

Avaliação de co-infecção de *Anticarsia gemmatilis* MNPV e *Chrysodeixis includens* NPV em cultura de células de inseto



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
333**

**Avaliação de co-infecção de *Anticarsia
gemmatalis* MNPV e *Chrysodeixis includens*
NPV em cultura de células de inseto**

*Márcio Martinello Sanches
William Sihler
Ana Cristina Meneses Gomes
Norton Polo Benito
Daniel Ricardo Sosa-Gómez
Claudia Efigênia Pereira Silva
Mariana Batista Caixeta Ferreira
Sulivan Dias Gomes
Marlinda Lobo de Souza*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva Maria Cléria Valadares Inglis; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Marília Lobo Burle

Revisão de texto
João Batista Teixeira

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Francisco Guilherme V. Schmidt

1ª edição
1ª impressão (ano): tiragem

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

Avaliação de co-infecção de *Anticarsia gemmatalis* MNPV e Chrysoideixis includens NPV em cultura de células de insetos. / Márcio Martinello Sanches... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

19 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 333).

1. Baculovirus. 2. Lagarta da soja 3. Lagarta falsa-medideira. I. Sanches, Márcio Martinello. II. Sihler, William. III. Gomes, Ana Cristina M. M. IV. Benito, Norton Polo. V. Sosa-Gomez, Daniel Ricardo. VI. Silva, Claudia Efigênia P. VII. Ferreira, Mariana Batista Caixeta. VIII. Gomes, Sullivan Dias. IX. Souza, Marlinda Lobo de. X. Série.

633.3491 – CDD 21

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	15
Conclusões.....	25
Referências	25

Avaliação de co-infecção de *Anticarsia gemmatalis* MNPV e *Chrysodeixis includens* NPV em cultura de células de inseto

Márcio Martinello Sanches¹

William Sihler²

Ana Cristina Meneses Gomes³

Norton Polo Benito⁴

Daniel Ricardo Sosa-Gómez⁵

Claudia Efigênia Pereira Silva⁶

Mariana Batista Caixeta Ferreira⁷

Sullivan Dias Gomes⁸

Marlinda Lobo de Souza⁹

Resumo – Os baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) e *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) que infectam duas importantes pragas da soja, *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*, respectivamente, foram testados a respeito da infectividade a diferentes linhagens celulares. As linhagens celulares, IPLB-SF-21AE, Sf9 e BTI-Tn-5B1-4, foram previamente definidas como produtivas para infecção de AgMNPV. Neste trabalho a susceptibilidade destas linhagens à infecção simples por ChinNPV e infecção mista de ChinNPV e AgMNPV foram testadas. As células foram semeadas a uma densidade de 1×10^6 por placa de 60mm^2 . Os vírus foram obtidos a partir de hemolinfa de larvas infectadas, aos 4 dias pós-infecção (d.p.i.), e adsorvidos a células durante 1 hora (P0). Células infectadas foram mantidas em meio TNMFH com-

¹ Virologista, Ph.D., pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Biólogo Molecular, mestre, analista Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Microscopia eletrônica, mestre, analista Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Entomologista, Ph.D., pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Entomologista, Ph.D., pesquisador da Embrapa Soja

