

# Aperfeiçoamento da Técnica de Produção Massal *in vivo* de Baculovírus *spodoptera*

## Improvement of *in vivo* Mass Production Technique of Baculovirus *spodoptera*

Lorena Contarini Machado<sup>1</sup>, Hugo José Gonçalves dos Santos Junior<sup>2</sup>, Laura Vaillant Ribeiro Mauri<sup>1</sup>, José Henrique Soler Guilben<sup>3</sup>, Carlos Eduardo Costa Paiva<sup>4</sup>

**RESUMO:** A multiplicação *in vivo* do Baculovírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) no hospedeiro específico *Spodoptera frugiperda* tem como principal problema o hábito canibal dessa espécie de inseto-praga, o que aumenta custos e reduz a produção final para comercialização. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi aperfeiçoar o método de produção *in vivo* de SfMNPV baseado na densidade de lagartas e no período de multiplicação do vírus. Lagartas de *S. frugiperda* com 4 dias de idade foram inoculadas com suspensão viral do isolado 6 ( $1 \times 10^8$  OB.mL<sup>-1</sup>) de SfMNPV em dieta artificial. As lagartas foram mantidas a 31 °C em duas densidades (50 e 100 lagartas/recipiente) e cinco períodos para multiplicação viral (48, 72, 96, 120 e 144 horas). Após cada período de multiplicação do vírus, as lagartas de ambas densidades foram congeladas, pesadas e maceradas para quantificação dos corpos de oclusão e cálculo dos parâmetros de produção. Com base nos parâmetros avaliados, as densidades de 50 e 100 lagartas/recipiente e período de 96 horas é adequado para aperfeiçoamento da produção *in vivo* do isolado 6 de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda*.

**Palavras-chave:** Baculoviridae. Canibalismo. Inseticida biológico. *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*.

**ABSTRACT:** The *in vivo* multiplication of baculovirus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) in the specific host *Spodoptera frugiperda* features the issue of cannibalism of the pest species, with increase in costs and reduction of the final production. Current paper aims at improving the *in vivo* production method of SfMNPV based on the density of caterpillars and in the period of virus multiplication. Four-day old caterpillars of *S. frugiperda* were inoculated by virus suspension of isolate 6 ( $1 \times 10^8$  OB.mL<sup>-1</sup>) of SfMNPV in artificial diet. Caterpillars were kept at 31°C in two densities (50 and 100 caterpillars/tray) and five periods for virus multiplication (48, 72, 96, 120 and 144 hours). After each period, the caterpillars of the two densities were frozen, weighed and ground to quantify occlusion bodies and the calculation of production parameters. Based on evaluated parameters, densities 50 and 100 caterpillars/tray and 96-h period are adequate for the improvement of *in vivo* production of isolate 6 of SfMNPV in caterpillars of *S. frugiperda*.

**Keywords:** Baculoviridae. Biological insecticide. Cannibalism. *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*.

### Autor correspondente:

Lorena Contarini Machado: [lorenarini@hotmail.com](mailto:lorenarini@hotmail.com)

Recebido em: 12/03/2020

Aceito em: 29/07/2020

## INTRODUÇÃO

Os baculovírus são uma boa opção para a formulação de produtos biológicos, demonstrando eficácia para o manejo de pragas, dentre os quais o *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) destaca-se no controle de *Spodoptera frugiperda* (VALICENTE *et al.*, 2013; LACEY, 2016). O método de produção *in vivo* é o mais empregado para a formulação dos bioinseticidas a base de SfMNPV (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010b). No entanto, o canibalismo é um dos principais problemas relacionados à multiplicação desses microrganismos em seu hospedeiro natural (CHAPMAN *et al.*, 1999; VALICENTE *et al.*, 2013).

Entre os métodos para minimizar esse efeito comportamental durante o processo de produção massal é a

<sup>1</sup> Doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre (ES), Brasil.

<sup>2</sup> Docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre (ES), Brasil.

<sup>3</sup> Doutor do Programa de Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre (ES), Brasil.

<sup>4</sup> Agrônomo da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre (ES), Brasil.

inoculação do baculovírus em lagartas individualizadas, uso de hospedeiro alternativo, e ainda a inoculação do baculovírus em grandes quantidades de lagartas e posterior individualização (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a). Contudo, esses procedimentos de individualização ou estabelecer outra criação de insetos na etapa de fabricação acarreta o aumento dos custos e tempo de produção (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a; SILVA; PARRA, 2013).

