

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

VICTOR HUGO DUARTE DA COSTA

**TESTES GENÉTICOS E BIOLÓGICOS DE BACULOVÍRUS COLETADOS EM
Helicoverpa armigera (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL**

DIAMANTINA - MG

2015

VICTOR HUGO DUARTE DA COSTA

**TESTES GENÉTICOS E BIOLÓGICOS DE BACULOVÍRUS COLETADOS EM
Helicoverpa armigera (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração em Manejo Integrado de Pragas, para a obtenção do título de “Mestre”,

Orientador: Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares.

DIAMANTINA – MG

2015

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

C837t Costa, Victor Hugo Duarte da.
2015 Testes genéticos e biológicos de baculovírus coletados em
Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil /
Victor Hugo Duarte da Costa. – Diamantina : UFVJM, 2015.
40 p. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares.

Dissertação (mestrado) –Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri. Faculdade de Ciências Agrárias. Programa
de Pós-Graduação em Produção Vegetal, 2015.

1. Controle biológico. 2. Transmissão latente. 3.
Nucleopoliedrovírus. I. Soares, Marcus Alvarenga. II. Título.

CDD 632.96

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

VICTOR HUGO DUARTE DA COSTA

**TESTES GENÉTICOS E BIOLÓGICOS DE BACULOVÍRUS COLETADOS EM
Helicoverpa armigera (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM / /

Dr. Fernando Hercos Valicente – EMBRAPA Milho e Sorgo
(Convidado)

Dr. Veríssimo Gibran Mendes de Sá – Dow AgroSciences
(Convidado)

Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia – UFVJM
(Convidado)

Prof. Dr. Marcus Alvarenga Soares – UFVJM
(Orientador)

DIAMANTINA
2015

Dedico a minha mãe *Cormélia Duarte da Costa*, e ao meu pai *Antônio Ferreira da Costa*.

AGRADECIMENTOS

A Deus que estava presente em todas minhas decisões e que sempre me deu forças para que eu continuasse a buscar meus objetivos.

A todos meus familiares, em especial a minha mãe Cormélia Duarte da Costa ao meu pai Antônio Ferreira da Costa e a meu irmão William Duarte da Costa que sempre torceram e fizeram de tudo para que eu conseguisse realizar o meu sonho.

Aos professores Marcus Alvarenga Soares e Fernando Hercos Valicente pelos ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais, que nunca esquecerei. E por terem acreditado no meu potencial e terem dado minhas primeiras oportunidades.

Aos companheiros do laboratório de controle biológico da UFVJM e da EMBRAPA Milho e Sorgo que foram essenciais nos trabalhos de pesquisa desenvolvidos.

A Luciana Bahia Gontijo e toda sua família por terem me recebido sempre muito bem em Sete Lagoas.

A todos os funcionários da Universidade federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e da EMBRAPA Milho e Sorgo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

DA COSTA, V. H. D. Testes genéticos e biológicos de baculovírus coletados em *Helicoverpa armigera* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. 2015. 40p. (Dissertação – Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

Lagartas da espécie *Helicoverpa armigera* foram identificadas no Brasil atacando extensas áreas de produção agrícola. Algumas características fazem deste inseto uma das principais pragas a sistemas agrícolas do mundo, o que torna este ataque um perigo eminente às áreas de produção do país. Estudos com os insetos coletados nestas áreas são essenciais para que seja desenvolvido um manejo adequado. Estudos de laboratório podem selecionar possíveis práticas de manejo a fim de combater surtos de pragas no campo. Uma das formas de manejar o ambiente de forma segura é adotar o Manejo Integrado de Pragas, onde se destaca o controle biológico utilizando baculovírus. A lagarta de *H. armigera* é susceptível a estirpes de baculovírus, porém é necessário verificar esta suscetibilidade. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram selecionar estirpes autóctones de baculovírus tóxicas as lagartas desta espécie. Foram realizados testes genéticos e biológicos entre as estirpes autóctones, comparando-as com o produto comercial Gemstar®, de origem norte americana. A análise comparativa do sequenciamento genético realizada para os genes LEF-8 e LEF-9 revelaram que os isolados locais estão, estreitamente, relacionados com espécies de baculovírus da Austrália e da Índia. Todos os isolados testados possibilitaram o controle de lagartas de terceiro instar de *H. armigera*. Porém, análises biológicas da concentração letal média (CL50) e do tempo letal médio (TL50) variaram entre os isolados testados. O isolado HearNPV-BR2 apresentou os melhores resultados de CL50 e TL50. Ademais, este é o primeiro registro da ocorrência da espécie HearNPV-BR2 no Brasil, e suas propriedades inseticidas assinalam que a mesma pode ser útil para a fabricação de bioinseticidas para o controle de *H. armigera* no país.

Palavras-chave: Controle biológico, Transmissão latente, NPV.

ABSTRACT

DA COSTA, V.H.D. Genetic and biological tests of baculovirus collected in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. 2015. 40p. (Dissertation - Master in Plant Production) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2015.

Larvae of *Helicoverpa armigera* species were identified in Brazil attacking extensive agricultural production areas. Some features make this one of the main insect pests in agricultural systems in the world, which makes this attack an imminent danger to agricultural production in the country. Studies with insects collected in these areas are essential for developed proper management. Laboratory studies can select possible management practices to combat pest outbreaks in the field. One way to manage the secure environment is to adopt the Integrated Pest Management, highlighting the biological control using baculovirus. The *H. armigera* larvae is susceptible to strains of baculovirus but it is necessary check this susceptibility. Therefore the objectives of this work were to select indigenous strains of toxic baculovirus larvae of this species. Genetic and biological tests were carried out between indigenous strains, comparing them with the commercial product Gemstar®, origin from North American (USA). Comparative analysis of genetic sequencing performed for the LEF-8 and LEF-9 genes, revealed that indigenous strains are closely related to species of baculovirus of the Australia and India. All strains tested allowed control of the third instar of the *H. armigera* larvae. However, biological analysis of median lethal concentration (LC 50) and median lethal time (LT50) varied among the strains tested. The HearNPV-BR2 strain showed the best results of CL50 and TL50. Moreover, this is the first record of the occurrence of HearNPV-BR2 species in Brazil and its insecticidal properties indicate that BR2 may be useful for the manufacture of biological insecticides for *H. armigera* control in the country.

Keywords: Biological control, Latent transmission, NPV,

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Curvas de sobrevivência obtidas com o estimador Kaplan-Meier, de lagartas de <i>H. armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae) após ingestão de pedaços de 1,8 cm ² de folha de milho inoculadas com 1x10 ⁶ poliedros/ ml de diferentes isolados de baculovírus.....	19
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Isolados de NPV com o seu respectivo local de coleta utilizadas nos ensaios obtidos de diferentes espécies de insetos.....	14
TABELA 02 – Porcentagem de identidade, e-Value e acesso de baculovírus obtidos, após análise da sequência do locus LEF-8, por meio de algoritmo BLASTN contra o banco de dados NR do Genbank, para os distintos isolados utilizados neste estudo.....	17
TABELA 03 – Porcentagem de identidade, e-Value e acesso de baculovírus obtidos, após análise da sequência do locus LEF-9, por meio de algoritmo BLASTN contra o banco de dados NR do Genbank, para os distintos isolados utilizados neste estudo.....	17
TABELA 04 – Respostas de Concentração – mortalidade para os cinco isolados de nucleopoliedrovírus em lagartas de terceiro instar de <i>H. armigera</i> obtida a partir da regressão PROBIT pelo programa SAS (S.A.S 1998). N = número de ensaios, Slope \pm SE = erro padrão, X^2 = chi-quadrado, CL50 = concentração letal média, P = GI = grau de liberdade.....	18

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de ilustrações.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Introdução Geral.....	1
Referências Bibliográficas.....	5
Artigo científico.....	10
Resumo.....	10
Abstract.....	11
1. Introdução.....	12
2. Material e Métodos.....	13
3. Resultados.....	16
4. Discussão	19
5. Conclusão.....	23
6. Agradecimentos.....	24
7. Referências bibliográficas.....	24

INTRODUÇÃO GERAL

Espécies de insetos pragas causam perdas em produtividade que aliadas ao controle dos mesmos eleva o custo de produção em diversos sistemas agrícolas. Neste cenário destaca-se a lagarta *Helicoverpa armigera*, (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), como uma das mais importantes (Cunningham et al., 1999). O adulto desta praga é uma mariposa de hábito noturno que em seu estágio larval utiliza-se de partes de plantas para seu desenvolvimento. A *H.armigera* pode se alimentar de diferentes estruturas, porém, tem preferência por brotos, inflorescências, frutos e vagens (Reed, 1965; Fitt, 1989). Esta espécie é extremamente polífaga e seu ataque já foi reportado em mais de 60 espécies de plantas cultivadas e silvestres em cerca de 67 famílias hospedeiras ao redor do mundo, incluindo espécies de grande importância econômica (Fitt, 1989; Pogue, 2004). Como consequência, várias culturas são consideradas hospedeiras importantes da praga, onde, frequentemente, é registrado o seu ataque, principalmente em cultivos de tomate, algodão, grão-de-bico, sorgo, soja, feijão, batata, milho, tabaco e algumas espécies do gênero de *Citrus* (Lammers e Macleod, 2007).

