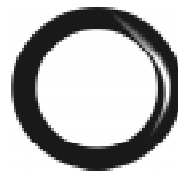




Baculovírus para o CONTROLE DE PRAGAS

Panacéia ou realidade?



O controle de pragas, principalmente em sistemas de produção agrícola, é realizado mediante aplicações freqüentes de inseticidas químicos, como método predominante para reduzir o risco de danos econômicos em lavouras. Embora o controle químico seja importante para este fim, o uso de produtos de alta toxicidade e de amplo espectro pode resultar em efeitos adversos ao homem e ao ambiente, amplamente discutidos na literatura brasileira e mundial.

Vários outros métodos de controle têm sido pesquisados, dentre eles o uso de produtos à base de vírus, principalmente os da família Baculoviridae. Esta família é atualmente dividida em dois gêneros: *Nucleopolyedrovirus* (vírus de poliédrose nuclear-VPN) e *Granulovirus* (vírus de granulose-VG). Sua principal característica é que as partículas virais são oclusas em corpos protéicos (poliédricos para os VPN e granulares para os VG). Além disso, os baculovírus são restritos aos invertebrados e específicos aos seus hospedeiros, constituindo-se, portanto, em agentes ideais para o controle de pragas, sem riscos aos vertebrados (incluindo o homem), a outros organismos não visados e ao meio ambiente.

Diversos programas de uso de baculovírus têm sido desenvolvidos em vários países, envolvendo pragas em várias culturas e florestas (Moscardi 1999). No entanto, o maior programa de uso de um vírus para o controle de insetos foi implantado no Brasil, a partir do início da década de 1980, tendo como alvo a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*, um inseto de importância nacional e que demanda cerca de 60% das aplicações de inseticidas realizadas na soja no país. Neste trabalho, esse programa será discutido, bem como os problemas relacionados ao uso de baculovírus no controle de pragas e estratégias atuais de pesquisa para controlá-los.

MODO DE AÇÃO DE BACULOVÍRUS

A fase larval do inseto, ao se alimentar de partes da planta hospedeira contaminadas com corpos protéicos de inclusão (CPI) de baculovírus, propiciam a penetração dos CPIs virais no sistema digestivo do inseto. No intestino médio (ventrículo), com pH altamente alcalino, os CPIs são dissolvidos, liberando os virions (nucleocapsídeo + envelope), cujas membranas se fundem às membranas das microvilosidades das células epiteliais do ventrículo. Em seguida, os nucleocapsídeos migram através do

Flávio Moscardi
Engenheiro Agrônomo, PhD
Embrapa Soja
moscardi@cnpsa.embrapa.br

Marlinda Lobo de Souza
Virologia Molecular, PhD
Embrapa Cenargen
marlinda@cenargen.embrapa.br

citoplasma da célula e, no caso de VPNs, penetram através dos poros nucleares, atingindo o núcleo, onde liberam o DNA viral, aí ocorrendo a transcrição dos genes do vírus e a replicação do seu genoma. Nessa fase primária de infecção são sintetizados no núcleo apenas nucleocapsídeos, geralmente não havendo a formação de CPIs para a maioria dos hospedeiros, à exceção, por exemplo, de VPNs associados a larvas de himenópteros desfolhadores, nos quais a infecção se restringe às células epiteliais do ventrículo com a formação de poliedros (CPIs). Os nucleocapsídeos formados no núcleo passam através da membrana nuclear e atravessam a membrana basal das células, adquirindo um novo envelope.

Nessa fase, são chamados de "budded virions" (BVs), os quais se distinguem dos virions derivados dos CPIs por suas características morfológicas e a presença de proteínas específicas aos BVs (ver revisão de Funk et al. 1997 e literatura aí citada). Os BVs, então, atingindo a hemolinfa e o sistema traqueal do inseto, espalham-se e provocam infecções secundárias em outros tecidos do hospedeiro. Nas células desses tecidos, ocorre a formação de BVs que se disseminam de célula para célula. Em estágios avançados da infecção, há a formação de CPIs, nos quais ocorre a oclusão dos virions. Gradativamente, os núcleos das células infectadas tornam-se repletos de CPIs, havendo a ruptura das membranas celulares e a liberação de grande quantidade de CPIs na hemolinfa do hospedeiro. No processo de infecção, o inseto é debilitado, perdendo sua capacidade motora e de alimentação, apresentando a característica de se deslocar para as partes superiores da planta hospedeira onde morre em 5 a 8 dias da infecção, apresentando o corpo descolorido (amarelo-esbranquiçado) em relação à lagarta sadia. Em pouco tempo (logo após a morte, para a maioria dos insetos e cerca de dois dias para a lagarta da soja), o corpo do inseto

se rompe, liberando grande quantidade de vírus sobre partes da planta. Dessa forma, larvas infectadas ou mortas servem de inóculo para a transmissão horizontal do vírus, por meio da chuva e do movimento de artrópodes nas plantas, bem como pela predação e parasitismo em insetos infectados (Fuxa, 1991; Cunningham, 1995; Moscardi, 1999; e referências citadas).