O estudo da técnica de produção *in vivo* vem sendo pesquisado com intuito de otimizar a produção e qualidade do produto, destacando-se dietas para inoculação (ELVIRA *et al.*, 2010a; ZAMORA-AVILÉS *et al.*, 2017), procedimentos para obtenção de maiores quantidades de poliedros virais (RAMÍREZ-ARIAS *et al.*, 2019), temperatura para inoculação (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006; RAMÍREZ-ARIAS *et al.*, 2019). Quando esses e outros aspectos são aperfeiçoados possibilitam adaptações nos métodos de produção massal *in vivo*.

Adequações no desempenho da replicação *in vivo* é um fator chave para viabilizar economicamente a produção e a competitividade destes produtos no mercado. Dessa forma pesquisas vêm sendo realizadas fazendo-se de grande importância estudos que contribuam no processo de fabricação de bioinseticidas entomopatogênicos (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006; ELVIRA; WILLIAMS; CABALLERO, 2010; VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a; RIOS-VELASCO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012; LACEY *et al.*, 2015; ZAMORA-AVILÉS *et al.*, 2017; RAMÍREZ-ARIAS *et al.*, 2019).

Uma tática que pode ser estudada e aperfeiçoada é a inoculação do baculovírus em grandes quantidades de lagartas. Essa técnica de inoculação demanda alimento *in natura* e posterior individualização das lagartas infectadas (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a). Além disso, o canibalismo se intensifica com o crescimento dos indivíduos, principalmente nos últimos estágios larvais (ELVIRA; WILLIAMS; CABALLERO, 2010b). Porém nenhum trabalho foi desenvolvido estudando o método de inoculação em grandes quantidades de lagartas em dieta artificial ao longo do tempo de inoculação. Se encontrássemos um binômio tempo de inoculação x densidade lagartas que permitisse uma produção de poliedros virais, que eliminasse a alimentação *in natura* e evitasse o processo de individualização, poderia ser uma forma de aperfeiçoar tal método.

Diante disso, o objetivo do trabalho foi aperfeiçoar a técnica de produção *in vivo* de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda*, pelo método de inoculação do baculovírus em grandes quantidades de lagartas, baseando-se na densidade do hospedeiro e no período de multiplicação do vírus em dieta artificial.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Entomologia do Núcleo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Manejo Fitossanitário de Pragas e Doenças (NUDEMAFI), localizado no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE/UFES), no período de março a junho de 2016.

A criação de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de pupas provenientes do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). A multiplicação e manutenção foram realizadas em sala climatizada a temperatura de  $25 \pm 2$  °C, umidade relativa de 60% e fotofase de 12 horas. Os adultos foram mantidos em gaiola de PVC (Policloreto de polivinila) forradas com papel branco tipo sulfite para a remoção das posturas e alimentados com solução de sacarose a 10%. Os insetos recém-eclodidos foram transferidos para completarem o desenvolvimento até a fase adulta em dieta artificial a base de feijão, gérmen de trigo e levedura de cerveja descrita por Nalim (1991).

Para o ensaio foi utilizado o isolado 6, proveniente do Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, por não ocasionar a liquefação do tegumento imediatamente após a morte do inseto, minimizando as perdas dos poliedros antes da quantificação do mesmo (VIEIRA *et al.*, 2012).

Para a montagem do ensaio houve a multiplicação do inóculo viral e em seguida o processo de purificação,

o qual seguiu a metodologia proposta por Hashimoto *et al.* (2000) com modificações descritas a seguir. Lagartas infectadas foram maceradas em água destilada autoclavada contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 1% e filtrada em tecido *voile* com intuito de facilitar a separação entre tecidos corporais das lagartas, da suspensão que continha os OB. O filtrado foi deixado sob agitação orbital a 250 RPM por 30 minutos e a suspensão foi centrifugada a 6.000 RPM/20 minutos por três vezes. Após a última centrifugação, o precipitado obtido foi ressuspensão em água destilada esterilizada e armazenado a 4 °C para posterior utilização.

Para a determinação da densidade de lagartas e do período de multiplicação viral para a produção *in vivo* de SfMNPV em lagartas de *S. frugiperda* foram avaliadas duas densidades: 50 e 100 lagartas; e cinco períodos de multiplicação: 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Para cada tratamento, utilizou-se quatro repetições e a testemunha foi estabelecida para cada densidade sendo observada por todo período de multiplicação.