Helicoverpa armigera apresenta particularidades relevantes em seu estágio reprodutivo que garantem sucesso em sua colonização em regiões agrícolas ao redor do mundo (Fitt, 1989). As fêmeas são capazes de produzir cerca de 1.500 ovos, que são distribuídos de forma desagregada nas plantas hospedeiras, em que cerca de 75% destes são viáveis (Kumar et al., 2009). Além disso, os adultos possuem grande capacidade de migração e dispersão. Isso possibilita a procura por condições favoráveis para o seu desenvolvimento por grandes distâncias (Pedgley 1985). Associado a estas características a espécie apresenta, também, alta capacidade de sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis, como excesso de calor, frio ou seca, sendo possível ter várias gerações ao longo do ano. A fase de pupa ocorre no solo e, dependendo das condições climáticas, pode entrar em diapausa, o que garante o suprimento de adultos em diferentes épocas, em uma mesma área de cultivo (Chen et al., 2013).

O uso de cultivares resistentes expressando proteína Bt e a aplicação de inseticidas químicos são a base do manejo utilizado para o controle de surtos de *H.*

armigera. Porém populações resistentes a estes métodos de controle foram registradas em importantes regiões de produção agrícola no mundo (McCaffery, 1998; Gunning et al., 2005; Tabashnik et al., 2009; Liu et al., 2010; Yang et al., 2013). Isso a torna uma das principais pragas de sistemas agrícolas modernos (Zalucki, 2014). Pois além do sucesso adaptativo, consegue desenvolver resistência aos principais métodos de controle empregados pelo homem.

Surtos populacionais de *H. armigera* não incluíam as Américas como local de incidência. Porém, no início de 2013 foi confirmado o ataque desta lagarta em extensas áreas produtoras de grãos no Brasil, em plantios de algodão, milho e soja (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013). A praga se estabeleceu com sucesso nas principais regiões produtoras do país e já se encontra disseminada por quase todos os estados (Tay et al., 2013). Muito se debateu sobre como ocorreu a introdução desta espécie, não havendo consenso. Contudo, estudos indicam que o trânsito de produtos e pessoas entre os países podem ter sido responsáveis pela migração deste inseto praga (Mazzi e Dorn, 2012). Além disso, análises da diversidade genética existente entre os espécimes de *H. armigera* coletados no Brasil sugerem que as populações nacionais não são provenientes de apenas um evento de imigração, mas sim, a partir de vários, dando origem às diversas populações deste Lepidoptera estabelecidas entre as distintas regiões do país (Leite et al., 2014).

Por se tratar de um dos maiores produtores agrícolas do mundo, surtos desta lagarta no Brasil podem comprometer a produção e causar elevados prejuízos ao setor produtivo do país. Prejuízos anuais na ordem de U\$ 2 bilhões são atribuídos aos danos causados pela lagarta em lavouras de países da Europa, Ásia e África (Venette et al., 2003; FAO, 2013). Assim sendo, é necessária a implantação de medidas que visem o controle da lagarta para estas novas áreas de ocorrência. Estudos relevantes sobre o manejo de *H. armigera* foram desenvolvidos, principalmente, nos países onde os surtos populacionais da praga, historicamente, já comprometem a produção (Duffield e Steer, 2006; Wu, 2007). No entanto, existem relatos que indicam diferenças significativas no manejo entre populações que se desenvolvem em diferentes regiões (Kranthi et al., 2001; Chen et al., 2013; Tay et al., 2013). Surge então, a necessidade de realizar estudos com as populações que se adaptaram nos agrossistemas

brasileiros, para que se possa desenvolver um manejo adequado da espécie para estas novas regiões de infestação.

CONTROLE BIOLÓGICO UTILIZANDO BACULOVÍRUS

O Controle biológico é uma das ferramentas utilizadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP), adotadas visando a supressão de populações de insetos em ambientes agrícolas. Em um manejo adequado, a preferência por métodos naturais de controle de pragas é uma das formas mais seguras de se manipular o ambiente (Price e Martinsen, 1994). Vários são os agentes naturais passíveis de serem utilizados neste tipo de técnica, incluindo predadores, parasitoides e entomopatógenos. Dentre estes últimos, os vírus pertencentes ao grupo dos baculovírus são apontados com grande potencial de uso na agricultura e em áreas florestais (Moscardi, 1999; Kutinkova et al., 2012).

Os baculovírus compreendem o maior grupo de vírus de insetos pertencentes a família Baculoviridae. A família é composta por dois grupos, os Nucleopoliedrovírus (NPV) e os Granulovírus (GV). Esta nomenclatura faz referência a diferenças na conformação morfológica existente entre os corpos de oclusão. Além disso, a partir da especificidade dos baculovírus em infectar determinadas ordens de insetos, a família é subdividida em quatro grandes gêneros, Alphabaculovirus (NPVs de Lepidoptera), Betabaculovirus (GVs de Lepidoptera), Gammabaculovirus (NPVs de Hymenoptera) e Deltabaculovirus (NPVs de Diptera). Os baculovírus possuem dois tipos de fenótipos infecciosos, uma forma oclusa do vírus, responsável pela transmissão de inseto para inseto (poliedros), e outra, chamada de forma não oclusa, que é responsável pela transmissão de célula para célula, em um mesmo indivíduo (Granados e Federici, 1986).

Após a ingestão dos corpos de oclusão pelos insetos, a matriz proteica existente nestes corpos é dissolvida no intestino médio devido ao pH ser fortemente alcalino. A partir daí, ocorre a dissolução desta matriz no lúmen digestivo, onde é liberado os virions. Essas partículas infectivas penetram nas células epiteliais do intestino médio, mediada por receptores específicos, e são transportadas ao núcleo, liberando o seu DNA, iniciando o processo de replicação viral. A replicação do vírus produz a forma não oclusa, infectando todos os tecidos do inseto. Porém, a forma

oclusa somente é produzida nos estágios finais da infecção viral, quando ocorre a produção dos poliedros. Nesta ocasião ocorre a ruptura das células e a liberação dos poliedros no ambiente. É quando ocorre a morte do inseto seguida da liquefação dos tecidos (Federici, 1997; 1999).

Os baculovírus são extremamente específicos aos insetos e aos seus hospedeiros. Sua proteção nos poliedros permite a formulação de bioinseticidas com fácil tecnologia de aplicação. A ordem Lepidoptera possui o maior relato de espécies susceptíveis a sua ação (Burges et al., 1980; Rollie et al., 2013). Portanto, grande sucesso foi obtido no controle de importantes lepidópteros praga com baculovírus por meio da aplicação de bioinseticidas fabricados a base deste micro-organismo (Kutinkova et al., 2012).

No Brasil, na década de 90, foi reportado o maior sucesso na utilização de baculovírus do mundo, quando cerca de um milhão de hectares foram tratados anualmente para o controle de surtos de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebididae) em plantios de soja (Moscardi e Sosa-Gomes, 1992). Dentre as pragas suscetíveis a estes bioinseticidas, estão as lagartas da espécie *H. armigera* (Zhang, 1994). Na Austrália, bioinseticidas à base de baculovírus são empregados com sucesso, obtendo bons índices de controle de *H. armigera*, tanto em cultivos agrícolas tradicionais como em cultivos protegidos (casa de vegetação) (Buerger et al., 2007). Contudo, antes da formulação destes produtos, testes com toxicidade de baculovírus devem ser realizados a fim de encontrar isolados com potencial para uso no controle de lagartas (Chen et al., 2000; Arrizubieta et al., 2013). Isso se justifica por ocorrerem diferenças quanto às respostas de toxicidade para diferentes isolados do vírus, influenciados ainda pelo tipo de hospedeiro e o local de coleta (Barrera et al., 2011). No Brasil já existem produtos importados, registrados e produzidos com baculovírus para uso comercial e controle de *H. armigera*. No entanto, os isolados utilizados na formulação destes bioinseticidas são alóctones, o que pode comprometer o desenvolvimento de isolados locais reduzindo o *pool* genético existente nas populações locais de vírus (Muñoz e Caballero, 2000). Por isso, faz-se necessário selecionar isolados brasileiros, e testar seu potencial de controle destas lagartas.