USO DE BACULOVÍRUS EM CAMPO

Existem quatro estratégias principais para o uso de baculovírus em campo, para o controle de pragas: 1) Introdução e Colonização, em que a introdução de um baculovírus é feita em uma região onde ele não ocorre naturalmente com o objetivo de seu estabelecimento no ambiente do hospedeiro e seu controle permanente (controle biológico clássico); 2) Introdução Inoculativa, em que o patógeno é aplicado e se multiplica e se dissemina eficientemente no ambiente controlando o inseto hospedeiro por mais de uma geração, mas podendo ser reaplicado se necessário; 3) Manipulação do Ambiente, em que a ocorrência natural de um vírus é aumentada por intervenção do homem, por meio de práticas culturais que beneficiam o aumento de baculovírus em populações do inseto hospedeiro; e 4) Inseticida Microbiano, em que um vírus é aplicado quantas vezes necessário, nos moldes de um inseticida químico, para manter a praga hospedeira abaixo de níveis de dano econômico para a cultura atacada. Esta é a estratégia mais utilizada para o controle de pragas em campo por baculovírus. As outras estratégias têm sido muito pouco exploradas, embora tenham resultado em alguns casos importantes de sucesso (Moscardi 1999). É importante enfatizar que o uso de baculovírus como inseticida microbiano difere fundamentalmente do uso de inseticidas químicos. Os baculovírus são seguros ao homem, a outros organis-

mos não visados e ao meio ambiente. Exigem um tempo de incubação no hospedeiro e, portanto, um maior tempo para matar uma praga, demandando tecnologia de aplicação específica e elaborada para evitar danos à cultura em questão. Pela capacidade de se multiplicarem e se disseminarem em populações do hospedeiro, a aplicação de inseticidas biológicos à base de baculovírus pode resultar em controle do inseto visado com um menor número de aplicações, em relação aos inseticidas químicos.

Alguns dos principais programas envolvendo a utilização de baculovírus são apresentados na Tabela 1. Os principais programas envolvem o uso do VPN da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* no Brasil, o VPN de *Helicoverpa* spp.(EUA, China, Austrália, Tailândia), VPNs de espécies de *Spodoptera* (China, EUA, Brasil, Guatemala, Tailândia, Europa), e o VG de *Cydia pomonella* (EUA, Europa, Rússia). No geral, o uso desses agentes é ainda muito restrito, à exceção do baculovírus da lagarta-da-soja no Brasil (Moscardi 1999), programa este que será discutido na seqüência.

CONTROLE DA LAGARTA DA SOJA, *Anticarsia gemmatalis*: UM CASO DE SUCESSO DE USO DE UM BACULOVÍRUS

Histórico

A lagarta da soja, *A. gemmatalis*, é o principal desfolhador de soja no Brasil, contra a qual é realizada a maioria das aplicações de inseticidas na cultura (média de, aproximadamente, duas aplicações/safra). Na década de 1970, antes da implementação de um programa de manejo integrado de pragas da soja (MIPSoja), o número médio de aplicações de inseticidas, especialmente contra esse inseto e percevejos, se situava entre 5 a 6 aplicações por safra. Além disso, os produtos utilizados se constituíam, na maioria, de organoclorados (como DDT, Endrin, etc.) e

organofosforados (monocrotofós, paration metílico, etc), de alta toxicidade ao homem, de baixa seletividade e de impacto negativo ao meio ambiente (solo e águas). Com o advento do MIPSoja, em meados da década de 1970, essa situação começou a ser revertida, com progressiva e rápida redução no número médio de aplicações de inseticidas contra as principais pragas da cultura e do perfil dos produtos químicos utilizados (ver Moscardi 1993, Gazzoni 1994 e referências citadas).

