



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 33

**Identificação de um isolado de
Bombyx mori multiple
nucleopolyhedrovirus
(BmMNPV) no Estado do
Paraná, Brasil**

Rose Meire Costa Brancalhão
Ednéia Fátima Brambilla Torquato
Maria Elita Batista de Castro

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372
PABX: (61) 448-4600
Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias
Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual
Membros: Antônio Costa Allem
 Marcos Rodrigues de Faria
 Marta Aguiar Sabo Mendes
 Sueli Correa Marques de Mello
 Vera Tavares Campos Carneiro
Suplentes: Edson Junqueira Leite
 José Roberto de Alencar Moreira
Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual
Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi
Tratamento de ilustrações: Alysson Messias da Silva
Editoração eletrônica: Alysson Messias da Silva

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 150 exemplares.

Todos os direitos reservados.

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

Brancahã, Rose M. C.

Identificação de um isolado de *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) no Estado do Paraná, Brasil / Rose M. C. Brancahã; Ednéia F. B. Torquato; Maria Elita B. de Castro - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

10 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; n. 33).

1. *Bombyx mori*. 2. Nucleopolyhedrovirus. 3. BmMNPV. 4. Bicho-de-Seda. I. Torquato, Ednéia Fátima Brambilla. II. Castro, Maria Elita Batista de. III. Título. IV. Série.

638.2 CDD 21

© Embrapa 2002

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Materiais e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Referências Bibliográficas	12

Identificação de um isolado de *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus (BmMNPV) no Estado do Paraná, Brasil

*Rose Meire Costa Brancalhão*¹

*Ednéia Fátima Brambilla Torquato*²

*Maria Elita Batista de Castro*³

Resumo

Sericicultura é uma importante atividade agrícola no Brasil; 97% da produção nacional é destinada à exportação e o Estado do Paraná contribui com 83,59% da produção nacional. Contudo, a produção de fios de seda no Brasil é baixa quando comparada à de outros países, principalmente devido à ocorrência de doenças nas criações do bicho-da-seda. Entre estas doenças as de etiologia viral ocupam uma importante posição. Lagartas do bicho-da-seda saudáveis e doentes foram obtidas de indústrias serícolas e em locais de criação nas regiões nordeste, oeste e sudoeste do Estado do Paraná. Estas lagartas, bem como, larvas inoculadas experimentalmente, foram inicialmente criadas e mantidas sob condições de laboratório para observar o desenvolvimento dos sintomas e identificar o agente causal da doença. Análises de microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram também conduzidas para determinar a taxonomia do patógeno, que infecta larvas de *Bombyx mori*. Os sintomas observados foram os mesmos daqueles descritos na literatura, com características típicas de doença causada por *Nucleopolyhedrovirus*. A replicação viral no núcleo das células-alvo e os efeitos citopáticos típicos mostrados pela análise ultraestrutural sustentam a conclusão de que o agente infeccioso é um vírus do gênero *Nucleopolyhedrovirus*, da família Baculoviridae. A ocorrência de mais do que um nucleocapsídeo por envelope (múltiplo) é um diagnóstico

¹ Bióloga, PhD, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR. E-mail: rosebrancalhao@uol.com.br

² Bióloga, M.Sc, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR.

³ Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

favorável à denominação de multiple *Nucleopolyhedrovirus* (MNPV), um fenótipo altamente virulento. Os nucleocapsídeos medem em torno de 95 nm de diâmetro e 315 nm de comprimento. Esses nucleocapsídeos envelopados ou vírions são ocluídos em cristais de proteína, a poliedrina, que forma o corpo de oclusão ou poliedro. Os poliedros medem 2,6 a 4,10 µm em tamanho, maduram no núcleo de células infectadas, e contêm vários vírions.

Identification of a *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus isolate (BmMNPV) in Parana State, Brazil

