, que continha na sua maioria vírus de granulose, foi centrifugado em microcentrífuga INCIBRAS-SPIN I a 15600g por 30 minutos. Os precipitados das duas últimas centrifugações foram ressuspendidos juntos num total de 1 ml de água destilada para posterior quantificação.

3.2.2 QUANTIFICAÇÃO VIRAL

A quantificação de suspensões virais, após homogeneização e sonicação das mesmas, foi feita utilizando-se um

hematímetro de Neubauer em microscópio de contraste de fase LEITZ (DIALUX 20), num aumento de 400 vezes. A amostra a ser observada foi deixada em repouso no hematímetro por dois minutos antes da quantificação para precipitação do material. Foram feitas duas quantificações para cada material, uma na parte superior do hematímetro e outra na inferior, escolhendo-se para cada contagem os cinco quadrantes sendo quatro dispostos nos quatro cantos e um central. Considerou-se a contagem somente quando os valores diferiram em menos de 10% entre eles, caso contrário, uma nova homogeneização precedia-se à nova contagem, como proposto por MARTIGNIONI & IWAI (1978).

Nas soluções que continham os dois tipos de vírus utilizados, o procedimento de quantificação foi o mesmo e, devido à diferença de tamanho entre eles, foi possível o reconhecimento e quantificação diferencial de cada um.

Após a quantificação, prepararam-se soluções estoques contendo um número conhecido de cristais em cada 2.7 μ l, por ser este o volume colocado sobre as dietas e ingerido pelas lagartas no procedimento de bioensaio. Estas soluções foram mantidas a -20°C em frascos de vidro de 10 ml.

3.2.3 BIOENSAIOS

Foi seguido o método descrito por PAVAN e col. (1981) com algumas modificações.

Em placas de acrílico contendo vinte e quatro cavidades, foram colocados pequenos discos de dieta artificial de 3 mm de diâmetro por 1 mm de espessura, de modo a obter-se um disco por cavidade. Nesses discos, adicionou-se 2.7 μ l da concentração e do vírus a serem utilizados, com auxílio de um microaplicador graduado. Nos tratamentos-controle denominados "branco", a solução viral foi substituída por água destilada. Foi colocada, então, uma lagarta de 11 dias de idade (3^o instar) em cada cavidade e fechada a placa, com o objetivo de se estabelecer 24 compartimentos individuais sem comunicação. Para evitar o ressecamento dos pequenos discos de dieta, as placas foram transferidas para câmaras úmidas e estas, por sua vez, foram mantidas numa sala de 28 \pm 1^oC por 24 horas. Após esse tempo, as lagartas que ingeriram toda a dieta foram transferidas individualmente a tubos contendo dieta não contaminada. Colocaram-se estes tubos novamente na sala de 28^oC com um fotofase de 12 horas. A mortalidade larval foi verificada diariamente até o empupamento das lagartas e estas, quando mortas, eram transferidas para pequenos frascos de vidro. A presença de vírus nas lagartas mortas foi confirmada pela observação de tecido gorduroso de algumas lagartas tomadas ao acaso em microscópio de contraste de fase, assim como pela aparência leitosa que as lagartas apresentam quando contaminadas com baculovírus. As lagartas mortas pela infecção foram mantidas a -20^oC para posterior purificação ou análise microscópica de alguns tecidos.

Foram realizados bioensaios para determinar Dose Letal 50 (DL₅₀) e Tempo Letal 50 (TL₅₀), viabilidade pupal, mortalidade larval causada pela infecção com VGDs e/ou VPNAg, efeito da idade larval na infecção viral e, por último, produção de vírus em lagartas infectadas.

3.2.3.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50 (DL₅₀) E DO TEMPO LETAL 50 (TL₅₀)

Dose Letal 50 é a dose necessária para matar 50% dos indivíduos tratados com a substância estudada. Este cálculo é utilizado na determinação de potencialidade de uma substância ou estímulo, ou então, na avaliação da toxicidade de um produto ativo (TREVAN, 1927).

Através do método de inoculação viral descrito anteriormente (item 3.2.3), foram feitas 4 repetições com 20 lagartas para cada dose utilizada, conforme se descreve a seguir: VGDs - 10¹, 10², 10³, 10⁴ e 10⁵ cristais virais por lagarta; VPNAg - 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ cristais virais por lagarta. A mortalidade larval foi verificada diariamente para obtenção da DL₅₀ de cada vírus.

Para o estudo do efeito de cada vírus utilizou-se o $\log q \cdot d_i/d_0$ sendo q a razão geométrica da dosagem (neste caso, $q=10$), d_i a dose i -ésima e d_0 a primeira dose utilizada. Desse

modo, qualquer dosagem feita em progressão geométrica, independente de seus valores, passa a ter a forma $x=0, 1, 2, \dots, n$ (A. E. PIEDRABUENA, comunicação pessoal).

Tempo Letal 50 é o tempo que 50% dos indivíduos leva para morrer quando submetidos a uma certa dose da substância a ser testada. Os cálculos de DL50 e TL50 foram feitos seguindo o método Probit de acordo com BLISS (1935 a,b) e FINNEY (1971).

As lagartas que empuparam foram mantidas nos tubos para posterior análise da viabilidade pupal.

3.2.3.2 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE PUPAL

As pupas mantidas nos tubos foram observadas diariamente a fim de se verificar quantas conseguiam chegar até a fase adulta e quantas morriam na fase pupal, de modo a avaliar-se a influência dos vírus na mortalidade pupal e poder-se calcular a DL50 de larvas e pupas.

3.2.3.3 DETERMINAÇÃO DA MORTALIDADE LARVAL PELA INFECÇÃO COM VGDs E/OU VPNAg

Com a finalidade de investigar a existência de interferência entre o VGDs e VPNAg inoculados em lagartas de D.

saccharalis, foram realizados oito tratamentos diferentes de inoculação viral com estes dois tipos de vírus, os quais foram inoculados isoladamente, simultaneamente e com determinados intervalos de tempo entre as inoculações. Estes diferentes intervalos de tempo permitiram avaliar o efeito do desenvolvimento do primeiro inóculo sobre o desenvolvimento do segundo. As doses virais utilizadas foram as correspondentes à Dose Letal 65 (DL₆₅) para cada um dos vírus. Nas inoculações simultâneas, a dose do inóculo correspondeu à somatória das duas doses. Dessa maneira, as doses utilizadas foram: VGDs: 5×10^3 cristais/lagarta; VPNAg: 5×10^5 cristais/lagarta; Inóculo Misto (IM): (5×10^3 cristais de VGDs + 5×10^5 cristais de VPNAg)/lagarta. Os intervalos de tempo entre as inoculações foram de 1 e 3 dias. Para cada tratamento, foram feitas 5 repetições com 20 lagartas de 11 dias de idade. O delineamento destes experimentos foi inteiramente ao acaso de acordo com o modelo estatístico: $Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij}$, onde: μ =média; a =tratamentos; $i=8$ (ver tabela 1); e =erro; $j=5$ repetições com 20 indivíduos.

No caso em que o intervalo de tempo entre as inoculações correspondeu a 1 dia, transferiram-se aquelas que ingeriram toda a dieta diretamente para novas placas de bioensaio para a segunda inoculação. Quando o tempo foi de três dias, fez-se a transferência para tubos como indicado no item 3.2.3.3, e uma nova inoculação foi feita quando estas lagartas completaram 14 dias. Nas placas-controle denominadas de "branco", as duas inoculações foram feitas com água destilada. A Tabela 1 mostra os

tratamentos realizados.

As lagartas mortas foram mantidas a -20° C para posterior análise dos seus tecidos através do microscópio óptico.

Tabela 1: Protocolo de inoculação viral simples e mista em lagartas de *Diatraea saccharalis* para determinação da mortalidade larval.

TRATAMENTO	1.INOCULAÇÃO	INTERVALO DE TEMPO	2.INOCULAÇÃO
VG	VGDs	1 ou 3 dias	H2O
VPN	VPNAg	1 ou 3 dias	H2O
IM	VGDs + VPNAg	1 ou 3 dias	H2O
VG - VG	VGDs	1 ou 3 dias	VGDs
VPN - VPN	VPNAg	1 ou 3 dias	VPNAg
IM - IM	VGDs + VPNAg	1 ou 3 dias	VGDs + VPNAg
VG - VPN	VGDs	1 ou 3 dias	VPNAg
VPN - VG	VPNAg	1 ou 3 dias	VGDs
BRANCO	H2O	1 ou 3 dias	H2O

3.2.3.4 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA IDADE LARVAL NA INFECÇÃO VIRAL

Para estudar o efeito da idade larval de *Diatraea saccharalis* na infecção com VGDs e VPNAg, foram inoculadas lagartas de 11 e 14 dias de idade com cada um dos vírus isolada e simultaneamente como mostra a Tabela 2. Os números entre parênteses correspondem à idade larval no momento da inoculação viral. Desta maneira, foi montado um experimento fatorial totalmente casualizado utilizando-se o seguinte modelo: $Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ijk}$, onde: μ =média; a=inóculos virais; i=3 (VGDs, VPNAg e IM=VGDs+VPNAg); b=idade larval; j=2 (11 e 14 dias); e= erro; k=3 repetições com 20 indivíduos.

Tabela 2: Protocolo de inoculação viral simples e mista em lagartas de *Diatraea saccharalis* para determinação do efeito da idade larval na infecção viral.

TRATAMENTO	1ª INOCULAÇÃO	INTERVALO DE TEMPO	2ª INOCULAÇÃO
VG (11)	VGDs	3 dias	H ₂ O
VPN (11)	VPNAg	3 dias	H ₂ O
IM (11)	VGDs + VPNAg	3 dias	H ₂ O
VG (14)	H ₂ O	3 dias	VGDs
VPN (14)	H ₂ O	3 dias	VPNAg
IM (14)	H ₂ O	3 dias	VGDs + VPNAg
BRANCO	H ₂ O	3 dias	H ₂ O

As lagartas que empuparam foram mantidas nos tubos e observadas diariamente até a sua morte ou a emergência de indivíduos adultos, para se verificar a influência da infecção viral na mortalidade pupal.

3.2.3.5 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VGDs E VPNAg EM D.saccharalis

A fim de se poder avaliar a produção de cristais virais de VGDs e VPNAg isoladamente e comparar esta produção com aquela obtida quando ambos os vírus foram inoculados numa mesma lagarta, foram montados oito tratamentos esquematizados conforme tabela 3. Novamente, os números entre parênteses correspondem à idade larval no momento da inoculação viral.

A mortalidade larval foi verificada diariamente e as larvas agrupadas segundo a idade com que morreram. Desta maneira os cinco grupos formados correspondem a larvas que morreram com: 19 a 21, 22 a 24, 25 a 27, 28 a 30 e 31 a 33 dias de idade. Estas lagartas foram guardadas a -20°C para posterior purificação e quantificação viral, como descrito nos itens 3.2.1.2 e 3.2.

Tabela 3: Protocolo para avaliação da produção de VGDs e VPNAg em lagartas de *Diatraea saccharalis*.

TRATAMENTO	1. INOCULAÇÃO	INTERVALO DE TEMPO	2. INOCULAÇÃO
VG (11)	VGDs	3 dias	H ₂ O
VPN (11)	VPNAg	3 dias	H ₂ O
IM (11)	VGDs + VPNAg	3 dias	H ₂ O
VG(11)-VPN(14)	VGDs	3 dias	VPNAg
VPN(11)-VG(14)	VPNAg	3 dias	VGDs
VG (14)	H ₂ O	3 dias	VGDs
VPN (14)	H ₂ O	3 dias	VPNAg
IM (14)	H ₂ O	3 dias	VGDs + VPNAg

3.2.4 ANÁLISE DE TECIDOS DE LAGARTAS INFECTADAS

Para a análise dos tecidos larvais infectados com VGDs e/ou VPNAg, foram utilizadas as lagartas mortas e mantidas a -20°C, obtidas a partir do experimento de inoculação mista com intervalo de 3 dias entre as inoculações (item 3.2.3.3).

As lagartas foram descongeladas e dissecadas sob microscópio estereoscópio ZEISS, em lâmina escavada contendo

cloreto de sódio 0.9%. Amostras dos tecidos gorduroso e intestinal foram escolhidas para serem analisadas e fotografadas a fresco em fotomicroscópio ZEISS. O filme utilizado foi AGFA PAN COPEX, asa 100. A escolha desses tecidos em particular foi feita devido ao conhecimento prévio de que tanto Vírus de Granulose como de Poliedrose infectam preferencialmente o tecido gorduroso. Por outro lado, no caso do tecido intestinal, sua escolha se deu pelo fato de existirem controvérsias sobre a sua infecção.

3.2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os valores de mortalidade larval foram submetidos à Análise de Variância transformando os valores de porcentagem em $\text{arc. sen } \sqrt{p}$, e todos os tratamentos, comparados pelo Teste de Tukey ao nível de 1 e 5% de significância (STEEL & TORRIE, 1980).

Os dados de mortalidade, obtidos a partir de lagartas inoculadas com VGDs e VPNAg isolada ou simultaneamente (IM), foram analisados para se conhecer o tipo de interação existente entre estes dois vírus: sinergismo, antagonismo ou efeito aditivo. Para tal foi aplicada a fórmula de Abbot, que é, na realidade, um teste de ação independente. Caso cada vírus agisse de maneira independente e todos os insetos fossem igualmente susceptíveis, a mortalidade devida à infecção mista (IM) seguiria a seguinte fórmula de probabilidade: $p = p_1 + p_2 - p_1p_2$, onde: p = proporção da população afetada pela inoculação mista; p_1 e

p_2 = as proporções da população afetada pelos vírus 1 e 2, respectivamente, e p_1p_2 = proporção susceptível aos dois vírus, assumindo que cada um agisse independentemente. Se p é considerado a mortalidade esperada, baseada em valores esperados e definidos para p_1 e p_2 , então qualquer variação significativa de p (pelo teste do qui-quadrado), quando os vírus 1 e 2 são inoculados simultaneamente (IM), indicará sinergismo (p obtido, maior que p esperado) ou antagonismo (p obtido, menor que p esperado) (BENZ, 1971; HARPER, 1986).

As retas probíticas dos diferentes tratamentos foram analisadas através do teste de paralelismo (A. E. PIEDRABUENA, comunicação pessoal).

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50 (DL₅₀) DO VÍRUS DE GRANULOSE DE Diatraea saccharalis (VGDs) EM Diatraea saccharalis

Lagartas de *D. saccharalis* com 11 dias de idade inoculadas com cinco doses diferentes de VGDs (de 10^1 a 10^5 cristais/larva) apresentaram uma mortalidade diretamente proporcional à dose inoculada, o mesmo acontecendo quando considerada a soma das mortalidades obtidas nas fases larval e pupal.

A Tabela 4 mostra o número de lagartas tratadas com cada dose viral e a mortalidade obtida nas fases larval e pupal isoladamente, assim como a somatória das mortalidades obtidas em cada caso. O cálculo da mortalidade de larvas e de larvas + pupas foi feito considerando-se o número total de larvas inoculadas. Já no caso da mortalidade pupal isoladamente, foram considerados aqueles indivíduos que não morreram na fase larval, conseguindo, assim, chegar até a fase pupal. No tratamento-controle, com 80 lagartas nas quais se inoculou água destilada, não se obteve nenhum indivíduo morto pela infecção viral.

O VGDs, a partir da dose 10^1 , começou a infectar lagartas de *D. saccharalis*, assim como a ocasionar a morte de algumas pupas. Com doses maiores, este efeito sobre indivíduos

Tabela 4. Mortalidade causada pela infecção viral nas larvas e pupas de *Diatraea saccharalis* inoculadas com várias doses de Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs)

Dose (cristais/larva)	Nº de Larvas Inoculadas	Larvas Mortas		Nº de Pupas(1)	Pupas Mortas		Larvas + Pupas Mortas	
		Nº	%		Nº	%	Nº (2)	% (3)
10 ¹	80	4	5.0	76	3	3.9	7	8.7
10 ²	79	13	16.5	66	16	24.2	29	36.7
10 ³	78	29	37.2	49	31	63.3	60	76.9
10 ⁴	79	63	79.7	16	16	100.0	79	100.0
10 ⁵	79	72	91.1	7	7	100.0	79	100.0
H ₂ O	80	0	0.0	80	0	0.0	0	0.0

(1) Larvas de *D. saccharalis* inoculadas que chegaram à fase pupal.

(2) Soma dos indivíduos mortos nas fases larval e pupal.

(3) Porcentagens obtidas considerando o número total de larvas inoculadas para cada dose.

Tabela 5. Determinação da DL₅₀ (cristais / larva) do VGDs em *Diatraea saccharalis*

Mortalidade de:	DL ₅₀	Intervalo de Confiança
Larvas	1.62 x 10 ³	1.05 x 10 ³ --- 2.50 x 10 ³
Larvas + Pupas	1.84 x 10 ²	1.30 x 10 ² --- 2.60 x 10 ²

que não morrem como lagartas mas que não conseguem passar da fase pupal fica mais evidente, como pode ser constatado na Tabela 4.

Com esses dados foi possível calcular a DL₅₀ em lagartas e lagartas + pupas, cujos valores estão apresentados na Tabela 5. Pode-se observar que o valor da DL₅₀ de larvas + pupas é quase 10 vezes menor que o valor obtido quando considerado somente a mortalidade larval. Este resultado é facilmente visualizado na Figura 1 onde se encontram as retas e equações probíticas correspondentes à mortalidade em função do log da dose inoculada (d_i), sobre a dose inicial (d_0 - neste caso 10^1), ou seja: $\log d_i/d_0$. Nessa figura, nota-se a influência da mortalidade pupal nos indivíduos inoculados com VGDs, não só no que diz respeito à diferença no valor da DL₅₀, mas também na inclinação da reta, cujo valor é maior (1.1551 vs 0.7969).

