

**Identificação Morfológica e
Avaliação da Infectividade de
Isolados Virais em Lagartas de
Chrysodeixis includens e em
Cultivos de Células de Insetos**



Foto: Elita Castro

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 328

Identificação Morfológica e Avaliação da Infectividade de Isolados Virais em Lagartas de *Chrysodeixis includens* e em Cultivos de Células de Insetos

Regio Araujo da Costa
Luis Arthur Versiane Moura Santos
Zilda Maria de Araújo Ribeiro
Saluana Rocha Craveiro
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes
Carlos Marcelo Silveira Soares
Maria Elita Batista de Castro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2017

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372 – Brasília, DF – Brasil – CEP: 70770-917
Fone: (61) 3448-4700 / Fax: (61) 3340-3624
Home page: <http://www.cenargen.embrapa.br/>
E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretária-Executiva: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols
 Lígia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosamares Rocha Galvão
Suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes
 João Batista Tavares da Silva

Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Editoração eletrônica e tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Identificação morfológica e avaliação da infectividade de isolados virais em lagartas de *Chrysodeixis includens* e em cultivos de células de insetos. / Maria Elita Batista de Castro ... [et al.] – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017. 30 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 328).

1. *Chrysodeixis includens*. 2. Controle biológico. I. Costa, Regio Araujo da. II. Santos, Luis Arthur Versiane Moura. III. Ribeiro, Zilda Maria de Araújo. IV. Craveiro, Saluana Rocha. V. Gomes, Ana Cristina Meneses Mendes. VI. Soares, Carlos Marcelo Silveira. VII. Castro, Maria Elita Batista de. VIII. Série.

632.96 – CDD 21

Sumário

Resumo.....	.05
Abstract.....	.07
Introdução.....	.09
Material e Métodos.....	.12
Resultados e Discussão.....	.19
Conclusões.....	.25
Referências Bibliográficas.....	.26

Identificação Morfológica e Avaliação da Infectividade de Isolados Virais em Lagartas de *Chrysodeixis includens* e em Cultivos de Células de Insetos

*Regio Araujo da Costa*¹

*Luis Arthur Versiane Moura Santos*²

*Zilda Maria de Araújo Ribeiro*³

*Saluana Rocha Craveiro*⁴

*Ana Cristina Meneses Mendes Gomes*⁵

*Carlos Marcelo Silveira Soares*⁶

*Maria Elita Batista de Castro*⁷

Resumo

A lagarta *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) tem causado grandes prejuízos econômicos a várias culturas, como soja, algodão, feijão e tomate. Com o intuito de identificar isolados virais de alta patogenicidade para uso no controle dessa praga, este trabalho teve como objetivo identificar e avaliar a atividade biológica in vivo e in vitro de quatro isolados virais de lagartas de *C. includens* infectadas por vírus, coletadas de plantações de soja e algodão de Mato Grosso, MT, Brasil. A morfologia ultraestrutural de partículas virais purificadas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). As análises mostraram corpos de oclusão poliédricos (OBs), caracterizados pela presença de sua principal proteína estrutural, poliedrina (~ 33kDa),

confirmada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Todos os quatro isolados virais exibiram corpos de oclusão com vírions contendo um único nucleocapsídeo por envelope (single:SNPV). Essas observações confirmam que as partículas são nucleopolyhedrovirus (NPV) pertencente ao gênero *Alphabaculovirus* e família *Baculoviridae*. As amostras virais foram, portanto, nomeadas como *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus (ChinNPV), e os isolados designados como ChinNPV-MT.A, ChinNPV-MT.B, ChinNPV-MT.C, ChinNPV-MT.D. Bioensaios realizados em triplicata com esses isolados virais determinaram que ChinNPV-MT.B é o mais virulento entre os quatro isolados testados para larvas de *C. includens*, com uma concentração letal média (CL₅₀) de 5.305 OBs/mL. Na concentração de 1,6 x 10⁵ OBs/ml de dieta, ChinNPV-MT.B foi capaz de causar 100% de mortalidade de larvas com um tempo médio de morte (TM) de 6,1 dias. Análises de infectividade in vitro demonstraram que o isolado ChinNPV-MT.B também foi capaz de infectar e produzir poliedros (OBs) em células Tn5B1-4 e SF-21AE, sendo que a primeira linhagem foi a mais produtiva.

Termos para indexação: *Chrysodeixis includens* NPV, identificação taxonômica, infectividade viral, linhagens celulares de insetos, potencial biológico.

¹ Graduando em Ciências Biológicas pelo UniCEUB, bolsista do CNPq (PIBIC), Brasília, DF

² Graduando em Ciências Biológicas pelo UniCEUB, estagiário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

³ Bióloga, mestra, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁴ Bióloga, doutora, bolsista do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), Brasília, DF

⁵ Bióloga, mestra, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

⁶ Engenheiro-agrônomo, doutor, pesquisador do Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMAmt), Mato Grosso, MT

⁷ Bióloga, doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Morphological Identification and Evaluation of the Infectivity of Viral Isolates to the Soybean Looper (*Chrysodeixis includens*) and Insect Cell Cultures