⁶ Biologia, graduação, Universidade Paulista-Unip

⁷ Biologia, graduação, Centro Universitário de Brasília - UniCEUB

⁸ Biologia, graduação, Centro Universitário de Brasília - UniCEUB

⁹ Virologista, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

pleto a 27°C. As células foram inicialmente monitoradas por microscópio ótico durante cinco dias para realizar as análises morfológicas. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados para novas infecções (P1) usando o mesmo procedimento. Aos 5 d.p.i., os sobrenadantes foram coletados para a segunda passagem (P2). A ultraestrutura dos corpos de oclusão foi analisada por Microscopia Eletrônica de Transmissão para a passagem P0. A quantidade de DNA obtida dos *Budded Virus* (BVs) das três passagens foi monitorada por PCR em tempo real (qPCR) usando sistema Sybr *green* com primers desenhados para *gp64* de AgMNPV e *photolyase* de ChinNPV. Bioensaios foram realizados com larvas de *A. gemmatalis* e *C. includens* para comprovação de co-occlusão na dose estimada de 1 poliedro/larva. Os resultados demonstraram sucesso na co-infecção nestas células, mas a quantidade de ChinNPV tende a diminuir nas passagens seriais, enquanto a quantidade de AgMNPV tende a aumentar na primeira passagem e estabilizar na segunda passagem. Os resultados de bioensaios comprovaram a presença de poliedros co-ocluidos com ambos os vírus.

Termos para indexação: co-occlusão, baculovirus, lagarta da soja, lagarta falsa-medideira, *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens*.

Abstract – The *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) and *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) baculoviruses that infect two important soybean pests, *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens* respectively, were tested regarding their infectivity to different cell lines. The cell lines IPLB-SF-21AE, Sf9 and BTI-Tn-5B1-4 were previously evaluated as productive to AgMNPV infection. In this work the susceptibility of these cell lines to single infection of ChinNPV and mixed infection of ChinNPV and AgMNPV was tested. The cells were seeded at a density of 1×10^6 per 60mm² dish. The viruses were obtained through hemolymph from infected larvae at 4 days post-infection (d.p.i.) and allowed to adsorb to cells during 1 hour (P0). Infected cells were kept in TNMFH complete medium at 27°C. Morphological changes were initially monitored by light microscopy for five days. Then, the supernatants were collected for new infections (P1) using the same procedure. At 5 d.p.i. the supernatants were collected for the second passage (P2). The ultrastructure of the occlusion bodies was analyzed by Transmission Electron Microscopy for P0 passage. The amount of DNA obtained from Budded Virus (BVs) particles of the three passages was monitored by real-time PCR (qPCR) using Sybr green system with primers designed to *gp64* of AgMNPV and *photolyase* of ChinNPV. Bioassays were performed with both *A. gemmatalis* and *C. includens* larvae, to investigate the co-occlusion at 1 polyhedra/larvae. The results demonstrated successful co-infection in these cells, but whereas the amount of ChinNPV tends to decrease over serial passages, the amount of AgMNPV tends to increase in the first passage and to stabilize in the second one. The bioassays results confirmed the presence of co-occluded polyhedra.

Index terms: Co-occlusion, Baculovirus, Velvetbean Caterpillar, Soybean looper, *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens*.

Introdução

As espécies de Lepidoptera que atacam a soja no Brasil, em ordem decrescente de importância, são *Chrysodeixis includens* (= *Pseudoplusia includens*), *Anticarsia gemmatalis* e as espécies do gênero *Spodoptera*, *S. cosmioides*, *S. eridania*, e *S. albula*, todas pertencentes à família Noctuidae. Nas últimas safras, ataques severos de lagartas nas culturas de soja, milho e algodão na região do cerrado têm sido relatados por produtores. 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 vulnerável aos insetos-praga devido à farta disponibilidade de alimentos, sítios de reprodução e abrigo durante quase todo o ano (Embrapa, 2013).

A crescente consciência da sociedade sobre as necessidades de desenvolvimento econômico sustentável comprometido com a saúde da população e de preservação do meio ambiente tem impulsionado o crescimento do uso de práticas alternativas aos métodos químicos de controle de pragas. No Distrito Federal, a soja é a cultura com maior área cultivada, tendo sido plantados cerca de 70 mil ha no ano de 2016 (Emater, 2017). Devido à presença de inúmeros mananciais que dão origem a reservatórios de água para a população do Distrito Federal e de importantes rios do Brasil, é grande a preocupação com uma agricultura mais sustentável e que utilize menor quantidade de agrotóxicos.

