

COMPARAÇÃO ENTRE DUAS METODOLOGIAS DE BIOENSAIOS PARA VÍRUS ENTOMOPATOGÊNICOS

Lauro Morales¹ e Flávio Moscardi²

ABSTRACT

Comparison of Two Bioassay Methods for Entomopathogenic Viruses

The nuclear polyhedrosis viruses (NPV) of *Chrysodeixis includens* (Walker) and *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) were bioassayed on the respective hosts by using the procedure of superficially contaminating diet discs and that of incorporating the virus to the insect diet. Results showed that the latter method was more adequate to *C. includens*, being also adequate to *A. gemmatalis*. The coefficients of variation in the bioassays with *C. includens* were, respectively, 27.8% and 7.9%, for the disc contamination and the diet incorporation methods. Differences were not observed between methods for *A. gemmatalis*. The diet incorporation procedure also presented the advantages of being less time consuming during bioassay implementation and demanding less larval manipulation.

KEY WORDS: Insecta, nuclear polyhedrosis virus, *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens*.

RESUMO

O trabalho foi feito com o objetivo de avaliar, comparativamente, duas metodologias utilizadas em bioensaios com vírus entomopatogênicos. A primeira, utilizando-se discos de dieta artificial contaminados superficialmente e, uma segunda metodologia, onde a suspensão viral foi incorporada à dieta. Os resultados demonstraram que a metodologia de incorporação da suspensão viral à dieta foi mais adequada para a espécie-teste *Chrysodeixis includens* (Walker), sendo, também, igualmente adequada para *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae). Os coeficientes de variação (CV) nos bioensaios com *C. includens* foram, respectivamente, 27,8% e 7,9% para a dieta contaminada superficialmente e para a suspensão viral incorporada à dieta. Esta diferença, entretanto, não foi observada quando

Recebido em 31/08/92.

¹EMATER-PR, Rod. Celso Garcia Cid, Km 375, Caixa postal 2312, 86001, Londrina, Pr.

²EMBRAPA-CNPSo, Rod. Carlos João Strass, Acesso Orlando Amaral, Caixa postal 1061, 86001, Londrina, Pr.

a espécie utilizada foi *A. gemmatalis*. O método de incorporação do vírus à dieta, além da adequabilidade para ambas as espécies, permitiu a realização dos bioensaios com menor manipulação dos insetos e com um gasto de tempo de apenas um terço, quando comparado com o de contaminação superficial de discos de dieta.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, vírus de poliedrose nuclear, *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens*.

INTRODUÇÃO

Os bioensaios são procedimentos rotineiros utilizados para avaliar a atividade biológica de um patógeno de inseto em diferentes espécies de hospedeiros, determinar a patogenicidade relativa de diferentes isolados a uma ou mais espécies, avaliar formulações e caracterizar e pesquisar isolados de patógenos (Vail 1975). Em bioensaios, além de vários aspectos relacionados ao patógeno e ao inseto-teste, deve, ainda, ser considerada a forma de administração do agente patogênico ao hospedeiro, que pode se constituir em um fator de custo, morosidade e estresse para o hospedeiro.

Várias metodologias para condução de bioensaios com vírus entomopatogênicos têm sido relatadas; entretanto, a contaminação da superfície da dieta, conforme descrita por Ignoffo (1965), é a forma mais frequentemente encontrada na literatura (Hughes & Wood 1986). Dentre os vários procedimentos utilizados, também são encontrados bioensaios em que a suspensão viral é incorporada à dieta (Vail *et al.* 1984 e Tompkins *et al.* 1988). Embora o método de contaminação de pequenos discos de dieta tenha sido, até então, utilizado pelo Centro Nacional de Pesquisa da Soja, EMBRAPA, para avaliações com o vírus de poliedrose nuclear (VPN) de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Moscardi 1983), este não se mostrou adequado para bioensaios com a espécie *Chrysodeixis includens* (Walker) e seu VPN, devido, principalmente, à morosidade na execução e ao estresse provocado neste inseto, pela constante manipulação das larvas.