4.2 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50 (DL₅₀) DO VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE Anticarsia gemmatalis (VPNAg) EM Diatraea saccharalis

Quatro doses de VPNAg foram utilizadas para inocular lagartas de D. saccharalis com 11 dias de idade: 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 cristais virais por lagarta. Neste caso, de maneira semelhante ao VGDs, as mortalidades larval e larval + pupal foram aumentando à medida que a dose inoculada foi maior, porém não se verificou um efeito marcante do vírus na mortalidade pupal

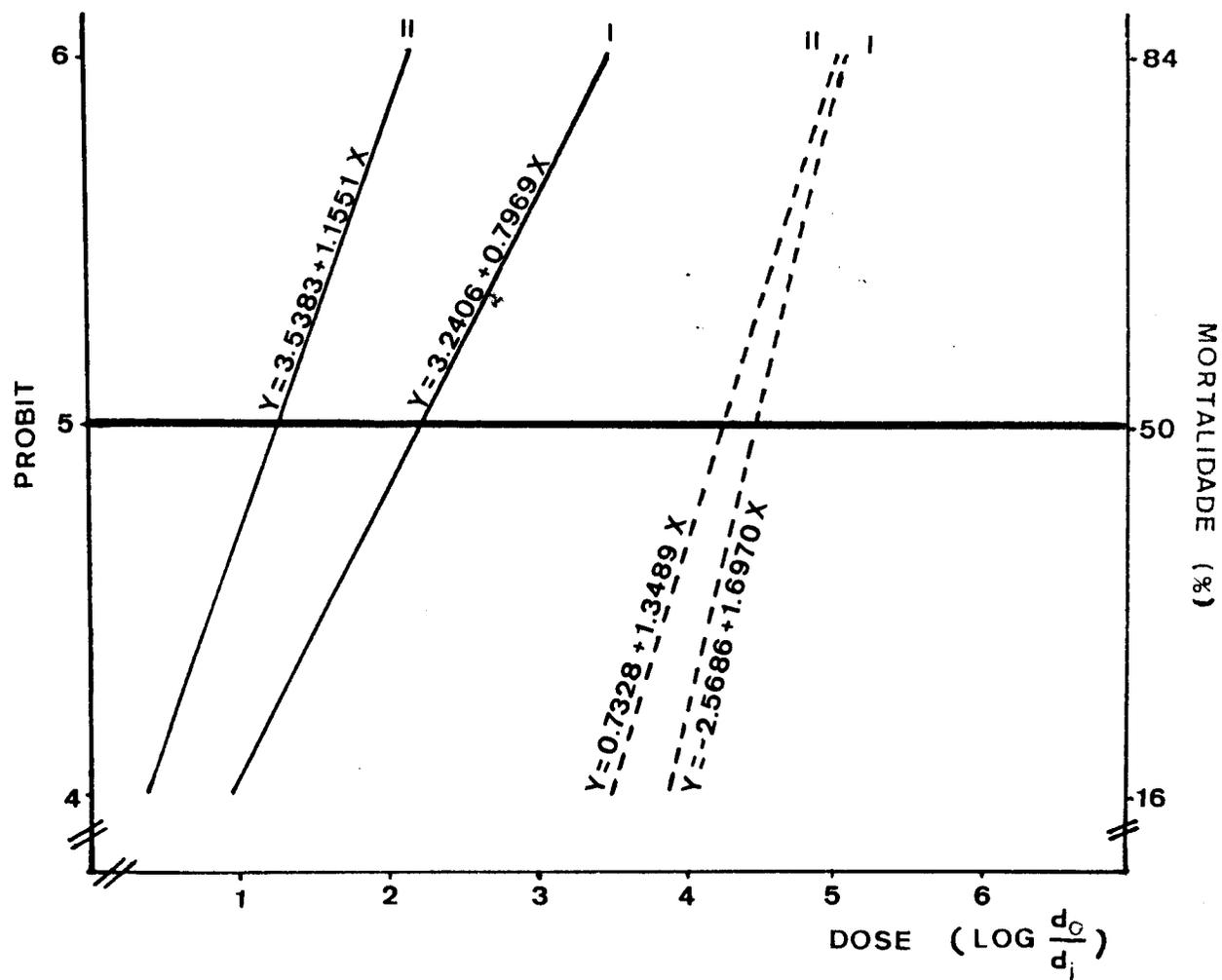


Figura 1. Equações e retas probíticas correspondentes à mortalidade larval e larval+pupal de *Diatraea saccharalis* inoculadas com várias doses de VGDs e VPNAg.

$d_0 = 10$; (—) VGDs; (---) VPNAg; (I) curva de mortalidade larval; (II) curva de mortalidade larval+pupal.

(Tabela 6). Na Figura 1, isto pode ser melhor visualizado, uma vez que as retas obtidas tanto para a mortalidade larval como para a mortalidade larval + pupal se comportam como paralelas (teste de paralelismo), não apresentando, portanto, diferença significativa no valor da inclinação da reta (1.3489 vs. 1.6970).

A Tabela 7 apresenta os valores de DL_{50} do VPNAg obtidos em lagartas e lagartas + pupas de *D. saccharalis*, sendo a diferença entre eles menor que duas vezes.

Na Figura 1, pode-se também observar claramente a diferença entre os valores da DL_{50} , para lagartas, obtidas para VGDs (vírus original da lagarta) e VPNAg (inoculado num hospedeiro alternativo), sendo a DL_{50} deste último mais de 100 vezes maior que a do VGDs (DL_{50} VGDs: 1.62×10^3 ; DL_{50} VPNAg: 2.91×10^5).

4.3 DETERMINAÇÃO DA MORTALIDADE LARVAL PELA INFECÇÃO COM VGDs E/OU VPNAg. INTERVALO ENTRE INOCULAÇÕES: 1 DIA

As lagartas de *D. saccharalis* submetidas a uma primeira inoculação com VGDs, VPNAg ou inóculo misto (IM = VGDs + VPNAg) e novamente inoculadas, 1 dia depois, com o mesmo, ou outro inóculo, (Tabela 1) apresentaram comportamentos diferentes quanto à mortalidade larval e Tempo Letal 50 (TL_{50}).

Tabela 6. Mortalidade causada pela infecção viral nas larvas e pupas de *Diatraea saccharalis* inoculadas com várias doses de Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg)

Dose (cristais/larva)	Nº de Larvas Inoculadas	Larvas Mortas		Nº de Pupas(1)	Pupas Mortas		Larvas + Pupas Mortas	
		Nº	%		Nº	%	Nº (2)	% (3)
10^4	80	1	1.3	79	3	3.8	4	5.0
10^5	80	19	23.7	61	10	16.4	29	36.3
10^6	80	64	80.0	16	2	12.5	66	82.5
10^7	80	79	98.7	1	1	100.0	80	100.0
H ₂ O	80	0	0.0	80	0	0.0	0	0.0

(1) Larvas de *D. saccharalis* inoculadas que chegaram à fase pupal.

(2) Soma dos indivíduos mortos nas fases larval e pupal.

(3) Porcentagens obtidas considerando o número total de larvas inoculadas para cada dose.

Tabela 7. Determinação da DL₅₀ (cristais / larva) do VPNAg em *Diatraea saccharalis*

Mortalidade de:	DL ₅₀	Intervalo de Confiança
Larvas	2.91×10^5	2.21×10^5 --- 3.83×10^5
Larvas + Pupas	1.81×10^5	1.77×10^5 --- 1.85×10^5

Os sintomas típicos de infecção causados por baculovírus (esbranquiçamento do corpo, perda do apetite e da mobilidade) começaram a aparecer, nas lagartas infectadas, só alguns dias após a inoculação.

A Tabela 8 mostra os dados de mortalidade larval devido à infecção viral, obtidos nos diferentes tratamentos. Nos tratamentos-controle, onde o inóculo viral foi substituído por água destilada, não se obteve nenhuma lagarta morta por vírus. Os dados de mortalidade (%) foram transformados em $\text{arc. sen} \sqrt{p}$ para a análise de variância e subsequente análise dos contrastes, entre as médias obtidas, pelo teste de Tukey. A Tabela 9 mostra os valores das médias de cada tratamento, assim como os valores dos contrastes, sendo possível comparar o grau de significância, ou a falta do mesmo, entre os oito tratamentos. Estes mesmos dados encontram-se de maneira resumida na Tabela 8, onde a presença de uma mesma situada ao lado dos valores de mortalidade larval correspondem a tratamentos cujas mortalidades não diferiram significativamente. Nesta mesma Tabela, encontram-se também os valores de TL_{50} para cada tratamento.

A mortalidade obtida nas lagartas inoculadas aos 11 dias com VGDs [VG(11)] ou com VPNAg [VPN(11)] não foi significativamente diferente, mesmo existindo uma diferença de 100 vezes entre as doses: 5×10^3 cristais de VGDs e 5×10^5 cristais de VPNAg/lagarta.

Tabela 8. Mortalidade devido à infecção viral e Tempo Letal 50 (TL₅₀) em larvas de *Diatraea saccharalis* submetidas à inoculação com VGDs e/ou VPNAg. (1),(2)

Tratamento (3)	Nº de Larvas Inoculadas	Mortalidade Larval		Significância (4)	TL ₅₀ (dias)	I.C. (5) (dias)
		Nº	%			
VG(11)	100	53	53.0	a	25.2	24.3 - 25.6
VPN(11)	96	68	70.8	a b	19.4	18.9 - 19.9
VG(11)-VG(12)	100	78	78.0	a b	20.2	19.0 - 21.7
VPN(11)-VPN(12)	96	86	89.6	b c	15.1	15.1 - 15.1
VPN(11)-VG(12)	99	86	86.9	b c	15.9	15.9 - 15.9
VG(11)-VPN(12)	100	91	91.0	b c	17.7	17.4 - 18.0
IM(11)	100	94	94.0	b c	16.0	15.7 - 16.4
IM(11)-IM(12)	98	97	99.0	c	15.6	15.6 - 15.6
H ₂ O	99	0	0.0	---	---	---

(1) Intervalo entre inoculações: 1 dia.

(2) Doses: VG = 5×10^3 cristais de VGDs / larva.

VPN = 5×10^5 cristais de VPNAg / larva.

IM = (5×10^3 cristais de VGDs + 5×10^5 cristais de VPNAg) / larva.

(3) Os números entre parênteses correspondem à idade larval (dias) no momento da inoculação

(4) Letras iguais correspondem a tratamentos cujas mortalidades não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5 %.

(5) I.C. = Intervalo de Confiança do TL₅₀.

Tabela 9: Significância dos contrastes entre médias de arco sen pelo teste de Tukey.

Dados referentes à tabela número 8.

	UPN	IM	UG - UG	UPN-UPN	IM - IM	UG - UPN	UPN - UG	Médias
UG	10.93 N.S.	30.72 **	16.15 N.S.	25.28 *	40.68 **	27.99 *	25.39 *	46.74
	UPN	19.79 N.S.	5.22 N.S.	14.35 N.S.	29.75 **	17.06 N.S.	14.46 N.S.	57.67
		IM	14.57 N.S.	5.44 N.S.	9.96 N.S.	2.73 N.S.	5.33 N.S.	77.46
			UG - UG	9.13 N.S.	24.53 *	11.84 N.S.	9.24 N.S.	62.89
				UPN-UPN	15.40 N.S.	2.71 N.S.	0.11 N.S.	72.02
					IM - IM	12.69 N.S.	15.29 N.S.	87.42
						UG - UPN	2.60 N.S.	74.73
							UPN - UG	72.13

Δ 5 % = 23.36

Δ 1 % = 28.06

N.S. = Não Significativo

* = Significativo ao nível de 5 %

** = Significativo ao nível de 1 %

A mortalidade obtida nas lagartas inoculadas com VGDs, VPNAg ou IM aos 11 dias não diferiu significativamente daquela em que o mesmo vírus foi inoculado novamente no dia seguinte: [VG(11)-VG(12), VPN(11)-VPN(12) e IM(11)-IM(12)], mostrando que uma segunda inoculação com o mesmo inóculo, 24 horas depois, não aumenta a porcentagem de mortalidade obtida com uma inoculação. Verifica-se, no entanto, uma diminuição nos valores dos TL₅₀ nos casos em que foram administradas doses virais duplas (Tabela 8). Nas Figuras 2a, 2b e 2c, encontram-se as equações e retas probíticas correspondentes à mortalidade larval em função do tempo. Nelas, observa-se que as inclinações das retas, nos experimentos de inoculação dupla, são maiores, o que corresponde a um efeito viral maior por unidade de tempo. Além disso, nestes tratamentos, a mortalidade iniciou-se num período de tempo menor quando comparada aos tratamentos 'simples', sendo que o IM foi o único tratamento que fugiu a este comportamento.

Quando o VPNAg foi inoculado 24 horas após uma primeira inoculação com VGDs [VG(11)-VPN(12)], a mortalidade larval obtida foi maior quando comparada ao tratamento contendo somente VGDs, levando também a uma considerável diminuição do TL₅₀ (Tabela 8). Na Figura 2a pode-se observar que a reta probítica desse tratamento tem uma inclinação maior que aquelas obtidas para VG(11) e VG(11)-VG(12).

Por outro lado, quando se inocula o VGDs um dia depois do VPNAg [VPN(11)-VGDs(12)], a mortalidade obtida não difere

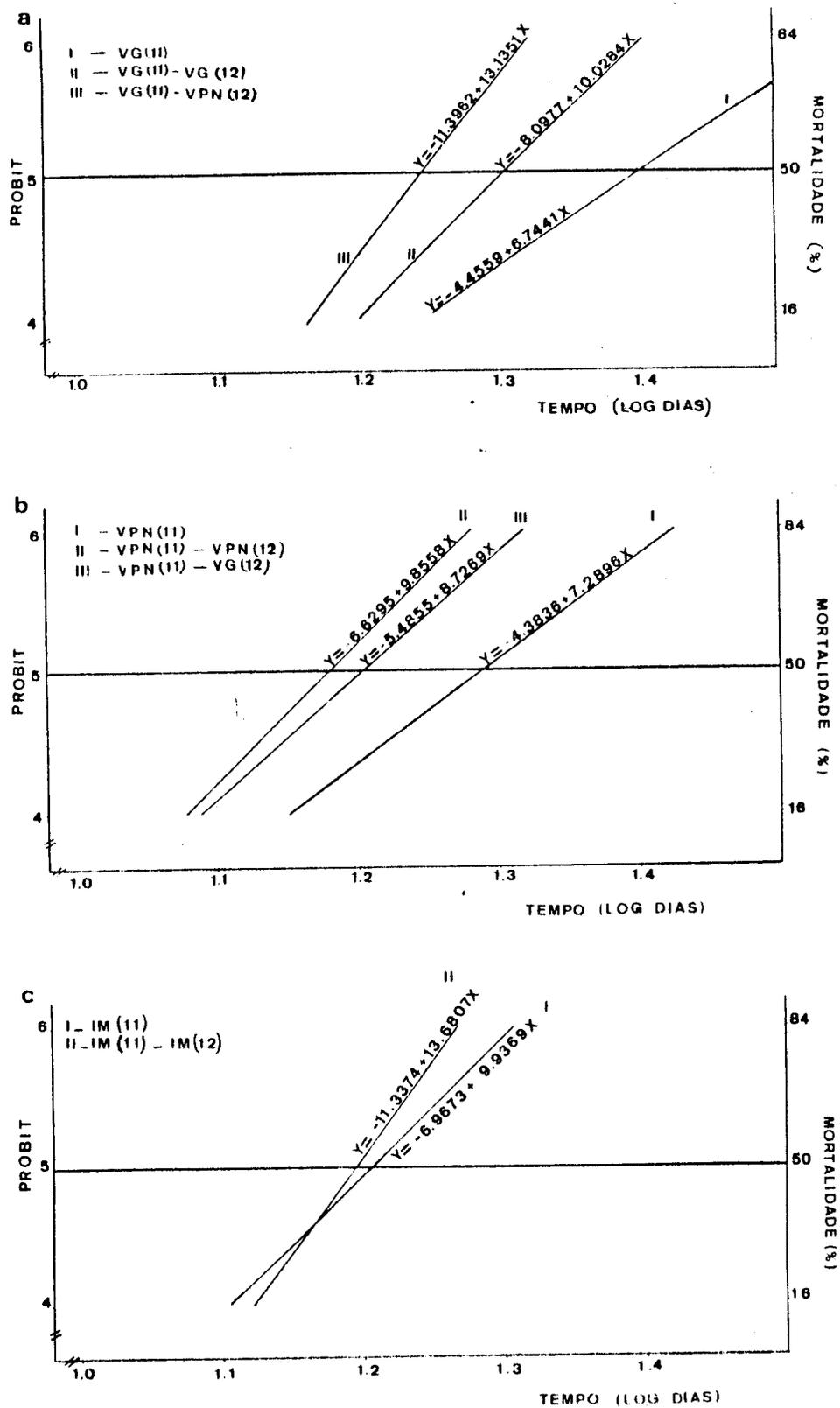


Figura 2. Equações e retas probíticas correspondentes à mortalidade larval de *Diatraea saccharalis* em função do tempo. Inóculos: VGDs, VPNAg e inóculo misto (IM). Intervalo entre inoculações: 1 dia.

significativamente daquela obtida pela inoculação simples de VPNAg, havendo, no entanto, uma queda no valor de TL₅₀ (Tabela 8). Através da Figura 2b, é possível verificar que uma segunda inoculação independentemente do tipo viral, leva a uma diminuição no valor do TL₅₀ e a um aumento na inclinação da reta probítica.