A formatação dessa dissertação segue os termos estabelecidos para as “Normas da ABNT para apresentação de trabalhos científicos, monografias,

dissertações e teses”, Manual de Normalização, de 2011. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRIZUBIETA, M.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P; AND SIMÓN, O. 2013. Selection of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. **Pest Management Science**, v.70, p.967-76, 2013.

BARRERA, G.; SIMÓN, O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T. AND CABALLERO, P. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potencial biological insecticide: genetic and phenotypic comparison of fields isolates from Colombia. **Biological Control**, v.58, p.113-120, 2011.

BUERGER, P.; HAUXWELL, C. AND MURRAY, D. Nucleopolyhedrovirus introduction in Australia. **Virologica Sinica**, v.22, n.2, p.173-179, 2007.

3 BURGESS, H.D.; CROIZER, G. AND HUBER, L. A review of safety tests on baculoviruses. **Entomophaga**, v.25, n.2, p.329-340, 1980.

CHEN, X.; IJKELE, W.F.J.; TARCHINI, R.; SUN, X.; SANDBRINK, H.; WANG, H.; PETERS, S.; ZUIDEMA, D.; LANKHORST, R.K.; VLAK, J. AND HU, Z. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, v.82, p.241-257, 2001.

CHEN, Y.S.; CHEN, C.; HE, H.M.; XIA, Q. W. AND XUE, F.S. Geographic variation in diapause induction and termination of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v.59, p.855-862, 2013.

CUNNINGHAM, J.P.; ZALUCKI, M.P. AND WEST, S.A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, v.89, p.201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, n.1, p.110-113, 2013.

DUFFIELD, S.J. AND STEER, A.P. The ecology of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in the Riverina region of south-eastern Australia and the implications for tactical and strategic management. **Bulletin of Entomological Research**, v.96, p.583-596, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Statistical Yearbook 2013. World Food and Agriculture, 2013.

FEDERICI, B.A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.) The baculoviruses. New York: **Plenum Press**, p.33-59, 1997.

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 Press**, v.5, p.301-320, 1999.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v.34, n.1, p.17-52, 1989.

GRANADOS, R.R. AND FEDERICI, B.A. **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, v.1, p.181-202, 1986.

GUNNING, R.V.; DANG, H.T.; KEMP, F.C.; NICHOLSON, I.C. AND MOORES, G.D. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2558-2563, 2005.

KRANTHI, K.R.; JADHAV, D.; WANJARI, R.; KRANTHI, S. AND RUSSELL, D. Pyrethroid resistance and mechanisms of resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.94, n.1, p.253-263, 2001.

KUMAR, S.; SAINI, S. K.; RAM, P. Natural mortality of *Helicoverpa armigera* (Hübner) eggs in the cotton ecosystem. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v.11, n.1, p.17-25, 2009.

KUTINKOVA, H.; SAMIETZ, J.; DZHUVINOV, V.; ZINGG, D. AND KESSLER, P. Successful application of the *Baculovirus* product madex® for control of *Cydia*

pomonella (l.) in Bulgaria. **Journal of plant protection research**, v.52, n.2, p.205-213, 2012.

LAMMERS, J.W. AND MACLEOD, A. **Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808)**. Plant Protection Service and Central Science Laboratory, 18 p., 2007.

LEITE, N.A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I. AND OMOTO, C. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **Plos one**, v.9, n.11, p.1-9, 2014.

LIU, F.; XU, Z.; ZHU, Y.C.; HUANG, F.; WANG, Y.; LI, H.; GAO, C.; ZHOU, W. AND SHEN, J. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, v.66, p.155-161, 2010.

MAZZI, D. AND DORN, S. Movement of insect pests in agricultural landscapes. **Annals of Applied Biology**, v.160, p.97-113, 2012.

McCAFFERY, A.R. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.353, p.1735-1750, 1998.

MOSCARDI, F. AND SOSA-GÓMEZ, D.R. **Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil**: Pest management in soybean. Elsevier Applied Science, p.98-109, 1992.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.44, p.257-289, 1999.

MUÑOZ, D. AND CABALLERO, P. Persistence and effects of parasitic genotypes in a mixed population of the *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v.19, p.259-264, 2000.

PEDGLEY, D. E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, v.36, n.1, p.15-20, 1985.

- POGUE, M. G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.97, n.6, p.1222-1226, 2004.
- PRICE, P.W. AND MARTINSEN, G.D. Biological pest control. Biomass and Bioenergy, v.6, p.93-101, 1994.
- REED, W. 1965. *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in western Tanganyika: II. Ecology and natural and chemical control. **Bulletin of Entomological Research**, v.56, n.1: p.127-140, 1965.
- ROLLIE, J.C.; PASSARELLI, A.L. AND RICHARD, C. Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects. **PloS Pathogens**, v.9, n.11, p.1-4 2013.
- SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; DE PAULA-MORAES S.V. AND SILVIA YANO A.C. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.6, p.689-692, 2013.
- SRIVASTAVA C.P.; NITIN, J. AND TRIVEDI, T.P. Forecasting of *Helicoverpa armigera* populations and impact of climate change. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v.80, p.3-10, 2010.
- TABASHNIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.J. AND CARRIERE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p.2011-2025, 2009.
- TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Plos One**, v.8, n.11, p.1-7 2013.
- YANG, Y.; LI, Y. AND WU, Y. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. **Journal of Economic Entomology**, v.106, p.375-381, 2013.
- VENETTE, R.C.; DAVIS, E.E.; ZASPEL, Z.; HEISLER, H. AND LARSON, M. **Mini risk assessment, old world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)**. US Department of Agriculture, 36 p., 2003.

WU, K. Monitoring and management strategy for *Helicoverpa armigera* resistance to Bt cotton in China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.5, p.220-22, 2007.

ZALUCKI, M.P.; DAGLISH, G.; FIREMPONG, S. AND TWINE, P.H. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: what do we know? **Australian Journal of Zoology**, v.4, p.779-814, 1986.

ZHANG, H.; YANG, Q.; QIN, Q.L.; ZHU, W.; ZHANG, Z.F.; LI, Y.N.; ZHANG, N. AND ZHANG, J.H. Genomic sequence analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus isolated from Australia. **Archives of Virology Journal**, v.159, p.595-601, 2014.

ZHANG, G. Research, development and application of *Heliothis* viral pesticide in China. **Resource and Environment in the Yangtze Valley**, v.3, p.36-41, 1994.

ARTIGO CIENTÍFICO

RESUMO

Lagartas da espécie *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) são polífugas e extremamente agressivas aos seus hospedeiros e foram identificadas no Brasil atacando extensas áreas de produção agrícola. Uma das formas de manejar o ambiente de maneira segura é adotar o Manejo Integrado de Pragas - MIP, onde se destaca o controle biológico por meio de baculovírus. Neste contexto, quatro isolados locais de nucleopoliedrovírus - NPV foram coletadas em populações brasileiras de *H. armigera* e foram comparadas, genética e biologicamente, entre si, e ao produto Gemstar®, à base de NPV importado. A análise comparativa de sequenciamento genético realizada para os genes LEF-8 e LEF-9 revelaram que os isolados brasileiros estão estreitamente relacionados com espécies de NPV da Austrália e da Índia. Todos os isolados testados produziram boas taxas de mortalidade para lagartas de terceiro instar de *H. armigera*. Contudo a concentração letal média (CL50) e o tempo letal médio (TL50) variaram entre os isolados testados, com HearNPV-BR2 apresentando os melhores resultados. Este é o primeiro relato ocorrência desta espécie de NPV no Brasil e as propriedades inseticidas do isolado HearSNPV-BR2 assinalam que este pode ser útil para a fabricação de bioinseticidas para o controle de *H. armigera* no país.

Palavras chave: Controle biológico, NPV, Transmissão vertical.

