

**Caracterização Morfológica e
Molecular de Isolados Virais
Obtidos de Larvas do Complexo
Heliothinae**

Foto: Elita Castro



ISSN 0102-0110
Maio, 2016

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 316

Caracterização Morfológica e Molecular de Isolados Virais Obtidos de Larvas do Complexo Heliothinae

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

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2016

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

Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha

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 N. Dias Côrtes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

1^a 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

Caracterização morfológica e molecular de isolados virais obtidos de larvas do complexo Heliothinae / Luis Arthur Versiane Moura Santos... [et al.] – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016.

26 p. : il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 316).

1. *Helicoverpa armigera* NPV. 2. Identificação taxonômica. 3. Análise de restrição de DNA. I. Santos, Luis Arthur Versiane Moura. II. Ribeiro, Zilda Maria de Araújo. III. Gomes, Ana Cristina Meneses Mendes. IV. Craveiro, Saluana Rocha. V. Soares, Carlos Marcelo Silveira. VI. Castro, Maria Elita Batista. VII. Série.

632.9 – CDD 21

© Embrapa 2016

Sumário

Resumo.....	05
Abstract.....	07
Introdução.....	09
Material e Métodos.....	12
Resultados e Discussão.....	15
Conclusões.....	21
Agradecimentos.....	21
Referências Bibliográficas.....	22

Caracterização Morfológica e Molecular de Isolados Virais Obtidos de Larvas do Complexo Heliothinae

Luis Arthur Versiane Moura Santos¹

Zilda Maria de Araújo Ribeiro²

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes³

Saluana Rocha Craveiro⁴

Carlos Marcelo Silveira Soares⁵

Maria Elita Batista Castro⁶

Resumo

Helicoverpa armigera é uma lagarta da subfamília Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-algodão, uma espécie exótica ao Brasil. Desde as safras 2012/2013, essa praga vem assumindo grande importância econômica devido aos severos danos causados em diferentes culturas agrícolas brasileiras. Neste trabalho, cinco isolados virais obtidos de larvas do complexo Heliothinae coletadas em plantações de algodão e soja (Mato Grosso, Brasil) foram caracterizados por análises morfológica e molecular visando obter isolados para o controle de *H. armigera*. Análises de partículas virais purificadas por centrifugação em gradiente de sacarose e observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) evidenciaram vírions contendo um único nucleocapsídeo por envelope (single: SNPV) imersos em uma matriz proteica de forma poliédrica. Essas partículas foram caracterizadas como corpos de oclusão (OBs: *occlusion bodies*) com a principal proteína estrutural dos NPVs, poliedrina (29 - 31kDa), detectada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Estas observações confirmam que esse vírus é um nucleopolyhedrovírus (NPV) pertencente ao gênero *Alphabaculovirus* da família *Baculoviridae*. As espécies foram nomeadas de *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV), *Helicoverpa/Heliothis spp. nucleopolyhedrovirus* (HespNPV), e os isolados de HearNPV-MT1,

HearNPV-MT2, HespNPV-MT3, HespNPV-MT4 e HearNPV-MT5. Perfis de restrição (EcoRI) de DNA destes isolados virais mostraram diferenças quanto ao tamanho e número de fragmentos gerados, demonstrando que esses isolados virais podem representar genótipos de uma mesma espécie ou ainda de diferentes espécies virais.

Termos para indexação: *Helicoverpa armigera* NPV, identificação taxonômica, análise de restrição de DNA, variantes genotípicos.

¹ Graduando, Ciências Biológicas, Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

² Bióloga, M.Sc. em Fitopatologia, Analista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga, M.Sc. em Ciências Agrárias, Analista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular, Bolsista Pós-doc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Biólogo, Ph.D. em Entomologia, Pesquisador, Instituto Mato-Grossense do Algodão – IMAMt.

⁶ Bióloga, Ph.D. em Virologia Molecular, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Morphological and Molecular Characterization of Viral Isolates from the Heliothinae Complex