A partir de 1979, por um esforço de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, na Embrapa Soja, em Londrina, PR, foi desenvolvido um programa para o uso de um Baculovírus, isolado de lagartas mortas de *A gemmatalis* na região de Londrina, PR, caracterizado como um vírus de poliedrose nuclear (VPNAg), para o controle da lagarta da soja (Moscardi 1986). Durante duas safras consecutivas (1980/81 e 1981/82) o VPNAg foi

testado em várias propriedades agrícolas do Paraná e Rio Grande do Sul, mostrando-se eficiente para reduzir populações da praga e manter o potencial produtivo das lavouras de soja, quando comparado a áreas pareadas com controle químico ou sem aplicação de medidas de controle (testemunha) (Moscardi 1986). Em seguida (safra 1982/83), o programa foi difundido a agricultores pelos órgãos de assistência técnica oficiais (Ematers) e privados (cooperativas, empresas de planejamento, etc). Houve progressivo aumento do uso do Baculovirus nas safras subseqüentes, que atingiu um patamar de cerca de um milhão de hectares tratados na safra 1989/90. Na safra 1997/98 o uso desse inseticida microbiano atingiu cerca de 1.250.000 ha (aproximadamente 10 % da área de soja cultivada com soja no país) (Moscardi 1999). Atualmente, esse produto biológico é utilizado em, aproximadamente, 1.400.000 ha de soja no país, sendo 40% desse uso con-

centrado no Estado do Paraná. No entanto, a utilização desse inseticida biológico têm aumentado rapidamente na região central do país.

A partir do início da década de 1990, empresas privadas realizaram contratos com a Embrapa para a produção e comercialização desse inseticida biológico, com “royalties” das vendas sendo revertidos para a pesquisa da Embrapa Soja. As empresas envolvidas (Coodec, Nitrál, Nova Era e Tecnivita, PR, e Geratec, RS) foram instrumentais para a difusão de produtos de alta qualidade entre sojicultores das várias regiões do país. Além disso, a Embrapa Soja, em Londrina, PR, através de sua Associação de Empregados, e a Embrapa-Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste, em Dourados, MS, também foram importantes para o atendimento desse objetivo. Presentemente, a utilização do VPNAg tende a aumentar drasticamente na região Centro Oeste. Apenas a Coodetec comercializou o produto para uso em

Tabela 1. Alguns Baculovirus utilizados como inseticidas microbianos¹

Espécie de Inseto	Baculovirus	Cultura	País/Região
<i>Adoxophyes orana</i>	VG	maçã	Suíça
<i>Anagrapha falcifera</i>	VPN	algodão, hortaliças	EUA
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	VPN	soja	Brasil, Paraguai
<i>Autographa californica</i>	VPN	algodão, hortaliças	EUA, China
<i>Cydia pommonella</i>	GV	maçã, pêra	EUA, Rússia, Europa
<i>Dendrolimus sibericus</i>	VPN	pinheiros	Rússia
<i>Erinnyis ello</i>	GV	mandioca	Brasil
<i>Helicoverpa</i> spp.	VPN	algodão, hortaliças Leguminosas	China, Índia, Austrália Rússia, Tailândia, EUA
<i>Homona magnânima</i>	VG	chá	Japão
<i>Hypantia cunea</i>	VG e VPN	frutíferas e parques	Bulgária, Rússia
<i>Leucoma salicis</i>	VPN	parques ornamentais	Rússia, Polônia
<i>Lymantria dispar</i>	VPN	florestas	EUA, Canadá, Rússia
<i>Mamestra brassicae</i>	VPN	couve, ervilha, beterraba	Europa, Rússia
<i>Neodiprion lecontei</i>	VPN	florestas	Canadá
<i>Neodiprion sertifer</i>	VPN	pinheiro	EUA, Europa, Rússia
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	VPN	florestas	EUA, Canadá
<i>Pieris rapae</i>	VG	hortaliças	China
<i>Spodoptera litura</i>	VPN	algodão, hortaliças	China
<i>Spodoptera littoralis</i>	VPN	algodão	África, França
<i>Spodoptera exigua</i>	VPN	hortaliças, ornamentais	EUA, Europa, Tailândia
<i>Spodoptera frugiperda</i>	VPN	milho	Brasil

¹ Fontes: Moscardi (1999), Chen (2001)

350.000 ha na safra 2001/2002, no estado de Mato Grosso (B. Santos, comunicação pessoal). Estima-se que a área total tratada com esse inseticida biológico deva atingir mais de 1.600.000 ha na safra 2001/2002, considerando o que já foi comercializado e o disponível, segundo informações das empresas produtoras. Nessa área, estima-se que cerca de 1,5 milhão de litros de inseticidas químicos deixarão de ser utilizados, considerando-se uma média de duas aplicações contra a lagarta-da-soja, significando consideráveis benefícios ambientais. Além do custo do produto biológico ser mais baixo que o dos inseticidas químicos, o baculovírus é empregado apenas uma vez durante a safra contra uma média de duas aplicações em áreas controladas com inseticidas químicos, resultando em um benefício econômico da ordem de cerca de R\$ 10,00/ha.