ABSTRACT

Larvae of the species *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) are polyphagous pest and are extremely aggressive to hosts and were identified in Brazil attacking large areas of agricultural production. One way to manage the environment safely is to adopt the Integrated Pest Management - IPM, which highlights the biological control by baculovirus. In this context, four local strains of nucleopolyhedrovirus - NPV were collected in Brazilian populations of *H. armigera* and compared genetically and biologically among themselves and Gemstar® product, the imported NPV base. Comparative analysis of genetic sequencing performed for the LEF-8 and LEF-9 genes revealed that the Brazilian strains are closely related to NPV of species from Australia and India. All isolates tested produced good mortality rates for third instar larvae of *H. armigera*. However, the median lethal concentration (LC₅₀) and the median lethal time (LT₅₀) varied among the strains tested, with HearNPV-BR2 presenting the best results. This is the first reported occurrence of this type of NPV in Brazil and the insecticidal properties of Br2 HearSNPV indicate that this strain may be useful for the production of insecticides for the control of *H. armigera* in the country.

Keywords: Biological control, NPV, Vertical transmission

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto polífago, considerado uma das mais importantes pragas de sistemas agrícolas no mundo (Cunningham e Zalucki, 2014). Seu estágio larval se desenvolve alimentando-se, preferencialmente, de estruturas reprodutivas de importantes culturas agrícolas nas regiões onde ocorrem (Fitt, 1989). Essa praga ocasiona perdas econômicas mundiais estimadas em mais de US\$2 bilhões anualmente, além de custos socioeconômicos e ambientais (Tay et al., 2013). No Brasil, a espécie foi identificada recentemente e já se encontra disseminada por quase todo território brasileiro, além de estar presente em outros países do continente, como o Paraguai e a Argentina (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013; Murúa et al., 2014). É praga de importantes *commodities* brasileiras, e é detectada, com maior frequência em cultivos de feijão, algodão e soja (Leite et al., 2014).

O uso de cultivares que se tornaram resistentes a partir da transformação genética para expressar proteínas Bt e a aplicação de inseticidas químicos são a base do manejo utilizado para o controle de surtos de *H. armigera*. Porém, populações resistentes a estes métodos de controle foram registradas em importantes regiões de produção agrícola na Austrália, China e Índia (McCaffery, 1998; Gunning, et al., 2005; Tabashnik et al., 2009; Liu et al., 2010; Yang et al., 2013). O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é o método sustentável mais indicado para retardar o surgimento de biótipos resistentes nas populações de *H. armigera* (Cumming e Spiesman, 2006).

Dentre as técnicas passíveis de utilização integrada com outros métodos de controle se destaca o uso de bioinseticidas a base de baculovírus (Moscardi, 1999; Raymond et al., 2006). Baculovírus é um grupo de vírus com capacidade de provocar infecção em determinadas ordens de insetos e são considerados um dos patógenos mais sofisticados do controle biológico (Rollie, 2013). Bioinseticidas a base de baculovírus possuem alta especificidade, virulência, capacidade de persistir no meio ambiente e são compatíveis com outros inimigos naturais (parasitoides, predadores e patógenos) e inseticidas químicos (Burgues et al., 1980). Grande sucesso foi obtido no controle de importantes lepidópteros praga, pela aplicação de bioinseticidas fabricados a base de alphabaculovirus (nucleopoliedrovírus específicos de lepidópteros, NPV) (Moscardi, 1999; Kutinkova et al., 2012).

No entanto antes da fabricação de bioinsetidas a base de baculovírus, uma avaliação comparativa dos isolados de vírus locais com isolados alóctones, deve ser realizada a fim de encontrar aquelas com maior potencial para uso no biocontrole (Chen et al., 2002; Figueiredo et al., 2009; Arrizubieta et al., 2013). Isto se justifica por ocorrerem diferenças nas respostas a toxicidade para diferentes vírus, influenciados ainda pelo tipo de hospedeiro e o local de coleta (Milks, 1999; Barrera, 2011). Além disso, isolados alóctones podem impactar negativamente a atividade biológica de isolados locais (Muñoz e Caballero, 2000). No Brasil, já existem produtos registrados à base de baculovírus para uso comercial no combate a *Helicoverpa armigera*. No entanto, os isolados utilizados na formulação destes bioinseticidas são alóctones. Sendo assim, o objetivo deste estudo, foi identificar e investigar a toxicidade de isolados locais de baculovírus em lagartas de *Helicoverpa armigera*.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DOS INSETOS

As lagartas de *H. armigera* utilizadas nos ensaios foram obtidas do Laboratório de Controle Biológico do Núcleo de Biologia Aplicada (NBA) da EMBRAPA Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. Os espécimes foram criados em sala climatizada a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa, com 12 horas de fotoperíodo, alimentadas com dieta artificial a base de feijão branco, descrita por Greene e colaboradores (1976).

OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE BACULOVÍRUS

Foram utilizadas cinco isolados de vírus, sendo que, destas, três foram obtidas a partir de coletas de lagartas de *H. armigera* em plantios de milho, ainda sem manifestação de sintomas viróticos, em Sete Lagoas, MG. Estas lagartas foram submetidas às condições laboratoriais de criação, tendo sido verificado sintomas típicos de infecção por baculovírus. Mudanças comportamentais, como a redução na alimentação, e alterações morfológicas, como diminuição do crescimento e descoloração do tegumento, foram observadas para três lagartas distintas. Após alguns dias foi verificada a morte das mesmas. Ainda, ao morrer foi observado o rompimento do tegumento do inseto. Destas três lagartas, uma foi coletada em fevereiro de 2013 e outras duas em abril de 2014. Um dos outros dois isolados utilizados foi obtido a partir do produto comercial Gemstar®LC, que é

reconhecidamente eficiente no controle de *H. armigera* (HzSNPV), considerado o isolado referência, e outro obtido a partir da passagem seriada de um *Baculovirus Spodoptera* SpNPV-BR4 (isolado de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), multiplicado em lagartas de *H. armigera* até que fosse reportada a mortalidade de 100% das lagartas em testes preliminares (Tabela 2). O procedimento para obtenção do isolado BR4 foi realizado assim como proposto por Pavan e colaboradores (1981). Onde um isolado de baculovírus de uma espécie de inseto é colocado para infectar outra espécie de inseto diferente. Para o nosso estudo um isolado de *Spodoptera frugiperda* SfNPV obtido do banco de baculovírus da Embrapa Milho e Sorgo foi inoculado em folhas de milho e fornecida para alimentação de lagartas de *H. armigera*. Foram realizadas três multiplicações deste baculovírus em populações de *H. armigera*. Este procedimento é chamado de passagem seriada e já na terceira passagem foi reportada a mortalidade de 100% assim sendo, este isolado selecionado para ser utilizado nos bioensaios.

Para obtenção dos poliedros, os cinco isolados de vírus selecionadas (Tabela 1) foram multiplicadas em 112 lagartas de terceiro instar de *H. armigera*, induzidas a se alimentarem em discos 1,8 cm² de folha de milho impregnadas com suspensões concentradas dos baculovírus, na concentração de 1×10^9 poliedros/ml. Os insetos mortos foram macerados com 100 ml de água destilada e coados através de uma camada fina de algodão (Gomez et al., 1999). O estoque de poliedros obtidos a partir deste procedimento foi utilizado para a montagem dos bioensaios.

Tabela 1. Isolados de NPV obtidos de diferentes espécies de insetos, com o seu respectivo local de coleta, utilizados nos ensaios

Isolados	Espécie de Insetos	Localidade
HearNPV-BR1	<i>H. armigera</i>	Sete Lagoas - MG
HearNPV-BR2	<i>H. armigera</i>	Sete Lagoas - MG
HearNPV-BR3	<i>H. armigera</i>	Sete Lagoas - MG
SfNPV- BR4	<i>S. frugiperda</i>	Cascavel - PR
Gemstar®	<i>H. zea</i>	EUA - Importado

IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS

Análises de sequenciamento genético a partir do DNA extraído dos isolados foram utilizados para identificação dos isolados dos vírus utilizadas nos ensaios. As

análises foram realizadas no Laboratório de Virologia do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília - UNB. As lagartas mortas provenientes dos bioensaios foram maceradas, filtradas em gaze e algodão por três vezes, centrifugadas a 15.000 rpm por 15 minutos, lavadas quatro vezes com dodecil sulfato de sódio a 2% (SDS 2%) e enxaguadas em água destilada para purificação das amostras e obtenção dos poliedros. Para extração do DNA total, 50 µl de solução de poliedros foram utilizados a partir do método fenol clorofórmio descrito por O'Reilly e colaboradores (1992). A amplificação por PCR e o sequenciamento foram efetuados tal como descrito anteriormente por Rowley e colaboradores (2010). Os *loci* altamente conservados (LEF-8 e LEF-9) foram amplificados com os iniciadores degenerados Lef 8-1B (5'-TAATACGACTCACTATA GGGCAYGGHGARATGAC-3') e Lef 8-2 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCAYRTASG GRTCYTCSGC-3'), para o locus Lef-8, e Lef 9-1 (5'-TAATGGCGACGACGATAGTA GTA-3') e Lef 9-2 (5'-CGATGAGCGAATTGGGTTTG-3') para o locus LEF-9. O sequenciamento se deu com esses mesmos iniciadores degenerados, pela empresa Macrogen (Coréia do Sul).