Este trabalho teve como objetivo comparar, para as espécies *C. includens* e *A. gemmatalis*, duas metodologias de bioensaios: (1) a suspensão viral pipetada sobre discos de dieta e (2) o patógeno incorporado à dieta.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia de Insetos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo), EMBRAPA, Londrina, Pr. As espécies de insetos utilizadas foram *A. gemmatalis* e *C. includens*, ambas de colônias estabelecidas no CNPSo. Os patógenos utilizados foram isolados dos vírus de poliedrose nuclear (VPN) de *A. gemmatalis* e de *C. includens*, cada um testado no respectivo hospedeiro original. Para a condução dos bioensaios, foram utilizados dois grupos de larvas de 3º ínstar de ambas as espécies, sendo tratados 30 indivíduos em cada uma de quatro repetições.

No primeiro grupo, o vírus foi administrado aplicando-se cinco microlitros da suspensão viral sobre discos (4 mm de diâmetro) de dieta artificial de Greene *et al.* (1976), omitindo-se o formol (Vail *et al.* 1968). A dieta contaminada foi colocada em câmaras (5 ml) de placas de bioensaio, juntamente com larvas individualizadas de 3º instar e mantidas em estufas incubadoras a 25°C, 70% de umidade relativa (UR) e 14 horas de fotofase. Após o consumo total da dieta, as larvas foram colocadas, duas a duas, em copos plásticos de 45 ml, contendo 10 ml de dieta completa (Vail 1975 e Alves 1986), tendo sido esta quantidade de dieta determinada como suficiente para alimentar as lagartas-testemunha até o estágio de prepupa. O período de alimentação em dieta contaminada, suficiente para o consumo do disco, foi de 24 horas para larvas de *A. gemmatalis*, sendo, entretanto, variável para larvas de *C. includens*.

Para o segundo grupo, 180 ml da dieta sem formol foram resfriados até 50°C em temperatura ambiente, crescendo-se, em seguida, 20 ml da suspensão viral, previamente calculada para se obter as concentrações desejadas. Após homogeneização, aproximadamente 10 ml do alimento contaminado foram colocados em copos plásticos de 45 ml, sendo colocadas duas larvas de 3º instar em cada recipiente e mantidas nas condições de temperatura, umidade e fotofase já descritas anteriormente. A mortalidade foi corrigida pela fórmula de Abbott, sendo os resultados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O coeficiente de variação (CV), nos bioensaios com *C. includens*, foi de 27,83% para o VPN pipetado sobre os discos de dieta e de apenas 7,97% quando incorporado à dieta (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade de larvas de 3º instar de *Chrysodeixis includens* provocada pelo seu VPN pipetado sobre discos de dieta ou incorporado à dieta.

Método de Bioensaio			
Pipetado sobre discos de dieta		Incorporado à dieta	
CPI por disco de dieta	Mortalidade por VPN	CPI por ml de dieta	Mortalidade por VPN
0	2,29 a	0	2,08 a
10	3,17 a	1.00	4,89 a
60	18,21 b	1.000	21,58 b
360	27,50 bc	10.000	64,38 c
2.160	33,61 c	100.000	93,67 d
12.960	77,50 d	1.000.000	99,99 d
CV = 27,83%		CV = 7,97%	

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

Entretanto, não foi observada a mesma diferença com *A. gemmatalis* (Tabela 2). Os resultados demonstraram que a metodologia com a suspensão viral incorporada à dieta apresentou valores mais homogêneos para *C. includens*, não ocorrendo diferença para *A. gemmatalis*. Da mesma forma, Hughes & Wood (1986), consideraram que a metodologia utilizando o VPN incorporado reproduz melhor os resultados do que a contaminação superficial da dieta.

Para o inseto-teste *C. includens*, a mortalidade provocada por seu VPN pipetado sobre discos de dieta variou entre 3,17%, na concentração de 10 corpos poliédricos de inclusão (CPI) por disco, até 77,5%, com 12.960 CPI/disco (Tabela 1). Para *A. gemmatalis* a mortalidade por seu VPN variou entre 61,44% e 93,63%, utilizando-se 20 e 80 CPI/disco, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 2. Mortalidade de larvas de 3º instar de *Anticarsia gemmatalis* provocada pelo seu VPN pipetado sobre discos de dieta ou incorporado à dieta.