Assim, após a obtenção da suspensão viral de SfMNPV e ajuste para  $1 \times 10^8$  OB. mL<sup>-1</sup> em câmara de Neubauer®, foi pipetado 770 µl e distribuída uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski sobre a superfície da dieta artificial, sem formaldeído, contida em um recipiente de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm). Para testemunha foi adicionada água destilada esterilizada sobre a superfície da dieta.

Após a evaporação da suspensão viral, lagartas de quatro dias de idade, mantidas a 31 °C desde a eclosão, foram distribuídas nas unidades experimentais de acordo com a densidade e mantidas em câmara climatizada regulada a  $31 \pm 2$  °C, UR de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas.

Em cada período de multiplicação as lagartas foram congeladas e posteriormente contabilizadas, pesadas e purificadas para a quantificação do OBs. Foram avaliados:

- (1) Contagem do número de lagartas mortas coletadas por período de multiplicação em cada repetição;
- (2) Corpos de oclusão por lagarta (OB/lagarta):

$$\frac{\text{OB total}}{\text{n}^\circ \text{ de lagartas coletadas de cada repetição}}$$

- (3) Percentagem de mortalidade:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de lagartas mortas no período de multiplicação}}{\text{Total de insetos}}$$

- (4) Percentagem de canibalismo:

$$\frac{[(\text{N}^\circ \text{ total insetos} - \text{N}^\circ \text{ de lagartas mortas no período de multiplicação}) \times 100]}{\text{N}^\circ \text{ total insetos}}$$

- (5) Lagarta equivalente (LE)\*:

$$\frac{3 \times 10^{11}}{\text{OB/lagarta de cada repetição}}$$

\*Parâmetro que corresponde ao número de lagartas necessárias para obtenção de uma dose comercial de  $3,0 \times 10^{11}$  OB para pulverizar um hectare (MAPA, 2015);

(6) Corpos de oclusão pelo número de lagartas mortas a cada 100 lagartas inoculadas (OB/100 Lagartas):

$$\text{Porcentagem de mortalidade} \times \frac{\text{OB}}{\text{lagarta}}$$

Com base no melhor resultado, foi estimado o número máximo de ciclos de produção anual e, consequentemente, a produtividade anual de doses comerciais ( $3,0 \times 10^{11}$  OB), por meio da fórmula empregada por Subramanian *et al.* (2006) adaptada. Dessa forma, a estimativa hipotética do número máximo de ciclos de produção anual (Fórmula 1) e da produtividade/ano (Fórmula 2), com a suposição de que 1.000 larvas são inoculadas por ciclo de produção, foi realizada:

- Fórmula 1: Número máximo de ciclos/ano:

$$\frac{365 \text{ dias} \times 24 \text{ horas}}{\text{Período de multiplicação selecionado}}$$

- Fórmula 2: Produtividade/ano:

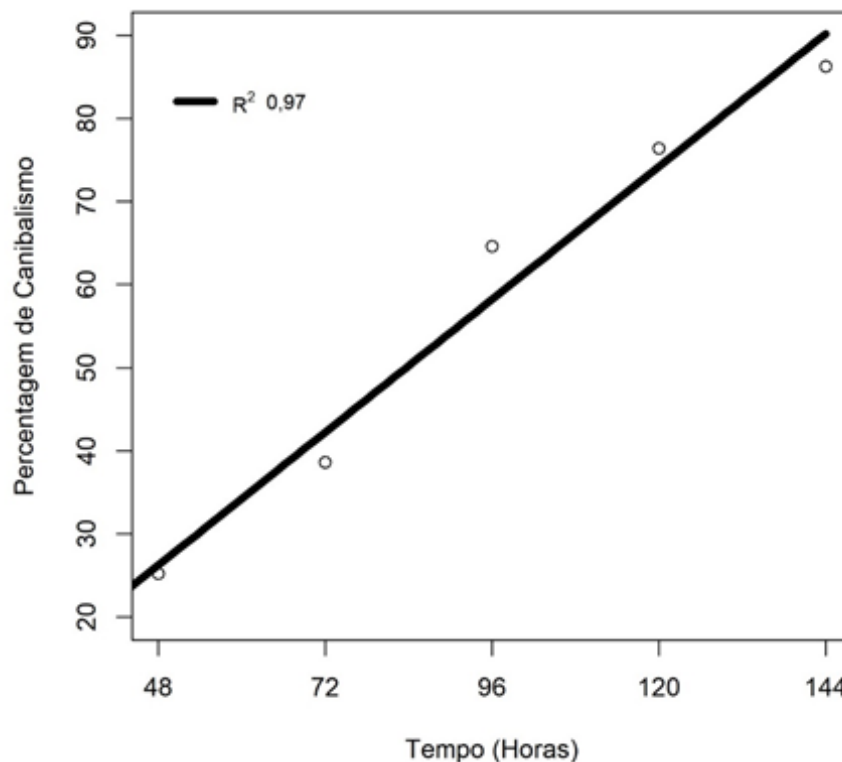
$$\frac{365 \text{ dias} \times 24 \text{ horas} \times (\text{porcentagem de mortalidade} \times \text{OB/lagarta}) \times 10}{\text{Período de multiplicação selecionado}}$$