Abstract

Helicoverpa armigera is a caterpillar in the Heliothinae subfamily (Lepidoptera: Noctuidae), known as the cotton bollworm, an exotic species in Brazil. Since 2012/2013 the harvest, this pest has assumed greater economic importance due to severe damage caused to various Brazilian crops. In this work, five viral isolates, obtained from Heliothinae larvae collected from cotton and soybean plantations (Mato Grosso, Brazil) were characterized by morphological and molecular analysis, aiming to obtain isolates for control of the *H. armigera*. Analysis of virus particles purified by sucrose gradient centrifugation and visualized by transmission electron microscopy (TEM) showed virions containing a single nucleocapsid per envelope (single: SNPV) immersed in a polyhedral protein matrix. These particles were characterized as occlusion bodies (OBs) with the major structural protein of the NPVs, polyhedrin (29-31 kDa), detected in denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE). These observations confirmed that this virus is a nucleopolyhedrovirus (NPV) belonging to the genus *Alphabaculovirus* of the *Baculoviridae* family. The species were named *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV), *Helicoverpa/Heliothis* spp. *nucleopolyhedrovirus* (HespNPV) and isolates HearNPV-MT1, HearNPV-MT2, HespNPV-MT3, HespNPV-MT4 and HearNPV-MT5. EcoRI DNA restriction patterns from these isolates showed differences in size and number of fragments generated demonstrating that these viral isolates might represent different

genotypes of the same species or different virus species.

Index terms: *Helicoverpa armigera* NPV, taxonomic identification, DNA restriction analysis, genotypic variants.

Introdução

Helicoverpa armigera é um inseto da subfamília Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae), conhecido popularmente como lagarta-do-algodão. Este inseto é considerado praga quarentenária no Brasil e desde as safras 2012/2013 vem assumindo grande importância por causar severos danos a várias culturas agrícolas brasileiras. Prejuízos econômicos mundiais de aproximadamente 5 bilhões de dólares por ano têm sido registrados como resultantes de ataques dessa praga, que é extremamente polífaga, às culturas de algodão, soja, milho, tomate, sorgo, milheto, girassol, pimentão, caupi, braquiária e várias hortaliças (CZEPAK et al., 2013a, b; ÁVILA et al., 2013).

O ciclo de vida larval da *H. armigera* é de 5 a 6 ínstares, e sua coloração varia de acordo com a alimentação (preto, rosa, verde, amarelo claro e marrom). A partir do quarto ínstare, as lagartas apresentam um formato de sela no primeiro segmento abdominal, devido à presença de tubérculos abdominais escuros e visíveis. Outra forte característica dessa espécie, que difere das demais espécies de Heliothinae que ocorrem no Brasil, é quanto à textura do seu tegumento com aspecto levemente coriáceo. Esta característica tem sido associada à capacidade de resistência que esses insetos têm apresentado a certos inseticidas químicos (CZEPAK et al., 2013a, b; ÁVILA et al., 2013).

No Brasil, a ocorrência dessa praga foi registrada, recentemente, atacando lavouras de soja e algodão nos estados de Goiás, Mato Grosso e Bahia. Entretanto, acredita-se que essa praga possa estar disseminada por quase todo o território nacional (CZEPAK et al., 2013a). Esse fato pode ser atribuído ao alto potencial de reprodução, migração, adaptação e, principalmente, resistência desses insetos a inseticidas químicos (NIMBALKAR et al., 2009; FATHIPOUR e SEDARATIAN, 2013). Atualmente, 30% de todos os inseticidas no mundo são utilizados para controlar esta praga (AHMAD, 2007). Em alguns países europeus, como a Espanha, essa praga chega a ser a

mais nociva para as lavouras de tomate. No continente asiático, em países como China e Índia, cerca de metade dos inseticidas utilizados visam controlar esta lagarta (CZEPAK et al., 2013).

Além da praga *H. armigera*, outras espécies de lagartas da subfamília Heliothinae, como *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) apresentam hábitos e morfologia bastante similares e são capazes de atacar essas mesmas culturas trazendo grandes prejuízos econômicos ao país (ÁVILA et al., 2013).

Mundialmente, pesquisas estão sendo realizadas objetivando o desenvolvimento de agentes mais seguros e menos nocivos ao meio ambiente para o controle de pragas. Inseticidas biológicos têm se tornado bastante atraentes para uso em programas de manejo integrado de pragas (MIP), como os vírus patogênicos a insetos chamados de baculovírus (MOSCARDI et al., 2011; HAASE et al., 2015).

Os baculovírus são vírus de ocorrência natural, exclusivos ao filo Arthropoda e normalmente são muito patogênicos a seus hospedeiros, sendo encontrados principalmente em insetos da ordem Lepidoptera. Estes vírus formam a família *Baculoviridae*, que está dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (NPVs de Lepidoptera), *Betabaculovirus* (GVs de Lepidoptera), *Gammabaculovirus* (NPVs de Hymenoptera) e *Deltabaculovirus* (NPVs de Diptera) (JEHLE et al., 2006; HERNIOU et al., 2012).