No Brasil, um bioinseticida denominado baculovírus anticarsia, cujo princípio ativo é o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), tem sido empregado para o controle da lagarta da soja (Moscardi, 1999). Constitui-se no maior programa do mundo de controle biológico com vírus (Moscardi et al., 2011) tendo sido utilizado desde a década de 1980. No entanto, a área tratada com este agente de controle microbiológico foi reduzida drasticamente, em decorrência de desequilíbrio ecológico, levando a ressurgência de pragas como a lagarta falsa-medideira, *C. includens*, cujas populações tornaram-se mais frequentes desde 2003/2004 (Braga et al.

2011, Moscardi et al., 2011). Em 2007, foi relatada a ocorrência natural de *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) em lagartas falsa-medideira no Paraná (Craveiro et al., 2013) e em 2014 na região dos cerrados (Souza et al., 2015).

Os baculovírus possuem como característica peculiar, durante seu ciclo de vida, a formação de dois fenótipos virais distintos em estrutura e função: as formas *Occluded Derived Virus* (ODV) e *Budded Virus* (BV). A forma BV é produzida por brotamento do vírus através da membrana plasmática de células infectadas e serve para transmitir a doença entre várias células e tecidos dos insetos. A forma ODV, é encontrada nas partículas oclusas (poliedros), sendo altamente infecciosa às células epiteliais do intestino. Essa forma oclusa é embebida em uma matriz protéica, constituída principalmente por uma proteína derivada do vírus denominada poliedrina, sendo estável no meio ambiente e servindo para a transmissão da doença de inseto para inseto.

A produção comercial de baculovírus é atualmente feita pela infecção massal de lagartas em laboratório. A produção de baculovírus em cultura de células, em biorreatores, é uma alternativa interessante, pois possibilitaria a sua multiplicação em condições estéreis e utilizando menor espaço laboratorial. Apesar de vantajosa em relação à produção in vivo, a produção de baculovirus em sistema in vitro tem sido limitada devido a alterações genéticas causadas pela passagem do vírus em cultura de células (Krell, 1996). Estudos têm sido desenvolvidos para otimização de processos de produção in vitro.

A co-occlusão é um processo que ocorre após a co-infecção de uma célula hospedeira por dois vírus distintos. Foi muito utilizada para testes com espécies de baculovírus transgênicos com insertos na região do gene da poliedrina. Assim, a co-occlusão dos vírus recombinantes e dos tipos selvagens, que produzem normalmente a poliedrina, resultou em ambos os tipos de vírus ocluídos em poliedros (Hamblin et al., 1990; Wood et al., 1994). Em trabalho realizado com a co-occlusão de dois genótipos distintos de *Helicoverpa armigera* single *nucleopolyhedrovirus* (HearSNPV), Arrizubieta et al. (2015), verificaram que a linhagem resultante do processo apresentou características mais vantajosas para um biopesticida em comparação com as linhagens dos genótipos utilizadas isoladamente.

O presente trabalho visou a utilização da estratégia de co-occlusão de isolados de AgMNPV e ChinNPV em sistema *in vitro*, utilizando uma única linhagem celular, bem como a avaliação de sua patogenicidade no inseto hospedeiro.

Material e Métodos

2.1. Vírus e linhagens celulares

Foram utilizados os vírus *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV), coletado em Buritis-MG, e *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), clone viral 2D, cedido pelo Dr. James Maruniak (Universidade da Florida).

Células de *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) e *Spodoptera frugiperda* (SF21 e Sf9) foram mantidas em frascos T-25, a 27°C, em meio TNMFH (Gibco) suplementado com soro fetal bovino 10%.

2.2. Purificação de poliedros

Poliedros foram purificados de acordo com Maruniak (1986). Larvas de *C. includens* infectadas com o isolado Buritis (Souza et al. 2015) e de *A. gemmatalis* infectadas com o isolado Ag2D (Johnson e Maruniak, 1989) foram trituradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris 0,01M pH 7,8; EDTA 0,001M pH 8,0). Após filtragem em três camadas de gaze com lã de vidro e centrifugação a 10.000 rpm, por 15min, a 4°C (rotor Sorval SS 34), o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em 10 ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0). Após nova centrifugação a 12.000 rpm, por 12min, o pellet foi suspenso em tampão TE. Em seguida, foram aplicados 5,0 ml da amostra em gradiente de sacarose de densidade 1,17 a 1,30g/ml e submetido à centrifugação a 24.000 rpm, por 40min a 4°C (rotor Sorvall AH 627). A banda de poliedros formada no terço inferior do tubo foi coletada com uma pipeta Pasteur e diluída em quatro volumes de tampão TE. 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 .