Abstract

The caterpillar *Chrysodeixis includens* has caused great economic damage to various crops, such as soybeans, cotton, beans and tomatoes. In order to identify viral isolates of high pathogenicity for use for control of this pest, this work aimed to identify and evaluate the in vivo and in vitro biological activity of four viral isolates from *C. includens* larvae infected by viruses, collected from soybean and cotton plantations in Mato Grosso-MT, Brazil. The ultrastructural morphology of purified viral particles was analyzed by transmission electron microscopy (TEM). The analysis showed polyhedral occlusion bodies (OBs), characterized by the presence of its main structural protein, polyhedrin (~33kDa), confirmed on denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE). All four viral isolates exhibited occlusion bodies with virions containing a single nucleocapsid per envelope (single: SNPV). These observations confirm that the particles are nucleopolyhedrovirus (NPV) belonging to the genus *Alphabaculovirus* and family *Baculoviridae*. The viral samples were therefore named Chrysodeixis

includens nucleopolyhedrovirus (ChinNPV) and the isolates were designated as ChinNPV-MT.A, ChinNPV-MT.B, ChinNPV-MT.C, and ChinNPV-MT.D. Bioassays performed in triplicate with these viral isolates determined that ChinNPV-MT.B is the most virulent among the four tested isolates to *C. includens* larvae, with a mean lethal concentration (LC₅₀) of 5,305 OBs/mL. At the concentration of 1.6×10^5 OBs/ml diet, ChinNPV-MT.B was able to cause 100% mortality of larvae with a mean time to death (TD) of 6.1 days. In vitro infectivity analyses demonstrated that the ChinNPV-MT.B isolate was also able to infect and produce polyhedra (OBs) in Tn5B1-4 and SF-21AE cells, where the former line was the most productive.

Index terms: *Chrysodeixis includens* NPV, taxonomic identification, viral infectivity, insect cell lines, biological potential.

Introdução

A lagarta *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) é uma espécie de inseto considerada praga agrícola de ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Norte dos Estados Unidos até o Sul da América do Sul e a Austrália (CABI, 2014). É conhecida popularmente como lagarta falsa-medideira devido ao seu deslocamento dobrando o corpo em movimentos do tipo “mede-palmo”. Dentre suas características, possuem três pares de falsas pernas na região abdominal; coloração verde-clara, com listras longitudinais esbranquiçadas e pontuações pretas; fase larval com duração entre 13 a 20 dias, podendo chegar até o 6º instar, atingindo de 40 a 45 mm de comprimento; e capacidade de uma única fêmea depositar de 500 a 1300 ovos (MOSCARDI et al., 2012). Essa espécie foi por muito tempo chamada de *Pseudoplusia includens*, sendo essa nomenclatura revisada e o gênero *Pseudoplusia* reclassificado para *Chrysodeixis* (GOATER et al., 2003; MOSCARDI et al., 2012).

Esse inseto é polífago e pode se alimentar de até 174 espécies de plantas de 39 famílias diferentes (SPECHT et al., 2015), envolvendo várias culturas de importância econômica, em que se destacam, no Brasil, soja, algodão, feijão e tomate. Nos últimos anos, esse inseto-praga tem se tornado um sério problema na cultura de soja no Brasil, com ocorrência em diversas regiões, do Rio Grande do Sul até Roraima, exigindo controle na maioria das safras de crescimento da soja (MARSARO JUNIOR et al., 2010; MOSCARDI et al., 2012; SPECHT et al., 2015).

A lagarta falsa-medideira tem grande capacidade de desfolha e pode consumir até 200 cm² de área foliar da soja, porém não consome as nervuras, o que confere à folha atacada um aspecto rendilhado (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; BUENO et al., 2007). Até o final da década de 1990, essa lagarta foi considerada praga secundária na soja, pois era mantida sob controle pela presença de inimigos naturais

(predadores, parasitoides e patógenos). Entretanto, após as safras de 2000/2001 e 2001/2002, com o surgimento da ferrugem asiática, o intenso uso de fungicidas para seu controle contribuiu para um desequilíbrio no sistema de produção da soja, resultando em surtos frequentes de *C. includens* em altos níveis populacionais (MOSCARDI et al., 2012). Desde então, essa praga se tornou primária e tem causado danos econômicos em praticamente todas as últimas safras de lavouras de soja, requerendo cuidados durante todo o período de desenvolvimento das plantas (TOMQUELSKI et al., 2015; MARTINS; TOMQUELSKI, 2015).

Diferentes métodos de controle desse inseto no Brasil têm sido propostos, porém observa-se um período de transição entre a utilização de inseticidas químicos, o uso de soja geneticamente modificada e o controle biológico em programas de manejo integrado de pragas (BESPALHOK FILHO et al., 2012; BERNARDI, 2012; PALMA et al., 2015). Nesse contexto, é interessante que sejam desenvolvidas estratégias mais eficazes para o controle dessa praga e menos nocivas para o meio ambiente e os seres humanos. Assim, inseticidas à base de baculovírus são uma alternativa para controlar *C. includens*, além de serem fortes aliados para superar os problemas relacionados com a redução dos inimigos naturais e a possível resistência a inseticidas químicos (BUENO et al., 2007).

Baculovírus são um grupo de vírus de ocorrência natural capazes de infectar mais de 700 espécies de insetos (HERNIOU et al., 2003). Esses vírus recebem esse nome devido às partículas infectivas estarem envelopadas em forma de bastão (FRIESEN, 2007) e taxonomicamente pertencem à família *Baculoviridae*, que está dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus*, respectivamente nucleopolyhedrovirus (NPV) e granulovirus (GV), que infectam insetos da ordem Lepidoptera; e *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus*, vírus que infectam himenópteros e dípteros, respectivamente (HERNIOU et al., 2012). Os NPVs podem apresentar apenas um nucleocapsídeo por envelope (SNPV: single nucleopolyhedrovirus) ou

vários (MNPV: multiple nucleopolyhedrovirus) por corpo de oclusão. Os membros dessa família têm um genoma de DNA de dupla-fita, circular, variando de 80-180 Kb e possuem 38 core genes, que são altamente conservados em todos baculovírus até então sequenciados (GARAVAGLIA et al., 2012; JAVED et al., 2017).