Durante o ciclo de infecção, os baculovírus produzem dois tipos de partículas infecciosas: os vírus derivados de oclusão (*occlusion derived viruses* – ODVs), responsáveis pela infecção primária (inseto-inseto), e os vírus extracelulares (*budded viruses* - BVs), responsáveis pela infecção secundária no hospedeiro (célula-célula). Esses fenótipos virais possuem a mesma informação genética, mas diferem na composição do envelope viral e nas propriedades biológicas (BONNING, 2005; SLACK e ARIF, 2007; WANG et al., 2016).

Uma das principais aplicações tecnológicas dos baculovírus é sua utilização como agentes de controle de pragas agrícolas, demonstrando vantagens aos inseticidas químicos por apresentarem alta especificidade e virulência ao inseto hospedeiro, além de serem ambientalmente seguros e compatíveis com outras estratégias de controle. No Brasil, vários produtos biológicos à base de baculovírus, como *Anticarsia gemmatalis* MNPV, *Spodoptera frugiperda* NPV e *Condylorrhiza vestigialis* MNPV já se encontram comercialmente disponíveis para uso no controle de pragas em culturas de soja, milho e álamo, respectivamente (MOSCARDI et al., 2011; KUMAR e SINGH, 2014; LACEY et al., 2015). Entretanto, para o controle da praga *H. armigera*, existe pouco ou nenhum registro desses produtos, uma vez que essa praga é de recente ocorrência no Brasil (CZEPAK et al., 2013a; TAY et al., 2013).

Estudos mostram que existe grande variação genética entre as populações de baculovírus. No entanto, o significado funcional dessas diferenças ainda permanece pouco conhecido, sendo isso crucial para a compreensão da diversidade e evolução desses vírus (FIGUEIREDO et al., 2009; ZWART, 2008; ROWLEY et al., 2011).

Análises de perfil de restrição de DNA pela técnica “polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição” (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) têm sido uma ferramenta muito utilizada para investigar variações genotípicas entre isolados virais da mesma espécie (intraespecíficas) e/ou entre espécies diferentes (interespecíficas) (ALEXANDRE et al., 2010; ROWLEY et al., 2011).

Este trabalho tem como objetivo caracterizar isolados virais com base em análises morfológica e molecular, a fim de contribuir para maior conhecimento da biologia dos baculovírus e de sua utilização no controle de *H. armigera* e de outras pragas do complexo Heliothinae.

Material e Métodos

Vírus e insetos

Os isolados virais foram obtidos de larvas mortas de *H. armigera* e *Heliothis virescens*, coletadas em plantações de soja e algodão na região de Primavera do Leste, Mato Grosso-MT (Brasil), e cedidas por Carlos Marcelo S. Soares (Instituto Mato-Grossense do Algodão – IMAmt). Esses isolados foram então depositados na Coleção de Vírus de Invertebrados (CVI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN (Tabela 1). Larvas sadias de *H. armigera* foram obtidas da Plataforma de Criação de Insetos (CENARGEN), onde são criadas com dieta artificial, sob temperatura em torno de 26°C e umidade relativa de 70%.

Tabela 1. Isolados virais obtidos de larvas do complexo Heliothinae infectadas por vírus na região de Primavera do Leste, Mato Grosso.

Isolados virais	Nº de Acesso/CVI	Inseto Hospedeiro	Data de Coleta	Cultura	Instituição
HearNPV-MT1	BRM 028590 CVI 117	<i>Helicoverpa armigera</i>	31/01/2014	Soja	IMAmt
HearNPV-MT2	BRM 028591 CVI 118	<i>Helicoverpa armigera</i>	07/02/2014	Soja	IMAmt
HespNPV-MT3	BRM 037918 CVI 125	<i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa spp</i>	06/2014	Soja	IMAmt
HespNPV-MT4	BRM 037919 CVI 126	<i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa spp</i>	06/2014	Soja	IMAmt
HearNPV-MT5	BRM 033054 CVI 124	<i>Helicoverpa armigera</i>	26/02/2014	Algodão	IMAmt

Multiplicação de vírus

Larvas de *H. armigera* de 3º/4º ínstare, colocadas individualmente em copos plásticos, foram alimentadas com dieta artificial contendo 50-100 µL de vírus na concentração de 1x108 OB/mL distribuídos sobre

a superfície da dieta. Após 3 dias de infecção (dp.i.), as larvas foram observadas diariamente, coletadas logo após sua morte e armazenadas a -20°C para posterior purificação de partículas virais.