Abstract

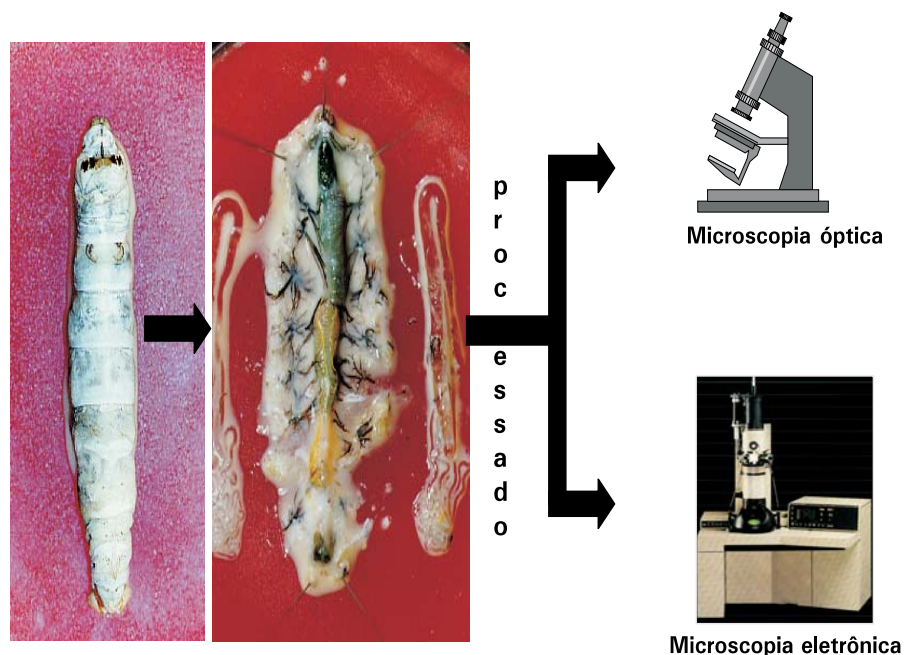
Sericulture is an important agricultural activity in Brazil; 97% of the national production is allocated for exportation and Parana State contributes with 83.59% to the national production. Silk production in Brazil, however, is low when compared to that of other countries, a problem mainly due to the occurrence of silkworm diseases. Among these, the viral diseases have an important position. Healthy and diseased silkworm larvae were obtained from silk industries and silk farms in the Northern, Western and Southern regions of Parana State. These larvae, as well as larvae inoculated experimentally, were initially reared and maintained under laboratory conditions in order to observe the development of the symptoms and identify the causal agent of the disease. Analysis on optical and transmission electron microscopy (TEM) were also carried out to determine the taxonomy of the pathogen infecting *Bombyx mori* larvae. The symptoms observed are the same those described in the literature as typical of disease caused by *Nucleopolyhedrovirus*. The ultrastructural analysis, which showed viral replication in the nuclei of target cells and the typical cytopathic effects, support the conclusion that the infection agent is a *Nucleopolyhedrovirus*, a genus of the Baculoviridae family. The occurrence of more than one rod-shaped nucleocapsid per envelope is diagnostic for the Multiple *Nucleopolyhedrovirus* (MNPV), a highly virulent phenotype. Nucleocapsids average 95 nm in diameter and 315 nm in length. These enveloped nucleocapsids or virions are embedded in a crystalline protein lattice called polyhedrin which forms the occlusion body or polyhedron. Polyhedra measure 2,6 to 4,10 mm in size, mature within nuclei of infected cells and contain many virions.

Introdução

A sericultura é uma importante atividade agroindustrial no Brasil. Cerca de 97% da produção nacional de fios de seda são destinados à exportação. Destacam-se como principais produtores os estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e Goiás. O Paraná é responsável por 83,59% da produção nacional. Contudo, a produção de fios de seda no Brasil é baixa quando comparada à de outros países, principalmente devido a ocorrência de doenças nas criações do bicho-da-seda, causada por vírus, bactérias, fungos e protozoários. Profilaxia e controle dessas doenças são essenciais para melhoria da produção de seda (Watanabe et al., 2000; Sengupta et al., 1990; Fonseca & Fonseca, 1986).

O bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae), é um inseto oligofago que se alimenta principalmente das folhas de amoreira. O mais importante aspecto da fisiologia do bicho-da-seda é a síntese da proteína da seda. Visitando alguns sericultores no estado do Paraná, observou-se grande quantidade de casulos manchados e larvas mortas com os corpos enegrecidos, que geralmente encontravam-se penduradas de cabeça para baixo, fixadas por suas patas posteriores. Os casulos danificados, provenientes dessas áreas, causam consideráveis danos econômicos, constituindo uma ameaça à produção de seda. Essa doença apresenta características típicas de infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus* (NPV).

No inseto, a principal rota natural de infecção é através da ingestão de alimento contaminado com o vírus na forma ocluída (poliedros). Os poliedros ao alcançarem o intestino médio da larva do inseto são dissolvidos por enzimas e secreções altamente alcalinas, presentes no ambiente, liberando os vírions. Os vírions atravessam a matriz peritrófica, infectam células alvos e iniciam seus ciclos de vida. A infecção é caracterizada inicialmente por hipertrofia nuclear e presença de estroma virogênico, onde os vírions são produzidos. Em um segundo estágio, os vírions são ocluídos em cristais protéicos, os poliedros. E em um estágio mais avançado, as células sofrem lise com liberação de um grande número de poliedros e virions na hemolinfa (Federici, 1997).