Os dados obtidos a partir do sequenciamento genético para cada isolado foram submetidos ao programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al. 1990), para comparação com sequências depositadas no repositório mundial GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências foram comparadas com a base de dados de nucleotídeos BLASTN utilizando-se o algoritmo MEGABLAST, otimizado para a busca de sequências altamente similares. O resultado foi classificado de acordo com o valor esperado e-Value, que calcula a probabilidade em se obter um resultado similar ao acaso, dos valores do score máximo (Max Score), e da porcentagem de identidade (% identity). O resultado obtido a partir da ferramenta BLAST possibilita identificar o grupo de espécies ao qual os isolados analisados são similares.

BIOENSAIOS

Lagartas de terceiro instar de *H. armigera*, com seis dias de idade, foram individualizadas e deixadas sem alimento por 4 horas. Posteriormente, as lagartas foram alimentadas com um disco de 1,8 cm² de folha de milho impregnada com 20 µl de diferentes concentrações de suspensão de poliedros dos cinco isolados. As

concentrações utilizadas foram 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 poliedros/ml. Em cada suspensão foram adicionadas duas gotas de Tween 80. As concentrações dos isolados utilizados foram determinadas, previamente, por meio de contagem em hemocítômetro (câmara de Neubauer). As lagartas que consumiram completamente os discos de folha dentro de um período de 48 horas foram transferidas para recipientes com dieta artificial isenta de patógeno. Grupos de 32 lagartas foram utilizadas para montagem dos tratamentos. No tratamento controle os discos de folhas foram tratadas somente com água esteril e Tween 80. A mortalidade foi registrada a cada 24 h, por 10 dias, e a infecção por NPV foi confirmada por meio da visualização do patógeno nos tecidos das lagartas mortas (Rowley et al., 2011).

A concentração letal média (CL50) foi calculada para cada isolado usando regressão PROBIT. O tempo letal médio (TL50) foi estimado pela análise de sobrevivência de Kaplan-Meyer. Para esta última análise foi selecionada uma única concentração, 1×10^6 poliedros/ml. Esta concentração foi a menor utilizada nos ensaios a produzir mortalidade de 100% das lagartas para o isolado, Gemstar.

RESULTADOS

ANÁLISE GENÉTICA

O agrupamento realizado a partir do sequenciamento genético feito para os genes LEF-8 e LEF-9 indicaram similaridade dos isolados locais com isolados de HearNPV de outras localidades (Tabelas 2 e 3). As análises da sequência de nucleotídeos para o gene LEF-8 apresentaram identidade de 99% para o isolado BR1 e de 100% para os isolados BR2 e BR3 com o gene LEF-8 de NPV da Austrália HearNPV-Aus (GenBank N°. JN584482.1), publicado por Zhang e colaboradores (2014). Para as análises realizadas para o gene LEF-9, os isolados BR1 e BR3 apresentaram 99% e 95% de identidade com NPV da Austrália HearNPV-Aus, enquanto o isolado BR2 apontou 96% de identidade com NPV da Índia HearNPV-Faridkot (GenBank N°. KM357515.1) submetido por Rakshit e colaboradores (2014). Já a análise realizada para o isolado obtido de lagartas de *S. frugiperda* SpNPV-BR4, multiplicada de forma seriada em *H. armigera*, agrupou-se com vírus relacionados a *H. armigera* em ambos os genes avaliados, sendo o LEF-8 com 99% de similaridade com NPV da Austrália HearNPV-Aus e de 99% de similaridade do LEF-9 com NPV da Índia HearNPV-Faridkot. Isto indica que a infecção tenha sido causada por um

Baculovirus H. armigera (HearNPV) presente na forma latente nas lagartas utilizadas e não pelo isolado oferecido, obtida a partir da infecção por *Baculovirus Spodoptera* (SpNPV). Além disso, as análises de nucleotídeos realizadas para o isolado Gemstar, para ambos os genes LEF-8 e LEF-9, apresentaram identidade de 98% e 95%, respectivamente, com espécie de HzSNPV (isolado de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae)) (GenBank N°. AF334030.1), publicado por Chen e colaboradores (2002), confirmando assim a identidade do produto comercial.

Tabela 2. Porcentagem de identidade, e-Value e acesso de baculovírus obtidos, após análise da sequência do locus LEF-8, por meio de algoritmo BLASTN contra o banco de dados NR do Genbank, para os distintos isolados utilizadas neste estudo.

Isolado	Identidade (%)	e-Value	Acesso	Espécie Relacionada
BR1	99	0.0	JN584482.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV strain Australia, complete genome
BR2	100	0.0	JN584482.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV strain Australia, complete genome
BR3	100	0.0	JN584482.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV strain Australia, complete genome
BR4	99	0.0	JN584482.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV strain Australia, complete genome
Gemstar	98	0.0	AF334030.1	<i>Helicoverpa zea</i> single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, complete genome

Tabela 3. Porcentagem de identidade, e-Value e acesso de baculovírus obtidos, após análise da sequência do locus LEF-9, por meio de algoritmo BLASTN contra o banco de dados NR do Genbank, para os distintos isolados utilizados neste estudo.

Isolado	Identidade (%)	e-Value	Acesso	Espécie Relacionada
BR1	99	2e-20	JN584482.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV strain Australia, complete genome
BR2	96	7e-88	KM357515.1	<i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus strain Faridkot late expression factor 9 gene, partial cds
BR3	95	4e-91	JN584482.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV strain Australia, complete genome
BR4	99	0.0	KM357515.1	<i>Helicoverpa armigera</i> nucleopolyhedrovirus strain Faridkot late expression factor 9 gene, partial cds
Gemstar	95	4e-93	AF334030.1	<i>Helicoverpa zea</i> single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, complete genome

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS NPV EM LAGARTAS DE *H. armigera*

Todas os isolados foram capazes de provocar infecção e causar morte em lagartas de terceiro instar de *H. armigera* em dez dias de observação. As respostas de mortalidade das lagartas aos isolados foram diretamente relacionadas com as concentrações. As CL50 foram de $7,2 \times 10^4$, $8,0 \times 10^4$, $4,1 \times 10^4$, $3,5 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^5$ poliedros/ml para os isolados Gemstar, BR1, BR2, BR3 e BR4, respectivamente (Tabela 4). Os limites inferiores e superiores para as CL50 foram diferentes entre si onde os menores valores foram observados para o isolado BR2. Já os limites para os isolados Gemstar e BR1 apresentaram valores intermediários ao se comparar os isolados testados. Enquanto os isolados BR3 e BR4 tiveram os maiores limites observados com os limites superiores acima da dose máxima verificada para os outros isolados. Neste caso as respostas de mortalidade para o isolado BR2 indicaram ser este o mais virulento entre os isolados testados.

Tabela 4. Respostas de Concentração – mortalidade para os cinco isolados de nucleopoliedrovírus em lagartas de terceiro instar de *H. armigera* obtida a partir da regressão PROBIT pelo programa SAS (SAS 1998). N = número de ensaios, Slope \pm SE = erro padrão, X^2 = chi-quadrado, CL50 = concentração letal média, P = P-valor, GI = grau de liberdade.