Purificação de vírus

Larvas infectadas ou mortas pelo vírus foram maceradas em água destilada e 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 (10.000 rpm/15 minutos), o *pellet* tratado com NaCl 0,5M, centrifugado nas mesmas condições anteriores e ressuspensionado em H₂O Milli-Q. Para melhor purificação das partículas virais, parte do material foi submetido a ultracentrifugação em gradiente de sacarose (40-65%), que consistiu do seguinte procedimento: 5 mL da suspensão viral foram aplicados em gradiente de sacarose contínuo preparado em tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) a uma densidade de 1,17-1,31 g/mL. O material foi centrifugado a 24.000 rpm (Sorvall OTD 75 U, rotor AH-627) por 40 minutos a 4°C. A banda correspondente aos OBs, posicionada no terço inferior do tubo, foi coletada com pipetas Pasteur, diluída 5 vezes em tampão TE e centrifugada a 10.000 rpm (Sorvall RC-5B, rotor SS-34) por 15 minutos, a 4°C. Os OBs foram ressuspensos em água Milli-Q, autoclavados e armazenados a -20°C.

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para análise morfológica e identificação do agente causal da doença, o material foi processado e analisado no microscópio eletrônico de transmissão (MET). Corpos de oclusão (OB) purificados foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7,2 e mantidos a 4°C por cerca de 24 horas. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0.1 M, pH 7,2. Para

a pós-fixação, essas amostras foram imersas em acetato de uranila 0,5% (contrastação *in bloc*) durante 24 h a 4°C, desidratadas em série crescente de etanol. Seguiu-se a infiltração com resina Epon 812® pelo protocolo do fabricante. A inclusão foi feita em moldes próprios para polimerização a 70°C. Seções ultrafinas foram obtidas com 40 nm em grades de cobre cobertas com Formvar®, utilizando-se o ultramicrótomo Leica, contrastadas com acetato de uranila 5% por 1 hora, em condições escuras, sendo, então, analisadas e fotodocumentadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão – MET (Zeiss modelo EM 109).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Partículas virais purificadas (OB) foram preparadas em tampão amostra (2X: 125 mM de Tris-HCl pH 6,7; 30% de glicerol; 4% de SDS; 0,002% de azul de bromofenol e 10% de β-mercaptoetanol), fervidas por 5 minutos, resfriadas em gelo por 15 minutos e submetidas a eletroforese 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 horas e em seguida descorado (metanol 40%, ácido acético 7,5% e água destilada) por 1 hora e 30 minutos e fotografado.

Purificação de DNA viral

Os DNAs de cinco isolados virais foram purificados segundo o protocolo estabelecido por O'Reilly et al. (1992). A suspensão de 1 mL contendo 1×10^9 de OBs puros foi incubada a 37°C com uma solução de 0,1 M de N_2CO_3 por 30 minutos para liberar os virions no meio aquoso. Em seguida, foram adicionados 1% de SDS e 0,5 mg/mL de proteinase K, e incubados a 37°C durante a noite. O DNA foi extraído por ciclos de extrações com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Em sequência, foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,2), 2 volumes de etanol absoluto, e incubado a -20°C durante a noite. O DNA precipitado foi coletado por centrifugação a 14.000 g por 15 minutos,

a 4°C, e então lavado com etanol 70%. O DNA foi solubilizado em tampão TE (pH 8.0), estimado por eletroforese em gel de agarose e armazenado a 4°C para o uso.

Clivagem de DNA com enzimas de restrição

DNAs dos isolados virais foram incubados com as enzimas de restrição EcoRI, individualmente, a 37°C por 4 a 12 h. A reação foi finalizada com a adição de tampão amostra 1X (5x: 2,5 µg/mL de azul de bromofenol e 50 mg/mL de glicerol). Os fragmentos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, a 40 V por 10 a 18 h, utilizando-se o tampão TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0). O DNA *ladder plus* 1 Kb foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, visualizado e fotografado em UV – fotodocumentador (Lab Trade-Wealtec).