Larva de *B. mori* (5º instar) infectada com BmMNPV- 7 dp.i. Lagarta seccionada ventralmente: tecido adiposo.

Materiais e Métodos

Lagartas saudáveis e doentes do bicho-da-seda foram obtidas das indústrias e produtores rurais das regiões do Nordeste, Oeste e Sudeste do estado do Paraná. Essas lagartas, bem como as larvas inoculadas experimentalmente, foram inicialmente criadas e mantidas sob condições de laboratório para observar o desenvolvimento dos sintomas e identificar o agente causal da doença.

Análises de microscopia óptica e eletrônica de transmissão (MET) foram conduzidas para identificar o patógeno infectando larvas de *Bombyx mori*. Amostras do tecido adiposo foram removidas de larvas de quinto instar de *B. mori* no sétimo dia pós-inoculação (dp.i.), como pode ser visto na figura mostrada neste tópico. Para estudos de microscopia óptica, as amostras foram fixadas com DuBosq Brasil e coradas pela técnica de Hamm. As amostras para MET foram fixadas com Karnovsky, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, por duas horas, e coradas com acetato de uranila 0,5%, por 12 horas, a 4°C.

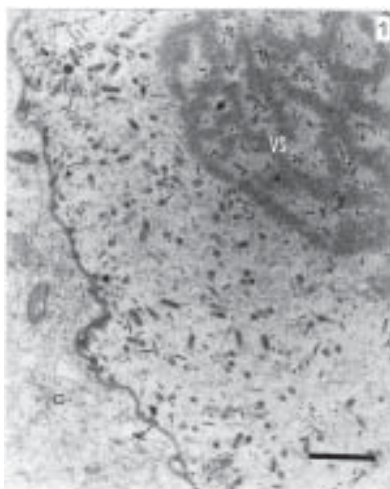


Fig. 1. Replicação viral mostrando a formação de nucleocapsídeos e envelopamento dos vírions dispersos pelo estroma virogênico (VS). Envelope nuclear (NE), citoplasma (C). Escala 1 mm.

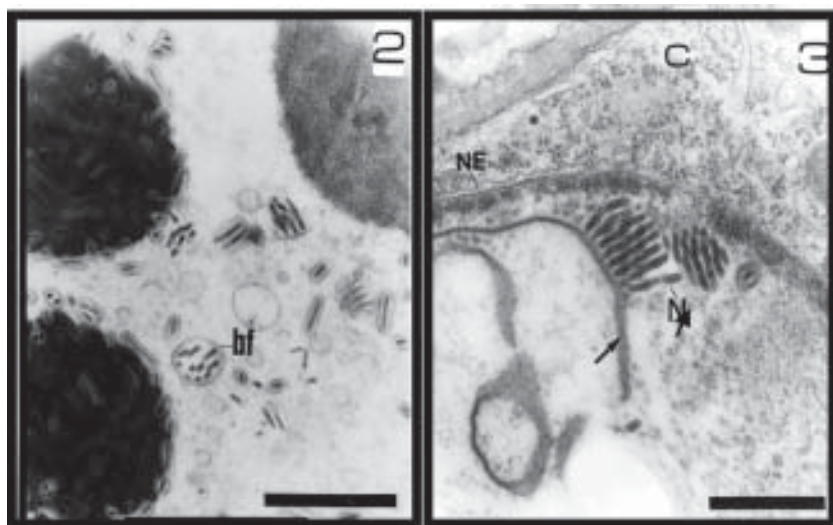


Fig. 2-3. Replicação de nucleocapsídeos: formação de múltiplos nucleocapsídeos por envelope - formação de feixe (bf), estrutura membranosa que forma o envelope do vírion (seta), nucleocapsídeos não-envelopados (NE). Fig. 2, escala 0,5 mm e Fig. 3, escala 1 mm.

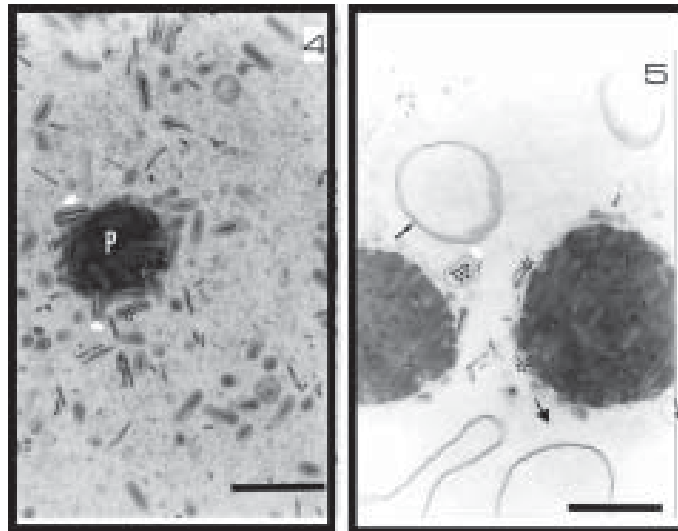


Fig. 4-5. Estágios de formação do poliedro: vírions com único nucleocapsídeo (I), vírions com múltiplos nucleocapsídeos (setas brancas), corpo de oclusão ou poliedro (P), envelope do poliedro (setas na fig. 5). Escalas 1 mm.