Isolado	N	Slope \pm SE	X^2	CL50	Limites	P	GI
Gemstar	192	1.3984 \pm 0.2988	8.6068	7.2×10^4	$2.1 \times 10^4 - 2.0 \times 10^5$	<.0001	4
BR1	192	1.2791 \pm 0.1818	4.5663	8.0×10^4	$4.8 \times 10^4 - 1.2 \times 10^5$	<.0001	4
BR2	192	0.9123 \pm 0.1386	4.0808	4.1×10^4	$1.9 \times 10^4 - 7.5 \times 10^4$	<.0001	4
BR3	192	0.9754 \pm 0.1769	8.5379	3.5×10^5	$1.0 \times 10^5 - 1.3 \times 10^6$	<.0001	4
BR4	192	0.9373 \pm 0.1606	8.1627	5.0×10^5	$1.4 \times 10^5 - 1.8 \times 10^6$	<.0001	4

Os TL50 variaram de 7 a 10 dias com curva de sobrevivência atingindo limite de 50% para os isolados BR1 e BR2 por volta dos sete dias após a inoculação. Para os isolado Gemstar a curva de sobrevivência atingiu a TL50 por volta dos 8 dias. Já para os isolados BR3 e BR4 a curva atingiu a TL50 aos 9 e 10 dias respectivamente. No tratamento controle (sem vírus), todas as lagartas estavam vivas até 10 dias de observação (figura 1).

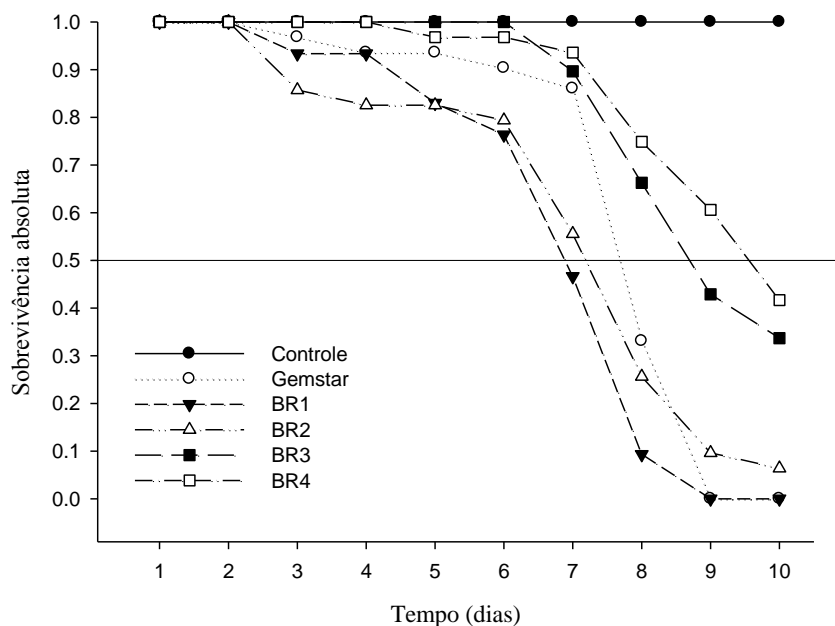


Figura 1. Curvas de sobrevivência obtidas com o estimador Kaplan-Meier de lagartas de *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) após ingestão de folha de milho inoculadas com 1×10^6 poliedros/ ml de diferentes isolados de baculovírus (Gemstar®, BR1, BR2, BR3, BR4 mais o tratamento controle).

DISCUSSÃO

A aplicação de testes genéticos e biológicos em baculovírus é utilizada como ferramenta de identificação e seleção de novos isolados de vírus. Deste modo, pode-se definir entre distintos isolados aqueles que apresentam melhor capacidade para o uso como agente de controle biológico de pragas. Variações genéticas são reportadas com frequência para populações de baculovírus coletadas no campo e a presença de variantes genotípicos pode ser expressa em melhor performance biológica dos isolados (Cory et al., 2005; Baillie e Bouwer, 2012). Novos direcionamentos para o manejo de *H. armigera* utilizando baculovírus no Brasil foram encontrados ao se comparar, genética e biologicamente, os isolados avaliados nestes ensaios.

ANALISE GENÉTICA

Diferenças foram observadas quando se comparou as sequências de DNA de cada um dos isolados entre si. Foi possível verificar diferenças genéticas entre os isolados de baculovírus, as quais podem ser utilizadas como instrumento de identificação e caracterização de novos isolados desses vírus (Blissard e Rohrmann, 1999; Tang et al., 2012).

A análise de agrupamento genético indicou alta similaridade dos isolados brasileiros com cepas isoladas de *H. armigera* da Austrália (HearNPV-Aus) e Índia (HearNPV- Faridkot). Estes resultados assinalam a presença de baculovírus com alta especificidade em infectar *H. armigera* no Brasil. Espécies de *Baculovirus* HearNPV ainda não tinham sido reportadas no país e sua identificação sugere que tenham sido introduzidas junto com populações de *H. armigera*. A proximidade genética existente entre os isolados nacionais com NPVs da Austrália e Índia indicam que os baculovírus, juntamente com os insetos, podem transcender barreiras geográficas e colonizar novos habitats (Mazzi e Dorn, 2012). Baculovírus são empregados com frequência nos locais de surtos de praga nestes países. A identificação de mais de uma espécie de NPV em nossas análises, sugere que, assim como os insetos, os baculovírus foram também introduzidos. Não somente a partir de um único evento de invasão, mas a partir de várias rotas de colonização, como proposto por Leite e colaboradores (2014). Neste sentido, a dispersão natural de baculovírus em grandes distâncias só é possível graças a sua capacidade de preservar-se em estado latente nos diferentes estádios de desenvolvimento do inseto (Vilaplana et al., 2010).

Baculovírus pode manter-se latente dentro do corpo de seus hospedeiros, o que ocorre quando o vírus é ingerido em concentrações subletais e se encontra em estado de dormência (replicação do vírus inexistente) sem provocar sintomas da doença (Cory e Myers, 2003; Burden et al., 2003). Contudo, o vírus em estado de latência pode ser ativado e iniciar a infecção ou, ainda, permanecer latente e ser ou não transmitido para seus descendentes (Kukan, 1999). A ativação dos vírus ocorre a partir de fatores estressantes para os hospedeiros, como baixas temperaturas, nutrição inadequada, alta densidade populacional e a presença de outros patógenos dentro de um mesmo hospedeiro (Fuxa et al., 1999; Takatsuka et al., 2007).

Portanto, para os isolados BR1, BR2 e BR3 as condições de laboratório impostas às lagartas coletadas no campo podem ter causado estresse capazes de desencadear a ativação de baculovírus latentes. Um vírus latente pode ser transmitido entre várias gerações de insetos (Kukan, 1999) e, ao serem identificados em nossos ensaios, podem indicar a ocorrência da transmissão de baculovírus entre gerações. A transmissão de vírus entre gerações é classificada como transmissão vertical e, frequentemente, é reportada para baculovírus (Kukan, 1999). Trabalhos similares

indicam a capacidade de baculovírus permanecer em estado latente em insetos genitores e iniciar a infecção em suas progênes. Khurad et al. (2004) provaram a existência deste tipo de contaminação em nucleopoliedrovírus quando infectaram lagartas de quinto instar de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) que, ao se reproduzirem, originaram progênes infectadas com o mesmo isolado utilizado nos ancestrais. Do mesmo modo, para lagartas de *H. armigera* cerca de $30,9 \pm 2,9\%$ das progênes estavam infectadas devido a transmissão vertical de vírus em testes laboratoriais realizados com isolados de baculovírus da China (Zhou et al., 2005). Enquanto Burden e colaboradores (2002), confirmaram a presença de baculovírus latentes entre 60 a 80% das progênes de segunda geração, ao infectar insetos antecessores com doses subletais de vírus, em testes realizados em *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). A partir da transmissão vertical foi possível então, a introdução de isolados de HearNPV em estado latente nas populações de insetos brasileiras.

O fato do isolado BR4 agrupar-se com espécies de baculovírus HearNPV indica que o mesmo pode também, tratar-se de um baculovírus latente. Porém, a ativação do vírus pode ter sido provocada pela presença do vírus SfNPV oferecido às lagartas nos ensaios. Quando um inseto está infectado com um vírus heterólogo (isolado a partir de uma espécie diferente), este pode desencadear infecção com seu próprio vírus homólogo (isolado da mesma espécie) presente em estado latente dentro do hospedeiro (Matthews et al., 2002). Resultado semelhante foi reportado por Hughes e colaboradores (1993), que determinaram que em uma população laboratorial de *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae), um baculovírus latente foi ativado a partir da infecção com um vírus de AcNPV (nucleopoliedrovírus isolados de *Autographa californica* (Speyer) (Lepidoptera: Noctuidae)) filogeneticamente distante ao MbNPV (nucleopoliedrovírus isolados de *M. brassicae*). Sendo assim, nossos resultados confirmam tal fenômeno, ao indicar similaridade do isolado BR4 com baculovírus relacionados à *H. armigera*, a partir da infecção inicial dos hospedeiros com outra espécie de baculovírus.