O ciclo infectivo desses vírus produz dois fenótipos: vírions derivados de oclusão (ODV, do inglês “occlusion-derived virus”), responsáveis pela infecção oral e que estão ocluídos em um corpo cristalino proteico, chamado de corpo de oclusão (OB, do inglês “occlusion body”); e vírions brotados (BV, do inglês “budded virus”), também chamados de vírus extracelulares, que são responsáveis pela propagação da infecção célula a célula pelo corpo do hospedeiro (infecção sistêmica) e pela infecção em cultivos celulares de inseto. Em infecção in vitro, similar em sistemas de infecção in vivo, as duas formas virais são produzidas (ODV e BV). Os ODVs são encontrados no núcleo das células, e os vírus extracelulares (BV) na hemolinfa de insetos infectados ou no sobrenadante de células de insetos infectadas (BILIMORIA, 1991; CASTRO et al., 1999; ROHRMANN, 2013; CLEM; PASSARELLI, 2013).

O desenvolvimento de estudos e processos visando a aplicações biotecnológicas de baculovírus tem atingido grande importância e interesse no que se refere ao uso dos baculovírus como agentes de controle biológico, vetores de expressão para produção de proteínas heterólogas e vetores de terapia gênica.

Os baculovírus têm alto potencial para o controle biológico, pois são específicos e possuem alta infectividade em seus hospedeiros, oferecendo segurança aos humanos e compatibilidade com outros inimigos naturais. Esses vírus, quando utilizados de forma adequada, controlam eficientemente insetos-praga no campo sem poluir nascentes, rios, além de não ser tóxico aos aplicadores (VALICENTE; TUELHER, 2009; MOSCARDI et al., 2011). Essas vantagens têm também proporcionado e facilitado o desenvolvimento de bioprocessos

para agregação de valor ao produto final, embora a multiplicação viral em ambos os sistemas de infecções in vivo e in vitro apresentem diversas limitações para atender a produção de baculovírus em escala comercial.

Devido à recente importância econômica de *C. includens* em diversas culturas agrícolas, iniciativas têm sido implementadas no sentido da realização de estudos visando avaliar o potencial de uso de baculovírus como um inseticida biológico no combate à praga.

Com esse enfoque, estudos de caracterização de isolados de *Chrysodeixis includens* NPV vêm sendo realizados no Laboratório de Virologia de Insetos - CENARGEN com o intuito de dar suporte à pesquisa e ao desenvolvimento de formulações biopesticidas.

Este trabalho teve como objetivo selecionar isolados virais com base em resultados obtidos de análises morfológica e infectividade viral em larvas de *C. includens* e em diferentes linhagens celulares de insetos.

Material e Métodos

Isolados virais

Os isolados virais foram obtidos a partir de lagartas mortas de *C. includens* infectadas com baculovírus, coletadas em plantações de soja e algodão em campos experimentais do Instituto Mato-Grossense do Algodão – IMAmt, em Primavera do Leste, no estado do Mato Grosso, e cedidas por Carlos Marcelo S. Soares (IMAmt). Esses isolados foram conduzidos para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e depositados na Coleção de Vírus de Invertebrados (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus (ChinNPV).

Isolados virais	Nº de Acesso/CVI	Inseto Hospedeiro	Data de Coleta	Local de Coleta (*)	Cultura	Instituição
ChinNPV-MT.A	BRM 028529 CVI 114	<i>Chrysodeixis includens</i>	14/01/2014	Primavera do Leste - MT	Soja	IMAmt
ChinNPV-MT.B	BRM 028530 CVI 115	<i>Chrysodeixis includens</i>	17/01/2014	Primavera do Leste - MT	Soja	IMAmt
ChinNPV-MT.C	BRM 028711 CVI 119	<i>Chrysodeixis includens</i>	31/03/2014	Primavera do Leste - MT	Soja	IMAmt
ChinNPV-MT.D	BRM 028712 CVI 120	<i>Chrysodeixis includens</i>	29/05/2014	Primavera do Leste - MT	Algodão	IMAmt

(*) Área Experimental do IMAmt em Primavera do Leste, MT.

Linhagens celulares de insetos

Quatro linhagens celulares de insetos foram utilizadas para os testes de infecção in vitro: BTI-Tn-5B1-4 – *Trichoplusia ni* (GRANADOS et al., 1994); IPLB-SF-21AE – *Spodoptera frugiperda* (VAUGHN et al., 1977); Sf9 – *Spodoptera frugiperda* (SUMMERS; SMITH, 1988); e UFL-AG-286 – *Anticarsia gemmatalis* (SIEBURTH; MARUNIAK, 1988). Para o cultivo celular, utilizou-se o meio TNMFH suplementado com soro bovino fetal 10%, exceto para a linhagem UFLAG 286, em que foi utilizado o meio de cultura TC100.

Criação e manutenção de colônia de *C. includens*

A criação de *C. includens* teve início a partir de 35 pupas cedidas pelo Dr. Fernando H. Valicente (Embrapa Milho e Sorgo – MG) ao Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e posteriormente teve continuidade com a utilização de pupas enviadas por Dr. Bráulio Santos (Universidade Federal do Paraná – UFPR). As pupas foram mantidas em gaiolas de tubos PVC (30 cm de diâmetro e 40 cm de altura) revestidos internamente por papel toalha e cobertos com tecido *voile* sob

condições controladas de temperatura ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14 h) (Figura 1A). Durante a emergência das mariposas, foram colocados na gaiola copos plásticos de 50 mL com um chumaço de algodão embebido em uma solução de 10% de mel, 0,1 g de ácido sórbico e 90 mL de água destilada (HOFFMANN-CAMPO et al., 1985). Após o aparecimento das posturas, o papel toalha foi removido e acondicionado em um pote de 2 litros com um cubo de dieta artificial (cerca de 5x5 cm) (GREENE et al., 1976) até a eclosão das larvas. Posteriormente, a dieta com as larvas eclodidas foi transferida para potes menores e feita a reposição de nova dieta no pote anterior (2 litros) (Figura 1B). Para a manutenção da colônia, larvas em 4º instar foram colocadas em copos plásticos de 50 mL (3 a 4 larvas/copo), contendo cubos de aproximadamente 2x2 cm de dieta artificial e monitoradas até a formação de pupas (Figura 1C). Todo o ciclo de desenvolvimento e manutenção da colônia de insetos foi mantido sob condições controladas de temperatura, umidade e fotoperíodo, conforme já descritas.