Resultados e Discussão

Infectividade de isolados virais em larvas de *Helicoverpa armigera*

A infectividade de cinco isolados virais obtidos de larvas *H. armigera* e *Heliothis virescens* foi examinada para verificar a suscetibilidade do hospedeiro *H. armigera*. Os testes mostraram que, embora tenham sido observadas diferenças na taxa de mortalidade, todos os isolados virais foram capazes de infectar e causar morte das larvas de *H. armigera*. Dentre os isolados testados, HearNPV-MT5 foi o que apresentou maior taxa de mortalidade, com mais 90%, a 7 dp.i., na concentração de 1×10^8 OBs/mL. Sintomas característicos de infecção viral foram observados nas larvas, que apresentaram uma série de alterações comportamentais e morfológicas, como perda do apetite e da coordenação dos movimentos; mudança na coloração e flacidez tegumentar e, após a morte, liquefação dos tecidos e liberação de partículas virais infectivas (Figura 1C). Estoques virais foram,

portanto, produzidos a partir da multiplicação desses isolados no hospedeiro testado (*H. armigera*) e utilizados para as análises realizadas neste estudo. Para investigar o potencial de patogenicidade desses isolados virais, bioensaios serão realizados com a utilização de larvas de *H. armigera* e inóculos virais em diferentes concentrações para determinação da concentração média letal (CL_{50}) e do tempo médio de sobrevivência (ST_{50}).

Fotos A e B: Jacob Crosariol Netto – IMAmt



Figura 1. Lagartas do gênero *Helicoverpa*.
 (A) Lagarta *Helicoverpa* spp – plantação de algodão.
 (B) *Helicoverpa* spp. atacando botão floral. Safra: 2014/2015. Primavera do Leste, Mato Grosso.
 (C) Lagarta *Helicoverpa armigera* infectada pelo baculovírus *Helicoverpa armigera* NPV – 7dp.i. Ensaios realizados em laboratório.

Foto C: Elita Castro

Análise morfológica e classificação taxonômica

Amostras de suspensão viral purificadas em gradiente de sacarose (Figura 2A) e observadas no microscópio óptico exibiram partículas de alta refringência, o que sugere tratar-se de corpos de oclusão (OBs) do tipo *nucleopolyhedrovirus* (NPV), uma vez que o tamanho dessas partículas possibilitou sua visualização. As partículas OBs, ao serem analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 16% e comparadas com proteínas de pesos moleculares conhecidos, apresentaram uma banda intensa em torno de 29 kDa, peso correspondente à proteína poliedrina, principal componente estrutural dos corpos de oclusão de *nucleopolyhedrovirus* (NPVs) (Figura 2B).

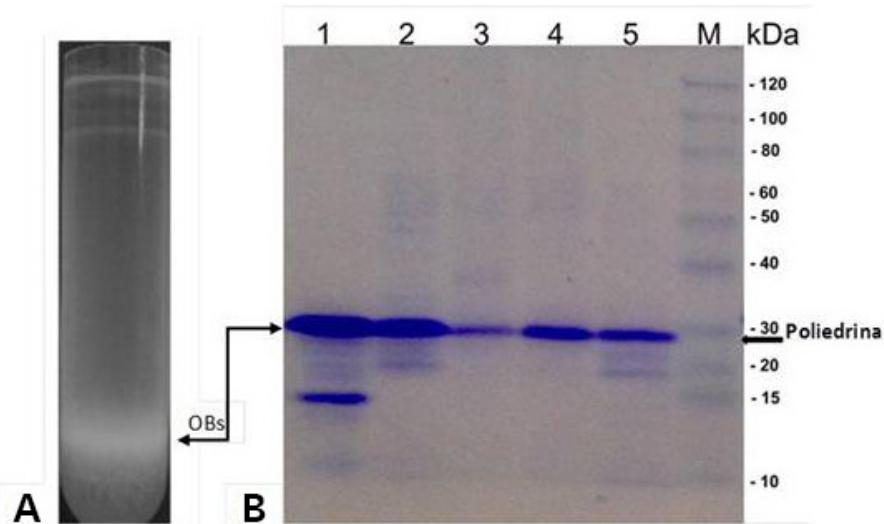


Figura 2. (A) Corpos de oclusão (OBs: poliedros) de isolados virais de larvas *Helicoverpa* purificados por ultracentrifugação em gradiente de sacarose (40-65%). (B) Proteínas estruturais de OBs de *Helicoverpa armigera* NPV e de *Helicoverpa/Heliothis* spp NPV detectadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 16% (SDS-PAGE). 1- HearNPV-MT1, 2- HearNPV-MT2, 3- HespNPV-MT3, 4- HespNPV-MT4, 5- HearNPV-MT5, M: marcador de peso molecular - *BenchMark Protein Ladder 1Kb Invitrogen*. A seta indica uma banda intensa correspondente à principal proteína estrutural dos OBs, a poliedrina (29-31 kDa).

Cortes transversais e longitudinais de partículas desses isolados virais, examinados e analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET), mostraram estruturas poliédricas, contendo vários vírions com um único nucleocapsídeo por envelope, o que torna possível afirmar que o vírus é um single *nucleopolyhedrovirus* (SNPV). Uma micrografia representativa da ultraestrutura morfológica de todos os isolados virais analisados é mostrada na Figura 3.