A ordem de inoculação dos dois vírus utilizados não altera a mortalidade larval no caso em que o intervalo entre estas inoculações é de 1 dia.. Isto pode ser observado na Tabela 8 onde os tratamentos VPN(11)-VG(12) e VG(11)-VPN(12) não apresentaram diferenças significativas.

Analisando os dados de mortalidade obtidos pelos tratamentos com VGDs [VG(11)], VPNAg [VPN(11)] e inóculo misto [IM(11)], através da aplicação da fórmula de Abbot, não se verificou a existência de antagonismo entre os vírus inoculados simultaneamente, dado o $\chi^2 = 0.69$ (G.L.=1), e sim um efeito aditivo entre eles.

4.4 DETERMINAÇÃO DA MORTALIDADE LARVAL PELA INFECÇÃO COM VGDs E/OU VPNAg. INTERVALO ENTRE INOCULAÇÕES: 3 DIAS

Os resultados de mortalidade e TL₅₀ dos vários tratamentos de inoculação viral (com 3 dias de intervalo) encontram-se sumarizados na Tabela 10. Não se obteve nenhuma lagarta infectada no experimento-controle onde o inóculo viral

Tabela 10. Mortalidade devido à infecção viral e Tempo Letal 50 (TL₅₀) em larvas de *Diatraea saccharalis* submetidas à inoculação com VGDs e/ou VPNAg. (1),(2)

Tratamento (3)	Nº de Larvas Inoculadas	Mortalidade Larval		Significância (4)	LT ₅₀ (dias)	I.C. (5) (dias)
		Nº	%			
VPN(11)	99	56	56.6	a	21.3	20.4 - 22.3
VPN(11)-VG(14)	95	66	69.5	a b	17.1	16.5 - 17.7
VG(11)	100	71	71.0	a b	18.2	17.3 - 19.7
IM(11)	100	84	84.0	a b c	15.7	15.3 - 16.2
VPN(11)-VPN(14)	87	71	81.6	a b c	17.0	16.4 - 17.6
IM(11)-IM(14)	93	80	86.0	a b c	15.9	15.5 - 16.3
VG(11)-VG(14)	99	84	84.8	b c	18.4	18.1 - 18.7
VG(11)-VPN(14)	96	89	92.7	c	17.2	15.9 - 18.7
H ₂ O	98	0	0.0	---	---	---

(1) Intervalo entre inoculações: 3 dias.

(2) Doses: VG = 5×10^3 cristais de VGDs / larva.

VPN = 5×10^5 cristais de VPNAg / larva.

IM = (5×10^3 cristais de VGDs + 5×10^5 cristais de VPNAg) / larva.

(3) Os números entre parênteses correspondem à idade larval (dias) no momento da inoculação

(4) Letras iguais correspondem a tratamentos cujas mortalidades não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5 %.

(5) I.C. = Intervalo de Confiança do TL₅₀.

foi substituído por água destilada.

A Tabela 11 apresenta os valores das médias utilizadas na análise de variância a que foram submetidos os dados de mortalidade, após conversão dos mesmos a $\text{arc. sen} \sqrt{\hat{p}}$, assim como os contrastes entre estes valores. A partir desta tabela, é possível verificar-se o grau de significância entre as mortalidades larvais obtidas para cada tratamento de maneira semelhante ao item anterior. Estes dados encontram-se também na Tabela 10, onde a ausência de diferença significativa entre mortalidades está representada pela presença da mesma letra.

Neste experimento, da mesma forma que no visto anteriormente, a mortalidade larval obtida pelos tratamentos com VGDs e VPNAg inoculados isoladamente em lagartas de 11 dias [VG(11) e VPN(11)], não apresentou diferenças significativas, ficando dentro do intervalo de confiança calculado para as doses utilizadas que correspondem à DL₅₀.

Comparando-se as mortalidades larvais devidas à infecção pelo mesmo vírus inoculado uma ou duas vezes [i.e.: VPN(11) vs. VPN(11)-VPN(14); VG(11) vs. VG(11)-VG(14); IM(11) vs. IM(11)-IM(14)], pode-se comprovar a inexistência de um aumento significativo de lagartas mortas devido à segunda inoculação. No primeiro caso, porém, existe uma diminuição no TL₅₀, o que não acontece nos dois últimos casos. Na Figura 3a pode-se observar, pela inclinação da reta, que existe um aumento na velocidade de ação viral quando o VGDs é inoculado duas vezes. No entanto,

Tabela 11: Significância dos contrastes entre médias de arco sen $\sqrt{\hat{p}}$ pelo teste de Tukey.
 Dados referentes à tabela número 10.

	UPN	IM	VG - VG	UPN-UPN	IM - IM	VG - UPN	UPN - VG	Médias
VG	8.78	9.78	12.22	9.95	11.01	21.10	0.54	57.62
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	*	N.S.	
UPN	18.56	21.00	18.73	19.79	29.88	8.24	48.84	
	N.S.	*	N.S.	N.S.	**	N.S.		
IM	2.44	0.17	1.23	11.32	10.32	67.40		
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.			
VG - VG	2.27	1.21	8.88	12.76	69.84			
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.				
UPN-UPN	1.06	11.15	10.49	67.57				
	N.S.	N.S.	N.S.					
IM - IM	10.09	11.55	68.63					
	N.S.	N.S.						
VG - UPN	21.64	78.72						
	*							
UPN - VG		57.08						

Δ 5 % = 20.40

Δ 1 % = 24.49

N.S. = Não Significativo

* = Significativo ao nível de 5 %

** = Significativo ao nível de 1 %

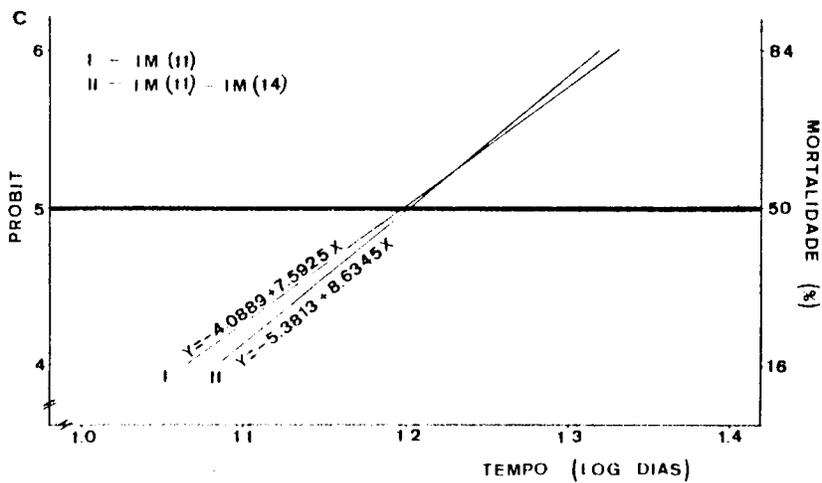
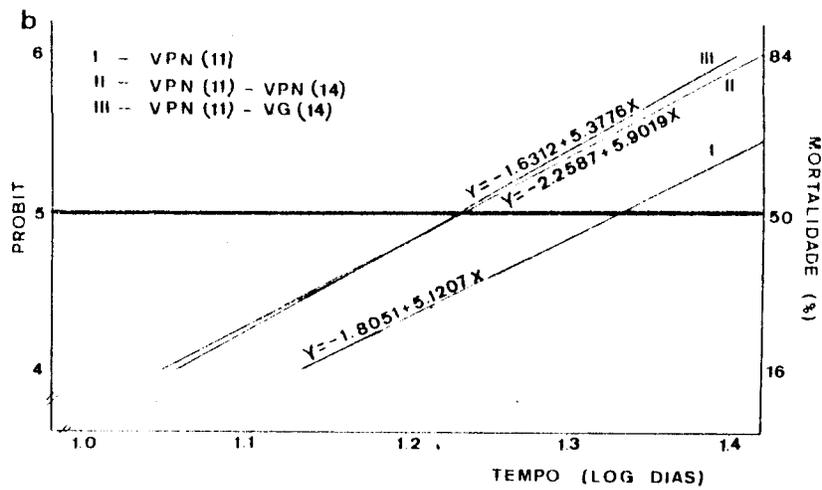
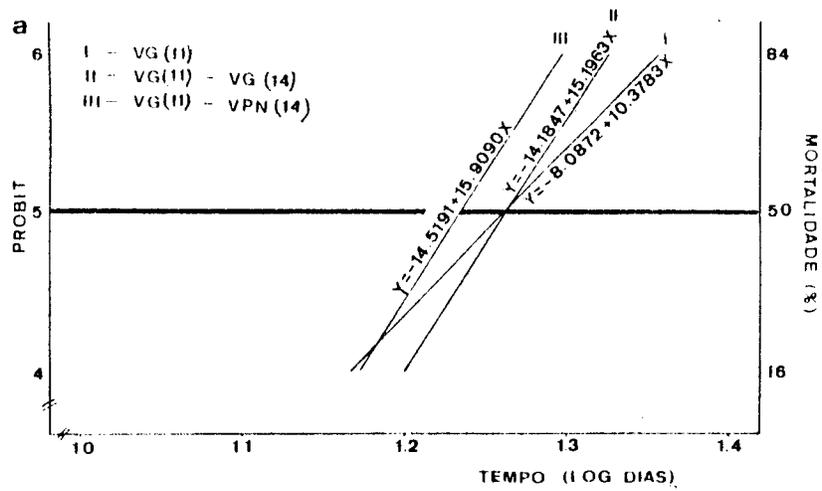


Figura 3. Equações e retas probíticas correspondentes à mortalidade larval de *Diatraea saccharalis* em função do tempo. Inóculos: VGDs, VPNAg e inóculo misto (IM). Intervalo entre inoculações: 3 dias.

comparando-se as retas probíticas obtidas para os tratamentos de inoculação simples e dupla de VPNAg (Figura 3b), não se obteve diferenças na inclinação das retas. Este paralelismo entre as retas mostra que o modo de atuação dos vírus nestes dois tratamentos é o mesmo, sendo, porém, o tratamento duplo claramente de ação mais rápida, levando um tempo menor para matar as lagartas. Nos casos em que o IM foi inoculado uma ou duas vezes [IM(11); IM(11)-IM(14)] (Figura 3c), os resultados não apresentaram nenhuma diferença considerável no que diz respeito à mortalidade, inclinação da reta ou intensidade de ação do vírus, podendo, portanto, estes dois tratamentos, serem considerados iguais.

Quando o VPNAg é inoculado três dias após o VGDs [VG(11)-VPN(14)], a mortalidade obtida neste tratamento é significativamente maior que aquela obtida pelo tratamento simples com VGDs [VG(11)] (Tabela 10), sendo também a inclinação da sua reta probítica maior (Figura 3a), demonstrando uma diferença na atuação viral entre estes tratamentos. Por outro lado, a única diferença encontrada entre o tratamento em questão [VG(11)-VPN(14)] e o de dupla inoculação com VGDs [VG(11)-VG(14)] está na maior intensidade do primeiro no que diz respeito à velocidade de ação, sem existir, no entanto, diferença considerável na mortalidade causada em cada caso.

Sendo o VGDs o vírus inoculado três dias após o VPNAg [VPN(11)-VG(14)], observa-se que a mortalidade obtida não difere

significativamente dos tratamentos que utilizam VPNAg em dose simples ou dupla [i.e.: VPN(11); VPN(11)-VPN(14)] (Tabela 10). O mesmo acontece com a inclinação das retas apresentadas na Figura 3b.

Quando o VPNAg é inoculado três dias após o VGDs [VG(11)-VPN(14)], a mortalidade obtida é significativamente maior que aquela do tratamento inverso [VPN(11)-VG(14)], mostrando neste caso, uma alteração devida à sequência de inoculação. É importante ressaltar que as doses utilizadas são as correspondentes à DL_{65} para larvas de 11 dias de idade e que, para cada vírus, a dose utilizada, tanto em indivíduos de 11 como de 14 dias, foi a mesma.

A mortalidade larval obtida da inoculação simultânea com VGDs e VPNAg [IM(11)] não diferiu significativamente daquela esperada se cada um dos vírus atuasse de maneira independente no inseto ($\chi^2 = 0.13$, G.L. = 1).

4.5 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DA IDADE LARVAL NA INFECÇÃO VIRAL

Lagartas de *D. saccharalis* tratadas com 11 ou 14 dias de idade com os seguintes inóculos virais: VGDs - 10^4 cristais/lagarta; VPNAg - 10^6 cristais/lagarta; IM - (10^4 cristais de VGDs + 10^6 cristais de VPNAg)/lagarta, foram acompanhadas até a fase adulta a fim de se obter informação sobre

o efeito da idade na infecção viral não só das lagartas mas também das pupas. Os resultados encontram-se nas Tabelas 12 e 13. Na Tabela 12, acham-se os valores de mortalidade obtidos nas fases larval e pupal, isoladamente, assim como a somatória de ambos. Os cálculos de mortalidade foram feitos considerando-se o número total de lagartas tratadas, com exceção dos casos de mortalidade pupal isoladamente, onde foram considerados somente os indivíduos que chegaram até essa fase. Portanto, o número de pupas com o qual foram feitos estes cálculos não foi o mesmo para todos os tratamentos. No grupo de insetos no qual o inóculo viral foi substituído por água destilada, 100% das lagartas chegaram à fase adulta.

Das lagartas tratadas com VGDs e VPNAg aos 11 dias de idade, 10 chegaram à fase pupal em cada um dos casos, porém, destes, só aqueles indivíduos inoculados com VPNAg passaram para a fase adulta na sua totalidade, o que não aconteceu quando o inóculo foi VGDs, onde a metade das pupas morreu infectada, sendo que somente 5 indivíduos chegaram à fase adulta. No caso das lagartas cujo inóculo foi misto [IM(11)], apenas 3 das 60 lagartas chegaram a fase pupal e morreram como tal.

A mortalidade larval obtida em cada um desses tratamentos não apresentou diferenças significativas entre elas, como pode ser observado na Tabela 13. Nela também estão

Tabela 12. Mortalidade causada pela infecção viral nas larvas e pupas de *Diatraea saccharalis* inoculadas a diferentes idades com VGDs, VPNAg ou Inóculo Misto (IM). (1)

Tratamento (2)	Nº de Larvas Inoculadas	Larvas Mortas		Nº de Pupas(3)	Pupas Mortas		Larvas + Pupas Mortas	
		Nº	%		Nº	%	Nº (4)	% (5)
VG(11)	60	50	83.3	10	5	50.0	55	91.7
VPN(11)	60	50	83.3	10	0	0.0	50	83.3
IM(11)	60	57	95.0	3	3	100.0	60	100.0
VG(14)	60	24	40.0	36	5	13.9	29	48.3
VPN(14)	60	33	55.0	27	4	14.8	37	61.7
IM(14)	60	36	60.0	24	3	12.5	39	65.0
H ₂ O	60	0	0.0	60	0	0.0	0	0.0

(1) Doses: VG = 10^4 cristais de VGDs / larva.

VPN = 10^6 cristais de VPNAg / larva.

IM = (10^4 cristais de VGDs + 10^6 cristais de VPNAg) / larva.

(2) Os números entre parênteses correspondem à idade larval (dias) no momento da inoculação.

(3) Larvas de *Diatraea saccharalis* inoculadas que chegaram à fase pupal.

(4) Soma dos indivíduos mortos nas fases larval e pupal.

(5) Porcentagens obtidas considerando número total de larvas inoculadas em cada tratamento.

Tabela 13. Mortalidade e Tempo Letal 50 (TL₅₀) em larvas de *Dia-
traea saccharalis* inoculadas a diferentes idades com
VGDs, VPNAg ou Inóculo Misto (IM). (1),(2)

Tratamento	Idade das Larvas Inoculadas (dias)	Mortalidade Larval % (3)	Significância (4)	LT ₅₀ (dias)	I.C. (5) (dias)
VG	11	83.3	a	14.6	14.2 - 15.0
VG	14	40.0	b	--	-----
VPN	11	83.3	a	11.6	10.9 - 12.3
VPN	14	55.0	b	18.4	17.2 - 19.8
IM	11	95.0	a	10.3	9.8 - 10.8
IM	14	60.0	b	17.9	17.1 - 18.7

(1) Dados referentes à Tabela 12.

(2) Doses: VG = 10^4 cristais de VGDs / larva.

VPN = 10^6 cristais de VPNAg / larva.

IM = (10^4 cristais de VGDs + 10^6 cristais de VPNAg) / larva.

(3) Número de larvas inoculadas em cada tratamento: 60.

(4) Letras iguais correspondem a tratamentos cujas mortalidades não apresentaram diferenças significativas ao nível de 5 %.

(5) I.C. = Intervalo de Confiança do TL₅₀.

apresentados os valores de TL₅₀ com seus respectivos intervalos de confiança (I.C.). O valor de TL₅₀ do IM(11) foi o menor, seguido pelo VPNAg(11), sendo o VGDs(11) o tratamento que teve um maior valor de TL₅₀. No entanto, como pode ser visto na Figura 4 pela inclinação da reta, (valor de b na equação), este último tratamento é aquele que apresenta maior mortalidade por unidade de tempo. A comparação dos valores de inclinação das retas dos três tratamentos [VG(11); VPNAg(11) e IM(11)] indica um comportamento intermediário na velocidade de ação do inóculo misto.

Quando os mesmos três inóculos utilizados anteriormente são administrados em lagartas com 14 dias de idade (4º instar), a mortalidade larval cai significativamente, enquanto se observa um aumento nos valores de TL₅₀ quando comparados aos inóculos aos 11 dias de idade, como mostrado na Tabela 13.