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

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o canibalismo não houve interação significativa entre os fatores densidade e período de multiplicação ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, desta forma os mesmos foram analisados isoladamente ( $p\text{-value} = 0,063$ ) (Tabela 1). O canibalismo na densidade de 100 lagartas/recipiente diferiu-se estatisticamente pelo teste F da densidade de 50 lagartas/recipiente, apresentando médias de 64,25 e 52,20%, respectivamente (Tabela 1).

Em relação ao período de multiplicação viral, o canibalismo ajustou-se ao modelo linear, apresentando nas primeiras 48 horas um canibalismo em torno de 25%, contudo, esse comportamento aumentou com o tempo, atingindo aproximadamente 86% nas 144 horas (Figura 1). Os resultados demonstram que o canibalismo se intensifica com o aumento da densidade de insetos por recipiente e período de multiplicação viral.



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

Adaptações no método para a criação massal de *S. frugiperda* sem a necessidade de individualizar os insetos foram estudados por Silva e Parra (2013), que constataram uma estratégia interessante com a densidade de 40 lagartas/ recipiente. Esses autores reforçam a necessidade de ajustes no método de criação massal buscando maximizar tempo, espaço e custos, contornando o comportamento canibal.

No entanto para a inoculação do vírus durante o processo produtivo existem basicamente três formas para inoculação do baculovírus: Inoculação do baculovírus em hospedeiro natural de forma individualizada; Inoculação do baculovírus em hospedeiro natural em alta densidade de lagartas; e a Inoculação do baculovírus em um hospedeiro alternativo (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a).

Atualmente é mais usual a inoculação do baculovírus em hospedeiro natural de forma individualizada (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a), contudo em uma produção massal de SfMNPV aumentam-se os gastos com mão de obra e requer um *layout* de produção maior.

Nesse contexto, esse trabalho busca aperfeiçoar a inoculação do baculovírus em hospedeiro natural em alta densidade de lagartas, evitando assim individualizar as lagartas após 48h e excluir o uso de dieta *in natura* no processo de inoculação do vírus como é proposto (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a).

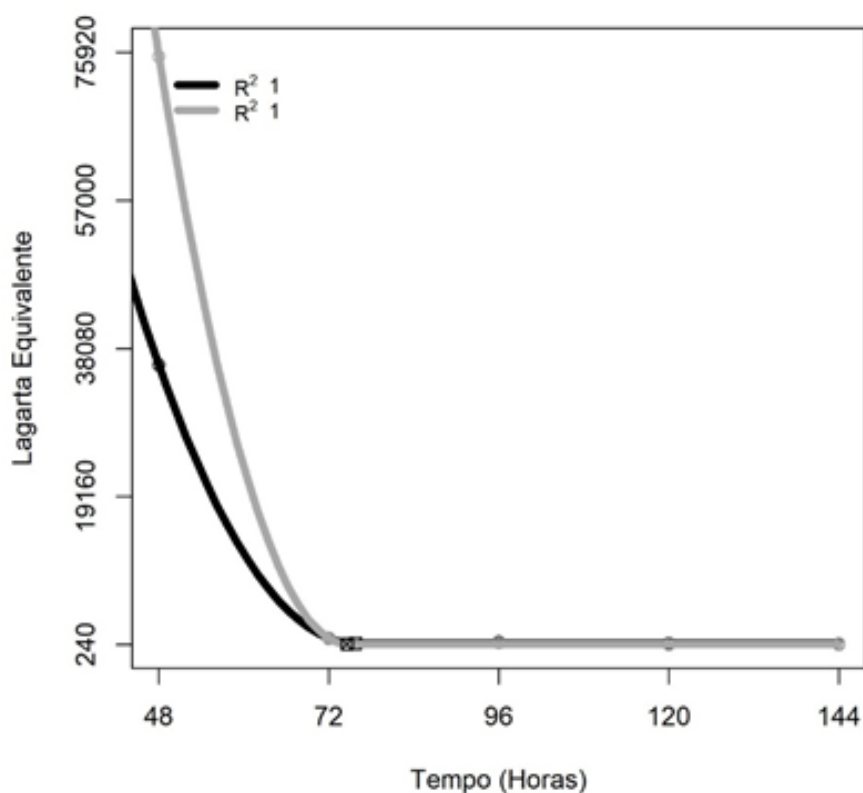
Pesquisas demonstram que lagartas inoculadas com vírus em folha de mamona apresentaram redução do canibalismo (VALICENTE *et al.*, 2013). Apesar disso, em uma produção massal, deve-se ressaltar que manter uma área cultivada para suprir a demanda por folhas *in natura* pode não ser interessante a partir do momento que a inoculação do SfMNPV em dieta artificial é alcançada sem a individualização.