Multiplicação de partículas virais

Lagartas de *C. includens* de 4º instar foram utilizadas para multiplicação e obtenção de poliedros. Foi preparada dieta artificial segundo Greene et al. (1976), sendo nela incorporada o vírus na concentração de 1×10^5 OBs/mL de dieta, distribuindo-se cerca de 10 mL em copos plásticos (50 mL), nos quais foram colocadas 5 larvas por copo. As lagartas foram mantidas em BOD sob temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. Os experimentos foram monitorados diariamente para coleta das lagartas mortas, armazenamento a -20°C e posterior purificação de partículas virais.



Figura 1. Estabelecimento da colônia de *Chrysodeixis includens* (lagarta falsa-medideira) e infecção de insetos por *Chrysodeixis includens* NPV. 1A: criação de insetos; 1B: lagartas infectadas e purificação viral; 1C: multiplicação de vírus e testes de patogenicidade (bioensaios).

Coleta de hemolinfa (inóculo)

Larvas de *C. includens* no 4º instar foram infectadas com cada isolado viral separadamente, e no quarto dia após a infecção dessas larvas,

período em que a quantidade de partículas extracelulares (BV: *budded virus*) é alta e a larva continua viva, a hemolinfa foi coletada das larvas. Alíquotas de 500 μL de hemolinfa foram colocadas em tubos de microcentrífuga, mantidos no gelo, contendo 450 μL de meio TNMFH ou TC-100 (Gibco) sem soro e 50 μL de cisteína (concentração final de 0,01 M), totalizando 1 mL. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 segundos, e o sobrenadante coletado foi filtrado em filtro Millipore 0,45 μL , sendo em seguida adicionado às células de inseto em cultivo, conforme o protocolo descrito neste trabalho no tópico a seguir.

Ensaio de infectividade viral in vitro

Células na densidade de 2×10^5 células /poço foram semeadas em placas de 6 poços, incubadas *overnight*. Para infecção das células 500 μL do inóculo (hemolinfa) foram adicionados e, após 1 hora de adsorção do vírus, o sobrenadante foi removido e, após lavagem 1x em meio de cultura sem soro, foram adicionados 2 mL de meio de cultura completo. Os sistemas de infecção foram incubados a 27°C e acompanhados diariamente por microscopia óptica, e os efeitos citopáticos foram fotografados, registrados e analisados a partir de 3 dias pós-infecção. BVs foram coletados 72 horas pós-infecção (hp.i.) e utilizados como inóculo para as infecções seguintes.

Purificação de partículas virais (OBs)

Larvas infectadas ou mortas pelo vírus foram maceradas em água destilada, filtradas em camadas de gaze e a suspensão obtida foi submetida à centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em água destilada e tratado com SDS (dodecil sulfato de sódio) a uma concentração final de 0,5%, com agitação magnética por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado de novo (10.000 rpm/15 minutos). O *pellet* obtido foi ressuspenso em água Milli-Q autoclavada e centrifugado

nas mesmas condições anteriores. Desta vez, o *pellet* foi ressuspenso em água Milli-Q autoclavada e armazenado a -20°C .

Contagem de partículas OBs (poliedros)

Para estimativa da concentração viral, os estoques foram diluídos em água 200-500x e contados por microscopia ótica em câmara de Neubauer, utilizando-se campos de contagem com área de $0,04\text{ mm}^2$. Os 4 campos laterais e o campo central foram contados, descartando-se os poliedros que estavam na parte esquerda e inferior dos quadrantes. O somatório da contagem dos quadrantes foi multiplicado pelo fator de correção da câmara (5×10.000) e pelo fator de diluição. Para determinação da concentração viral (OBs/mL), foi calculada a média do somatório das contagens do número de poliedros dos dois lados do hemacitômetro e esta adicionada na seguinte fórmula (MORAES; ALVES, 1986):

$$\text{Concentração viral (OBs/mL)} = \text{Média (5 campos)} \times 5 \times 10^4 \times \text{fator de diluição}$$

Microscopia eletrônica de transmissão

Para a microscopia eletrônica de transmissão, os OBs purificados foram fixados em solução contendo glutaraldeído 2,5% e 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2) e mantidos a 4°C por cerca de 24 horas. Em seguida, os OBs foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% e 0,1 M de tampão cacodilato de sódio (pH 7,2), por 1 hora. Após a fixação, as amostras foram imersas em acetato de uranila 0,5% (contrastação in bloc), durante 24 horas a 4°C , desidratadas em série gradual de etanol e, logo depois, as amostras foram embebidas em resina de Epon 812[®], pelo protocolo do fabricante. Secções ultrafinas foram obtidas com 40 nm em grades de cobre cobertas com Formvar[®], ao ultramicrotomo Leica, corados com acetato de uranila 5% por 1 hora, em condições escuras, analisadas e fotodocumentadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, modelo EM 109).