Baseando-se nos resultados das análises realizadas e na atual classificação taxonômica dos baculovírus (HERNIOU et al., 2012), os isolados virais foram classificados conforme o gênero do inseto hospedeiro coletado no campo. Portanto, trata-se de um vírus da

família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus*, sendo as espécies nomeadas de *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV) e *Helicoverpa/Heliothis* spp. *nucleopolyhedrovirus* (HespNPV). Os isolados foram designados de HearNPV-MT1, HearNPV-MT2, HespNPV-MT3, HespNPV-MT4 e HearNPV-MT5.

Foto: Ana Cristina M. M. Gomes

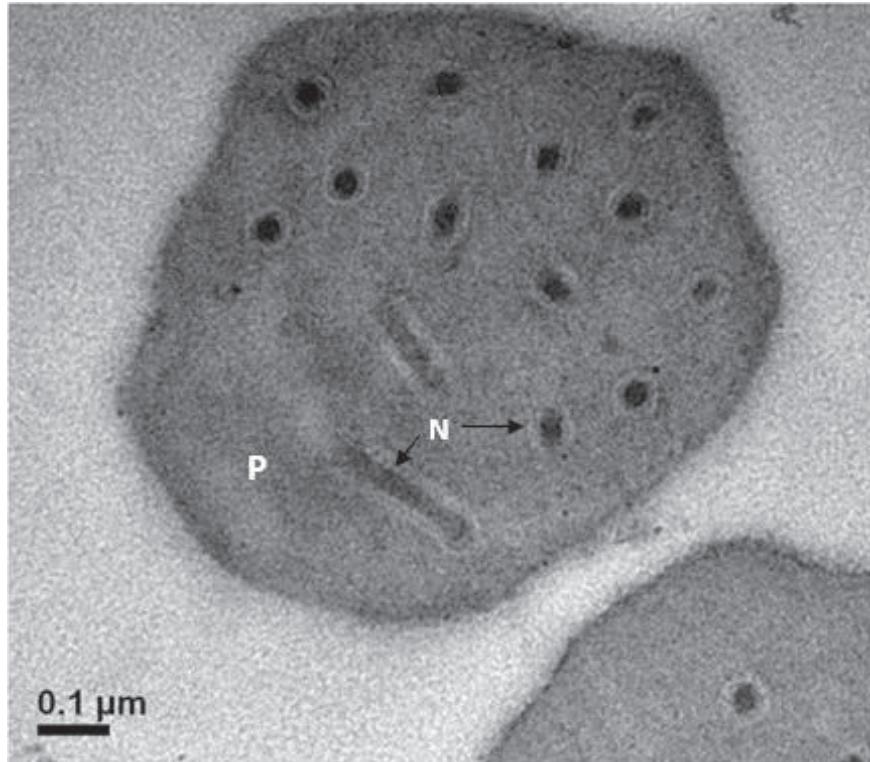


Figura 3. Micrografia eletrônica de poliedros de isolados de *Helicoverpa armigera* NPV com vírions contendo um único nucleocapsídeo por envelope (SNPV: single nucleopolyhedrovirus), inclusos em uma matriz proteica. P: poliedrina. N: nucleocapsídeo (cortes longitudinal e transversal).

Detecção e análise comparativa de variantes genotípicos

Análises de restrição de DNA de cinco isolados virais foram feitas por comparação de fragmentos adicionais presentes em relação ao número de fragmentos comuns a todos isolados gerados pela clivagem EcoRI (Figura 4). Dois padrões distintos de perfis eletroforéticos foram evidenciados com diferentes número de fragmentos e bandas submolares, um com perfis de restrição muito similares aos exibidos pelos isolados HearNPV-MT1, HearNPV-MT2 e HearNPV-MT-5, apresentando cerca de 18 fragmentos e outro com os isolados HespNPV-MT3 e HespNPV-MT4 com cerca de 14 fragmentos detectados, apresentando perfis similares entre si, porém bastante diferentes dos outros três isolados (HearNPV-MT1, HearNPV-MT2 e HearNPV-MT-5) (Figura 4).