Razões do Sucesso do Programa

Vários fatores contribuíram para o sucesso do programa de uso do baculovírus da lagarta-da-soja no Brasil, tais como:

-Alta virulência contra o hospedeiro (*A. gemmatalis*) e transmissão eficiente do vírus nas populações do hospedeiro por fatores bióticos e abióticos

-Possibilidade de produção do vírus em campo, com o custo do produto final competitivo com o dos inseticidas químicos disponíveis para o controle desse inseto

-Larvas de *A. gemmatalis*, por serem desfolhadoras, são continuamente expostas ao Baculovirus aplicado sobre as plantas de soja

-Geralmente, na maioria das regiões produtoras de soja, não há outras pragas simultaneamente a *A. gemmatalis* que demandem controle

-A soja tolera desfolha substancial (>30%) sem que ocorra redução significativa do rendimento de

grãos da cultura

-Implementação de um programa de manejo integrado de pragas da soja, na década de 1970, favorecendo a aceitação do Baculovirus pelos sojicultores

-Ação proativa e formal da assistência técnica oficial em alguns estados, como Paraná e Rio Grande do Sul

Os fatores que favoreceram a implementação e o uso do Baculovirus da lagarta-da-soja no Brasil, dificilmente são encontrados na grande maioria dos outros sistemas vírus-hospedeiro-planta, dificultando o uso de Baculovirus. Às vezes, dispõe-se de um vírus altamente virulento a uma determinada espécie de inseto, mas seu hábito críptico (brocas, minadores, insetos subterrâneos, etc.) dificulta a ingestão de uma dose letal do patógeno. Em outros casos (ex. algodoeiro), a ocorrência simultânea de várias pragas importantes limita o uso de um produto tão seletivo como um Baculovirus. Em outros sistemas, o inseto alvo afeta diretamente o fruto (maçã, pera, tomate, etc.), tornando a tecnologia de aplicação de vírus sofisticada e intensa durante a safra, para evitar dano "cosmético" aos frutos e sua rejeição pelo mercado ou depreciação. A expansão do uso de Baculovirus como inseticidas biológicos vem sendo limitada por esses e outros fatores (ver Moscardi 1999), conforme resumido a seguir:

PROBLEMAS QUE TÊM LIMITADO A EXPANSÃO DO USO DE BACULOVÍRUS COMO INSETICIDA BIOLÓGICO

Vários programas, em diferentes países, têm sido desenvolvidos e implementados com recursos governamentais, dado o relativo desinteresse do setor privado em produzir e comercializar produtos a base de Baculovirus. Algumas características dos Baculovirus têm contribuído para esse baixo inte-

resse da indústria (principalmente as de grande porte) em produzi-los e comercializá-los.

Uma delas é a alta especificidade dos baculovirus. Esta característica, embora seja desejável em programas de manejo integrado de pragas, torna o mercado de produtos a base desses agentes extremamente restrito (geralmente uma espécie de praga em uma cultura), e de baixo retorno econômico potencial quando comparado com inseticidas químicos, o que deve ter influenciado na decisão de algumas empresas privadas em descontinuar o desenvolvimento e a comercialização de alguns inseticidas virais (Fuxa 1991, Cunningham, 1995). Alguns poucos baculovirus, como os de *Autographa californica*, *Anagrapha falcifera* e *Mamestra brassicae* possuem espectro mais amplo de hospedeiros, dentro de Lepidoptera, o que tem atraído o interesse da indústria (Cunningham 1995).

Outro fator limitante tem sido, até hoje, a impossibilidade (técnica e econômica) de se produzir Baculovirus em escala comercial *in vitro*, utilizando-se células de insetos multiplicadas em bioreatores (fermentadores) de grande porte. Atualmente, todos os baculovirus produzidos em escala comercial são multiplicados *in vivo*, principalmente em insetos criados em laboratório e alimentados com dieta artificial, que, geralmente, resulta em produto final com custo elevado, muitas vezes não competitivo com o custo dos produtos químicos disponíveis. Para alguns outros vírus, como o VPN da lagarta da soja, é possível produzi-los em campo. Outro aspecto importante é a alta sensibilidade dos poliedros virais à radiação solar, especialmente ao seu espectro ultra violeta, que desativa o vírus aplicado em dois a cinco dias, o que pode ser resolvido mediante a adição de protetores solares às formulações de baculovirus, mas que podem onerar ainda

Tabela 2. Alguns baculovirus recombinantes (GM) desenvolvidos para o controle de pragas e que resultaram em redução do tempo para matar o hospedeiro (TMH)¹