A Figura 4 mostra a semelhança de comportamento dos tratamentos VPNAg(14) e IM(14). Por outro lado, a análise do tipo de interação viral existente entre os dois vírus inoculados no tratamento IM(14) demonstrou ser do tipo aditivo. Assim sendo, verifica-se que o efeito do VPNAg em lagartas de 14 dias é mais evidente do que no caso do VGDs.

Através da Tabela 12, nota-se que não existe grande diferença entre a mortalidade pupal obtida nos três tratamentos, sendo, nos três casos, relativamente baixa.

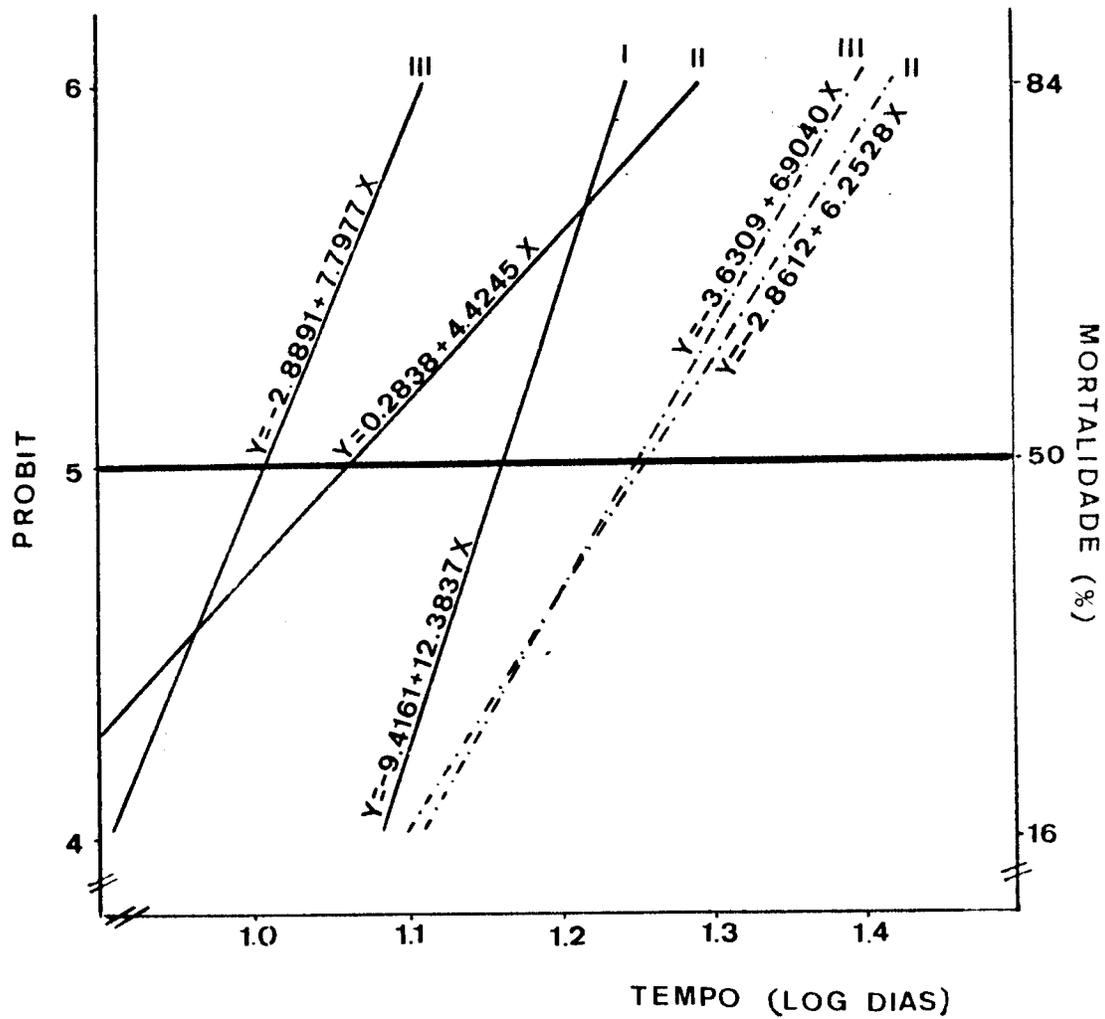


Figura 4. Equações e retas probíticas correspondentes à mortalidade larval de *Diatraea saccharalis* em função do tempo. Inóculos: VGDs, VPNAg e inóculo misto (IM). Larvas inoculadas com 11 e 14 dias de idade.

(I) VGDs; (II) VPNAg; (III) IM; (—) idade larval: 11 dias; (- - -) idade larval: 14 dias.

4.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VGDs E VPNAg em Diatraea saccharalis

Uma outra maneira de se determinar o tipo de interação viral existente entre VGDs e VPNAg, inoculados em lagartas de D. saccharalis, se deu através da análise da capacidade de cada um destes vírus se multiplicar na presença ou ausência do outro.

A Tabela 14 apresenta o número de grânulos de VGDs e poliedros de VPNAg produzidos por grama de lagartas mortas em diferentes idades, as quais foram submetidas a diversos tratamentos virais. Estes tratamentos consistiram na inoculação isolada ou simultânea (inóculo misto) do VGDs e VPNAg em larvas de 11 e 14 dias de idade. Como pode ser constatado, a produção dos dois vírus em praticamente todas as repetições dos diversos tratamentos, de maneira independente à idade larval, foi da mesma ordem de grandeza: 10^9 cristais/grama de lagarta. Estes dados encontram-se na Figura 5 onde se pode acompanhar a produção viral obtida a partir de lagartas que foram morrendo com diferentes idades. A falta de alguns dados é devida à ausência de lagartas mortas naquele intervalo de tempo. Pode-se verificar que, em praticamente todos os casos, existe uma maior produção de VPNAg nas larvas que morrem antes, acontecendo o contrário no caso do VGDs.

Tabela 14. Produção de poliedros de VPNAg e grânulos de VGDs ($\times 10^9$ cristais / grama de larva) em larvas de *Diatraea saccharalis* mortas a diferentes idades devido à infecção viral. (1),(2)

Tratamento (3)	Vírus Quantificado	Idade das larvas (dias) mortas pela infecção viral				
		19 - 21	22 - 24	25 - 27	28 - 30	31 - 33
VG(11)	VGDs	---	5.85	2.12	2.34	---
VPN(11)	VPNAg	13.60	8.36	6.25	---	---
IM(11)	VGDs	0.87	1.23	2.64	2.50	---
	VPNAg	4.10	4.30	0.35	1.56	---
VG(11)-VPN(14)	VGDs	---	2.58	1.20	1.54	---
	VPNAg	---	2.38	2.30	5.84	---
VPN(11)-VG(14)	VGDs	1.33	2.04	1.44	3.19	---
	VPNAg	3.50	7.56	1.78	3.12	---
VG(14)	VGDs	---	2.15	2.00	3.48	9.89
VPN(14)	VPNAg	---	8.80	6.72	4.37	2.22
IM(14)	VGDs	---	1.50	1.19	2.37	4.06
	VPNAg	---	7.10	8.82	3.67	1.77

(1) Intervalo entre inoculações: 3 dias.

(2) Doses: VG = 5×10^3 cristais de VGDs / larva.

VPN = 5×10^5 cristais de VPNAg / larva.

IM = (5×10^3 cristais de VGDs + 5×10^5 cristais de VPNAg) / larva.

(3) Valores entre parênteses correspondem à idade larval (dias) no momento da inoculação.

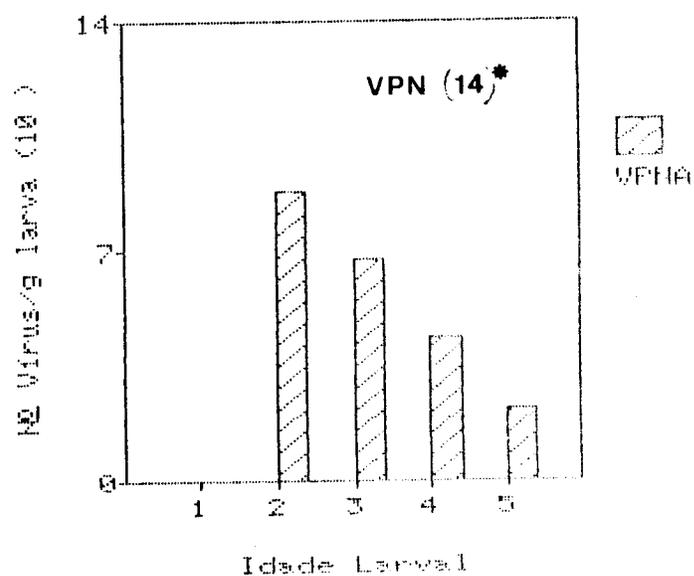
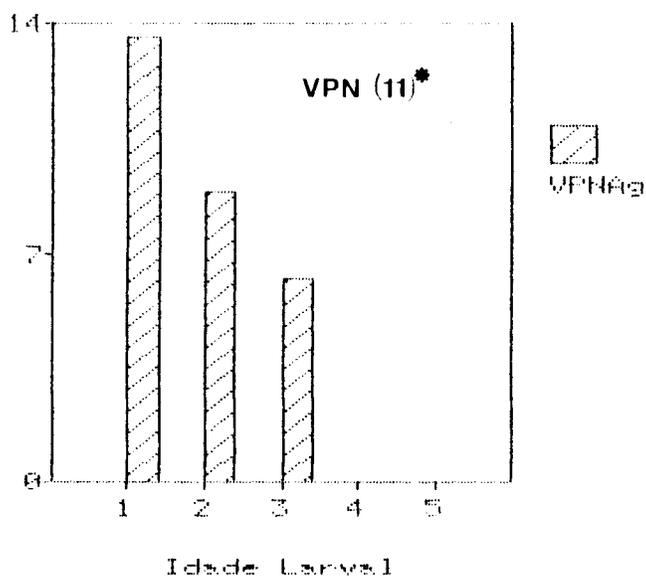
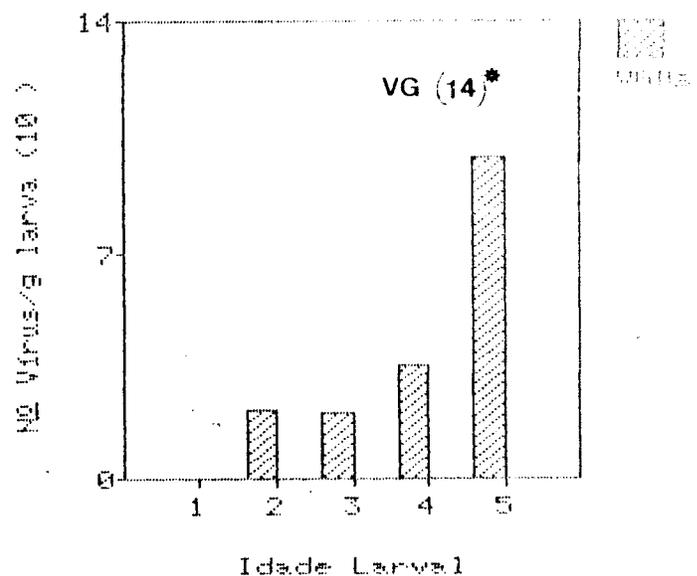
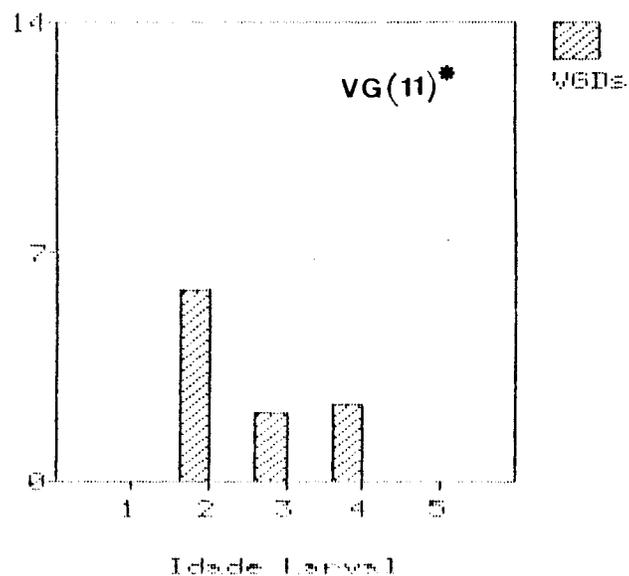


Figura 5. Produção de cristais virais por grama de larva de *Diatraea saccharalis* mortas nos diferentes tratamentos (*).

Idade larval: 1 = 19-21 dias
 2 = 22-24 dias
 3 = 25-27 dias
 4 = 28-30 dias
 5 = 31-33 dias

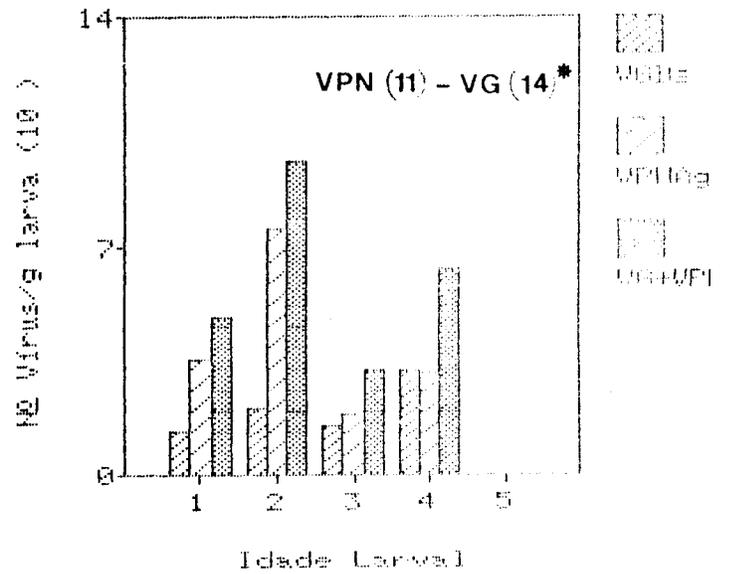
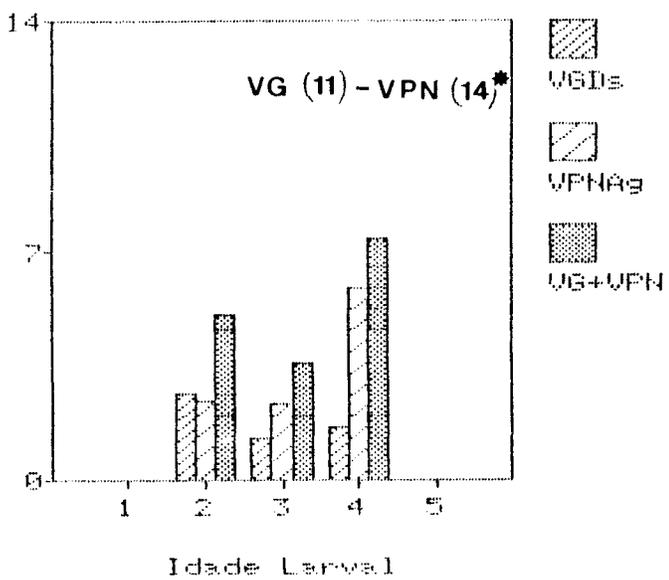
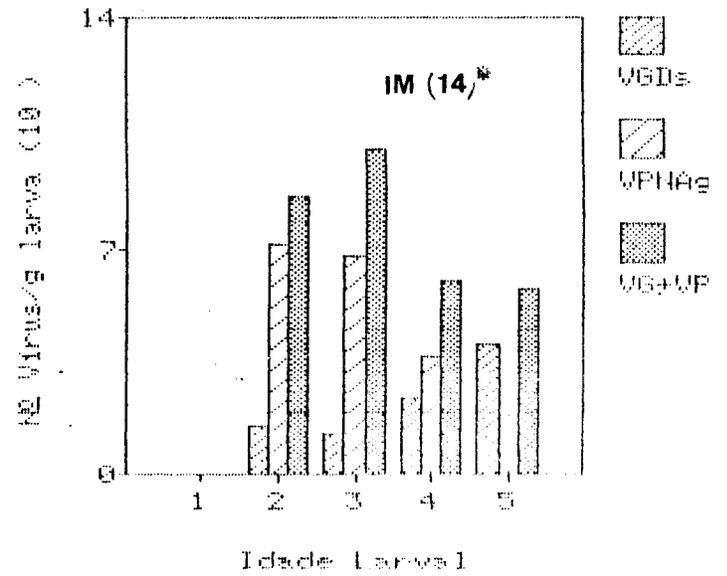
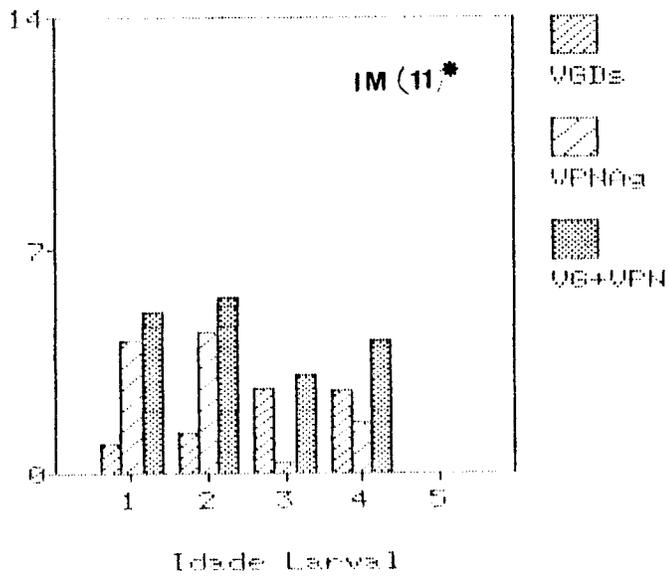


Figura 5. continuação

Na Tabela 15 encontram-se as produções virais médias ponderadas para cujo cálculo considerou-se o número de lagartas mortas em cada intervalo de tempo, e a porcentagem que corresponde cada valor. Através destes dados foi possível se verificar uma maior produção de VPNAg em todos os tratamentos. A Figura 6 apresenta os valores de produção viral média de VGDs e VPNAg, assim como a somatória do número de cristais virais nos casos em que ambos são encontrados. A análise destes dados através do teste t-Student indicou que não houve diferenças significativas na produção de cada um dos vírus nos diferentes tratamentos. Assim sendo, observa-se claramente ausência de inibição na multiplicação de qualquer um dos vírus, independentemente da ordem de inoculação, havendo em todos os casos uma alta produção viral.