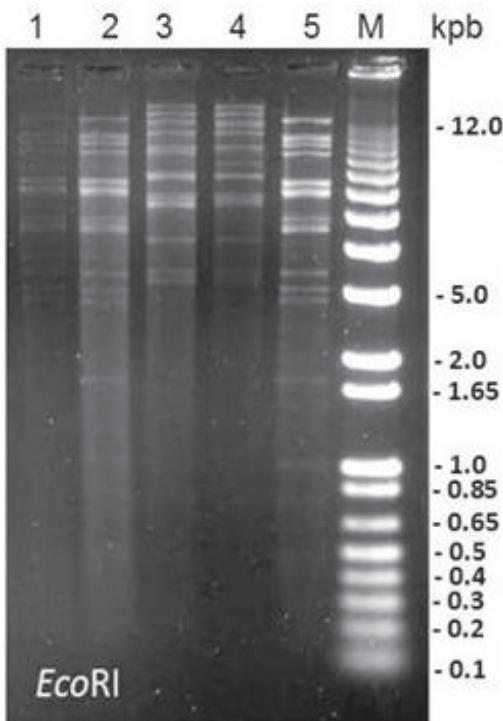


Figura 4. Perfis de restrição com EcoRI de DNAs de cinco isolados de *Helicoverpa armigera* NPV e *Helicoverpa/Heliothis* spp. NPV. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 - HearNPV-MT1, 2 - HearNPV-MT2; 3 - HespNPV-MT3; 4 - HespNPV-MT4; 5 - HearNPV-MT5; M: 1Kb plus DNA Ladder.

Isolados do campo frequentemente apresentam variações genotípicas, que são detectadas pela presença de bandas submolares em perfis de restrição (IKEDA et al., 2015). Tendo isso em vista, e com base na variação genética detectada entre os isolados virais analisados neste estudo, uma busca foi realizada na literatura visando comparar perfis de restrição obtidos com a mesma enzima EcoRI, utilizando-se mapas físicos construídos e/ou sequências genômicas de outros isolados virais da mesma espécie ou gênero depositadas no banco de dados GenBank do NCBI – *National Center for Biotechnology Information*. Esta comparação com um isolado de *Helicoverpa zea* (CHEN, 2002) e 18 isolados de *H. armigera* (OGEMBO et al., 2009, ARRIZUBIETA et al., 2015, NOUNE e HAUXWELL, 2015) mostrou, nitidamente, que os isolados HespNPV-MT3 e HespNPV-MT4 apresentam perfis de restrição bastante distintos dos outros isolados virais comparados quanto à distribuição e presença de bandas. Da mesma forma, essas diferenças também foram observadas com relação a isolados de HearNPV da Espanha e de Portugal (ARRIZUBIETA et al., 2013).

Os resultados obtidos em ambas as análises comparativas, de perfis de restrição (EcoRI) dos DNAs virais e da busca realizada na literatura, sugerem que os isolados virais devem ser variantes genotípicos da mesma espécie de vírus ou até mesmo de espécies distintas.

Trabalhos realizados com isolados da mesma espécie, *Helicoverpa armigera* NPV, demonstraram que os isolados analisados possuem capacidade de infectar hospedeiros das espécies *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa gelotopoeon* (CHAKRABORTY e REID, 1999; FERRELLI et al., 2015), o que sugere a proximidade genética desse vírus com os vírus *Helicoverpa zea nucleopolyhedrovirus* (HzNPV) e *Helicoverpa gelotopoeon nucleopolyhedrovirus* (HegeNPV). Entretanto, para estabelecer a proximidade genética entre os variantes genotípicos analisados no presente trabalho, estudos filogenéticos terão que ser realizados.

Conclusões

A estrutura poliédrica dos isolados de HearNPV e HespNPV foi confirmada por MET e gel SDS-PAGE, evidenciando corpos de oclusão (OBs) caracterizados como poliedros, tendo sido detectada a principal proteína estrutural dos NPVs, a poliedrina, que tem peso molecular na faixa de 29 a 31 kDa.

Os isolados virais analisados foram identificados e classificados como NPV (nucleopolyhedrovirus) pertencentes ao gênero *Alphabaculovirus* e espécies *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* (HearNPV) e *Helicoverpa/Heliothis spp nucleopolyhedrovirus* (HespNPV), esta última a ser melhor definida pelo sequenciamento do genoma completo.

As análises de restrição de DNA evidenciaram variação genética entre os isolados virais, o que demonstra tratar-se de uma mistura de genótipos de uma mesma espécie ou ainda de diferentes espécies virais. Estes resultados serão objetos de investigação posterior.

Agradecimentos

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

Aos estagiários Samantha K. Araujo, Régio A. Costa e Yasmin F. S. Rodrigues pelo auxílio na purificação dos isolados virais.