Eletofórese em gel de poliacrilamida desnaturante – SDS

Partículas OBs provenientes das diferentes infecções foram preparadas em tampão amostra (2X: 125 mM de Tris-HCl pH 6,7; 30% de glicerol; 4% de SDS; 0,002% de *bromophenol blue* e 10% de β -mercaptoetanol), fervidas por 5 min, resfriadas em gelo por 15 min, e submetidas à eletrofórese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 16%. O gel foi corado (*Coomassie Brilliant Blue* R-250 0,05%, metanol 40%, ácido acético 7,5% e água destilada), por 2 h, e em seguida descorado (metanol 40%, ácido acético 7,5% e água destilada) por 1 h e 30 min e, então, fotografado.

Bioensaios

Para avaliação do potencial biológico de quatro isolados virais, bioensaios foram realizados utilizando-se dieta artificial (GREENE et al., 1976) sem formol (VAIL et al., 1968), e suspensão viral incorporada na dieta de acordo com os procedimentos descritos por Morales e Moscardi (1993). De cada isolado viral, três concentrações foram testadas: 2.500, 10.000 e 160.000 OBs/mL de dieta, mediante a exposição de 40 larvas de terceiro instar por tratamento (2 larvas/copo de 50 mL). Os bioensaios foram realizados em triplicata e mantidos em câmara BOD sob temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. As larvas foram monitoradas diariamente até a morte ou atingirem o estágio de pupa. Logo após a morte, as larvas foram coletadas, contadas e armazenadas a -20°C . Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit (FINNEY, 1971) para o cálculo dos valores de concentração letal média (CL_{50}) e parâmetros associados (limites de confiança e regressão). A média do tempo de morte (TM) foi calculada de acordo com o protocolo de Morales et al. (2001).

Resultados e Discussão

O procedimento para criação de *C. includens* foi estabelecido conforme descrito em materiais e métodos. Observações foram feitas durante o desenvolvimento da criação, confirmando dados similares aos descritos na literatura (CARVALHO et al., 2012; MOSCARDI et al., 2012), tais como: desenvolvimento embrionário larval de cerca de 2,5 dias; período larval de aproximadamente 12 a 15 dias, em que ocorrem mudanças de coloração da larva nos diferentes instares, e após seis instares ela se transforma em pupa; período de pupa de 9 a 12 dias até a emergência de adultos. Ao final da 5ª geração da colônia, foram adicionadas novas pupas para evitar declínio populacional por endocruzamentos.

Análise morfológica

Cortes transversais e longitudinais das partículas virais encontradas em larvas de *C. includens*, obtidos pelo uso de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, evidenciaram estruturas com formas poliédricas contendo vários vírions com um único nucleocapsídeo por envelope (single nucleopolyhedrovirus: SNPV), formando corpos de oclusão (OBs) (Figura 2). De acordo com a taxonomia da família *Baculoviridae* (HERNIOU et al., 2012), os quatro isolados virais analisados neste estudo são, portanto, NPVs pertencentes ao gênero *Alphabaculovirus*, similares aos sete isolados de *Chrysodeixis includens* *single nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) classificados em estudos anteriores (CRAVEIRO et al., 2010, 2015, 2016). Esses isolados virais foram então denominados ChinNPV-MT.A, ChinNPV-MT.B, ChinNPV-MT.C e ChinNPV-MT.D, tendo sido adicionado MT por serem provenientes do estado do Mato Grosso.

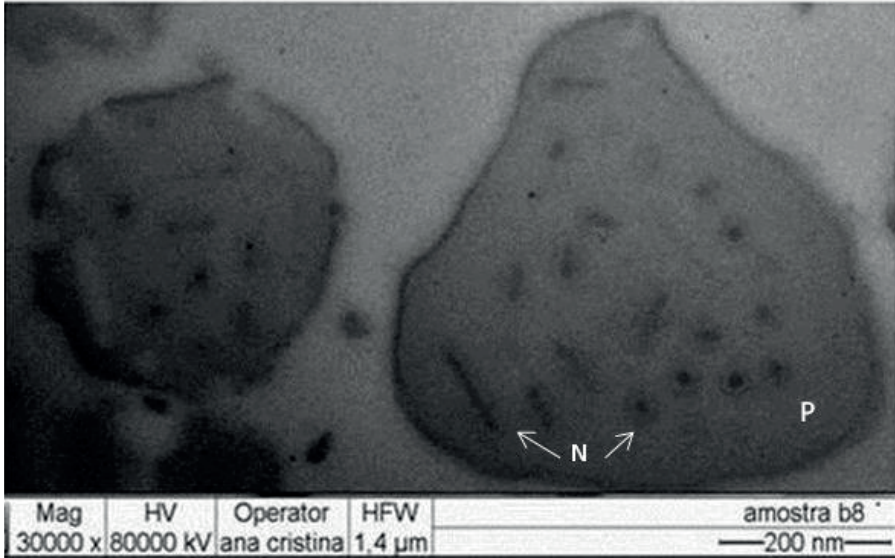


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de corpos de oclusão (OBs: poliedros) de um isolado de *Chrysodeixis includens single nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) mostrando vírions contendo um único N: nucleocapsídeo por envelope. N: nucleocapsídeo - cortes: longitudinal (esquerda) e transversal (direita). P: poliedrina.

Análise de infectividade viral em linhagens celulares de insetos

Os isolados ChinNPV-MT.B e ChinNPV-IE, considerados mais virulentos a lagartas de *C. includens*, foram testados em quatro linhagens celulares de insetos (Tn5B1-4, SF-21AE, Sf9, UFLAG-286) com o objetivo de observar as possíveis alterações quanto ao tamanho e/ou morfologia das células, lise celular semelhante a apoptose e/ou produção de poliedros (Figura 3). Diferentes sinais de infecção nesses sistemas foram observados em microscópio óptico de contraste de fase, exceto a Sf9, que foi considerada não suscetível aos isolados virais testados (Figura 3A).