4.7 ANÁLISE DE TECIDOS DE LAGARTAS DE Diatraea saccharalis INFETADAS COM VGDs E VPNAg

Neste experimento, foram analisados os tecidos gorduroso e intestinal de lagartas de *D. saccharalis* mortas pela infecção viral com VGDs e/ou VPNAg. Esta análise mostrou que os dois vírus são capazes de infectar o tecido gorduroso, enquanto que só o VPNAg aparece infectando células do tecido intestinal.

Tabela 15. Produção viral média ponderada (cristais/grama de larva) em larvas de *Diatraea saccharalis* mortas pela infecção viral. (1), (2), (3)

Tratamento (1)	VGDs		VPNAg		Total (5) Nº(x10 ⁹)
	Nº(x10 ⁹)	%	Nº(x10 ⁹)	%	
VG(11)	3.70	100.00	0.00	0.00	3.70
VPN(11)	0.00	0.00	10.50	100.00	10.50
IM(11)	1.22	27.17	3.72	75.30	4.94
VG(11)-VPN(14)	1.93	40.80	2.80	59.20	4.73
VPN(11)-VG(14)	1.69	25.80	4.86	74.20	6.55
VG(14)	3.92	100.00	0.00	0.00	3.92
VPN(14)	0.00	0.00	6.11	100.00	6.11
IM(14)	2.06	25.49	6.02	74.51	8.08

(1) Valores obtidos considerando a porcentagem de lagartas mortas nas diferentes idades.

(2) Intervalo entre inoculações: 3 dias.

(3) Doses: VG = 5×10^3 cristais de VGDs / larva.

VPN = 5×10^5 cristais de VPNAg / larva.

IM = (5×10^3 cristais de VGDs + 5×10^5 cristais de VPNAg) / larva.

(4) Os números entre parênteses correspondem à idade larval (dias) no momento da inoculação

(5) Somatória da produção de VGDs e VPNAg.

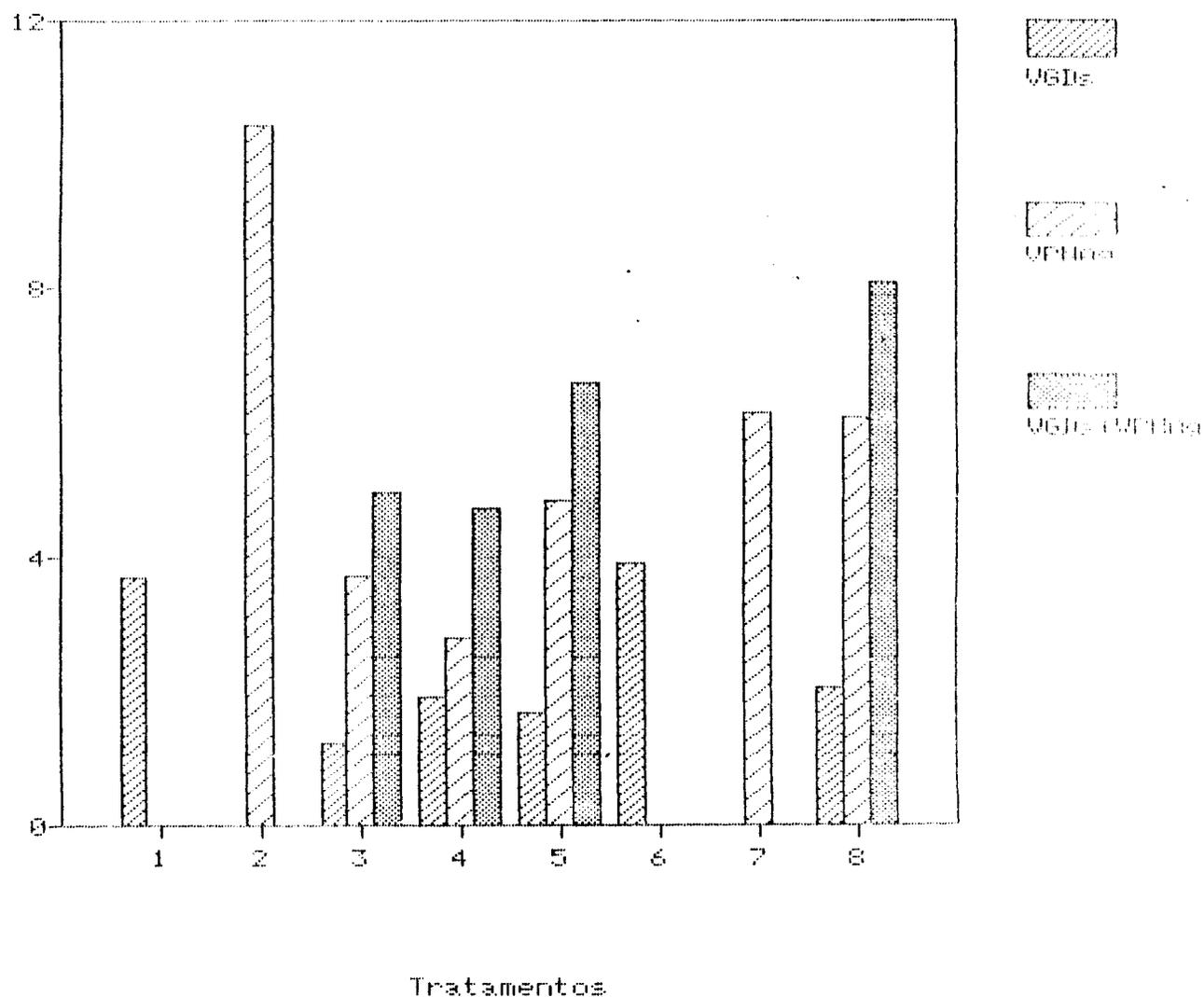


Figura 6. Produção média ponderada de cristais virais por grama de lagarta morta pela infecção viral.

Tratamentos: 1 = VG (11)*
 2 = VPN (11)
 3 = IM (11)
 4 = VG (11) - VPN (14)
 5 = VPN (11) - VG (14)
 6 = VG (14)
 7 = VPN (14)
 8 = IM (14)

* idade larval (dias) no momento da inoculação

Inicialmente, analisaram-se as partículas dos dois vírus purificados. As Figuras 7 e 8 mostram o VGDs e o VPNAg, respectivamente, em suspensão aquosa. A diferença de tamanho entre eles é pronunciada, facilitando, sobremaneira, seu reconhecimento, sendo o diâmetro médio do primeiro de 0.5 μm (PAVAN, 1983) e do segundo de aproximadamente 2.0 μm . Os VGDs aparecem, vistos em microscópio de contraste de fase, como partículas refringentes apresentando rápido movimento browniano. Os VPNAg são, por sua vez, altamente refringentes e brilhantes, não apresentando esse movimento típico sob a lâmina.

A observação de células do tecido gorduroso não infectadas é mais facilitada em lagartas jovens. A Figura 9 mostra parte deste tecido, onde podem ser diferenciadas as células das gotículas de gordura já livres no meio. Em lagartas maiores fica dificultada a observação de células isoladas devido à grande quantidade de bolhas de gordura. Na Figura 10, encontra-se uma célula gordurosa, isolada, não infectada.

A análise do tecido gorduroso de lagartas infectadas com VPNAg permitiu verificar a presença deste vírus replicando-se no núcleo destas células, o que leva a uma hipertrofia do mesmo (Figuras 11 e 12). Células apresentando vários graus de infecção podem ser observadas mostrando claramente que a montagem dos poliedros acontece de maneira gradual dentro dos núcleos das células (Figura 11).

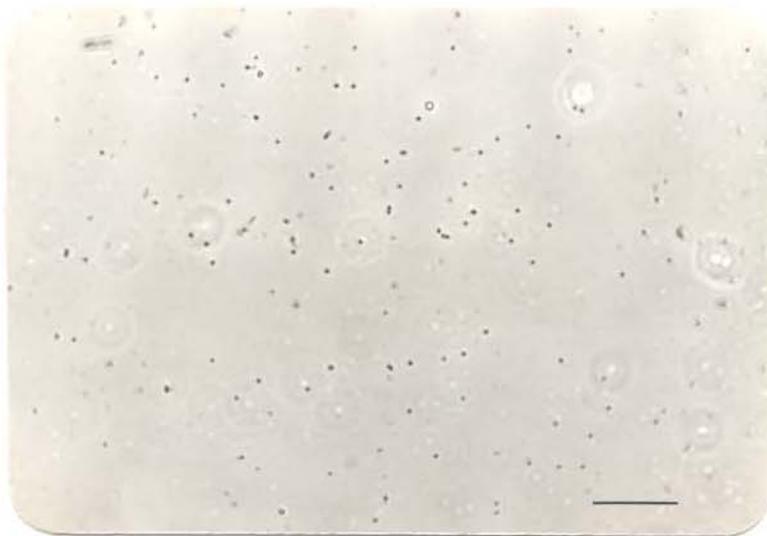


Figura 7. Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) em suspensão aquosa. Barra = 10 μ m.

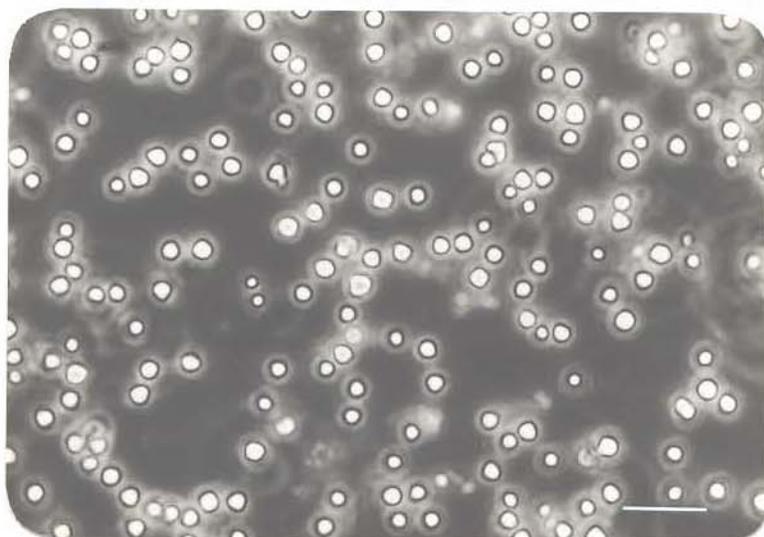


Figura 8. Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) em suspensão aquosa. Barra = 10 μ m.

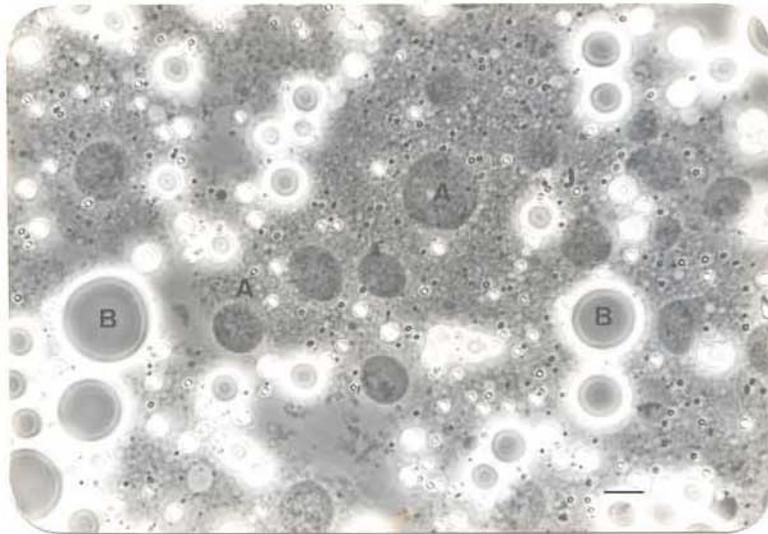


Figura 9. Tecido adiposo de *Diatraea saccharalis* sem infecção viral.
A - Células do tecido adiposo
B - Bolhas de gordura
Barra = 10 μ m.

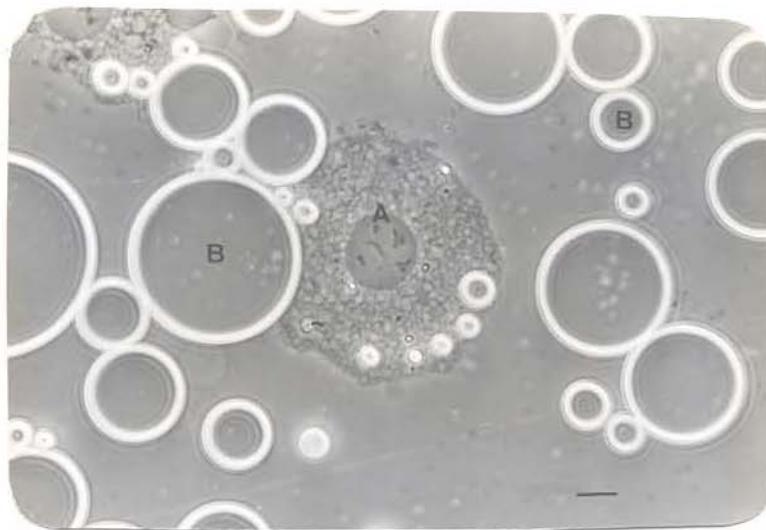


Figura 10. Célula adiposa de *Diatraea saccharalis* sem infecção viral.
A - Célula
B - Bolhas de gordura
Barra = 10 μ m.

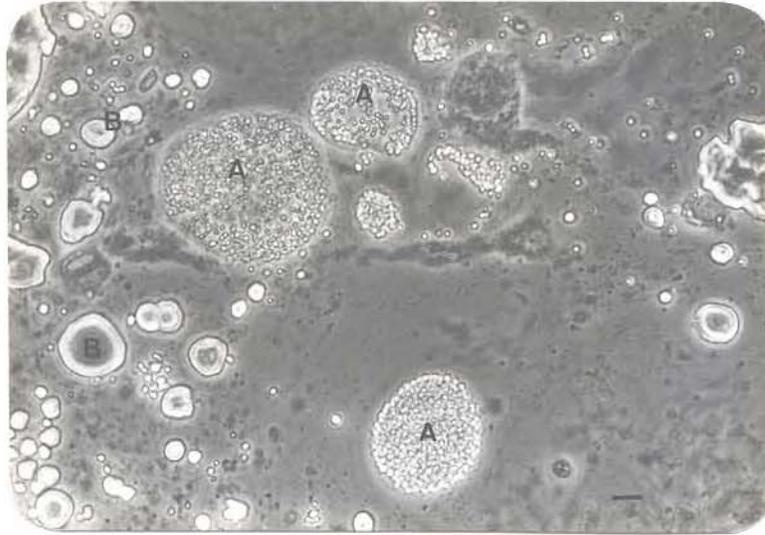


Figura 11. Tecido adiposo de *Diatraea saccharalis* infectado pelo VPNAg.
A - Núcleos de células adiposas com diversos graus de infecção
B - Bolhas de gordura
Barra = 10 μ m.

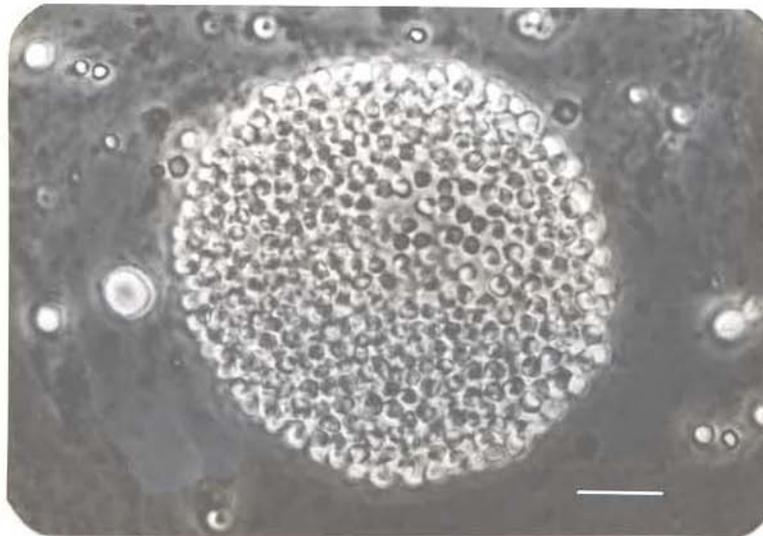


Figura 12. Núcleo de uma célula adiposa de *Diatraea saccharalis* infectado com VPNAg.
Barra = 10 μ m.

Já a observação de células desse tecido infectadas com o VGDs não é tão simples como no caso anterior, desde que, devido ao tamanho do vírus, estes apresentam-se agrupados formando manchas escuras como pode ser visto na Figura 13. A infecção por este vírus, no entanto, é facilmente diagnosticada pela grande quantidade de cristais fora das células que ficam soltos entre as gotículas de gordura, apresentando a aparência e tipo de movimento típicos, comentados anteriormente.