Métodos de Bioensaio			
Pipetado sobre discos de dieta		Incorporado à dieta	
CPI por disco de dieta	Mortalidade* por VPN	CPI por ml de dieta	Mortalidade* por VPN
0	0	0	0
20	61,44 a	40	25,13 a
40	73,60 b	200	42,30 b
60	87,05 c	1000	75,39 c
80	93,63 c	5000	97,47 d
CV = 13,71%		CV = 16,42%	

* Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

Quando o VPN foi incorporado à dieta, a mortalidade provocada em *C. includens* foi de 4,89%, para uma concentração de 1×10^2 CPI/ml de dieta, e de 99,99%, utilizando-se 1×10^6 CPI/ml de dieta (Tabela 1). Em *A. gemmatalis* esta metodologia provocou mortalidade variando entre 25,13% e 97,47%, com concentrações de $0,4 \times 10^2$ e 5×10^3 CPI/ml de dieta, respectivamente (Tabela 2). Vail *et al.* (1984), utilizando as duas metodologias, observaram diferença no tempo letal médio (TL_{50}) para larvas de *Cactoblastis cactorum* (Berg) (Lepidoptera: Phycitidae) infectadas por VPN de *Autographa californica* (Speyer); entretanto, as lagartas consumiram o alimento apenas na superfície, hábito incomum naquele inseto. Por outro lado, Tompkins *et al.* (1988) não relataram qualquer dificuldade na condução de bioensaios utilizando VPNs de *A. californica*, *Trichoplusia ni* (Hüb.) *Rachiplusia nu* (Guen.) e *Heliothis armigera* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) incorporados à dieta.

Tabela 3. Concentração letal média (CL_{50}), calculada pelo método de probites, para os VPNs de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* pipetados em discos de dieta ou incorporados à dieta.

Espécie	Método de Bioensaio	
	Pipetado em discos de dieta (CPI/disco)	Incorporado à dieta (CPI/ml de dieta)
<i>A. gemmatalis</i>	13,52	208,56
<i>C. includens</i>	2.583,60	3.830,80

A concentração letal média (CL_{50}) apresentou maior variação entre as duas metodologias quando a espécie utilizada foi *A. gemmatalis* (Tabela 3), sendo de 13,52 CPI/disco com o vírus na superfície da dieta e de 208,56 CPI/ml de dieta com a suspensão viral incorporada. Para *C. includens*, a CL_{50} foi de 2.583,6 CPI/disco e 3.6730,8 CPI/ml de dieta com o VPN incorporado. Além da metodologia de incorporação mostrar-se mais adequada à *C. includens* e igualmente adequada para *A. gemmatalis*, permitiu a implantação dos bioensaios com menor manipulação dos insetos-testes. O tempo gasto na implantação dos bioensaios, utilizando-se a metodologia de incorporação, foi de apenas 1/3 em relação ao método de contaminação superficial de discos de dieta.

LITERATURA CITADA

- Alves, S.B. 1986. Vírus entomopatogênicos, p. 171-187. In Alves, S. B. (ed.), Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 407 p.
- Greene, G. L., N. C. Leppla & W. A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. J. Econ. Entomol. 69 : 487-488.
- Hughes, P. R. & H. Wood. 1986. In vivo and in vitro bioassay methods for baculoviruses, p. 1-30. In Granados, R. R. & B. A. Federici (eds.), The biology of baculoviruses: practical application for insect control. Boca Raton, CRC, v.2, 276p.
- Ignoffo, C. M. 1965. The nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (Fabricius). IV. Bioassay of virus activity. J. Invertebr. Pathol. 7:315-319.
- Moscardi, F. 1983. Utilização de *Baculovirus anticarsia* para o controle de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Comun. Téc. 23, Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 21 p.
- Tompkins, G. J., E. M. Dougherty, J. R. Adams & D. Diggs. 1988. Changes in the virulence of nuclear polyhedrosis viruses when propagated in alternate noctuid (Lepidoptera: Noctuidae) cell lines and hosts. J. Econ. Entomol. 81: 1027-1032.

- Vail, P. V. 1975.** Standardization and quantification: Insect laboratory studies, p. 44-48. In Summers, M. R. Engler, L. A. Falcon & P. V. Vail (eds.), *Baculoviruses for insect pest control: safety considerations*. Washington, Am. Soc. Microbiol. 186 p.
- Vail, P. V., T. J. Henneberry, A. N. Kishaba & K. Y. Arakawa, 1968.** Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. *J. Invertebr. Pathol.* 10: 84-93.
- Vail, P. V., S. S. Vail & M. D. Summers. 1984.** Response of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Phycitidae) to the nuclear polyhedrosis virus isolated from *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 13: 1241-1244.