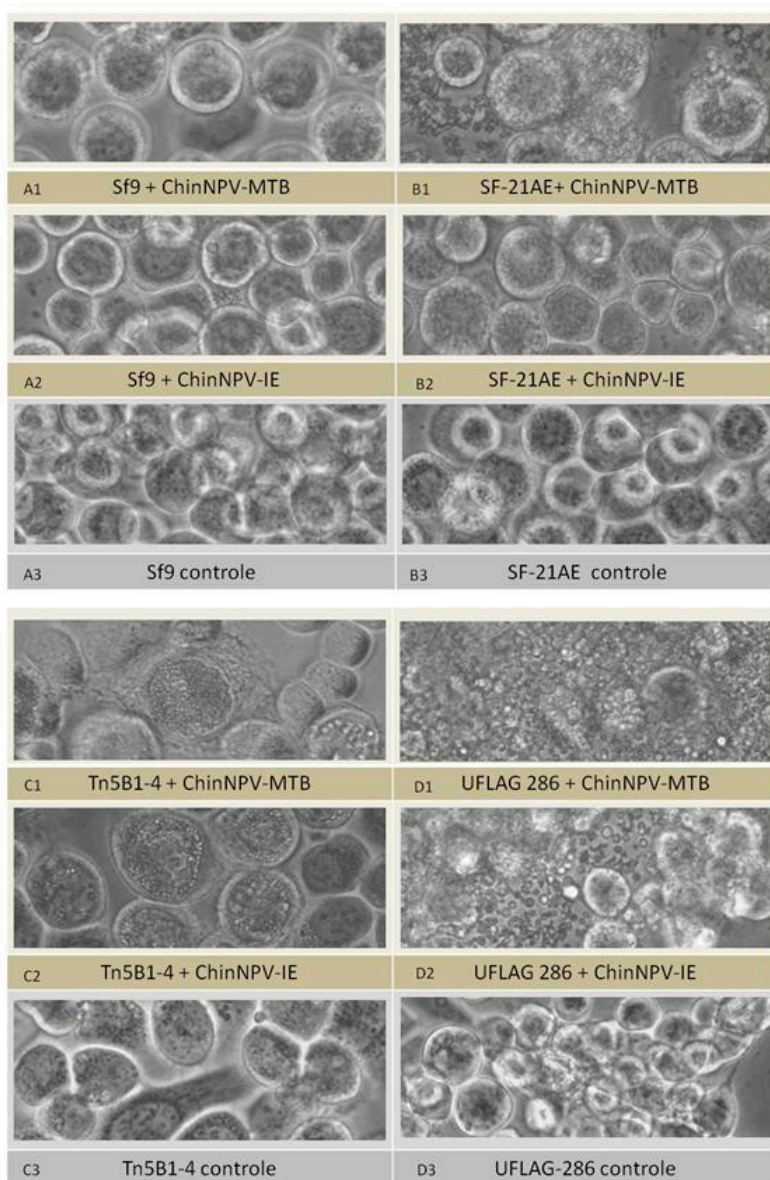


Figura 3. Micrografias de contraste de fase de linhagens celulares de insetos não infectadas e infectadas por isolados de *Chrysodeixis includens* NPV a 72 hp.i. (400x). 1. ChinNPV-MT.B, 2. ChinNPV-IE, 3. Linhagens celulares de insetos - controle.

Células UFLAG-286 apresentaram intensa lise quando infectadas com esses isolados (72 hp.i.) (Figura 3D), sendo esse efeito citopático mais acentuado em sistema de infecção com o isolado ChinNPV-MT.B, embora, comparativamente em células Tn5B1-4, este isolado foi menos infectivo do que o ChinNPV-IE. A linhagem celular Tn5B1-4 foi a mais suscetível (Figura 3C), seguida da SF-21AE (Figura 3B). Os isolados ChinNPV-MT.B e ChinNPV-IE foram capazes de infectar as células Tn5B1-4 e produzir poliedros (OBs). O isolado ChinNPV-IE foi o mais infectivo, 70% do total de células apresentaram sintomas de infecção e 60% exibiram poliedros em seus núcleos (7×10^8 OBs/mL, 144 hp.i.), enquanto o isolado ChinNPV-MT.B causou infecção em 60% do total de células e somente 40% das células continham poliedros ($4,1 \times 10^8$ OBs/mL, 144 hp.i.). A presença de poliedros em células Tn5B1-4 e SF21-AE infectadas foi também confirmada pela detecção da poliedrina (33 kDa) em gel de poli-acrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (Figura 4).

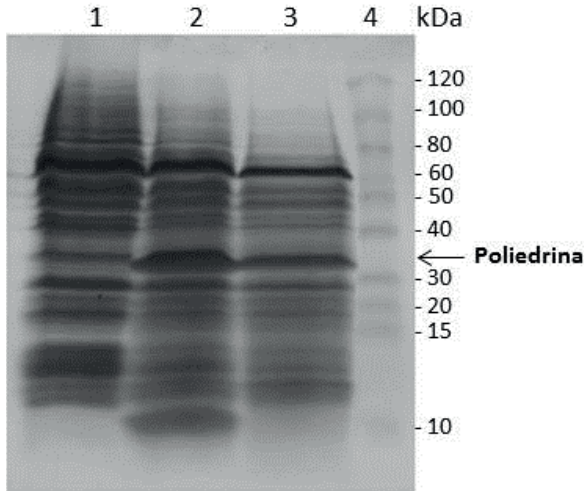


Figura 4. Proteínas de *Chrysodeixis includens* NPV produzidas em células Tn5B1-4 infectadas (144 hp.i.), detectadas por eletroforese em gel de poli-acrilamida desnaturante 16% (SDS-PAGE). 1: Células Tn5B1-4 – controle; 2: Tn5B1-4 com ChinNPV-IE; 3: Tn5B1-4 com ChinNPV-MT.B; 4: Marcador de peso molecular - *BenchMark Protein Ladder* 1 Kb Invitrogen. A seta indica a banda correspondente à poliedrina (~33kDa), proteína estrutural dos corpos de oclusão (poliedros) dos NPVs.