A transmissão vertical pode ter sido a principal rota de entrada dos vírus latentes encontrados nos ensaios, pois até então, na área de plantio onde os insetos foram coletados, ainda não tinha sido empregado qualquer método de controle contra

H. armigera. Portanto, para a população de insetos utilizada em nossos ensaios, tanto as condições de laboratório, quanto a presença de outra espécie de baculovírus, podem ter produzido fatores de estresse capazes de desencadear a ativação dos vírus latentes HearNPV.

ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS NPV EM LAGARTAS DE *H. armigera*

Novas cepas de vírus podem ser isolados de populações de insetos locais e assim que identificadas, devem ser utilizadas em testes laboratoriais para avaliação biológica antes de serem levados para testes a campo. Dessa forma, análises da atividade biológica, que envolvem testes de patogenicidade e virulência de entomopatogenos são importantes parâmetros de comparação, e servem como características de seleção de novos isolados de baculovírus em programas de controle biológico de pragas (Moscardi, 1999; Harrison et al., 2014). A patogenicidade é a capacidade de um agente invasor de causar doença em seu hospedeiro. Enquanto a virulência determina o grau de patogenicidade e pode ser definida pela capacidade relativa de um agente patogênico em se multiplicar e causar danos ao seu hospedeiro e pode ser mensurada pelo tempo letal médio (TL50) e pela concentração letal média (CL50) (Casadevall e Pirofski, 2001). Aspectos consideráveis foram encontrados ao se confrontar os dados de virulência entre os isolados analisados.

Todos os isolados, nas concentrações testadas, foram capazes de provocar mortes em lagartas de terceiro instar de *H. armigera*. No entanto, o isolado BR2 obteve melhores repostas para a CL50 (Tabela 3). Adicionalmente, ocorreram diferenças entre os TL50 para os isolados testados, onde a análise da inclinação da curva de sobrevivência indicou uma replicação mais rápida para os isolados BR1 e BR2 (Figura 1). Como resultado, o isolado BR2 foi considerado o mais virulento, pois produziu o mesmo grau de mortalidade com menor concentração de poliedros e precisou de menos tempo para se replicar, multiplicar e provocar a morte das lagartas. A morte de insetos pragas em menores intervalos de tempo, utilizando menores concentrações de poliedros, representam fatores chaves para escolha de baculovírus com potencial para utilização como bioinseticida (Moscardi, 1999; Kutinkova et al., 2012). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com outros trabalhos que encontraram diferenças entre respostas de virulência entre NPVs em ação contra lagartas de *H. armigera*. Figueiredo e colaboradores (2009) reportaram tais

diferenças, quando verificaram a atividade biológica de diferentes baculovírus coletados em distintas regiões da Península Ibérica em lagartas de segundo instar de *H. armigera*. Além disso, o tempo letal médio por volta de sete dias, assim como encontrados aqui, também foram reproduzidos em análises laboratoriais de lagartas de terceiro instar de *H. armigera* infectadas por diversos isolados de baculovírus (Ogembo et al., 2005; Arrizubieta et al., 2013). Já valores próximos para CL50, aos encontrados em nossos ensaios, foram reproduzidos em testes de seleção de melhores isolados que visavam a utilização destas em programas de controle biológico de pragas (Rowley et al., 2011; Arrizubieta et al., 2013).

A espécie *H. armigera* foi identificada recentemente no Brasil e estar suscetível a ação de inimigos naturais presentes no ambiente (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013). No mundo, agentes de controle biológico são comumente coletados nos campos de surtos de pragas e empregados no MIP (Wyckhuys et al. 2013; Luo et al., 2014). A ocorrência natural de isolados de baculovírus com bom desempenho no controle de *H. armigera* no Brasil pode levar a fabricação de bioinseticidas a base destes baculovírus sem que haja necessidade de importação de isolados para utilização (Rollie et al., 2013; Moscardi, 1999). Arrizubieta e colaboradores (2013), em testes comparativos realizados para seleção de baculovírus na Espanha, sugeriram um isolado local, extraído de lagartas de *H. armigera* coletadas em campo, como capaz de ser utilizada como o material ativo para o desenvolvimento de um inseticida biológico. Do mesmo modo na Austrália, após sucesso obtido com a adoção de produtos importados à base de NPVs exóticos, um isolado local foi selecionado para a produção de um bioinseticida similar ao importado, que obteve melhores respostas de toxicidade para a mesma espécie praga (Buerger et al., 2007). Nossos resultados indicam que um isolado local foi mais eficaz no controle de populações de *H. armigera* coletadas no Brasil. No entanto, todos os isolados testados produziram boas respostas de efetividade, porém abaixo do isolado melhor avaliado. Sendo assim, o isolado BR2 obteve o maior potencial biológico entre os isolados testados, portanto deverá ser utilizado em programas de controle biológico de *H. armigera* no país.

CONCLUSÃO

Este foi o primeiro registro da ocorrência de isolados locais de NPV relacionadas com *H. armigera* no Brasil. A identificação de baculovírus com alta

especificidade em infectar *H. armigera* em lagartas coletadas no campo, reforça a ideia da existência de baculovírus em estado latente e a transmissão vertical como possível rota de introdução desta espécie de vírus no país. O isolado BR2 produziu melhores repostas de virulência entre os isolados testados.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento e suporte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n.3, p.403-410, 1990.

ARRIZUBIETA, M.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P; AND SIMÓN, O. 2013. Selection of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. **Pest Management Science**, v.70, p.967-76, 2013.

BAILLIE, V.; L. AND BOUWER, G. 2012. High levels of genetic variation within *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus populations in individual host insects. **Archives of Virology**, v.157, p.2281-2289, 2012.

BARRERA, G.; SIMÓN, O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T. AND CABALLERO, P. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potencial biological insecticide: genetic and phenotypic comparison of fields isolates from Colombia. **Biological Control**, v.58, p.113-120, 2011.

BLISSARD, G.W. AND ROHRMANN, G.F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v.35, p.127-55, 1999.

BUERGER, P.; HAUXWELL, C. AND MURRAY, D. Nucleopolyhedrovirus introduction in Australia. **Virologica Sinica**, v.22, n.2, p.173-179, 2007.

- BURDEN, J.P.; NIXON, C.P.; HODGKINSON, A.E.; POSEE, R.D.; SAIT, S.M.; KING, L.A. AND HAILS, R.S. Covert infections as a mechanism for long term persistence of baculoviruses. **Ecology Letters**, v.6, p.524-531, 2003.
- BURDEN, J.P.; GRIFFITHS, C.M.; CORY, J.S.; SMITH, P. AND SAIT, S.M. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. **Molecular Ecology**, v.11, p.547-555, 2002.
- BURGES, H.D.; CROIZER, G. AND HUBER, L. A review of safety tests on baculoviruses. **Entomophaga**, v.25, p.329-340, 1980.
- CASADEVALL, A. AND PIROFSKI, L.A. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **Journal of Infectious Diseases**, v.184, p.337-344, 2001.
- CHEN, X.; IJKEL, W.F.J.; TARCHINI, R.; SUN, X.; SANDBRINK, H.; WANG, H.; PETERS, S.; ZUIDEMA, D.; LANKHORST, R.K.; VLAK, J. AND HU, Z. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Journal General Virology**, v.82, p.241-257, 2001.
- CHEN, X; ZHANG, W.J.; WONG, J.; CHUN, G.; LU, A.; MCCUTCHEN, B.F.; PRESNAIL, J.K.; HERRMANN, R.; DOLAN, M.; TINGEY, S; HU, Z. H. AND VLAK, J.M. Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. **Journal of General Virology**, v.83, p.673-684, 2002.
- CORY, J.S. AND MYERS, J.H. The ecology and evolution of insect baculoviruses. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.34, p.239-272, 2003.
- CORY, J.S.; GREEN, B.M.; PAUL, R.K.; HUNTER-FUJITA, F. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. **Journal Invertebrate Pathology**, v.89, p.101-111, 2005.
- CUNNINGHAM, J.P. AND ZALUCKI, M.P. Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: What is a host plant? **Journal of Economic Entomology**, v.7, p.881-896, 2014.