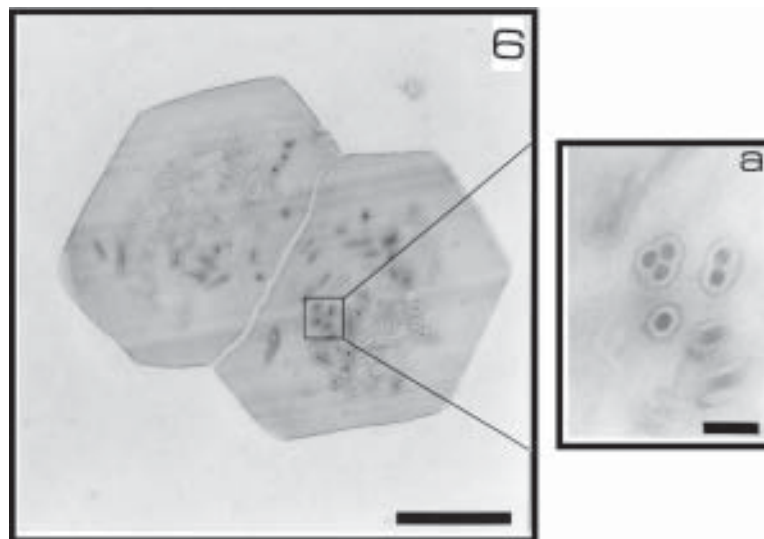


Fig. 6. Poliedros maduros com vários vírions. Escala 1 mm. (a) Secções transversais de vírions com um, dois e três nucleocapsídeos envelopados. Escala 0,1 mm.

O material foi desidratado e emblocado em resina "Spurr". Secções ultra-finas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisadas por microscopia eletrônica. O material controle seguiu o mesmo processamento do material infectado.

Resultados e Discussão

Os sintomas observados no inseto são similares aos descritos na literatura como típicos de doença causada por *Nucleopolyhedrovirus*. As análises ultraestruturais mostraram replicação viral no núcleo das células alvos e efeitos citopáticos típicos de infecção causada por *Nucleopolyhedrovirus*, gênero pertencente à família Baculoviridae (Fig. 1-6). A ocorrência de mais do que um nucleocapsídeo por envelope é diagnóstico para o múltiplo *Nucleopolyhedrovirus* (MNPV), um fenótipo altamente virulento (Fig. 2, 4, 5 e 6). Os nucleocapsídeos têm, em média, 95nm de diâmetro e 315nm de comprimento. Esses nucleocapsídeos envelopados ou vírions são embebidos em uma matriz cristalina protéica, tendo como principal proteína a poliedrina, que forma o corpo de oclusão ou poliedro. Os poliedros medem 2,60 a 4,10mm em tamanho, sua maturação ocorre dentro do núcleo de células infectadas e contêm vários virions (Fig. 6). As figuras de 1 a 6 são secções mostrando estágios da infecção por BmMPV em núcleos de células de tecido adiposo de *B. mori* (7 dp.i.).

Para uma melhor caracterização do patógeno e detecção de prováveis variantes genotípicos, estudos da citopatologia da doença e análises bioquímicas e moleculares de DNA e proteínas estão sendo conduzidos. Os resultados deverão contribuir para um maior conhecimento sobre o ciclo de desenvolvimento do patógeno dentro de seu hospedeiro, o que poderá vir a ser útil na aplicação de medidas profiláticas na sericicultura no Brasil.

Referências Bibliográficas

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

FONSECA, A. S.; FONSECA, T. C. **Cultura da Amoreira e criação do bicho-da-seda**. São Paulo: Nobel, 1986. p. 182-191.

SENGUPTA, K; KUMAR, P.; BAIG, M.; GOVINDAIAH. **Handbook on pest on disease control of mulberry and silkworm**. Bangkok, Thailand: United Nations Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, 1990. 88 p.

WATANABE, J. K. YAMAOKA, R. S.; BARONI, S. A. **Cadeia produtiva da seda: diagnóstico e demandas atuais**. Londrina: IAPAR, 2000. 129 p.