A Tabela 16 mostra os resultados da inoculação dos dois vírus em lagartas de *D. saccharalis*. Pode-se observar que nos quatro tratamentos obteve-se lagartas onde ora um, ora outro vírus, estavam presentes no tecido examinado, porém, em todos os tratamentos também se encontraram larvas infectadas pelos dois vírus ao mesmo tempo. Neste último caso, como se observa nas Figuras 14 e 15, os vírus apresentam-se infectando células vizinhas no mesmo tecido, não se encontrando qualquer infecção mista numa mesma célula.

A dissecação do tecido intestinal de lagartas infectadas (tratamentos descritos na Tabela 1), mostrou que somente o VPNAg foi encontrado infectando os núcleos desse tecido. Nos casos em que as lagartas tinham morrido pela infecção com VPNAg, este vírus apareceu claramente nos núcleos das células gordurosas, e nos núcleos do tecido intestinal (Figuras 11, 12 e 17). Do mesmo modo, nos tratamentos em que foram administrados os

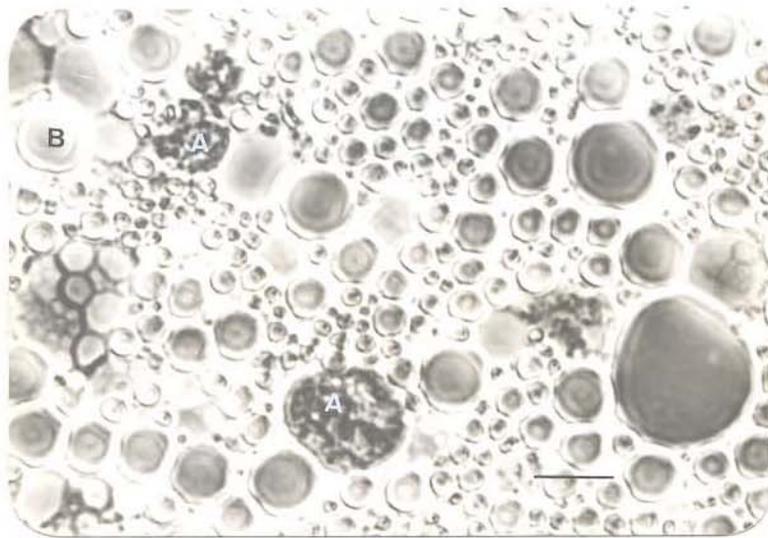


Figura 13. Tecido adiposo de *Diatraea saccharalis* infectado pelo VGDs.
A - Células gordurosas contaminadas
B - Bolhas de gordura
Barra = 10 μ m.

Tabela 16. Análise de infecção viral em células do tecido adiposo de larvas de *Diatraea saccharalis* mortas pela infecção viral. (1),(2)

Tratamento (3)	Número de larvas analisadas	Tipo de vírus presente nas células do tecido adiposo					
		VGDs		VPNAg		VGDs + VPNAg	
		Nº larvas	%	Nº larvas	%	Nº larvas	%
VG(11)-VPN(14)	48	24	50.0	13	27.1	11	22.9
VPN(11)-VG(14)	38	0	0.0	34	89.5	4	10.5
IM(11)-IM(14)	49	11	22.5	33	67.3	5	10.2
IM(11)	49	6	12.2	31	63.3	12	24.5

(1) Intervalo entre inoculações: 3 dias.

(2) Doses: VG = 5×10^3 cristais de VGDs / larva.

VPN = 5×10^5 cristais de VPNAg / larva.

IM = (5×10^3 cristais de VGDs + 5×10^5 cristais de VPNAg) / larva.

(3) Os números entre parênteses correspondem à idade larval (dias) no momento da inoculação

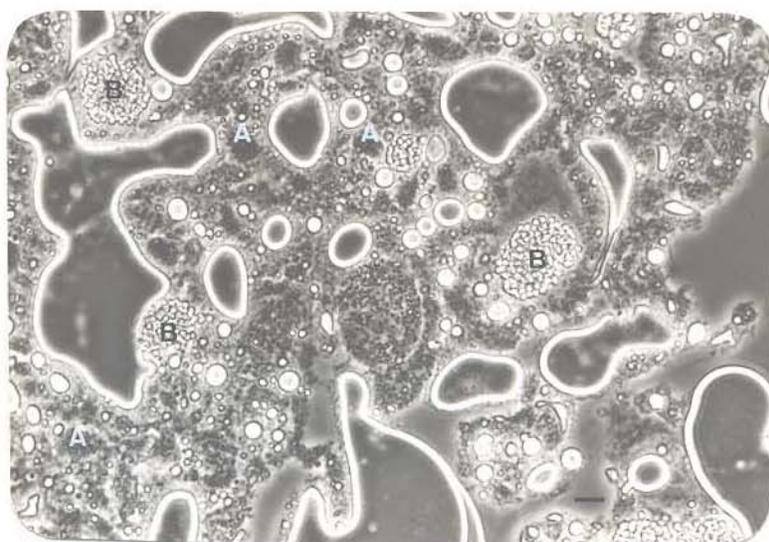


Figura 14. Tecido adiposo de *Diatraea saccharalis* infectado com VGDs e VPNAg
 A - Células infectadas com VGDs
 B - Celulas infectadas com VPNAg
 Barra = 10µm.

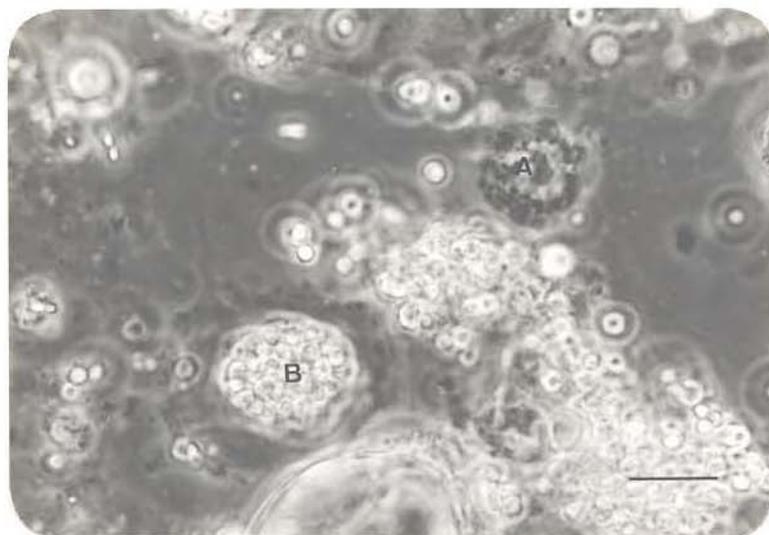


Figura 15. Células adiposas de *Diatraea saccharalis* infectadas com VGDs e VPNAg
 A - Célula infectada com VGDs
 B - Célula infectada com VPNAg
 Barra = 10µm.

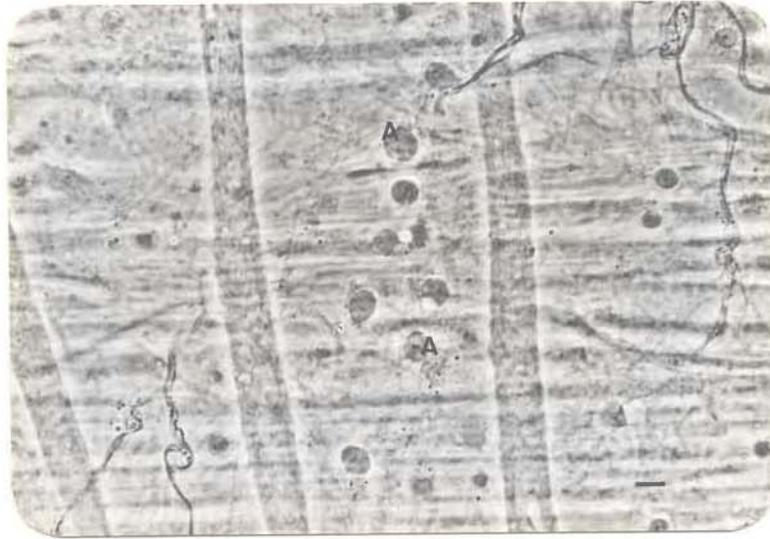


Figura 16. Tecido intestinal de *Diatraea saccharalis* sem infecção viral
A - núcleos não infectados
Barra = 10 μ m.



Figura 17. Tecido intestinal de *Diatraea saccharalis* infectado pelo VPNAg
A - núcleos infectados
Barra = 10 μ m.

dois vírus, só o VPNAg apareceu infectando as células intestinais. A infecção pode ser facilmente reconhecida como pode ser visto comparando-se as Figuras 16 e 17 que apresentam amostras do tecido intestinal sem e com infecção pelo VPNAg respectivamente. No entanto, em lagartas mortas pela infecção com VGDs, não foi possível se observar a sua presença nas células intestinais.

5 DISCUSSÃO

A relação de um vírus com seu hospedeiro implica numa interação complexa que pode ser examinada a nível ecológico, orgânico, celular ou molecular. A soma de tais investigações nos provê de certo nível de compreensão com respeito aos inumeráveis fatores que influem na relação vírus-hospedeiro. Além do mais, o estudo de como os vírus interagem com outros vírus em hospedeiros específicos e como esta interação afeta tanto o hospedeiro como o curso da infecção viral, é considerada importante, razão pela qual foi objeto deste trabalho.

O estudo comparativo da infecção do vírus original de *Diatraea saccharalis* (VGDS) e de um vírus isolado de um inseto de outra família, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (VPNAg), permitiu conhecer melhor o desenvolvimento de ambos de maneira independente, suas semelhanças e diferenças, assim como o tipo de interação que sofrem quando inoculados juntos na mesma lagarta.

5.1 INTERAÇÃO VIRAL

O efeito da inoculação mista com baculovírus tem sido investigado por vários autores. Assim, o efeito sinérgico, ocasionado por uma fração protéica presente na matriz protéica de

um vírus de granulose, foi extensivamente estudado (TANADA, 1959; TANADA & HUKUHARA, 1971; TANADA e col., 1973; HARA e col., 1976; OHBA & TANADA, 1984; NAKAGAKI e col., 1987). Por outro lado, exemplos clássicos de antagonismo foram apresentados por BIRD (1959), TANADA e col. (1969), WHITLOCK (1977a) e BOUCIAS & NORDIN (1978). Já o efeito aditivo foi relatado unicamente por LOWE & PASCHKE (1968a), os quais verificaram que a mortalidade ocasionada pelo inóculo misto não diferiu daquela obtida quando qualquer um dos vírus era inoculado em dose dupla.

De acordo com os resultados obtidos de vários experimentos, verificou-se que tanto o VGDs como o VPNAg conseguem desenvolver-se em lagartas de *D. saccharalis*. O tipo de interação viral encontrada quando ambos são inoculados simultaneamente foi aditivo. Os valores de mortalidade larval obtidos, quando o inóculo foi misto, correspondem àquele esperado se cada um dos dois vírus agisse de maneira independente, não existindo nenhum aumento significativo que levasse a supor um provável efeito sinérgico. Por sua vez, a ausência de antagonismo entre eles foi comprovada pela alta produção de ambos os vírus quando inoculados tanto simultaneamente como quando dada uma vantagem de 3 dias entre a inoculação de um e outro e pelos valores de mortalidade obtidos com larvas de 3^o e 4^o instar que refletem a ação independente de cada vírus.

Uma dose 100 vezes maior foi necessária para que o VPNAg causasse uma mortalidade semelhante ao VGDs nas larvas

utilizadas. Esta baixa virulência observada do VPNAg pode ser atribuída ao fato da inoculação ter sido feita num hospedeiro alternativo.

Trabalhos mostrando infecção de vírus de poliedrose em hospedeiros alternativos pertencentes a gêneros, famílias ou mesmo a ordens diferentes têm sido descritos desde 1950 (IGNOFFO, 1968). Vírus de poliedrose nuclear isolados originalmente de *Trichoplusia ni* (VPNTn), *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) e *Autographa californica* (VPNAc) mostraram ser capazes de infectar lagartas de *D. saccharalis* quando inoculadas em altas doses. No entanto, a passagem seriada desses vírus durante várias gerações no hospedeiro alternativo levou a aumentar a virulência dos mesmos em até 1500 vezes (RIBEIRO, 1985, 1989; RODRIGUES, 1989). Este aumento na atividade viral pode ser atribuído à seleção de isolados mais virulentos para o hospedeiro alternativo (VEBER, 1962; SHAPIRO & IGNOFFO, 1970; PAVAN e col., 1981; STAIRS e col., 1981; RIBEIRO, 1985, 1989, RODRIGUES, 1989).

O VPNAg demonstrou não só ser capaz de infectar lagartas de *D. saccharalis* como de apresentar um tempo entre inoculação e a morte dos primeiros indivíduos menor do que o VGDs. A análise de alguns tecidos larvais mostra que esse vírus consegue multiplicar-se nas células adiposas e intestinais, produzindo um grande número de cristais virais, muitas vezes maior que o número obtido com VGDs.

Dessa maneira verificou-se que, uma vez invadido o hospedeiro, o VPNAg se multiplica e propaga produzindo cristais morfológicamente homogêneos. Assim sendo, a baixa virulência desses vírus nas larvas utilizadas não é devida à fagocitose dos virions ou inibição química dos mesmos na hemolinfa, resistência celular após a invasão pelos virions ou redução da taxa de replicação dentro das células, processos estes classificados por BRIESE (1986) como pertencentes à fase pós-invasão. O bloqueio viral deve encontrar-se, portanto, na fase de invasão do organismo, desde que se verificou que as células do intestino permitem sua multiplicação após a entrada do vírus no seu interior.

Progressos significativos na compreensão dos mecanismos de defesa envolvidos na resistência a vírus têm sido feitos somente com *Bombyx mori*, devido ao fato de que os vírus, nesse caso, representam um sério problema para a sericicultura. As evidências sugerem que o principal obstáculo à infecção viral encontra-se na barreira intestinal, embora também possa existir, de maneira contrária ao encontrado no presente trabalho, inibição a nível de hemolinfa, depois de iniciada a infecção (BRIESE & PODGWAITE, 1985).

O alto valor de DL₅₀ obtido para o VPNAg em lagartas de *D. saccharalis*, a falta de incompatibilidade entre este vírus e o hospedeiro após iniciada a infecção e o conhecimento da existência de um aumento acentuado de virulência após passagens

seriadas neste inseto representam fortes evidências de que, no inóculo inicial, existiram somente algumas partículas virais adaptadas para o processo de invasão, as quais podem ser selecionadas.

5.2 COMPETIÇÃO POR SÍTIOS DE REPLICAÇÃO

A infecção por ambos os vírus pode ser facilmente observada analisando-se o tecido adiposo das lagartas. Como foi mencionado anteriormente, o VGDs infecta preferencialmente o tecido adiposo de *D. saccharalis*. Só após a infecção deste é que o vírus invade outros tecidos (PAVAN e col., 1983). Por outro lado, o VPNAg, mesmo sendo poliorganotrófico, infecta também de maneira preferencial esse tecido. HUGHES (1972) estudando os tecidos de larvas infectadas com vírus de poliedrose observou que, mesmo apresentando infecção em outros tecidos, esta nunca foi encontrada sem ocorrer também no tecido adiposo.

Geralmente, quando mais de um vírus infecta o mesmo hospedeiro, pode existir competição pelos sítios de replicação, especialmente nos casos em que estes são comuns para ambos os patógenos (HARPER, 1986). Neste caso, no entanto, mesmo sendo o tecido gorduroso infectado pelo VGDs e VPNAg, não houve bloqueio na multiplicação de nenhum deles, nem observou-se efeito antagônico na mortalidade larval que mostrasse interferência entre eles. A maior produção de um vírus, quando somente ele foi

inoculado, é compreensível, desde que ambos os vírus compartilham sítios de replicação. Porém, não existe uma queda drástica na produção de nenhum deles quando os dois são inoculados juntos ou quando um deles é pré-inoculado 3 dias antes.

Infeccção viral simultânea num mesmo tecido larval já tinha sido relatada por outros autores em diferentes hospedeiros (BIRD, 1959; LOWE & PASCHKE, 1968b; WATANABE & KOBAYASHI, 1970). No caso do presente trabalho, não foi observada a presença dos dois vírus infectando a mesma célula, enquanto KURSTAK & GARZON (1975), KIMURA & McINTOSH (1976), ODIER (1977) e HESS e col. (1978) encontraram infecção simultânea de dois ou mais vírus numa mesma célula do inseto.

A infecção de células adjacentes do mesmo tecido (neste caso adiposo) pelos VGDs e VPNAg, tanto quando eles eram inoculados simultaneamente como quando existia um intervalo entre as inoculações, sugere que a existência de uma substância tipo "interferon", proposta por LOWE & PASCHKE (1968b), não ocorreria neste caso. Segundo esses autores, a substância seria produzida pelo inseto, o qual, uma vez infectado por um vírus, não permitiria a invasão do segundo. Por outro lado, a presença dos dois vírus sempre em células diferentes sugere a existência de um mecanismo semelhante ao proposto por RITTER & TANADA (1978), segundo os quais um vírus entrando numa célula a transformaria de maneira a impedir a infecção por um segundo vírus.

5.3 SEQUÊNCIA DE INFECÇÃO

Quando o VPNAg, que infecta vários tecidos simultaneamente, é inoculado com 3 dias de vantagem sobre o VGDs, a maioria das lagartas aparecem infectadas só com VPNAg e algumas com ambos os vírus. Quando a sequência de inoculação é inversa, sendo o VGDs inoculado anteriormente, encontram-se indivíduos apresentando infecção por um ou outro vírus ou ambos (infecção mista). Isto indica uma maior velocidade de propagar a infecção por parte do VPNAg, o qual, uma vez dentro das células, não permitiria a invasão pelo VGDs.