Análise de infectividade viral em insetos – Patogenicidade

Dentre os isolados virais testados quanto à patogenicidade em larvas de *C. includens*, o ChinNPV-MT.B apresentou a menor CL_{50} (5305,1 OBs/mL), seguido de ChinNPV-MT.C, com CL_{50} de 7629,4 OBs/mL (Tabela 2). Os valores de CL_{50} relacionados aos diferentes isolados virais não foram significativos, indicando que os dados eram homogêneos para todos os isolados e ajustados ao modelo de análise Probit utilizado (FINNEY, 1971). Na concentração de $1,6 \times 10^5$ OBs/mL de dieta, o isolado ChinNPV-MT.B foi capaz de causar 100% de mortalidade das larvas e um tempo médio de morte (TM) de 6,1 dias, destacando-se como o mais virulento dentre os quatro isolados aqui analisados. O MT.C nessa mesma concentração levou um tempo médio de morte de 6,6 dias, sendo o segundo menor tempo, mas nas outras concentrações não seguiu um padrão, os isolados MT.A e MT.D tiveram um tempo médio de morte próximos (Tabela 3).

Sete isolados virais de ChinNPV (I-A a I-G) já foram estudados e analisados quanto à infectividade em condições de laboratório (ALEXANDRE et al., 2010), sendo o isolado ChinNPV-IE selecionado como mais patogênico. O presente trabalho veio trazer resultados de outros quatro isolados de ChinNPV, analisados por procedimentos similares, destacando-se o ChinNPV-MT.B como o mais patogênico, embora a CL_{50} seja cerca de 1,8x maior do que a CL_{50} determinada anteriormente para ChinNPV-IE (2.974 OBs/mL). Esses dois isolados estão sendo considerados como um interessante ingrediente ativo para o desenvolvimento de formulação de um protótipo inseticida biológico.

Os isolados testados em laboratório (LVI-Cenargen) foram enviados para o Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMAmt) para serem multiplicados em uma biofábrica construída em Primavera do Leste, MT, onde serão realizados procedimentos de criação massal do hospedeiro sadio, infecção do hospedeiro sadio com os isolados virais, coleta e armazenamento dos insetos infectados e mortos.

Tabela 2. Concentração letal média (CL_{50}) de isolados virais em larvas de *C. includens*.

Isolados	CL_{50}	Limites Fiduciais 95%		Slope \pm SE	χ^2
		Inferior	Superior		
ChinNPV-MT.A	9774,1	5291,8	18053,3	1,093 \pm 0,136	0,951
ChinNPV-MT.B	5305,1	3106,2	9060,7	1,331 \pm 0,119	0,873
ChinNPV-MT.C	7629,4	4646,7	12526,8	1,452 \pm 0,110	0,272
ChinNPV-MT.D	9041,7	5058,8	16160,6	1,174 \pm 0,129	0,526

Tabela 3. Determinação da porcentagem média e tempo médio de morte de larvas de *C. includens* infectadas com *Chrysodeixis includens* NPV.

Isolado viral	OBs/mL de dieta	Mortalidade média (%)	Tempo de morte (dias)
ChinNPV-MT.A	$1,6 \times 10^5$	90,8	7,9
	$1,0 \times 10^4$	50,8	9,9
	$2,5 \times 10^3$	26,7	11,4
ChinNPV-MT.B	$1,6 \times 10^5$	100,0	6,1
	$1,0 \times 10^4$	64,2	8,6
	$2,5 \times 10^3$	33,3	9,8
ChinNPV-MT.C	$1,6 \times 10^5$	98,3	6,6
	$1,0 \times 10^4$	67,5	9,2
	$2,5 \times 10^3$	19,2	10,8
ChinNPV-MT.D	$1,6 \times 10^5$	90,8	8,3
	$1,0 \times 10^4$	65,0	9,0
	$2,5 \times 10^3$	19,2	11,7

Conclusões

A estrutura morfológica dos isolados virais foi caracterizada, confirmando sua forma poliédrica pela evidência de corpos de oclusão (OBs). Os isolados virais foram identificados como nucleopolyhedrovirus (NPV) pertencentes ao gênero *Alphabaculovirus* e espécie *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV).

Análises de infectividade nas diferentes linhagens celulares de insetos evidenciaram Tn5B1-4 como uma linhagem suscetível e produtiva aos isolados ChinNPV-MT.B e ChinNPV-IE. Em infecções em insetos, causadas por isolados provenientes de Mato Grosso, ChinNPV-MT.B foi o mais virulento às lagartas de *C. includens*.

Dentre 11 isolados de *Chrysodeixis includens* NPV, sete analisados em trabalho anterior e quatro no presente trabalho, os isolados ChinNPV-IE (= PsinNPV-IE) e ChinNPV-MT.B foram selecionados para uso como agentes de controle biológico contra *C. includens*.

Agradecimentos

Ao Dr. Fernando Valicente, da Embrapa Milho e Sorgo, MG, e ao professor Dr. Braúlio Santos, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), por terem cedido pupas de *Chrysodeixis includens*.