Designação do Vírus GM ²	Proteína Heteróloga	Hospedeiro ³	Redução do TMH
Deleção de gene			
VEGTDEL	deleção do gene <i>egt</i>	Sf	22%
VEGTDEL	deleção do gene <i>egt</i>	Tn	0,5-1,0 dia
VEGTDEL(LdMNPV)	deleção do gene <i>egt</i>	Ld	33%
Inserção de gene (hormônio de inseto)			
BmDH5 (BmNPV)	hormônio diurético	Bm	1,0 dia
Ac-JHE-KK	Hv JHE	Tn	4-9%
Inserção de gene (toxina)			
BmAaIT(BmNPV)	toxina AaIT de <i>A. australis</i>	Bm	≈40%
AcST3	toxina AaIT de <i>A. australis</i>	Tn	24%
AcUW2(B)AaIT	toxina AaIT de <i>A. australis</i>	Hv	36%
AcMNPVAaIT	toxina AaIT de <i>A. australis</i>	Tn	20-30%
p10-AaIT	toxina AaIT de <i>A. australis</i> e promotores alternados	Hv	p10:22% le 1:10%
vSP-tox-34	neurotoxina 34 de <i>P. tritici</i>	Tn	39%
vSP-tox21A	neurotoxina 34 de <i>P. tritici</i>	Tn	49%
vSP-tox34	neurotoxina 34 de <i>P. tritici</i> ,	Tn	ss:26-47%
vp6.9tox34	várias sequências simples (ss),	Tn	pr:28-58%
vDA26tox34	vários promotores (pr)	Sf	ss:47-53%
vHSPtox34		Sf	pr:39-59%
vSP-tox34#4	neurotoxina 34#4 de <i>P. tritici</i>	Hv	27-33%
		Tn	56%
vSat2p	neurotoxina AsII de <i>Anemonia sulcata</i>	Tn	37%
		Sf	36%
vMAg4	neurotoxina Aga-IV de <i>Angeles nopsis aperta</i>	Tn	17%
		Sf	43%
vSsh1p+	neurotoxina Sh I de <i>Stichodactyla belianthus</i>	Tn	37%
		Sf	40%
vAcTaITX1	toxina da aranha <i>Tegenaria agrestis</i>	Tn	20%
		Se	18%
AcNPVLIT	alfa-latroinsetotocina da aranha viúva negra	Hv	4%
		Tn	12%
AcLqhIT2	toxina LqhIT2 de <i>Leiurus quinquestriatus hebreus</i>	Tn	50-56%
		Se	37-47%
AcLIT.p10	toxina LqhIT1 e LqhIT2 de <i>L. q. hebreus</i>	Ha	24;32%
Inserção de gene (outros genes)			
BV13T, BV13.3940	gene mitocondrial URF13 de milho	Tn	≈40%
AcMNP.chi	gene MC “chintase”	Sf	22-23%
vhcf-1z	AcMNPV fator celular 1 do hospedeiro	Tn	20-29%
AcMNPV-MycAs	“human c-myc antisense”	Sf	28%
AcBX-PBBAN-4	Hv PBAN	Tn	19-26%
Deleção e inserção de genes			
HzEGTp6.9tox34	neurotoxina de <i>P. tritici</i> , deleção	Hz	35-42%
HzEGThsptox34	do gene <i>egt</i> , vários promotores		34-47%
HzEGTDA26tox34 (HzSNPV)			

¹ Baseado em Bonning & Hammock (1996), Moscardi (1999) e Chen (2001) (e literaturas citadas nestes trabalhos).

² Quando o vírus parental utilizado não é AcMNPV (MNPV de *Autographa californica*), o vírus parental é indicado entre parêntesis.

³ Bm=*Bombyx mori*; Ha=*Helicoverpa armigera*; Hz=*Helicoverpa zea*; Hv=*Heliothis virescens*; Se=*Spodoptera exigua*; Sf=*Spodoptera frugiperda*; Tn=*Trichoplusia ni*

mais o custo do produto final.

Um dos fatores mais importantes que limita o interesse da indústria e a aceitação pelos agricultores por inseticidas à base de baculovírus é a ação relativamente lenta desses agentes em matar o inseto alvo e em reduzir sua capacidade de causar danos. Mesmo em culturas com alta tolerância ao dano por insetos, como a soja, os agricultores são, inicialmente, muito relutantes em usar um inseticida viral, devido a essa característica. Algumas estratégias têm sido pesquisadas para contornar essas “deficiências” dos produtos à base de baculovírus, as quais são discutidas na seqüência.