HESS e col. (1978) observaram uma diminuição no número de poliedros nos núcleos de células infectadas, tratadas com um inóculo misto, em relação à quantidade encontrada nos núcleos de indivíduos infectados somente com VPN. De maneira oposta, observou-se no presente trabalho que a quantidade de VPNAg no núcleo de células tratadas com o inóculo misto não difere da quantidade encontrada quando o inóculo foi simples.

O VPNAg, como comentado anteriormente, é capaz de invadir, multiplicar-se e formar poliedros nos núcleos das células intestinais, permitindo assim a utilização deste tecido no reconhecimento da infecção. O desenvolvimento de poliedros nas células intestinais foi um assunto discutido, havendo autores que relataram a presença de cristais virais nestas células (BERGOLD, 1953; TANADA, 1954; LAUDEHO & AMARGIER, 1963; HEIMPEL & ADAMS,

1966; M.T.MARIANI, comunicação pessoal) e aqueles que nunca os encontraram, mesmo quando a infecção foi constatada em vários outros tecidos (BIRD & WHALEN, 1954; BENZ, 1963).

Mesmo existindo semelhanças entre o VGDs e VPNAg, no que se refere a tecido preferencialmente atacado e produção viral, há diferenças a respeito da velocidade de ação de cada um, o que leva a mudanças na mortalidade larval e pupal dos indivíduos inoculados com cada um desses vírus isoladamente ou juntos na mesma lagarta.

O período de incubação (tempo entre a inoculação e morte larval) (BRIESE, 1986) do VGDs é maior que o do VPNAg devido ao fato de que o VGDs infecta primeiro o tecido gorduroso (PAVAN e col.,1983), que é basicamente um tecido de reserva, e só depois de algum tempo afeta os outros tecidos vitais, cuja destruição por causa da infecção causa a morte do indivíduo. O VPNAg, por outro lado, infecta vários tecidos ao mesmo tempo, sendo assim mais rápida a destruição de tecidos vitais e, conseqüentemente, a morte do indivíduo. M. T. MARIANI (comunicação pessoal) encontrou esse vírus infectando vários tecidos de *D. saccharalis* 24 horas após a inoculação viral. Essa diferença de etiologia no processo infeccioso entre vírus de poliedrose e granulose também foi verificada por outros autores (BIRD, 1959; SHVETSOVA & TSAI, 1962; LOWE & PASCHKE, 1968a; RIBEIRO, 1985).

A inoculação de *D. saccharalis* com doses inferiores a 10^4 cristais/lagarta, em larvas do 3º instar, produziu uma mortalidade pupal de tal forma elevada que, quando se considerou a mortalidade total (larval + pupal) em vez de somente a mortalidade larval, observou-se uma redução de 10 vezes no valor da DL₅₀. Devido à ação mais rápida do VPNAg, a mortalidade pupal é reduzida em condições semelhantes. Da mesma forma, tanto para o VGDs como para o VPNAg, indivíduos inoculados no 4º instar não apresentam uma taxa de mortalidade elevada na fase pupal.

Durante a metamorfose, na fase pupal, o tecido gorduroso é totalmente consumido e os vírus não se desenvolvem em tecidos de adultos. PAVAN e col. (1983) verificaram que adultos sobreviventes de indivíduos que tinham sido inoculados com VGDs não apresentaram sinais de infecção viral. Desta maneira, sugere-se que larvas de *D. saccharalis* (que apresentam uma grande quantidade de tecido gorduroso) inoculadas numa idade mais avançada, poderiam empupar apresentando infecção viral somente no tecido gorduroso, conseguindo assim emergir como adultos normais. Porém, se outros tecidos já tivessem sido infectados, como provavelmente acontece quando se inoculam larvas mais novas, a possibilidade de morte no estágio pupal é muito grande, havendo, em alguns casos, adultos que emergem defeituosos. Assim sendo, larvas mais velhas inoculadas com VGDs teriam uma maior chance de empupar e chegar à fase adulta que aquelas inoculadas em estágios anteriores, as quais podem chegar a empupar, apresentando, no entanto, uma alta mortalidade nesta fase. Isto aconteceria

simplesmente pelo fato do vírus ter ou não o tempo necessário para infectar outros tecidos além do gorduroso.

Estes fatos indicam a importância de se analisar a mortalidade pupal. Geralmente, os dados de DL₅₀ são calculados com base apenas no número de larvas mortas. Porém, desde que os vírus de granulose apresentam um período de incubação prolongado, os resultados, considerando-se somente a mortalidade larval, podem não estar refletindo o efeito real do vírus na população de insetos. É proposto, portanto, para fins de uso prático, considerar-se com atenção o comportamento das pupas.

5.4 EFEITO DA IDADE LARVAL NA INFECCÃO VIRAL

Aumento da resistência à infecção viral foi observado quando comparadas as mortalidades de indivíduos do 3º e 4º instar tratados com o mesmo inóculo. Esta "imunidade de maturação", que nada mais é do que uma maior resistência do inseto com o aumento da maturidade larval, foi verificada para os dois vírus. No entanto, o fato deste efeito ser mais acentuado quando o inóculo foi VGDs pode ser explicado pela diferença na dinâmica de infecção que este vírus apresenta com respeito ao VPNAg.

WHITLOCK (1977b) mencionou que a aparente resistência das lagartas mais velhas poderia estar relacionada com o fato destas empuparem antes que o vírus pudesse causar sua morte. Este

comportamento, como foi discutido anteriormente, acontece com maior frequência em vírus de granulose.

BOUCIAS & NORDIN (1977) observaram, de maneira semelhante aos resultados obtidos neste trabalho, que larvas dos últimos instares eram menos susceptíveis a vírus de granulose que a vírus de poliedrose.

Esses dados permitem compreender a diferença encontrada nos valores de mortalidade larval quando a sequência de inoculação do VGDs e VPNAg é alterada entre larvas de 3º e 4º instar. Um aumento significativo na mortalidade foi encontrado quando se compara o tratamento no qual inocula-se VGDs em larvas do 3º instar (11 dias) e VPNAg quando chegam ao 4º instar (14 dias) [VG(11)-VPN(14)] em relação ao tratamento inverso [VPN(11)-VG(14)]. O VPNAg, possuindo um espectro de atuação mais prolongado, ou seja, apresentando maior capacidade de infectar larvas mais idosas, foi o responsável pelo aumento da mortalidade quando inoculado em indivíduos mais velhos. Este efeito não foi observado quando o segundo inóculo foi o VGDs, o qual não foi capaz de aumentar, de maneira significativa, a mortalidade ocasionada pelo VPNAg devido à idade avançada das lagartas. É por isso que, quando um experimento semelhante foi feito com indivíduos do mesmo instar, não se observou essa diferença.

Esse aumento na mortalidade não pode ser atribuído unicamente ao fato de terem sido feitas duas inoculações, já que

o mesmo vírus inoculado duas vezes não aumentou significativamente a mortalidade quando comparada àquela ocasionada pela dose simples.

Seria esperado que duas doses iguais do vírus, inoculado com um certo intervalo de tempo, matassem mais lagartas que a dose simples. Isto, porém, não aconteceu. Uma das hipóteses que explicaria este fato seria que, à medida que as larvas amadurecem, ficam mais resistentes à infecção viral, como foi discutido anteriormente e observado por vários outros autores (TANADA, 1959; STAIRS, 1965; BIRD, 1969; BOUCIAS e col., 1980; EVANS, 1981; PAYNE e col., 1981; MOSCARDI, 1983; SHAPIRO e col., 1986). Esses resultados explicam bem o caso onde a diferença de idade larval entre as inoculações foi de 3 dias, havendo, inclusive, passagem de um instar para outro.

GRANADOS & WILLIAMS (1986), estudando a cinética de infecção viral, mostraram que 16 horas após a ingestão do vírus, a "progênie" viral já se encontrava totalmente desenvolvida, existindo representantes não oclusos e alguns oclusos. Estudos detalhados das diferentes fases de expressão gênica de vírus de poliedrose demonstram que a expressão do gene da poliedrina começa aproximadamente 18 horas após a inoculação, sendo esta a última fase da expressão gênica dos VPN (MILLER, 1988). Estes dados servem como base para uma segunda hipótese, a qual explica melhor o caso onde o intervalo entre as duas inoculações foi de apenas um dia. M. T. MARIANI observou que o VPNAg produz

poliedros 24 horas após a infecção do mesmo em lagartas de *D. saccharalis* (comunicação pessoal). Assim, devido ao processo de multiplicação ser muito ativo nesse período, quando fosse feita a segunda inoculação, já haveria, no próprio sistema do inseto, grande quantidade de unidades infecciosas que mascarariam o efeito da segunda dose.

Ao longo dos vários experimentos, uma grande quantidade de lagartas foi submetida a inoculações mistas. Em todos os casos, a ação independente dos dois vírus demonstrou uma ausência de antagonismo entre eles, podendo ambos infectar simultaneamente larvas de *Diatraea saccharalis* e até compartilhar um mesmo tecido nessa infecção.

A observação dos cristais formados após a infecção mista não revelou diferenças morfológicas ou numéricas que pudessem sugerir o aparecimento de recombinantes virais. No entanto, investigações detalhadas precisariam ser feitas antes de poder afirmar a falta de recombinação "in vivo" destes dois vírus.

6 RESUMO E CONCLUSÕES

Dois baculovírus diferentes, o Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) e o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg), foram inoculados em lagartas de *D. saccharalis*. Os efeitos da infecção dos dois vírus foram estudadas inoculando-os de maneira isolada, simultânea e alternada. A dose utilizada para ocasionar uma mortalidade semelhante foi 100 vezes maior para o VPNAg cujo hospedeiro original pertence a outra família de Lepidoptera.

A alta produção de poliedros e grânulos dos dois vírus, obtida tanto quando ambos foram inoculados simultaneamente como quando um deles é pré-inoculado, demonstra a inexistência de qualquer tipo de interferência na multiplicação ou desenvolvimento dos vírus no mesmo hospedeiro.

O estudo comparativo da infecção desses dois vírus nos tecidos gorduroso e intestinal, através da utilização de microscopia de contraste de fase, mostrou que ambos são capazes de se multiplicar e formar uma grande quantidade de cristais virais em células diferentes do tecido gorduroso, o que indica que a infecção por um vírus modifica a célula de maneira a deixá-la incapaz de permitir uma segunda infecção. No tecido intestinal, no entanto, somente foram encontrados poliedros.

A presença do VPNAg em mais de um tecido, e a alta quantidade de cristais formados, muitas vezes maior que a do VGDs, demonstra a sua capacidade de propagar a infecção dentro do inseto uma vez iniciada. Assim sendo, a baixa virulência do VPNAg (verificada pelo alto valor de DL_{50}), parece dever-se à existência de somente alguns variantes genéticos com capacidade para a invasão na população originalmente utilizada.

O VGDs e o VPNAg apresentam diferentes períodos de incubação e o período mais curto conferiu uma vantagem, no desenvolvimento, ao VPNAg quando inoculado em indivíduos mais velhos.

O tipo de interação obtido, analisando-se os valores de mortalidade larval quando os dois vírus foram inoculados simultaneamente, foi do tipo aditivo, não sendo encontrado efeito sinérgico ou antagônico, o que sugere a ação independente de cada vírus.

A multiplicação viral no organismo da lagarta parece ser suficientemente veloz de tal forma a evitar que uma segunda inoculação, aplicada 24 horas após a primeira, aumente de maneira significativa a mortalidade larval. Assim sendo, a quantidade de vírus formados mascararia o efeito da segunda dose viral.

O desenvolvimento concomitante dos dois vírus em células do mesmo tecido, que poderia gerar o surgimento de recombinantes genéticos, não foi investigado mais detalhadamente, porém, não se observou o aparecimento de cristais, morfológica ou numericamente diferentes dos utilizados originalmente, que pudesse indicar tal acontecimento.

7 SUMMARY AND CONCLUSIONS

Two baculoviruses, the *Diatraea saccharalis* Granulosis Virus (DsGV) and the *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrosis Virus (AgNPV), were studied infecting the sugarcane borer (SCB), *D. saccharalis*. The effects of the infection of these two viruses were analysed by their inoculation simultaneously, sequentially and individually. Being a original virus of the SCB, the DsGV was inoculated in a dose 100 fold smaller than the AgNPV whose original host belongs to a different family of Lepidoptera.

Regardless of the inoculation timing being simultaneous or sequential in one order or the other, a high inclusion body production was observed for both viruses. This type of result discards the possibility of interference between the two pathogens.

A comparative study of the infection process of both viruses in the fat body and intestinal tissue, in phase-contrast microscopy, showed their ability to replicate and produce normal inclusion bodies in high amounts in different fat body cells. In the intestinal cells, only the AgNPV was able to develop and produce polyhedra while no sign of the granules of DsGV were observed.

In the fat body, even though neighboring cells were found infected, each with one type of virus, in no case the same cell was found to bear both types, thus, suggesting some type of inhibitory mechanism.

Despite the fact that the AgNPV is developing in an alternate host, thus, having a high LD₅₀ value, once it infects the larvae it is able to develop in a typical infection process. The AgNPV develops in several tissues, producing regular polyhedra in great amounts, in most cases, more than the capsule production by DsGV. These observations suggest a barrier in host at invasion level being determined by a low frequency of genetic variants being able to start infection in the population.

The DsGV and AgNPV in the SCB present different infection processes being the AgNPV faster in killing the insect, thus, showing more effectiveness in older larvae.

The interaction observed between the two baculoviruses was of the additive type while no synergism or interference type of effect was observed suggesting independent and non competitive behaviour between the two pathogens.

As suggested by previous data, the viral replication seems to be fast enough as to eliminate any significant mortality increase by a second inoculation performed after 24 hours following the first inoculum.

The simultaneous development of the two different virus in the same individual and same body tissue could result in genetic recombinant forms. No morfological or numerical alterations were found indicating the presence of such recombinants. However, further studies should be conducted to confirm these preliminary observations.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, G. E. & KNELL, J. D., 1977. A nuclear polyhedrosis of *Anticarsia gemmatalis* I: ultrastructure, replication and pathogenicity. Fla Ent., 60: 233.
- 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. Academic Press, Cap. 20.
- BENZ, G., 1963. A nuclear polyhedrosis of *Malacosoma alpicola* (Staudinger). J. Invertebr. Pathol.,5: 215.
- BENZ, G., 1971. Synergism of micro-organism and chemical insecticides. In: BURGESS, H. D. & HUSSEY, N. W. eds. Microbial Control of Insects and Mites. New York. Academic Press. Cap., 14.
- BERGOLD, G. H., 1943. Uber polyederkrankheiten bei insekten. Biol. Zentr., 63: 1.
- BERGOLD, G. H., 1951a. The polyhedral disease of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). Can. J. Zool., 29: 17.

- BERGOLD, G. H., 1951b. Fortschritte und probleme auf dem gebiete der insektenviren. Z. angew. Ent., 33: 267.
- BERGOLD, G. H., 1953. Insect viruses. Adv. virus Res., 1: 91.
- BILIMORIA, S. L., 1986. Taxonomy and identification of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A., eds. The Biology of Baculoviruses. Boca Raton, Fla., CRC. v.1, cap. 2.
- BIRD, F. T., 1959. Polyhedrosis and granulosis virus causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. J. Insect Pathol., 1: 406.
Apud BIRD, F. T., 1969, op cit.
- BIRD, F. T., 1969. Infection and mortality of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* and forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*, caused by a nuclear and cytoplasmic polyhedrosis virus. Can. Ent., 101: 1269.
- BIRD, F. T. & WHALEN, M. M., 1954. A nuclear and a cytoplasmic polyhedral virus disease of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.). Can. J. Zool., 32: 82.
- BLISS, C. I., 1935a. The calculation of the dosage mortality curve. Ann. appl. Biol., 22: 134.

- BLISS, C. I., 1935b. The comparison of dosage mortality data. *Ann. appl. Biol.*, 22: 307.
- BOUCIAS, D. G. & NORDIN, G. L., 1977. Interinstar susceptibility of the fall webworm, *Hyphantria cunea* to its nucleopolyhedrosis and granulosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 30: 68.
- BOUCIAS, D. G. & NORDIN, G. L., 1978. Susceptibility of *Hyphantria cunea* infected with the *Diacrisia granulosis* virus to its homologous baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 32: 341.
- BOUCIAS, D. G.; JOHNSON, D. W. & ALLEN, G. E., 1980. Effects of host age, virus dosage and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, larvae. *Envir. Ent.*, 9: 59.
- BRIESE, D. T., 1986. Insect resistance to baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, Fla., CRC., v.2., cap. 4.
- BRIESE, D. T. & PODGWAITE, J. D., 1985. Development of viral resistance in insect populations. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. E. eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. Orlando, Fla. Academic Press Inc., p. 361

- CARNER, G. E. & TURNIPSEED, S. G., 1977. Potential of a nucleopolyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *J. econ. Ent.*, 70: 608.
- CAVALLARO, A. C.; PAVAN, O. H.; OLIVEIRA, A. R. & ALMEIDA, L. C., 1986. Métodos de purificação do vírus de granulose de *Diatraea saccharalis*. Reunião Anual de Genética de Microrganismos, 13., Ribeirão Preto. Anais..., p. 78.
- 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). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- CHAPMAN, J. W. & GLASER, R. W., 1915. A preliminary list of insects which have wilt, with comparative study of their polyhedra. *J. econ. Ent.*, 8: 140.
- CONSIGLI, R. A.; TWEETEN, K. A.; ANDERSON, D. K. & BULLA, L. A., 1983. Granulosis viruses, with emphasis on the GV of the indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Adv. Virus Res.*, 28: 141.