Ao Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMAmt) pelo apoio financeiro em contrato de Cooperação Técnica formalizado entre Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) e IMAmt.

Referências

ALEXANDRE, T. M.; RIBEIRO, Z. M. A.; CRAVEIRO, S. R.; CUNHA, F.; FONSECA, I. C. B.; MOSCARDI, F.; CASTRO, M. E. B. Evaluation of seven viral isolates as potential biocontrol agents against *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 98-104, 2010.

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BESPALHOK FILHO, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. A. **Plantas transgênicas**. UFPR, 2012. Disponível em: <<http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%20transgenicos.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2013.

BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed). **Viruses of Invertebrates**. New York: Marcel Dekker, p. 1-72, 1991.

BUENO, R. C. O. F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; Di OLIVEIRA, J. R. G.; CAMILLO, M. F. Sem Barreira. **Revista Cultivar**, v. 93, p.12-15, 2007.

CAB International. **Crop Protection Compendium**; 2014; Available: <<http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>>.

CARVALHO, L. C.; FERREIRA, F. M.; BUENO, N. M. Importância

econômica e generalidades para o controle da lagarta falsa-medideira na cultura da soja. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15; p. 1021, 2012.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. *Biologia. Molecular de Baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, p. 1733-1761, 1999.

CLEM, R. J.; PASSARELLI, A. L. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. **PLoS Pathogens**, v. 9, e1003729, 2013.

CRAVEIRO, S. R.; MELO, F. L.; RIBEIRO, Z. M. A.; RIBEIRO, B. M.; BÁO, S. N.; INGLIS, P. W.; CASTRO, M. E. B. *Pseudoplusia includes* single nucleopolyhedrovirus: Genetic diversity, phylogeny, and hypervariability of the pif-2 gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 258-267, 2013.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. **Cambridge Univ. Press**, London, New York, 333 p., 1971.

FRIESEN, P. D. Insect Viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (Eds.). **Fields Virology**: Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed., v. 1. p. 707-736, 2007.

GARAVAGLIA, M. J.; MIELE, S. A.; ISERTE, J. A.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family *Baculoviridae*. **Journal of Virology**, v. 86, p. 12069-12079, 2012.

GOATER, B.; RONKAY, L.; FIBIGER, M. **Noctuidae Europeae**. Soro: Entomological Press, v. 10, n. 11, 452 p., 2003.

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean

caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 487-488, 1976.

HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus Insecticides in Latin America: Historical Overview, Current Status and Future Perspectives. **Viruses**, v. 7, p. 2230-2267, 2015.

HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. R. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 211-234, 2003.

HERNIOU, E. A.; ARIF, B. M.; BECNEL, J. J.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; HARRISON, R.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; VLAK, J. M. Baculoviridae. In: KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Eds.). **Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Elsevier Academic Press; San Diego, p. 163-173, 2012. (Ninth Report of the International Committee Taxonomy of Viruses).

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCADI, F.; CORREA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p. (EMBRAPA – CNPSo. Circular Técnica, 30).

OLIVEIRA, E. B. de; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1985. 23 p. (EMBRAPA – CNPSo. Documentos, 10).

JAVED, M. A.; BISWAS, S.; WILLIS, L. G.; HARRIS, S.; PRITCHARD, C.; VAN OERS, M. M.; DONLY, B. C.; ERLANDSON, M. A.; HEGEDUS, D. D.; THEILMANN, D. A. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus Ac83 is a per os infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV

envelopes. **Journal of Virology**, v. 91. pii: e02115-16, 2017.

LUIZ, C. F. C. **Otimização de parâmetros para a produção em larga escala de baculovirus para *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae)**. TCC (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei, Minas Gerais, 2016.

MARSARO JUNIOR, A. L.; PEREIRA, P. R. V. S.; SILVA, W. R.; GRIFFEL, S. C. P. Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no Estado de Roraima. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 71-76, 2010.

MARTINS, G. L.; TOMQUELSKI, G. V. Eficiência de inseticidas no controle de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 2, p. 25-30, 2015.

MORAES, S. A.; ALVES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole. 1996. p. 278-288.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PARO, F.; SSOLDÓRIO, I. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect. **Biological Control**, v. 20, p. 247-253, 2001.

MORALES, L.; MOSCARDI, F. Comparação entre duas metodologias de bioensaios para vírus entomopatogênicos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**: Londrina, PR, v. 29, 1993.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIA, B. S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja - manejo**

integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, 2012. cap. 4, p. 213-309.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, M. L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus Pesticides: present state and future perspectives. In : AHMAD I.; AHMAD F.; PICHTEL J. (Eds.) **Microbes and Microbial Technology Agricultural and Environmental Applications**. SpringerLink, p. 415-445, 2011. DOI: 10.1007/978-1-4419.

PALMA, J.; MAEBE, K.; GUEDES, J. V. C.; SMAGGHE, G. Molecular variability and genetic structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an important soybean defoliator in Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, DOI:10.1371/journal.pone.0121260, 2015.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology** [Internet]. 3. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013.

SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 1, p. 55-57, 2015.

TOMQUELSKI, G. V.; MARTINS, G. L. M.; DIAS, T. S. Características e manejo de pragas da cultura da soja. **Pesquisa, Tecnologia e Produtividade**, Chapadão do Sul-MS, v. 2, n. 9, p. 61-82, 2015.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. de S. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovirus**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 14 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 114).

VAIL, P. V.; HENNBERRY, A. N.; KISHABA. Sodium hypochlorite and formalin as antiviral agents against nuclear polyhedrosis virus in larvae of the cabbage looper. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 10, p. 84-93, 1968.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