Assim, para evitar os prejuízos decorrentes desse hábito comportamental em um sistema de produção *in vivo* de SfMNPV a partir do presente trabalho a melhor opção seria trabalhar com períodos de multiplicação menores, evitando assim a necessidade de individualização.

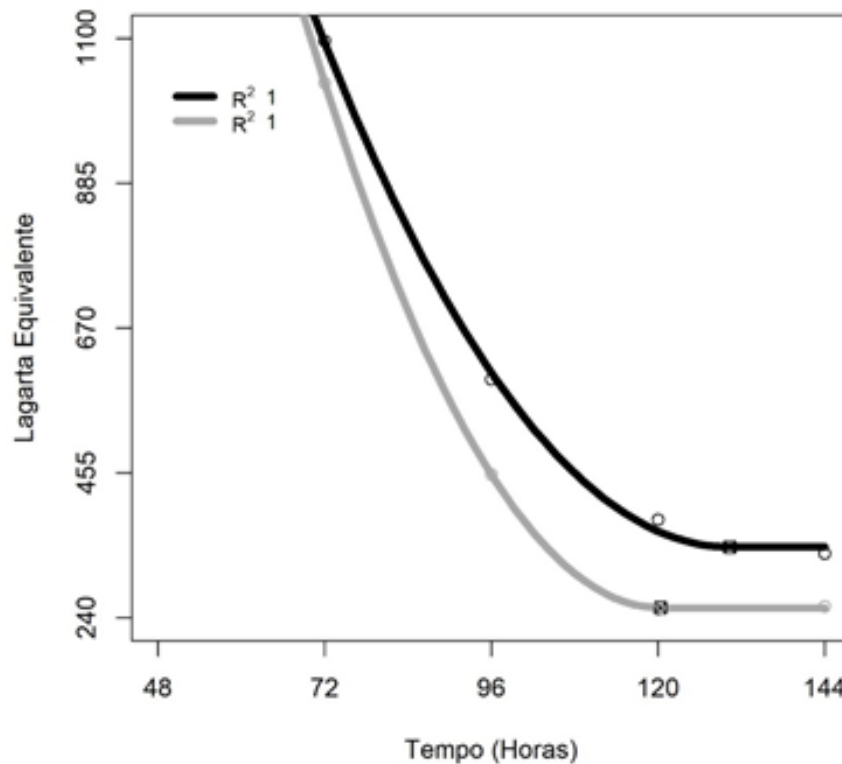
Para lagarta equivalente por hectare (LE.ha<sup>-1</sup>), que corresponde ao número de lagartas necessárias para obtenção de uma dose comercial de  $3,0 \times 10^{11}$  OB para pulverizar um hectare, a interação foi significativa (p-value =

0,001) (Tabela 1). Analisando-se o desdobramento dos fatores, o fator período de multiplicação dentro da densidade 50 lagartas/recipiente e o período de multiplicação dentro da densidade de 100 lagartas/recipiente (Tabela 2), ambos se ajustaram ao modelo quadrático segmentado com resposta platô (Figura 2a). Para mais detalhes, o intervalo entre 72 a 144 horas foi analisado em uma figura a parte (Figura 2b).

Observa-se, dessa forma, ao longo dos intervalos de avaliação para ambas as densidades, que há uma diminuição do número de lagartas necessárias para obter uma dose/ha ( $3 \times 10^{11}$  OB.ha<sup>-1</sup>), atingindo um ponto em que se estabiliza (Figuras 2a e 2b). Essa redução do número de lagarta equivalente por hectare (LE.ha<sup>-1</sup>) é importante, pois diminui o custo para a produção por dose (FEDERICI, 1999).