CUMMING, G.S. AND SPIESMAN, B.J. Regional problems need integrated solutions: pest management and conservation biology in agroecosystems. **Biological Conservation**, v.131, p.533-543, 2006.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O. AND CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.43, p110-113, 2013.

DUAN, L.Q.; OTVOS, I.S.; XU, L.B.; CONDER, N.; AND WANG, Y. Field testing chinese and japanese gypsy moth nucleopolyhedrovirus and disparivirus against a chinese population of *Lymantria dispar asiatica* in Huhhot, inner Mongolia, people's republic of China. **Journal of Economic Entomology**, v.105, p.344-353, 2012.

EBLING, P.M., OTVOS, I.S. AND CONDER, N. Comparative activity of three isolates of LdMNPV against two strains of *Lymantria dispar*. **Canadian Journal of Entomology**, v.136, p.737-747, 2004.

FIGUEIREDO, E.; MUÑOZ, D.; MURILLO, R.; MEXIA, A. AND CABALLERO, P. Diversity of Iberian nucleopolyhedrovirus wild-type isolates infecting *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.50, p.43-49, 2009.

FITT, G.P. The ecology of *Heliiothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v.34, p.17-52, 1989.

FUXA, J.R.; SUN, J.Z.; WEIDNER, E.H. AND LAMOTTE, L.R. Stressors and rearing diseases of *Trichoplusia ni*: evidence of vertical transmission of NPV and CPV. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.74, p.149-155, 1999.

GUNNING, R.V.; DANG, H.T.; KEMP, F.C.; NICHOLSON, I.C. AND MOORES, G.D. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2558-2563, 2005.

GOMEZ, S.A.; MOSCARDI, F. AND SOSA-GÓMEZ, D.R. Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.9, p.1539-1544, 1999.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C. AND DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.488-497, 1976.

HARRISON, R.L.; KEENA, M.A. AND ROWLEY, D.L. Classification, genetic variation and pathogenicity of *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus isolates from Asia, Europe, and North America. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.116, p.27-35, 2014.

HUGHES, D.S.; POSSEE, R.D. AND KING, L.A. Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insects. **Virology**, v.194, p.608-15, 1993.

KHURAD, A.M.; MAHULIKAR, A.; RATHOD, M.K.; RAI, M.M.; KANGINAKUDRU, S. AND NAGARAJU, J. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.87, p.8-15, 2004.

KUKAN, B. Minireview. Vertical Transmission of Nucleopolyhedrovirus in Insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.74, p.103-111, 1999.

KUTINKOVA, H.; SAMIETZ, J.; DZHUVINOV, V.; ZINGG, D. AND KESSLER, P. Successful application of the Baculovirus product Madex® for control of *Cydia pomonella* (l.) in Bulgaria. **Journal of Plant Protection Research**, v.52, p.205-212, 2012.

LEITE, N.A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I. AND OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **Plos one**, v.9, p.1-9, 2014.

LIU, F.; XU, Z.; ZHU, Y.C.; HUANG, F.; WANG, Y.; LI, H.; GAO, C.; ZHOU, W. AND SHEN, J. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, v.66, p.155-161, 2010.

LUO, S.; NARANJO, S.E. AND WU, K. Biological control of cotton pests in China. **Biological Control**, v.68, p.6-14, 2014.

MATTHEWS, H.; SMITH, I. AND EDWARDS, J. Lethal and sublethal effects of a granulovirus on the tomato moth *Lacanobia oleracea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.80, p.73-80, 2002.

MAZZI, D. AND DORN, S. Movement of insect pests in agricultural landscapes. **Annals of Applied Biology**, v.160, p.97-113, 2012.

MCCAFFERY, A.R. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.353, p.1735-1750, 1998.

MILKS, L.C. 1997. Comparative biology and susceptibility of *Cabbage looper* (Lepidoptera: Noctuidae) lines to a nuclear polyhedrosis virus. **Environmental Entomology**, v.26, p.839-848.

MURÚA, M.G.; SCALORA, F.S.; NAVARRO, F.R.; CAZADO, L.E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M.E.; LOBOS, E. AND GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist**, v.97, p.854-856, 2014.

MUÑOZ, D. AND CABALLERO, P. Persistence and effects of parasitic genotypes in a mixed population of the *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. **Biological Control**, v.19, p.259-264, 2000.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.44, p.257-289, 1999.

OGEMBO, G.; KUNJEKU, E.C. AND SITHANANTHAM, S. A preliminary study on the pathogenicity of two isolates of nucleopolyhedroviruses infecting African bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, v.25, p.218-222, 2005.

O'REILLY, D. R, MILLER, L. K AND LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors**: A laboratory manual. New York: W H Freeman and Co, 347 pp. 1992.

PAVAN, O.H.; BOUCIAS, D.G. AND PENDLAND, J.C. The effects of serial passage of a nucleopolyhedrosis virus through an alternate host system. **Entomophaga**, v.26, p.99-108, 1989.

RAKSHIT, O.; JALALI, S.K.; SHIVALINGASWAMY, T.M.; BHATNAGAR, R. AND ASHIKA, T.R. 2014. *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus strain Faridkot late expression factor 9 gene, partial cds. **Direct Submission**. Submitted (09-AUG-2014). Division of Insect Systematics, National Bureau of Agriculturally Important Insects, Hebbal, Bangalore, Karnataka 560024, India. Manuscrito não publicado.

RAYMOND, B.; SAYYED, A.H. AND WRIGHT, D.J. The compatibility of a nucleopolyhedrovirus control with resistance for *Bacillus thuringiensis*: coinfection and cross resistance studies with the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.93, p.114-120, 2006.

ROLLIE, J.C.; PASSARELLI, A.L. AND RICHARD, C. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. **Plos Pathogens**, v.9, n.11, 2013.

ROVESTI, L.; CROOK, N.E. AND WINSTANLEY, D. Biological and biochemical relationships between the nucleopolyhedroviruses of *Mamestra brassicae* and *Heliothis armigera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.75, p.2-8, 2000.

ROWLEYA, D.L.; POPHAMB, H.J.R. AND HARRISON, R.L. Genetic variation and virulence of nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.107, p.112-126, 2011.

ROWLEY, D. L.; FARRAR JR., R. R.; BLACKBURN, M. B. AND HARRISON, R. L. Genetic and biological variation among nucleopolyhedrovirus isolates from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Virus Genes**, v.40, p.458-468, 2010.

SPECHT, A., SOSA-GÓMEZ, D.R., DE PAULA-MORAES S.V., AND SILVIA, Y. A.C. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.689-692, 2013.

TABASHNIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.J. AND CARRIERE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p.2011-2025, 2009.

TANG, P.; ZHANG, H.; LI, Y.; HAN, B.; WANG, G.; QIN, Q. AND ZHANG, Z. Genomic sequencing and analyses of HearMNPV a new multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolated from *Helicoverpa armigera*. **Virology Journal**, v.9, p.168, 2012.

TAKATSUKA, J.; OKUNO, S.; ISHII, T.; NAKAI, M. AND KUNIMI, Y. Host range of two multiple nucleopolyhedroviruses isolated from *Spodoptera litura*. **Biological Control**, v.41, p.264-271, 2007.

TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T.; ANDERSON, C.; AND DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS ONE**, v.134, p.1-7, 2013.

VILAPLANA, L.; WILSON, K.; REDMAN, E.M. AND CORY, J.S. Pathogen persistence in migratory insects: high levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm. **Evolutionary Ecology**, v.24, p.147-160, 2010.

WYCKHUYS, K.A.G.; LU, Y.; MORALES, H., VAZQUEZ, L.L.; LEGASPI, J.C.; ELIOPOULOS, P.A. AND HERNANDEZ, L.M. Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. **Biological Control**, v.65, p.152-167, 2013.

YANG, Y., LI, Y., AND WU, Y. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. **Journal of Economic Entomology**, v.106, p.375-381, 2013.

ZHOUA, M.; SUN, X.; SUN, X.; VLAK, J.M.; HU, Z. AND VAN DER WERF, W. Horizontal and vertical transmission of wild-type and recombinant *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.89, p.165-175, 2005.

ZHANG, H.; YANG, Q.; QIN, Q.L.; ZHU, W.; ZHANG, Z.F.; LI, Y.N.; ZHANG, N. AND ZHANG, J.H. Genomic sequence analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus isolated from Australia. **Archives of Virology Journal**, v.159, p.595-601, 2014.