- CORSO, I. C.; GARZON, D. L.; OLIVEIRA, E.B. & GATTI, I. H., 1977. Ocorrência de poliedrose nuclear em *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818, na região sul do Brasil. *Anais Soc. Ent. Bras.*, 6: 312.
- CROIZIER, G.; GODSE, D. & VLAK, J., 1980. Sélection de types viraux dans les infections doubles à baculovirus chez les larves de lépidoptère. *C. R. Acad. Sc., Paris*, 290: 579.
- CROIZIER, G.; CROIZIER, L.; QUIOT, J. M. & LERECLUS, D., 1988. Recombination of *Autographa californica* and *Rachiplusia* ou nuclear polyhedrosis viruses in *Galleria mellonella* L. *J. gen. Virol.*, 69: 177.
- DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S. M. & MACEDO, N., 1981. Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região centro sul do Brasil. *Boletim Técnico IAA/PLANALSUCAR*, 3: 1.
- EVANS, H. F., 1981. Quantitative assessment of the relationships between dosage and response of the nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 37: 101.
- FINNEY, D. J., 1971. *Probit Analysis*. 3. ed. Cambridge, Cambridge University Press, v. 11.

- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. & ALVES, S. B., 1978. Manual de Entomologia Agrícola. São Paulo, Ceres, Cap. 10.
- GARCIA, A. M. & PAVAN, D. H. O., 1988a. Análise da coinfeção de VPNAg e VGDs em lagartas de *Diatraea saccharalis*. Cien. Cult., S Paulo, 40 (7 suppl.): 855.
- GARCIA, A. M. & PAVAN, D. H. O., 1988b. Efeito da infecção mista em *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar) com vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) e vírus de granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs). Reunião Anual de Genética de Microrganismos, 15., Piracicaba. Anais..., p. 98.
- GATTI, I. H.; SILVA, D. M. & CORSO, I. C., 1977. Poliedrosis occurrence in caterpillars of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) in the south of Brazil. Infect Dis., 5: 136.
- GLASER, R. W., 1928. Virus disease of insects. In: RIVERS, T. M., ed. Filterable Viruses. Baltimore. Williams & Wilkins Company, Cap. 8.
- GRANADOS, R. R., 1978. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. Virology, 90: 170.

- GRANADOS, R. R., 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnol. Bioeng.*, 22: 1377.
- GRANADOS, R. R. & LAWLER, K. A., 1981. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*, 108: 297.
- GRANADOS, R. R. & WILLIAMS, K. A., 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. eds. *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, Fla. CRC Press Inc., v.2, cap. 4.
- HALL, I. M., 1953. The role of virus diseases in the control of the alfalfa looper. *J. econ. Ent.*, 46: 1110.
- HARA, S.; TANADA, Y. & OMI, E. M., 1976. Isolation and characterization of a synergistic enzyme from the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 27: 115.
- HARPER, J. D., 1986. Interactions between baculoviruses and other entomopathogens, chemical pesticides and parasitoids. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A. eds. *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, Fla., CRC Press Inc. v.2, cap. 5.
- HARRAP, K. A. & PAYNE, C. C., 1979. The structural properties and identification of insect viruses. *Adv. Virus Res.*, 25: 273.

- HEIMPEL, A. M. & ADAMS, J. R., 1966. A new nuclear polyhedrosis of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 340.
- HENSLEY, S. D. & HAMMOND, J. R. A. M., 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on artificial diet. *J. econ. Ent.*, 61: 1742.
- HESS, R. T.; SUMMERS, M. D. & FALCON, L. A., 1978. A mixed virus infection in midgut cells of *Autographa californica* and *Trichoplusia ni* larvae. *J. Ultrastruct. Res.*, 65: 253.
- HUGER, A., 1963. Granulose of insects. In: STEINHAUS, E. A., ed. *Insect Pathology: An Advanced Treatise*. New York. Academic Press, v.1, cap. 16.
- HUGHES, K. M., 1972. Fine structure and development of two polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 19: 198.
- HUGHES, K. M., 1979. Some interactions of two baculoviruses of the Douglas-fir Tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Can. Ent.*, 111: 521.
- IGNOFFO, C. M., 1968. Specificity of insect viruses. *Bull. ent. Soc. Am.*, 14: 265.

- INJAC, M., 1973. Recherches sur les maladies virales du Lépidoptère Hyphantria cunea Drury. Docteur-Ingénieur Thesis , Univ. des Sciences Techniques du Languedoc, Montpellier, France. Apud HARPER, J. D., 1986, op cit.
- ISHIKAWA, Y. & ASAYAMA, T., 1961. Studies on the relation between the polyhedrosis of the wild insects and the silkworm, *Bombyx mori* L. II. On the double infection of the nuclear polyhedrosis in the silkworm larvae. *Nihon Sanshigaku Zasshi*, 30: 201. Apud MAZZONE, H. M., 1985, op, cit.
- KELLEN, W. R. & HOFFMANN, D. F., 1984. Occurrence of two baculoviruses in *Cadra figulilella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 439.
- KELLY, D. C., 1980. Suppression of baculovirus and iridescent virus replication in dually infected cells. *Microbiologica*, 3: 177.
- KIMURA, M. & Mc INTOSH, A. H., 1976. Dual infection of the *Trichoplusia ni* cell line with the Chilo iridescent virus (CIV) and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. In: KURSTAK, E. & MARAMOROSH, K., eds. *Invertebrate Tissue Culture*. New York., Academic Press. Cap.39.
- KURSTAK, E. & GARZON, S., 1975. Multiple infections of invertebrate cell by viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 266: 232.

- LAUDEHO, Y. & AMARGIER, A., 1963. Virose a polyédres nucléaires à localisation inhabituelle chez un Lépidopteres. *Revue. Path. vég. Ent. agric. Fr.*, 52: 207. Apud HEIMPEL, A. M. & ADAMS, J. R., 1966, op cit.
- LONGWORTH, J. L., 1983. Current problems in insect virus taxonomy. In: MATTHEWS, R. E. F., eds. *A Critical Appraisal of Virus Taxonomy*. Boca Raton, Fla., CRC Press. p.23.
- LOWE, R. E. & PASCHKE, J. D., 1968a. Simultaneous infection with the nucleopolyhedrosis and granulosis viruses of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 86.
- LOWE, R. E. & PASCHKE, J. D., 1968b. Pathology of a double viral infection of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 12 : 438
- LURIA, F. E.; BARNEL Jr., J. E.; BALTIMORE, D. & CAMPBELL, A., 1978. *General Virology*. 3rd ed. New York. John Wiley & Sons. Cap. 17.
- MACEDO, N. & BOTELHO, P. S. M., 1988. Controle integrado de broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). *Bras. açuc.*, 106: 2.
- MARTIGNIONI, M. E. & IWAI, P. J., 1978. Activity standardization of technical preparations of Douglas-fir tussock moth baculovirus. *J. econ. Ent.*, 71: 473.

- MARUNIAK, J. E., 1986. Baculoviruses structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B. A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Boca Raton, Fla., CRC Press Inc. v.1, cap. 6.
- MAZZONE, H. M., 1985. Pathology associated with baculovirus infection. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K. E., eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. Orlando, Fla., Academic Press Inc., p. 81.
- MILLER, L. K., 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *A. Rev. Microbiol.*, 42: 177
- MILLER, L. K.; LINGG, A. J. & BULLA Jr., L. A., 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science*, 219: 715.
- MOSECARDI, F., 1983. Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle de lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis*. Londrina, EMBRAPA., 21p. Comunicado Técnico, Nº 23.
- NAKAGAKI, M.; OHBA, M. & TANADA, Y., 1987. Specificity of receptor sites on insect cells for the synergistic factor of an insect baculovirus. *J. Invertebr. Pathol.*, 50: 169.
- ODIER, F., 1977. Mise en évidence et étude d'un complexe de maladies à parvovirus, baculovirus et iridovirus. *Entomophaga*, 22: 397.

- DHBA, M. & TANADA, Y., 1984. In vitro enhancement of nuclear polyhedrosis virus infection by the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Lepidoptera:Noctuidae). *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 135 E: 167.
- PAILLOT, A., 1936. Nouveau type de maladies à polyadres ou polyédries observé chez les chenilles d *Euxoa* (*Agrotis*) *segetum* Schiff. *C. R. Acad. Sc., Paris*, 202: 254.
- PASCHKE, J. D. & HAMM, J. J., 1962. Granulosis-polyhedrosis complexes in looper. *Proc. N. cent. Brch Ent. Soc. Am.*, 17: 148.
- PASCHKE, J. D.; LOWE, R. E. & GIESE, R. L., 1968. Bioassay of the nucleopolyhedrosis and granulosis viruses of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 10: 327.
- PASCHKE, J. D. & SUMMERS, M. D., 1975. Early events in the infections of the arthropod gut by pathogenic insect viruses. In: MARAMOROSCH, K. & SHAPE, R. E. eds. *Invertebrate Immunity*. New York., Academic Press, p. 75.
- PAVAN, O. H. D., 1983. O vírus de granulose de *Diatraea saccharalis* Fabricius (broca da cana-de-açúcar). *Saccharum*, 25: 27.

- PAVAN, O. H. O.; BOUCIAS, D. G. & PENDLAND, J. C., 1981. The effects of serial passage of a nucleopolyhedrosis virus through an alternate host system. *Entomophaga*, 26: 99.
- PAVAN, O. H. O.; BOUCIAS, D. G.; ALMEIDA, L. C.; GASPAR, J. O.; BOTELHO, P. S. M. & DEGASPARI, N., 1983. A granulosis virus of *Diatraea saccharalis* Fabr. I. Pathogenicity, replication and ultrastructure. In: Congress of International Society of Sugar Cane Technologists, 18, Cuba v,2: 644.
- PAYNE, C. C.; TATCHELL, G. M. & WILLIAMS, C. F., 1981. The comparative susceptibilities of *Pieris brassicae* and *P. rapae* to a granulosis virus from *P. brassicae*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 273.
- PRITCHETT, D. W.; YOUNG, S. Y. & YEARIAN, W. C., 1984. Some factors involved in the dissolution of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra by digestive fluids of *Trichoplusia ni* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 160.
- RIBEIRO, H. C. T., 1985. Seleção genética e interação de baculovírus em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). Campinas. Tese (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

- RIBEIRO, H. C. T., 1989. Seleção Genética e a Dinâmica de Baculovírus a Diferentes Fatores em Diatraea saccharalis (Fabr., 1794). Campinas. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- RITTER, K. S. & TANADA, Y., 1978. Interference between two nuclear polyhedrosis viruses of the armyworm, Pseudaletia unipuncta. *Entomophaga*, 23: 349.
- RODRIGUES, J. J. S., 1989. Seleção Genética do Vírus de Poliedrose Nuclear de Autographa californica (Baculoviridae) em Diatraea saccharalis (Fabr., 1794) (Lepidoptera:Pyralidae). Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
- SHAPIRO, M. & IGNOFFO, C. M., 1970. Nucleopolyhedrosis of Heliothis activity of isolates from Heliothis zea. *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 107.
- SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J. & BELL, R. A., 1986. Quantitative and qualitative differences in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus produced in different-aged larvae. *J. econ. Ent.*, 79: 1174.

- SHEPPARD, R. F. & STAIRS, G., 1977. Dosage-mortality and time-mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 216.
- SHVETSOVA, O. I. & TSAI, H., 1962. Virus diseases of *Agrotis segetum* Schiff and *Hadena sordida* Bkh (Lepidoptera: Noctuidae) under conditions of simultaneous infection with granulosis and polyhedral disease. *Ent. Rev.*, 41: 486.
- SMITH, G. E. & SUMMERS, M. D., 1980. Restriction maps of *Rachiplusia ou* and *Rachiplusia ou*-*Autographa californica* baculovirus recombinants. *J. Virol.*, 33: 311.
- SMITH, K. M. & XEROS, N., 1953. Studies on the cross-transmission of polyhedral viruses: experiments with a new virus from *Pyrameis cardui*, the painted lady butterfly. *Parasitology*, 43: 178.
- SMITH, K. M.; WYCKOFF, R. W. G. & XEROS, N., 1953. Polyhedral virus diseases affecting the larvae of the privet hawk moth (*Sphinx ligustri*). *Parasitology*, 42: 287.
- SMITH, K. M. & XEROS, N., 1954. An unusual virus disease of a dipterous larvae. *Nature*, 173: 866.
- SMITH, K. M. & RIVERS, C. F., 1956. Some viruses affecting insect of economic importance. *Parasitology*, 46: 235.

- 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.
- STAIRS, G. R.; FRASER, T. & FRASER, M., 1981. Changes in growth and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from *Choristoneura fumiferana* after passage in *Trichoplusia ni* and *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 230.
- STEEL, R. G. D. & TORRIE, J. H., 1980. *Principles and Procedures of Statistics*. 2nd ed. New York., McGraw Hill. 633p.
- STEINHAUS, E. A., 1957. New records of insect virus diseases. *Hilgardia*, 26: 417.
- STEINHAUS, E. A. & MARSH, G. A., 1962. Report of diagnoses of diseased insects 1951 - 1961. *Hilgardia*, 33: 349.
- STODDARD, P. J., 1980. Persistence and transmission of baculoviruses in insect populations in alfalfa. Berkeley. Tese (Doutorado). Universidade de California. Apud TANADA, Y., 1985, op cit.

- SUMMERS, M. D., 1971. Electron microscopic observation on granulosis virus entry, uncoating and replication process during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *J. Ultrastruc. Res.*, 35: 606.
- SUMMERS, M. D.; ENGLER, R.; FALCON, L. A. & VAIL, P., 1975. *Baculovirus for Insect Pest Control: Safety Considerations*. Washington, D. C., Am. Soc. Microbiol. 186p.
- SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E.; KNELL, J. D. & BURAND, J. P., 1980. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia* nuclear polyhedrosis virus recombinants. *J. Virol.*, 34: 693.
- TANADA, Y., 1953. Description and characteristics of a granulosis virus of the imported cabbageworm. *Hawaiian Ent. Soc. Proc.*, 15: 235.
- TANADA, Y., 1954. A polyhedrosis virus of the imported cabbageworm and its relation to a polyhedrosis virus of the alfalfa caterpillar. *Ann. ent. Soc. Am.*, 47: 553.
- TANADA, Y., 1956. Some factors affecting the susceptibility of the armyworm to virus infection. *J. econ. Ent.*, 49: 52.
- TANADA, Y., 1959. Synergism between two viruses of the armyworm *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae) *J. Insect Pathol.*, 1: 215. Apud TANADA, Y., 1985, op cit.

- TANADA, Y. & CHANG, G. Y., 1962. An epizootic resulting from a microsporidian and two virus infections in the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth). *J. Invertebr. Pathol.*, 4: 129.
- TANADA, Y. & HUKUHARA, T., 1968. A nonsynergistic strain of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 12: 263.
- TANADA, Y.; HUKUHARA, T. & CHANG, G. Y., 1969. A strain of nuclear polyhedrosis virus causing extensive cellular hypertrophy. *J. Invertebr. Pathol.*, 13: 394.
- TANADA, Y. & HUKUHARA, T., 1971. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 17: 116
- TANADA, Y.; HIMENO, M. & OMI, E. M., 1973. Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear polyhedrosis virus of the armyworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 21: 31.
- TANADA, Y. & OMI, E. M., 1974 Epizootiology of virus diseases in three lepidopterous insect species of alfalfa. *Res. Popul. Ecol.*, 16: 59.

- TANADA, Y. & HARA, S., 1975. Enzyme synergistic for insect viruses. *Nature*, 254: 328.
- TANADA, Y.; HESS, R. T. & OMI, E. M., 1975. Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* and the enhancement of a synergistic enzyme. *J. Invertebr. Pathol.*, 26: 99.
- TANADA, Y. & HESS, R. T., 1976. Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 28: 67.
- TANADA, Y.; INOUE, H.; HESS, R. T. & OMI, E. M., 1980. Site action of a synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.*, 34: 249.
- THOMPSON, C. G., 1951. A granulosis of the imported cabbageworm. *J. econ. Ent.*, 44: 255.
- TREVAN, J. W., 1927. The error of determination of toxicity. *Proc. R. Soc.*, 101: 433.
- VAGO, C., 1959. On the pathogenesis of simultaneous virus infections in insects. *J. Insect Pathol.*, 1: 75. Apud SHVETSOVA, O. I. & TSAI, H., 1962, op cit.

- VAGO, C. & VASILJEVIC, L., 1958. Polyédrie cytoplasmique chez L. écaille filense (*Hyphantria cunea* Drury, Lep. Arctiidae). *Entomophaga*, 3: 197.
- VAIL, P. V.; KNELL, J. D.; SUMMERS, M. D. & CDWAN, D. K., 1982. In vivo infectivity of baculovirus isolates, variants and natural recombinants in alternate hosts. *Envir. Ent.*, 11: 1187.
- VEBER, J., 1962. Virulence of an insect virus increased by repeated passages. In: *Colloq. Int. Pathol. Insect*, Paris, 2: 403.
- WATANABE, H. & KOBAYASHI, M., 1970. Histopathology of a granulosis in the larvae of the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 71.
- WHITLOCK, V. H., 1977a. Simultaneous treatment of *Heliothis armigera* with a nuclear polyhedrosis and a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 297.
- WHITLOCK, V. H., 1977b. Effect of larval maturation on mortality induced by nuclear polyhedrosis and granulosis virus infection of *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 30: 80.
- XEROS, N., 1954. A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature*, 174: 562.