ESTRATÉGIAS PARA CONTORNAR AS LIMITAÇÕES DE INSETICIDAS À BASE DE BACULOVÍRUS

Algumas estratégias têm sido desenvolvidas, principalmente para: 1) Permitir o uso de inseticidas virais em condições onde a população da praga, em termos de intensidade e tamanho das larvas, não recomendam o uso do vírus isoladamente e 2) Aumentar a virulência do vírus utilizado, reduzindo o tempo para causar mortalidade do inseto alvo e a sua capacidade de alimentação. No primeiro caso, tem sido possível a associação do VPNAg com doses reduzidas de inseticidas (1/4 a 1/5 da recomendada) para reduzir populações da lagarta-da-soja já muito elevadas para o controle apenas com o vírus (Moscardi & Sosa-Gómez, 1992; Silva, 1995). No segundo caso, as principais estratégias incluem:

1. *Substâncias que Potencializam a Atividade Viral.* O ácido bórico, a quitinase, enzimas associadas a al-

guns baculovírus (ex. fator sinérgico – “enhancin”, que é uma metaloprotease) e derivados do ácido stilbene dissulfônico (branqueadores ópticos) (Shapiro, 1995), têm sido utilizadas em formulações de baculovírus. Os resultados mais promissores têm sido obtidos com branqueadores ópticos, que são produtos utilizados em sabões em pó, detergentes, amaciantes de roupa, tintas, etc. Esses produtos rapidamente absorvem a luz UV, que é convertida em ondas longas e emitida a 440 nanômetros na porção azul do espectro visível (Villaume, 1958), conferindo, portanto, proteção a bioinseticidas à base de baculovírus contra a desativação pela radiação solar. O primeiro relato sugerindo o efeito de branqueadores ópticos como agentes de proteção contra a luz ultravioleta para um vírus de inseto foi feito por Martignoni & Iwai (1985), com o branqueador Tinopal DCS na concentração de 5,0 %, associado ao vírus de *Orgyia pseudotsugata*. Shapiro 1992, avaliando o efeito de proteção de baculovírus por branqueadores ópticos contra raios UV, verificaram que alguns desses produtos também provocavam um aumento substancial da virulência do VPN de *Lymantria dispar*. Em estudos subseqüentes, vários autores também observaram um aumento substancial da atividade viral para vários sistemas baculovírus-hospedeiro, bem como uma redução no tempo médio de mortalidade do inseto visado (ver Morales et al., 2001, e referências citadas).

Estudos associando vários branqueadores disponíveis no mercado brasileiro com o VPN da lagarta da soja, *A. gemmatalis*, indicaram que quatro desses branqueadores (Tinopal UNPA-GX), Tinopal DMS, BRY-10 D2 100 e Leukophor DUB,

na concentração de 0,5%) aumentaram a atividade desse inseticida biológico variando de cerca de 32 vezes (Leukophor DUB) a 145 vezes (Tinopal UNPA-GX, em lagartas de segundo instar, e de 5 vezes a 356 vezes, respectivamente em lagartas de quarto instar, além de reduzirem significativamente o tempo médio de mortalidade do inseto e proporcionarem proteção considerável ao vírus contra sua desativação pelo espectro UV da radiação solar (Morales 2000, Morales et al., 2001). O aumento mais expressivo da associação do VPNAg com branqueadores ópticos deu-se, no entanto, contra populações de lagartas de *A. gemmatalis* selecionadas em laboratório para uma alta resistência ao VPNAg, com um aumento da atividade viral variando de 10.000 vezes (Leukophor DUB) a 61.600 vezes (Tinopal UNPA-GX) (Morales et al. 2001). Portanto, branqueadores ópticos do grupo do ácido stilbene dissulfônico possuem grande potencial para serem utilizadas em formulações à base de baculovírus, visando o aumento da atividade viral, redução do tempo de mortalidade do hospedeiro, proteção contra raios UV e, ainda, para o manejo de eventual desenvolvimento de resistência por populações de hospedeiros a baculovírus em condições de campo. De acordo com a literatura, o aumento da atividade viral por branqueadores ópticos pode ocorrer por meio de uma ação disruptiva dessas substâncias sobre a membrana peritrófica do inseto (Wang & Granados, 2000), permitindo uma passagem inicial de grande número de nucleocapsídeos virais para multiplicação em células epiteliais do intestino médio e/ou diretamente através destas atingindo rapidamente a hemolinfa do hospedeiro ou, ain-

da, por interferirem no mecanismo de descarte/substituição pelo hospedeiro de células infectadas do intestino médio (Washburn et al. 1998).