**Figura 2a.** Lagarta equivalente por hectare (LE/ha) ao longo do período de multiplicação viral (Temp.  $31 \pm 2$  °C, UR de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas). Linha clara: Densidade de 100 lagartas/recipiente; Linha escura: Densidade de 50 lagartas/recipiente.



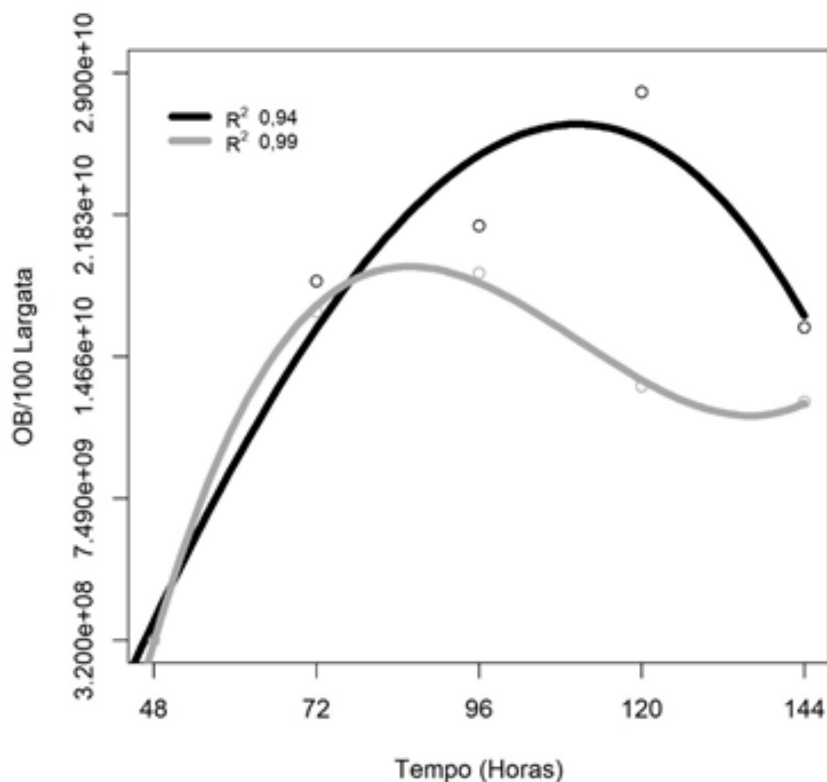
**Figura 2b.** Produção de lagarta equivalente por hectare (LE/ha) ao longo do período de multiplicação viral (Temp.  $31 \pm 2$  °C, UR de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas). Linha clara: Densidade de 100 lagartas/recipientes; Linha escura: Densidade de 50 lagartas/recipientes.

Analisando-se o fator densidade dentro de cada nível do fator período de multiplicação, pode-se perceber que a avaliação de 48 horas na densidade de 100 lagartas/recipientes eram necessárias em torno de 75 mil lagartas para produzir uma dose/hectare ( $3 \times 10^{11}$  OB), diferindo-se da densidade de 50 lagartas/recipientes que obteve uma média de aproximadamente 36 mil lagartas (Tabela 3 e Figura 2a). Essa elevada quantidade de lagartas para a formulação de uma dose, em ambas densidades, pode ser explicada pelo início da colonização e formação dos corpos de oclusão viral dentro do tecido das lagartas que se inicia a partir das 24 horas após a infecção (SLACK; ARIF, 2007).

Independentemente do período de multiplicação viral, as médias das densidades não diferiram entre si, reduzindo o número de lagartas necessárias para produzir uma dose/hectare ( $3 \times 10^{11}$  OB.ha<sup>-1</sup>), com uma média de 335 e 257 lagartas para as densidades de 50 e 100 lagartas/recipientes, respectivamente, no período de multiplicação de 144 horas (Tabela 3 e Figura 2b).

Outro fator que contribuiu para diminuir LE.ha<sup>-1</sup> é a idade das lagartas, à medida que a idade aumenta, há uma redução do número de lagartas necessárias para obter uma dose/ha, em torno de 408 LE.ha<sup>-1</sup> com lagartas de 5 dias de idade para, aproximadamente, 79 LE.ha<sup>-1</sup> quando inoculadas com 7 dias (VALICENTE *et al.*, 2013).

Em relação ao parâmetro OB/100 lagartas, a interação entre os fatores (densidade x período de multiplicação) foi significativa ( $p$ -value = 0,012) (Tabela 1). Ao analisar o desdobramento dessa interação, o fator período de multiplicação viral dentro da densidade 50 lagartas/recipientes e o período de multiplicação viral dentro da densidade de 100 lagartas/recipientes (Tabela 2), ambos se ajustaram ao modelo cúbico (Figura 3). A densidade de 50 lagartas/recipientes se apresentou crescente até a avaliação de 120 horas, e diminuiu após esse período. Comportamento semelhante da produção de OB/100 lagartas foi observado para a densidade 100 lagartas/recipientes, porém, essa redução foi observada desde a avaliação de 120 horas (Figura 3).



**Figura 3.** Produção de OB/100 lagartas de *Spodoptera frugiperda* inoculadas *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfM-NPV), ao longo do período de multiplicação (Temp.  $31 \pm 2$  °C, UR de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas). Linha clara: Densidade de 100 lagartas/recipiente; Linha escura: Densidade de 50 lagartas/recipiente.

566

Analisando-se o fator densidade dentro de cada nível do fator período de multiplicação viral, as médias de OB/100 lagartas das densidades de 50 e 100 lagartas/recipiente mantiveram-se semelhantes ao longo de cada período, exceto para a avaliação de 120 horas, com médias de  $2,80 \times 10^{10}$  e  $1,31 \times 10^{10}$  OB/100 lagartas, respectivamente (Tabela 3). Como esse parâmetro leva em consideração a porcentagem de mortalidade, ou seja, quantidade de lagartas mortas, considerando que fossem 100 lagartas inoculadas, essa diferença no período de multiplicação de 120 horas está relacionada com o maior número de lagartas coletadas na densidade de 50 lagartas/recipiente.

Esse parâmetro é importante, pois considera a porcentagem de mortalidade do lote realmente provocada pelo vírus, estimando-se a produção obtida a partir do mesmo (SUBRAMANIAN *et al.*, 2006). Em um processo de fabricação massal essa estimativa é importante para determinar o número de doses comerciais ( $3,0 \times 10^{11}$  OB) necessárias para pulverizar um hectare.

Dessa forma, fazendo uma estimativa do número máximo de ciclos de produção anual (Fórmula 1) e a produtividade anual (Fórmula 2), considerando o período de 96 horas que foi estatisticamente semelhante para a produção de OB/100 lagartas nos resultados obtidos, supondo que 1.000 lagartas são inoculadas por ciclo de produção e em ambas densidades, obteríamos aproximadamente 91 ciclos/ano. Assim a produtividade anual na densidade de 50 e 100 lagartas/recipiente seriam de  $1,93 \times 10^{13}$  e  $1,71 \times 10^{13}$  OB/ano, respectivamente.

Com base nesses resultados de produção de OB/ano, seria possível obter cerca de 64 e 57 doses/ha anualmente, para as densidades de 50 e 100 lagartas/recipiente, respectivamente, em 91 ciclos/ano com 1.000 lagartas inoculadas/ciclo. E ainda, como foram consideradas 1.000 lagartas inoculadas por ciclo de produção, seriam necessários 20 e 10 recipientes de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm), respectivamente, para as densidades 50 e 100 lagartas/recipiente, o que contribui para a otimização do espaço físico no *layout* de uma biofábrica. Contudo, é válido ressaltar que apesar



da densidade de 50 lagartas/recipiente obter um saldo de 7 doses anuais em relação a densidade de 100 lagartas/recipiente, pode-se perceber que são utilizados o dobro de recipientes e de dieta artificial.

Atualmente o procedimento padrão adotado pelas biofábricas é o método por inoculação do baculovírus em lagartas individualizadas, e, em muitos casos, até consegue-se obter um número de doses superior a encontrada neste trabalho a cada 1.000 lagartas inoculadas (VALICENTE; TUELHER; BARROS, 2010a; VALICENTE *et al.*, 2013). No entanto, quando se analisam a mão de obra, *layout* da biofábrica e tempo para realização da inoculação e individualização nota-se que o procedimento proposto no presente trabalho pode ser uma das alternativas para o início do aperfeiçoamento do método de inoculação do baculovírus em grandes quantidades de lagartas.

Estudos com um vírus de *Spodoptera exigua* também apontam sugestões para melhoria na produção massal e aumento na produtividade (ELVIRA; WILLIAMS; CABALLERO, 2010b; ZAMORA-AVILÉS *et al.*, 2017). Nesse mesmo intuito Ramírez-Arias *et al.* (2019), estudando períodos de incubação em baixas temperaturas antes da morte de lagartas de *S. frugiperda* provocada por *nucleopolyhedrovirus*, constataram que a temperatura de 15 °C proporcionou um aumento de 40% na produção total de OB comparado aos tratamentos de -20 °C e 5 °C.

No presente estudo o aperfeiçoamento do método, além do aumento de produtividade, tem o intuito de evitar o processo de individualização das lagartas de modo a minimizar o custo de mão de obra, bem como a necessidade da criação de um hospedeiro alternativo, visto que foi possível realizar a produção de Baculovírus sobre lagartas de *S. frugiperda* em alta densidade.

Além disso, evita-se a demanda por folhas *in natura* para a inoculação e multiplicação viral e não seria necessário o congelamento prévio do hospedeiro, pois o tegumento dos insetos infectados com 96 horas de multiplicação não rompe com facilidade, o que permite eficiência de rendimentos de OB durante o recolhimento das lagartas (VALICENTE *et al.*, 2013). E ainda, o atual resultado contribui para o avanço de pesquisas futuras que verifiquem, por exemplo, a quantidade de DNA genômico viral e a atividade inseticida desses OBs.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As densidades de 50 e 100 lagartas/recipiente mantidas até 96 horas após o fornecimento da dieta inoculada com o vírus são adequadas para aperfeiçoar a produção *in vivo* do isolado 6 de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *S. frugiperda* baseando-se no método de inoculação do baculovírus em grandes quantidades de lagartas.

É possível a produção de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) em lagartas de *S. frugiperda* sem a necessidade de individualização.

#### 5 AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa. À Embrapa Milho e Sorgo pela assistência prestada para execução da pesquisa, especialmente ao pesquisador Fernando Hercos Valicente.

## REFERÊNCIAS

- CHAPMAN, J. W.; WILLIAMS, T.; ESCRIBANO, A.; CABALLERO, P.; CAVE, R. D.; GOULSON, D. Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Behavioral Ecology**, v. 10, n. 3, p. 298-303, 1999.
- ELVIRA, S.; GORRÍA, N.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its affect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production. **Biological and Microbial Control**, v. 103, n. 1, p. 17-24, 2010a.
- ELVIRA, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 3, p. 577-582, 2010b.
- FEDERICI, B. A. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. In: HALL, F. R.; MENN, J. J. (ed.). **Methods in biotechnology: biopesticides, use and delivery**. Totowa: Humana Presse, 1999. p. 301-320.
- HASHIMOTO, Y.; HAYASHI, K.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; SHIMOJO, E. I.; KONDO, A.; MIYASONO, M.; SANO, Y.; MATSUMOTO, T.; GRANADOS, R. R. Physical map of a *Plutellaxylostella* granulovirus genome. **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, n. 1, p. 45-51, 2000.
- LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: back to the future. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.
- LACEY, L. A. (ed.). **Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice**. Academic Press, 2016. 444p.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Instrução Normativa Conjunta, n° 1, de 6 de fevereiro de 2015. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 2015. Disponível em: <http://www.in.gov.br/autenticidade.html>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- NALIM, D. M. **Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais**. 1991. 174f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: entomologia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.
- RAMÍREZ-ARIAS, F. G.; LASA, R.; MURILLO, R.; NAVARRO-DE-LA-FUENTE, L.; MERCADO, G.; WILLIAMS, T. Post-mortem incubation influences occlusion body production in nucleopolyhedrovirus-infected larvae of *Spodoptera frugiperda*. **Biological control**, v. 135, p. 33-40, 2019.
- RIOS-VELASCO, C.; GALLEGOS-MORALES, G.; BERLANGA-REYES, D.; CAMBERO-CAMPOS, J.; ROMO-CHACÓN, A. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. **Florida Entomologist**, v. 95, n. 3, p. 752-757, 2012.
- SILVA, C. S. B. DA; PARRA, J. R. P. New method rearing *Spodoptera frugiperda* in laboratory shows that larval cannibalism is not obligatory. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 57, n. 3, p. 347-349, 2013.
- SLACK, J. M.; ARIF, B. M. The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99-165, 2007.
- SUBRAMANIAN, S.; SANTHARAM, G.; SATHIAH, N.; KENNEDY, J. S.; RABINDRA, R. J. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v. 37, n. 3, p. 367-374, 2006.

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

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S.; BARROS, E. C. **Processo de produção comercial de baculovírus em grande escala**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2010a. 6p.

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

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

ZAMORA-AVILÉS, N.; MARTÍNEZ, A. M.; PINEDA, S.; BRAVO-PITINÓ, A.; FIGUEROA, I.; LASA, R. Cool-textured diets for use in baculovirus production. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 11, p. 1327-1338, 2017.