Referências

- AHMAD, M. Insecticide resistance mechanisms and their management in *Helicoverpa armigera* (Hübner) – a review. **Journal of Agricultural Research**, v. 45, p. 319-335, 2007.
- 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.
- ARRIZUBIETA, M.; WILLIAMS T.; PRIMITIVO, C.; SIMÓN, O. Selection of a nucleopolyhedrovirus isolate for *Helicoverpa armigera* as the basis for a biological insecticide. **Pest Management Science**, v. 70, p. 967-976, 2013.
- ARRIZUBIETA, M.; SIMÓN, O.; WILLIAMS T.; PRIMITIVO, C. Genomic sequences of five *Helicoverpa armigera Nucleopolyhedrovirus* genotypes from spain that differ in their insecticidal properties. **Genome Announcements**, v. 3, 2015.
- AVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. **Ocorrência aspectos biológicos danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hubner)(Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica, 23).

BONNING, B. C. Baculoviruses: biology, biochemistry and molecular biology. In: Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005, p. 233-270.

CHAKRABORTY, S.; REID, S. Serial passage of a *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* cell cultures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 303-308, 1999.

CHEN, X.; ZHANG, W. J.; WONG, J.; CHUN, G.; LU, A.; MCCUTCHEON, B. F.; PRESNAIL, J. K.; HERRMANN, R.; DOLAN, M.; TINGEY, S.; HU, Z. H.; 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.

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, p. 110-113, 2013a.

CZEPAK, C.; VIVAN, L. M.; ALBERNAZ, K. C. Praga da vez. **Cultivar: grandes culturas**, Pelotas, v. 15, n. 167, p. 20-27, 2013b.

FATHIPOUR, Y.; SEDARATIAN, A. Integrated Management of *Helicoverpa armigera* in Soybean Cropping Systems. In: El-Shemy, H. (Ed.). **Soybean-Pest Resistance**. InTech, Rijeka: Croatia, p. 231-280. 2013.

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

HAASE, S.; SCIACCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus Insecticides in Latin America: historical overview, current status and

future perspectives. **Viruses**, v. 7, n. 5, p. 2230-2267, 2015.

HARRISON, R. L.; POPHAM, H. J. R.; BREITENBACH, J. E.; ROWLEY, D. L. Genetic variation and virulence of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus isolates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 33-47, 2012.

HERNIOU, E. A.; ARIF, B. M.; BECNEL, J. J.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; HARRISON, R.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; VLAK, J. M. Baculoviridae. In: ADAMS, M. J., KING, A. M. Q., CARTSENS, E. B., LEFKOWITZ, E. J. **Virus Taxonomy**: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Oxford: Elsevier, 2011. p. 163-174.

IKEDA, M.; HAMAJIMA, R.; KOBAYASHI, M. Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. **Entomological Science**, v. 18, p. 1-20, 2015.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology**, v. 151, p. 1257-1266, 2006.

KUMAR, S.; SINGH, A. Biopesticides for integrated crop management: environmental and regulatory aspects. **Journal of Biofertilizers e Biopesticides**, v. 5, p. e121, 2014.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, M.; SZEWCZYK, B. Baculovirus Pesticides: present state and future perspectives. In: AHMAD I.; AHMAD F.; PICHTEL P. (Ed). **Microbes and microbial technology**. 1.ed. New York: Springer., 2011. p. 415-445.

NIMBALKAR, R. K.; SHINDE, S. S.; TAWAR, D. S.; MULEY, S.

P. Response of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) to different insecticides in Maharashtra, India. **World Journal of Agriculture Sciences**, v. 5, p. 250-255, 2009.

NOUNE, C.; HAUXWELL, C. Complete genome sequences of *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus strains AC53 and H25EA1 from Australia. **Genome Announcements**, v. 3, 2015.

ROWLEY, D. L.; POPHAM, H. J. R.; 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.

SIMON, O.; PALMA, L.; BEPERET, I.; MUÑOZ, D.; LOPEZ-FERBER, M., CABALLERO, P.; WILLIAMS, T. Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates: detecting positively selected genes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. 33-42, 2011.

SLACK, J.; ARIF, B. M. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99-165, 2007.

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, 2013.

WANG, Q.; BOSCH, B. J.; VLAK, J. M.; van OERS, M. M.; ROTTIER, P. J.; van LENT, J. W. M. Budded baculovirus particle structure revisited. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 134, p. 15-22, 2016.

ZWART, M. P. **Effects of population size on virus evolution:** a baculovirus perspective. PhD Thesis, University of Cologne, 2008.



**Recursos Genéticos e
Biotecnologia**

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA