

**Ocorrência de Baculovírus em
Larvas de *Chrysodeixis includens*
em Cultivo de Soja na Região do
Cerrado**

Foto: Francisco Guilherme Vergolino Schmidt



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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 313

Ocorrência de Baculovírus em Larvas de *Chrysodeixis includens* em Cultivo de Soja na Região do Cerrado

Marlinda Lobo de Souza
William Sihler
Marcio Martinello Sanches
Francisco Guilherme Vergolino Schmidt
Norton Polo Benito
Marcelo Lopes da Silva
Marcos Rodrigues de Faria
Rogério Biaggioni Lopes

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2015

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
 Lúgia Sardinha Fortes
 Lucas Machado de Souza
 Márcio Martinelli Sanches
 Rosamires 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: 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**

Ocorrência de baculovírus em larvas de *Chrysodeixis includens* em cultivo de soja na região do Cerrado. / Marlinda Lobo de Souza ... [et al.] – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015.

19 p.: il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 313).

1. Controle Biológico. 2. Baculovírus. 3. *Chrysodeixis includens*.
I. Souza, Marlinda Lobo de. II. Sihler, William. III. Sanches, Marcio Martinello. IV. Schmidt, Francisco Guilherme Vergolino. V. Benito, Norton Polo. VI. Silva, Marcelo Lopes da. VII. Faria, Marcos Rodrigues de. VIII. Lopes, Rogério Biaggioni. IX. Série.

632.96 – CDD 21

Sumário

Resumo.....	05
Abstract.....	07
Introdução.....	09
Material e Métodos.....	11
Resultados e Discussão.....	12
Conclusões.....	15
Referências Bibliográficas.....	16

Ocorrência de Baculovírus em Larvas de *Chrysodeixis includens* em Cultivo de Soja na Região do Cerrado

*Marlinda Lobo de Souza*¹

*William Sihler*²

*Marcio Martinello Sanches*³

*Francisco Guilherme Vergolino Schmidt*⁴

*Norton Polo Benito*⁵

*Marcelo Lopes da Silva*⁶

*Marcos Rodrigues de Faria*⁷

*Rogério Biaggioni Lopes*⁸

Resumo

Baculovírus são importantes agentes de controle de insetos, em especial de lepidópteros. Em fevereiro de 2014, foram observadas lagartas com sintomas de virose em populações de *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae), infestando lavoura comercial de soja na região de Buritis, MG, Brasil. As lagartas doentes apresentavam corpo flácido, com mudança de coloração e fragilidade da cutícula. Foram feitas coletas de lagartas vivas no início da fase reprodutiva da planta, e os insetos foram mantidos em laboratório por seis dias para a determinação do número de insetos doentes em cada coleta. As lagartas doentes foram maceradas, sendo o extrato resultante adicionado a folhas de soja e oferecido a larvas de terceiro instar de *C. includens* criadas em laboratório. Os insetos que se alimentaram do macerado apresentaram os mesmos sintomas, confirmando a natureza da infecção pelo agente microbiano. A visualização dos tecidos larvais em microscópio óptico demonstrou a presença de partículas refringentes típicas de baculovírus

do tipo *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). Um total de quatro coletas sucessivas de insetos na região revelou um aumento na porcentagem de insetos mortos por infecção natural de 10,6% para 31,2%. A fim de confirmar a identidade do patógeno, foi feita análise das amostras por microscopia eletrônica de transmissão. Para tanto, partículas virais foram purificadas por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, tratadas para microscopia eletrônica e contrastadas com acetato de uranila 2%. As partículas apresentaram tamanho de cerca de 1 μm , sendo o vírus identificado como *Pseudoplusia includens* Single *Nucleopolyhedrovirus* (PsinSNPV). O material foi depositado na Coleção de Vírus de Invertebrados da Embrapa sob o código CVI 113.

Palavras-chave: Controle Biológico, baculovírus, NPV, lagarta falsa-medideira, *Chrysodeixis includens*.

¹ Bióloga, Ph.D., Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Biólogo, MSc., Analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Biólogo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheiro-agrônomo, MSc., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Engenheiro-agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Engenheiro-agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁷ Engenheiro-agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁸ Engenheiro-agrônomo, Ph.D., Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Baculovirus Occurrence in Larvae of *Chrysodeixis includens* in Soybean Cultivation in the Cerrado Region

Abstract

Baculovirus are important biological control agents of insects, especially Lepidoptera. In February 2014, larvae with symptoms of virus infection were observed in populations of *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae), infesting soybean commercial field at Buritis, MG, Brazil. Dead larvae showed soft body, color change and fragile cuticle. Living insects were collected at the beginning of reproductive stage of soybean plants. The insects were reared under laboratory conditions for six days and the number of infected insects in each collect was determined. Infected larvae were macerated and the resulting extract applied on soybean leaves and offered to third instar *C. includens* larvae. The insects that fed on treated leaves showed the same symptoms of the disease, confirming the nature of infection by the microbial agent. Observations of larvae tissue in optical microscope showed the presence of typical virus particles of *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). A total of four successive insect collections in the area revealed the increase of dead insects by natural infection ranging from 10.6% to 31.2%. Transmission electron microscopy was then carried out in order to confirm the pathogen identity. Viral particles were purified by ultracentrifugation in sucrose gradient, treated for electron microscopy and contrasted with 2% uranyl acetate. The particles presented about 1 μm in size and the virus was identified as *Pseudoplusia includens*

Single Nucleopolyhedrovirus (PsinSNPV). A sample was deposited in the Collection of Invertebrate Viruses of EMBRAPA under the code CVI 113.

Keywords: Biological Control, baculovirus, NPV, soybean looper, *Chrysodeixis includes*.

Introdução

A região do Cerrado é o espaço em que mais cresce a produção de grãos e é visto como o grande potencial agropecuário do Brasil. Nas últimas safras, ataques severos de lagartas nas principais culturas da região têm sido relatados por produtores rurais. Em geral, o crescimento populacional de lagartas e consequentes prejuízos aos sistemas de produção foram ocasionados por um processo cumulativo de práticas de cultivo inadequadas, caracterizadas pelo plantio sucessivo de espécies vegetais hospedeiras (milho, soja e algodão) em áreas contíguas, associado a um manejo inapropriado dos agrotóxicos. Isso tornou o agroecossistema progressivamente suscetível a doenças e aos insetos-praga devido à farta disponibilidade de alimentos, aos sítios de reprodução e ao abrigo durante quase todo o ano (EMBRAPA, 2013), especialmente em áreas irrigadas.

As espécies mais importantes de Lepidoptera que atacam a soja no país são *Chrysodeixis includens* (também conhecida como *Pseudoplusia includens*), *Anticarsia gemmatalis*, o complexo de espécies do gênero *Spodoptera* e, mais recentemente, *Helicoverpa armigera* (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013). Na cultura da soja, *C. includens* era considerada uma praga secundária, controlada naturalmente por parasitoides e fungos entomopatogênicos. Entretanto, há alguns anos têm sido relatados surtos nos estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo e Paraná (ALEXANDRE, 2010). Possivelmente as aplicações de fungicidas para o controle da ferrugem asiática, na soja, estejam contribuindo para a diminuição da incidência de fungos entomopatogênicos que mantinham a população do inseto em equilíbrio (MOSCARDI et al., 2011; SOSA-GÓMEZ, 2006; SOSA-GÓMEZ et al., 2003).

Atualmente, para o controle de *C. includens* são utilizados basicamente produtos químicos, os quais não têm sido eficientes em determinadas regiões brasileiras devido ao hábito da lagarta de permanecer na região inferior das folhas e sua população ser maior quando a soja está bem desenvolvida, o que dificulta que seja atingida (ALEXANDRE., 2010;

OLIVEIRA et al., 2010). Este fato faz com que sejam aumentadas as doses dos inseticidas, diminuindo a ação de seus inimigos naturais, além da evolução da resistência aos produtos em populações da praga (MOLINA, 2007).

A crescente conscientização da sociedade sobre a necessidade de um desenvolvimento econômico sustentável, comprometido com a saúde da população e de preservação do meio ambiente, tem impulsionado o crescimento de práticas alternativas aos métodos químicos de controle pragas. No Brasil, um bioinseticida denominado baculovírus anticarsia, cujo princípio ativo é o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), foi empregado desde o início da década de 1980 para o controle da lagarta-da-soja (MOSCARDI, 1999), alcançando dois milhões de hectares de soja na safra 2003/2004 (MOSCARDI et al, 2011). No entanto, a área tratada com este agente de controle microbiológico foi reduzida drasticamente em decorrência de desequilíbrio ecológico, o que levou à ressurgência de pragas como a lagarta falsa-medideira (*C. includens*), cujas populações tornaram-se mais frequentes desde 2003/2004 (MOSCARDI et al, 2011; BRAGA et al. 2011).

Os baculovírus são vírus que infectam artrópodes, principalmente insetos da ordem Lepidoptera. O nome baculovírus é derivado do formato em bastão de seu capsídeo, que mede 40-50 nm de diâmetro e 200-400 nm de comprimento. Esses vírus apresentam DNA dupla fita, circular, com tamanho variando de 80 a 230 kbp. Uma nova classificação taxonômica dividiu, recentemente, a família *Baculoviridae* nos gêneros *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* (KING et al., 2012). Esta família encontrava-se anteriormente composta por dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Lagartas com sintomas de virose em populações de *C. includens*, infestando lavoura comercial de soja, foram observadas na região de Buritis, MG, em fevereiro de 2014. As lagartas doentes apresentavam corpo flácido, com mudança de coloração e fragilidade da cutícula. O

município de Buritis, por ser parte da região Noroeste de Minas Gerais, tem sua vegetação constituída por cerrado. O presente trabalho teve o objetivo de confirmar a etiologia viral da doença em *Chrysodeixis includens* e identificar o agente microbiano responsável pela patologia.

Material e Métodos

Coleta e avaliação da incidência da doença em populações de *Chrysodeixis includens*

No período de fevereiro a março de 2014, foi realizado o levantamento da população de *C. includens* e da proporção de insetos doentes com vírus em áreas de cultivo comercial de soja na região de Buritis, MG (S15°22,2' W46°50,7'). Para tal, em cada uma das quatro coletas, com "pano de batida", os insetos foram quantificados, acondicionados em recipientes plásticos e alimentados com folhas de soja por seis dias. A cada dois dias, foi feita a contagem e retirada dos insetos com sintoma de infecção por baculovírus dos recipientes, além da reposição de alimento. Parte das larvas apresentando sinais típicos de infecção foi macerada e submetida a análise por microscopia óptica (Olympus CK2) para identificação do patógeno (poliedros). Outra parte das lagartas doentes foi macerada em água estéril, sendo o extrato resultante aplicado sobre folhas de soja e oferecido a larvas de terceiro instar de *C. includens* criadas em laboratório. Os insetos foram acondicionados em copos plásticos (26°C) e observados por até 10 dias. Os insetos mortos com sintoma da doença foram novamente macerados e as partículas virais identificadas em microscópio óptico.

Purificação de poliedros

Lagartas infectadas foram trituradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris 0,01 M pH 7,8; EDTA 0,001 M pH 8,0). Após filtragem em camadas de gaze com lã de vidro e centrifugação a 10.000 rpm por 15 min a 4°C (rotor Sorval SS 34), foram feitas lavagens do macerado por centrifugação em tampão TE

(Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0). Em seguida, a amostra foi aplicada em gradiente de sacarose de densidade 1,17 a 1,30 g/ml e submetida à ultracentrifugação a 24.000 rpm por 40 min a 4°C (rotor Sorvall AH 627). A banda de poliedros formada no terço inferior do tubo foi coletada e diluída de tampão TE (MARUNIAK, 1986). Após centrifugação a 12.000 rpm por 15min a 4°C (rotor Sorvall SS 34), o *pellet* contendo os poliedros foi suspenso em água e armazenado a -20°C.

Análise ultraestrutural

Para a análise ultraestrutural, o material (poliedros purificados) foi inicialmente fixado em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M e glutaraldeído 2,5%. Após tratamento com tampão de pós-fixação contendo tetróxido 1%, a amostra foi submetida a uma série de desidratações em etanol 30%, 70%, 90% e 100%, e condicionada em resina spurr. Em seguida, o bloco foi cortado em seções finas com ultramicrótomo (navalha de diamante) e colocado sobre telinhas de cobre. Finalmente, as telinhas com amostras foram coradas com acetato de uranila 2% e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (BOZZOLA; RUSSELL, 1992).

Resultados e Discussão

Lagartas com sintomas de infecção por baculovírus apresentaram descoloração da epiderme, flacidez da cutícula, culminando com lise dos tecidos (Figura 1). Um total de quatro coletas sucessivas de insetos na região revelou um aumento na porcentagem de insetos mortos por infecção natural de 10,6% para 31,2% (Figura 2).

As lagartas criadas em laboratório e que se alimentaram do extrato apresentaram os mesmos sintomas, confirmando a natureza viral da infecção (postulado de Koch). A visualização dos tecidos larvais em microscópio ótico demonstrou a presença de partículas refringentes características de baculovírus do tipo *Nucleopolyhedrovirus* (NPV).

Fotos: Francisco Guilherme Vergolino Schmidt

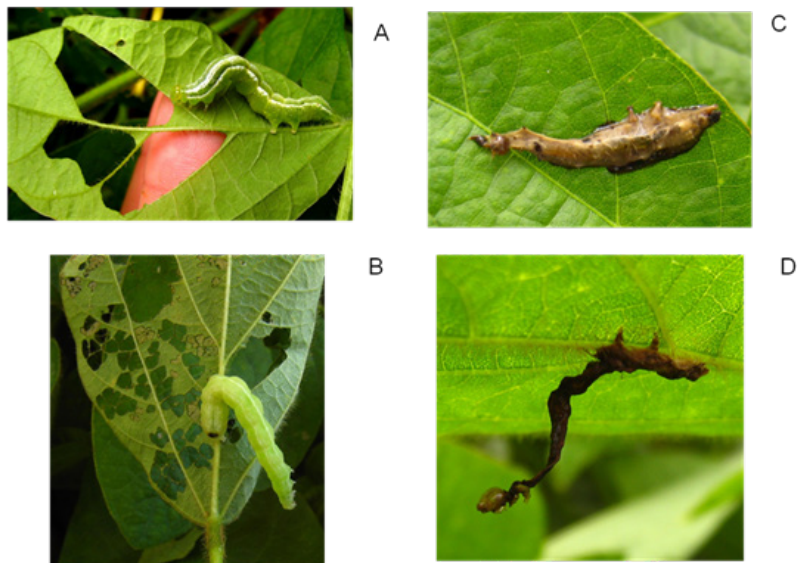


Figura 1. Figura 1. Sintomatologia da doença: (A) Larva de *Chrysodeixis includens* sadia em soja; (B) Larva doente apresentando descoloração da epiderme; (C) Larva morta com tegumento lisado; (D) tegumento seco da lagarta após lise celular.

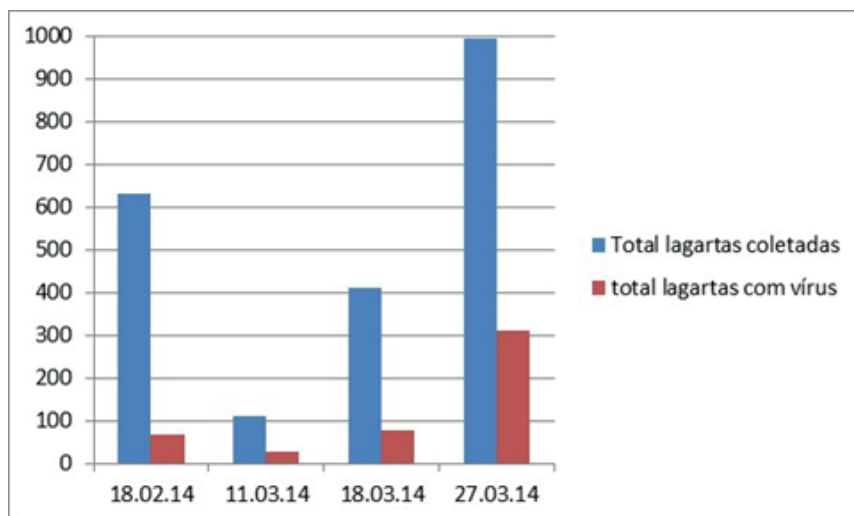


Figura 2. Número total de lagartas coletadas e infectadas com o vírus em lavoura comercial de soja nas diferentes datas (Buritis, MG).

A análise por microscopia eletrônica de transmissão revelou que as partículas virais (poliedros) medem cerca de 1 μM , com vários vírions oclusos na matriz proteica e contendo apenas um único vírion por envelope (Figura 3). O vírus foi identificado como *Pseudoplusia includens* Single Nucleopolyhedrovirus (PsinSNPV), pertencente ao gênero *Alphabaculovirus* da família *Baculoviridae*. O material foi depositado na Coleção de Vírus de Invertebrados da Embrapa sob o código CVI 113.

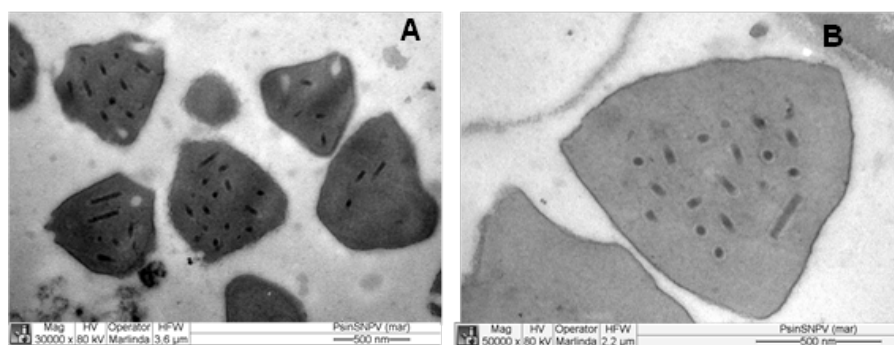


Figura 3. Ultraestrutura dos poliedros purificados. Os corpos de oclusão apresentam formato poliédrico (*nucleopolyhedrovirus*) contendo apenas um único vírion por envelope (*single*). (A) aumento de 30.000x; (B) aumento de 50.000x.

A ocorrência de *Pseudoplusia includens* Single Nucleopolyhedrovirus (PsinSNPV) em lagartas falsa-medideira coletadas em plantios de soja, no período de 2006 a 2008, nas regiões de Londrina, Maringá, Iguaraçu e Sertãozinho (Paraná) e em Dourados (Mato Grosso do Sul), e a análise comparativa dos isolados virais foi relatada por Alexandre e colaboradores (2010). Em cultura de maracujá infestado com *C. includens* no município de Linhares (Espírito Santo), também foi observada a infecção por baculovírus nos anos 2009 e 2010, porém o índice de insetos doentes foi considerado baixo, sem redução significativa das altas infestações da lagarta (BENASSI et al., 2012).

Conclusões

Embora o baculovírus PsinSNPV ainda não esteja disponível comercialmente, os dados observados para o isolado coletado em Buritis, MG, mostram que há potencial para sua utilização como biopesticida, requerendo futuros estudos de eficiência de controle para larvas de *C. includens*, em laboratório e campo, e de produção em larga escala.

Referências Bibliográficas

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.

BRAGA, D. P. V.; OLIVEIRA, W. S.; MARTINELLI, S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; OLIVEIRA, M. F. Estudo de caso da soja MON 87701 x MON 89788. In: BOREM, A.; ALMEIDA, G. D. de. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 347-390.

BENASSI, V. L. R. M.; VALENTE, F. I.; COMÉRIO, E. F.; CARVALHO, S. Lagarta- falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857), nova praga do maracujazeiro no Espírito Santo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 941-94, 2012.

BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy principles and techniques for biologists**. Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1992. 542 p.

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, 2013.

EMBRAPA. **Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas.** [Brasília, DF: Embrapa], 2013. 19 p.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. **Virus taxonomy:** classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 2012. 1.337 p.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.) **The biology of baculovirus.** CRC Press, Florida, v. 1, p. 129-146. 1986.

MOLINA, A. **Soja:** expectativa x frustração. 2007. Disponível em: <www.embrapa.br/Famasul.htm>. Acesso em: janeiro de 2011.

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

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**, SpringerLink, p. 415-445, 2011.

OLIVEIRA, J. R. G. di; FERREIRA, M. da C.; ROMÁN, R. A. A. Diferentes diâmetros de gotas e equipamentos para aplicação de inseticida no controle de *Pseudoplusia includens*. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 92-99, 2010.

SOSA-GOMEZ, D. R. Potencial do uso de entomopatógenos no controle de pragas da soja e seletividade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. In: SARAIVA, O. F.; LEITE, R. M. V. B. de C. (Ed.). **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja 2006.** Londrina: Embrapa Soja, 2006. p. 69-74. (Embrapa Soja. Documentos, 308).

SOSA-GÓMEZ, D. R.; DELPIN, K. E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M. H. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 287-291, 2003.

SPECHT, A; SOSA-GÓMEZ, D. R; PAULA-MORAES, S. V; YANO, S. 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.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANIHOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. In: **Virus Taxonomy**: seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1160 p, 2000.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