2. Modificação Genética de Baculovírus.

Através da engenharia genética de baculovírus, as propriedades inseticidas desses agentes podem ser aperfeiçoadas, incluindo a redução do tempo para matar o hospedeiro, aumento da virulência, diminuição da capacidade alimentar do inseto-praga e, ainda, expansão do espectro de hospedeiros de um dado vírus (Bonning & Hammock, 1996). Para isso, diferentes estratégias têm sido utilizadas, objetivando, principalmente, aumentar a velocidade de ação para matar o hospedeiro e reduzir a capacidade deste em causar dano.

Essas estratégias envolvem a eliminação ou incorporação de um ou mais genes no genoma viral que interferem com a fisiologia do inseto ou expressam toxinas de outros organismos, além da combinação dessas duas estratégias (Tabela 2). No primeiro caso, a eliminação do gene *egt* (ecdisteróide UDP-glicosiltransferase) do genoma de alguns baculovírus (VEGTDEL) resultou, em todas as tentativas, uma redução substancial do tempo para matar o inseto hospedeiro (cerca de 30%). Em baculovírus, esse gene (*egt*) é responsável pela inativação do hormônio ecdisteróide, bloqueando, portanto, a capacidade da lagarta infectada passar para o estágio seguinte, o que resulta em maior produção da progênie viral. A eliminação do gene *egt* do genoma viral faz com que o inseto infectado tente mudar prematuramente para o estágio seguinte, morrendo no processo. No segundo caso, a incorporação de genes que regulam aspectos importantes relacionados com a fisiologia de insetos, como os hormônios diurético, pro-toracicotrópico e os envolvidos na eclosão, bem como a esterase do

hormônio juvenil (JHE), geralmente, não resultaram em redução significativa do tempo para o vírus matar o inseto e da capacidade alimentar dos insetos infectados. De, aproximadamente, 13 tentativas realizadas nesse sentido, apenas duas resultaram em efeito significativo sobre o tempo de mortalidade do inseto (Chen 2001). No entanto, a incorporação de genes que expressam toxinas específicas a insetos no genoma de baculovírus tem se mostrado de grande importância para o aumento da virulência contra vários insetos hospedeiros (Tabela 2). Nesse sentido, de 32 tentativas efetuadas, 28 resultaram em redução do tempo para baculovírus matar o hospedeiro testado (Chen 2001). Os principais resultados obtidos, com a inserção de toxinas específicas a insetos no genoma de baculovírus, têm sido obtidos com a toxina AaIT do escorpião africano, *Androctonus australis*, e a neurotoxina TxP1 do ácaro *Pyemotes tritici*. Com a redução do tempo para matar o hospedeiro, geralmente há uma produção menor de poliedros virais em insetos submetidos a baculovírus geneticamente modificados, de 20% a 60% em relação aos respectivos vírus selvagens (não modificados geneticamente) (ver Moscardi 1999 e referências citadas). Portanto, uma das principais características de baculovírus selvagens, que é sua habilidade de se reciclar no ambiente da praga visada, seria prejudicada pelo uso de baculovírus recombinantes.

O FUTURO

Embora vários baculovírus tenham sido desenvolvidos como inseticidas biológicos para uso em diferentes culturas e países, sua aplicação prática tem sido restrita a alguns casos de sucesso, com o VPN da lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*, no Brasil, se constituindo no maior programa de uso de um Baculovírus. Esse programa serve para evidenciar que o emprego desses

agentes é viável, especialmente em sistemas vírus-inseto-plantas que favorecem o uso de agentes tão específicos como os Baculovírus. As principais limitações de baculovírus como inseticidas biológicos, como o tempo relativamente longo para matar o inseto visado, continuidade da alimentação da praga por alguns dias e rápida desativação pelo espectro UV da radiação solar, podem ser solucionadas pela sua aplicação contra estádios iniciais da praga, adotando-se níveis de ação apropriados às características desses agentes, e a incorporação de substâncias protetoras contra raios UV. O uso de agentes potencializadores da atividade viral, como os branqueadores ópticos em formulações de baculovírus parece ser, também, uma alternativa viável, mas que precisa ser melhor avaliada em condições de campo. O uso da engenharia genética tem mostrado potencial para, principalmente, diminuir o tempo para matar o inseto e a sua capacidade alimentar. No entanto, essa técnica, além de ter suscitado polêmica em vários segmentos da sociedade, quanto à sua segurança ambiental e para a saúde humana, necessita de uma avaliação mais profunda quanto aos seus reais benefícios em programas de manejo integrado de pragas e possíveis impactos em organismos não visados (Cory, 2000). Até hoje, poucos têm sido os testes em campo desses agentes engenheirados e a avaliação dos seus benefícios e dos riscos potenciais ao ambiente e à saúde humana. Acredita-se que, nos próximos cinco anos, haja um aumento significativo da área tratada com inseticidas virais não modificados geneticamente, em sistemas de cultivo favoráveis ao uso desses agentes, como a soja. Com a recente expansão substancial do uso do baculovírus da lagarta-da-soja no Brasil Central (MS, MT, GO), a área tratada com esse agente deverá atingir 1,6 milhões de hectares na safra 2001/2002, com

