

## **Tecnologias para uso de entomopatógenos no controle de *Anticarsia gemmatalis* e outras lagartas**

*Flávio Moscardi*  
*Sheila M. Levy*  
*Rose Monnerat*

### **Baculovírus da lagarta-da-soja (AgMNPV) - produção comercial em laboratório e formulação**

O objetivo desta atividade foi desenvolver métodos para a produção comercial do AgMNPV, considerando que a produção em campo, realizada até 2003, era muito variável, decorrente da maior ou menor abundância da lagarta-da-soja e de sua mortalidade natural em função de fatores bióticos e abióticos. Também havia a necessidade de modificar a formulação do inseticida biológico para uma melhor eficiência em campo, uma vez que aquela produzida pelas empresas até 2004 estava aquém de padrões físico-químicos (granulometria, suspensibilidade, molhabilidade, etc.). Assim, foram obtidos avanços quanto à produção comercial do AgMNPV em laboratório, usando insetos criados em dieta artificial e em condições controladas, permitindo um produto de custo competitivo com o custo dos inseticidas empregados contra o inseto na cultura da soja e a implementação de um “laboratório-piloto” de produção do AgMNPV em uma das empresas privadas (Coodetec) conveniadas com a Embrapa Soja. Essa iniciativa foi bem sucedida, levando a Coodetec a implantar o maior laboratório mundial de produção de um vírus entomopatogênico para o controle de um inseto. Por razões diversas, incluindo a queda na demanda pelo inseticida biológico, os baixos retornos econômicos e a necessidade de investir em outras atividades, a Coodetec encerrou as atividades de produção do AgMNPV. No entanto, um “laboratório-piloto” para a produção do inseticida biológico foi construído na Embrapa Soja, Londrina, PR, com o objetivo de treinar técnicos de empresas privadas interessadas na produção do AgMNPV. Isso porque a técnica de produção desenvolvida é viável e poderá ser adotada por empresas privadas, assim que a demanda pelo inseticida biológico aumentar novamente.

Houve, também, melhoria da formulação do AgMNPV com a micronização da formulação final do produto, resultando em granulometria inferior a 10 micrometros, além da adição de agente dispersante à base de lignina. Com isso, a formulação não mais entope bicos de pulverização, como ocorria com a formulação anterior (principalmente com volume de calda inferior a 80 L/ha), além do fato da nova formulação ter ótima suspensibilidade em água (cerca de 98 %). Verificou-se, ainda, que o uso de protetores na formulação, para proteger o vírus contra a desativação pela radiação solar em campo, resultou em avanços importantes. Os resultados mais expressivos foram obtidos com alguns “branqueadores ópticos” do grupo dos ácidos stilbenes (utilizados em detergentes, sabões em pó, tintas, etc). No entanto, esses produtos ainda não foram incorporados na formulação do inseticida biológico por terem custo relativamente elevado. Mas são substâncias com alto potencial para uso na formulação, pois, além de prolongar a meia-vida do AgMNPV em campo, têm a importante característica de potencializar a atividade do vírus e reduzir o tempo de mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis*, conforme dados anteriores e os obtidos com o projeto atual. Os testes iniciais (2004) com lignina e outras substâncias para proteger o vírus contra a desativação solar, tanto em laboratório como em casa-de-vegetação, não foram muito promissores, pois não propiciaram a mesma proteção ao vírus em relação a alguns dos stilbenes. Contudo, novas formulações testadas apresentaram resultados melhores, oferecendo boa proteção ao vírus até os quatro dias da aplicação, mas declinando drasticamente a partir daí, indicando a necessidade do teste de outras substâncias protetoras na formulação.

## **Avaliação, a campo, de substâncias que potencializam o AgMNPV**

Foram instalados experimentos a campo com o branqueador óptico Tinopal DMS 1 %, nas safras 2004/2005 e 2005/2006, visando a avaliar a potencialização do AgMNPV. Conseguiu-se verificar tendência de maior redução da população de lagartas quando utilizou-se o Tinopal DMS 1 % + Baculovírus, referente ao vírus isoladamente, sobretudo pela alta mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* por agentes naturais de controle biológico, como o fungo *Nomuraea rileyi*, levando a uma redução geral de lagartas na área experimental, inclusive na testemunha. Acredita-se que o papel de branqueadores ópticos, como o Tinopal DMS, deva ser melhor explorado em futuros experimentos, mas em aplicações antecipadas, quando a ação do fungo *N. rileyi* ainda não é evidente.

## Mecanismos de resistência de *A. gemmatalis* ao VPNAg e à bactéria *Bacillus thuringiensis*

### Mecanismos de resistência ao VPNAg

Foram realizados experimentos para verificar a existência de diferenças morfológicas regionais ao longo do intestino médio (IM) de larvas de *A. gemmatalis* suscetíveis (LS) e resistentes (LR) ao VPNAg, tanto em insetos-controle (não infectados pelo vírus) como em insetos sob infecção viral. Também buscou-se detectar diferenças na atividade hemaglutinadora de extratos do IM de LS e LR do inseto, que pudessem ser relacionadas com os mecanismos de resistência ao vírus. Verificou-se que houve diferenças morfológicas no epitélio do IM, especialmente de células colunares e da membrana peritrófica (MP), ao longo do IM de LR e LS que permitiram caracterizar duas regiões, proximal e distal. A região mediana apresentou características intermediárias, podendo ser considerada como área de transição. A membrana peritrófica (MP) mostrou espessamento na região proximal para a distal. As células colunares apresentaram aumento no número de protusões citoplasmáticas, de complexos de Golgi vesicular e de microvesículas nas microvilosidades na região distal do IM. As vesículas secretoras apicais da região proximal apresentaram conteúdo elétron-denso, enquanto as da região distal apresentaram conteúdo elétron-transparentes. O VPNAg penetra o IM de larvas de *A. gemmatalis* através das células colunares e caliciformes, afetando principalmente as células colunares e causando, ainda, lesões em células caliciformes e regenerativas. A resposta inicial das células colunares à infecção viral é caracterizada pela presença de corpos multivesiculares e vacúolos digestivos apicais; tardiamente existem hiperplasia nuclear, alterações de mitocôndrias, de retículo endoplasmático rugoso e de microvilosidades. Os vírus podem ser segregados em vacúolos digestivos e eliminados das células colunares através de protusões citoplasmáticas. Existe morte de células colunares e regenerativas na infecção tardia. O VPNAg é capaz de infectar larvas de *A. gemmatalis* resistentes (LR) à infecção viral, porém os efeitos são retardados e menos agressivos para as células do IM e MP. Lagartas resistentes (LR) ao VPNAg apresentaram MP mais espessa, maior quantidade de protusões citoplasmáticas, de microvesículas e de vacúolos secretores em células colunares, que podem contribuir para retardar a infecção no inseto. A região distal do IM foi a mais afetada tardiamente pela infecção viral, tanto em LS com

em LR. Não foram detectadas diferenças na atividade hemaglutinadora de extratos do IM de LS e LR que pudessem ser correlacionadas com mecanismos de resistência/susceptibilidade do inseto à infecção viral.

### **Mecanismos de resistência a *B. thuringiensis***

Verificou-se que para lagartas suscetíveis (LS) as toxinas Cry 1Ac e Cry 1Ab apresentaram as menores concentrações letais médias (CL50) em relação às toxinas Cry 1Aa e Cry 2A. Já o produto Dipel, que contém essas quatro toxinas, apresentou CL50 menor ou comparável às toxinas de maior atividade. Para LR, a CL50 do Dipel foi superior (até 17,6 vezes) a CL50 em LS. No entanto, todas as toxinas utilizadas isoladamente promoveram alta mortalidade em LR, com valores de CL50 inclusive inferiores aqueles obtidos em LS. Observou-se, também, que tanto as LS quanto as LR apresentaram reação positiva do teste, ou seja, houve ligação das 4 toxinas (mencionadas acima) a receptores localizados no intestino das larvas. Isso confirma os resultados dos bioensaios, quando não houve aumento da CL50 das toxinas puras, confirmando que as mesmas estão ativas. Em contraste, quando o produto Dipel, que contém as quatro toxinas, foi testado, a CL50 aumentou consideravelmente em LR. A causa pode estar na existência de outra toxina na cepa HD-1, que é a base do Dipel, e que não foi estudada, mas pode ser a toxina mais ativa contra a lagarta-da-soja. Com isso serão necessários estudos adicionais para esclarecer o mecanismo de resistência a Bt.

### **Linhas básicas de resposta de populações geográficas de *A. gemmatalis* à proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis***

Observou-se uma variação nos valores da concentração letal média (CL50) de 0,32 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) da proteína Cry 1Ac de *B. thuringiensis* por mililitro da dieta artificial do inseto para a população de Ijuí, RS (F4) a 0,60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dieta para a população de Campo Novo dos Parecis, MT (F4). Entretanto, os valores das CL50, para as diferentes populações não foram significativamente diferentes, considerando a sobreposição dos respectivos limites fiduciais 95 %. Isso evidencia que as populações de *A. gemmatalis*, mesmo de regiões distantes, são relativamente homogêneas quanto à resposta a proteína Cry 1Ac de *B. thuringiensis*. Portanto, em futuros estudos quanto a possível seleção de populações do inseto resistentes a essa toxina, pode-se considerar a variação observada nos

valores de CL50 como normal em populações de *A. gemmatalis* não expostas ou com pouca exposição à toxina, mesmo porque, em geral, formulações comerciais de *B. thuringiensis* são muito pouco utilizadas para o controle desse inseto nas diferentes regiões produtoras de soja no Brasil. No entanto, essas linhas básicas de suscetibilidade serão importantes para comparar populações geográficas do inseto com possível plantio de soja geneticamente modificada, portando gene da toxina de Bt, em futuro próximo. Não foi observada resistência cruzada a diferentes inseticidas, em população resistente a Bt., comparada à população suscetível, quando utilizados os seguintes inseticidas: i) Biológico (nucleopoliedrovirus de *A. gemmatalis*); ii) Regulador de crescimento (diflubenzuron); iii) Organofosforado (profenofós); iv) Carbamato (carbaril); v) Clorado (endossulfam) e; vi) Piretróide (permetrina). A não constatação de resistência cruzada em população resistente a Bt, provavelmente se deveu aos modos de ação muito distintos entre Bt e os demais inseticidas testados.

## Referências

- MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; MORALES, L.; PARO, F.E.; SOLDORIO, I.L. Selection for resistance in the laboratory to the nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (AgMNPV). In: CONGRESO NACIONAL DE CONTROL BIOLÓGICO, 26., Guadalajara. Memorias... Coyoacán: Sociedad Mexicana de Control Biológico, 2003. p.319-322
- PEDRINI, M.R.S.; MEDEIROS, U.K.L.; ANDRADE, W.M.; XAVIER, C.H.; SOLDORIO, I.L.; PARO, F.E.; MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L.; MEDEIROS, M.F.D. Drying of Baculovirus anticarsia biopesticide formulations in spouted bed of inert particles. In: MERCOSUR CONGRESS ON CHEMICAL ENGINEERING, 2. , 2005, Rio de Janeiro. **Proceedings...** 2005. p.1-9
- SANTOS, B.; MOSCARDI, F. Biofábrica do nucleopolyhedrovirus da lagarta-da-soja. Informativo da Sociedade Entomológica do Brasil, v.30. p.1- 5, 2005.
- TOLEDO, A.M; MOSCARDI, F.; BOIÇA JUNIOR, A.L; BROGIN, R.L. 2006. Uso de baculovírus para controle de *Anticarsia gemmatalis* na cultura da soja. In: DE BORTOLI, S.A.; BOIÇA JUNIOR, A.L.; OLIVEIRA, J.E.M. (Ed.). **Agentes de controle biológico: metodologias de criação, multiplicação e uso**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p.215-231.
- LEVY, S.M.; FALLEIROS, A.M.F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E.A.. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): structural study of the peritrophic membrane. Journal of Invertebrate Pathology, v.96, p.183-186. 2007.