uma demanda potencial para cerca de 4 milhões de hectares nos próximos cinco anos. Essa demanda dificilmente será atendida com as técnicas atuais de produção (em campo). Há, portanto, a necessidade de aprimorar técnicas de produção *in vivo* de baculovírus em laboratório, que resultem em um produto final de custo competitivo com o custo dos inseticidas químicos disponíveis no mercado. A produção *in vitro* de baculovírus, utilizando células de insetos em bioreatores, apesar das tentativas até hoje, não tem sido viável para a produção desses agentes comercialmente, principalmente devido à perda de virulência durante 4-5 passagens sequenciais durante o processo de escalonamento da produção (“scaling up”) do patógeno. A solução dos problemas hoje existentes, quanto à produção comercial *in vitro* de baculovírus, certamente abriria novas perspectivas para a expansão global do uso desses agentes como inseticidas biológicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonning, B.C. & Hammock, B.D. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annual Review of Entomology* 41:191-210.
- Chen, X. 2001. Genomics and genetic engineering of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. Wageningen, Holanda, 2001. 154p. Tese (Doutorado), Universidade de Wageningen, Holanda.
- Cory, J.S. 2000. Assessing the risks of releasing genetically modified virus insecticides: progress to date. *Crop Protection* 19:779-785.
- Cunningham, J.C. 1995. Baculoviruses as microbial insecticides, pp. 261-292. In: R. Reuveni (ed.), *Novel Approaches to Integrated Pest Management*. Boca Raton, Flórida: Lewis.
- Funk, C.J.; Braunagel, S.C. & Rohrmann, G.F. 1997. Baculovirus structure, pp. 7-32. In: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses*. New York: Plenum Press.
- Fuxa, J.R. 1991. Insect control with baculoviruses. *Biotech. Adv.* 9:425-442.
- Gazzoni, D.L. 1994. Manejo de Pragas da Soja: Uma Abordagem Histórica. Londrina: Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Documentos 8, 58p.
- Martignoni, M.E. & Iwai, P.J. 1985. Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of Douglas fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 78:982-987.
- Morales, L. 2000. Avaliação dos efeitos biológicos da associação de branqueadores óticos ao vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). Tese de Doutorado, UFPR.
- Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa-Gómez, D.R.; Paro, F.E. & Soldorio, I.L. 2001. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect. *Biological Control* 20:247-253.
- Moscardi, F. 1986. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja, pp. 188-202. In: S.B. Alves (ed.), *Controle Microbiano de Insetos*, primeira ed. São Paulo: Ed. Manole.
- Moscardi, F. 1989. Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 84:51-56.
- Moscardi, F. 1993. Soybean integrated pest management in Brazil. *Plant Protection Bull.* 41:91-100.
- Moscardi, F. 1998. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo, pp. 509-539. In: S.B. Alves (ed.), *Controle Microbiano de Insetos*, segunda ed.. Piracicaba: Fealq.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44:257-89.
- Moscardi, F. & Sosa-Gómez, D.R. 1992. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil, p. 98-109. In: L.G. Copping, M.B. Green & R.T. Rees (eds.), *Pest Management in Soybean*. Londres: Elsevier Applied Science.
- Shapiro, M. 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 85:1682-1686.
- Shapiro, M. 1995. Radiation protection and activity enhancement of viruses, p.153-164. In: F.R. Hall & J.W. Barry (eds.), *Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery*. Washington, Am. Chem. Soc. (ACS Symposium Series 595).
- Silva, M.T.B da. 1995. Associação de *Baculovirus anticarsia* com subdosagens de inseticidas no controle de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818). *Ciência Rural* 25:353-358.
- Villaume, F.G. 1958. Optical bleaches in soaps and detergents. *J. Am. Oil Chem. Oc.* 35:558-566.
- Wang, P. & Granados, R.R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30:135-143.
- Washburn, J.O.; Kirkpatrick, B.A.; Haas-Stapleton, E. & Volkman, L.E. 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. *Biological Control* 11:58-69. †