2.3.Extração de DNA viral a partir de células infectadas

Foi utilizado o kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) de acordo com as recomendações da fabricante, a partir de 100 μl de sobrenadante de células infectadas e/ou poliedros purificados.

2.4.Extração do DNA a partir de poliedros

Inicialmente, foram adicionados 100 μl de solução Na_2CO_3 1M a uma suspensão de 1,5 ml de poliedros purificados (concentração de 5×10^8 PIBs/ml). A suspensão de poliedros foi incubada a 37°C por 30 min, para solubilização da poliedrina e liberação dos virions. Em seguida, foram adicionados 50 μl de SDS 20% e, após 10 min, foram acrescentados 50 μl de proteinase K (5 mg/ml). Foi feita então a incubação do material a 37°C por um período de 6 a 14 h. Para rápida remoção de *debris* celulares, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 2 min (microcentrifuga). Para extração do DNA, foi adicionado, ao sobrenadante, igual volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e utilizado o protocolo padrão descrito por Sambrook et al. (1989).

2.5.Real-time PCR (qPCR)

Foram desenhados *primers* específicos para genes distintos entre as duas espécies virais (AgMNPV e ChinNPV). Foi adotado o sistema Sybr *Green*, conforme a metodologia descrita por Zwart et al. (2008) para determinar a frequência genotípica em populações de baculovírus. Embora o vírus AgMNPV e o vírus ChinNPV pertençam ao mesmo gênero (*Alphabaculovirus*) e sejam do tipo *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), eles são filogeneticamente agrupados separadamente. O vírus AgMNPV pertence ao grupo NPV I e o ChinNPV ao NPV II. Eles apresentam genes únicos que foram utilizados como molde no emprego da técnica de PCR em tempo real. Primers específicos foram desenhados para os genes *gp64* e a *ORF ag31* do vírus AgMNPV, que codifica a glicoproteína GP64 e proteína *PARP-like*, respectivamente. Da mesma forma, foram desenhados primers específicos para gene que codifica a fotoliase do

vírus ChinNPV e o gene único que codifica a ORF5. As análises foram efetuadas com o kit Rotor gene Sybr Green PCR master mix (Qiagen) em equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

2.5.1 Padronização da reação

A concentração de *primers* em cada reação foi previamente otimizada, bem como a possibilidade de resultados falso-positivos foi testada a partir de DNA obtido de controles sem vírus de cultivos celulares e larvas. Também foi verificada a possibilidade de detecção da espécie viral não-alvo.

Posteriormente, foram efetuadas diluições seriadas do DNA obtido dos poliedros purificados. As reações foram efetuadas em triplicata para obtenção dos parâmetros de eficiência da reação e *Cycle threshold* (Ct) das reações.

2.5.2. Validação da reação

Para validação dos parâmetros de detecção previamente determinados, foram efetuadas as seguintes diluições seriadas de poliedros de ChinNPV e AgMNPV misturados: (mistura 1) 1×10^6 pol/ μ l de ChinNPV e 5 pol/ μ l de AgMNPV; (mistura 2) 5×10^5 pol/ μ l de AgMNPV e 10 poliedros/ μ l de ChinNPV; (mistura 3) 10^3 pol/ μ l de cada vírus. As misturas foram submetidas à extração de DNA com kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) de acordo com as recomendações da fabricante e submetidas à reação de qPCR. As reações de qPCR foram realizadas em duplicata técnica e repetidas para confirmação.

2.6. Produção in vitro dos vírus ChinNPV e AgMNPV

Foram utilizadas células de três linhagens celulares: *T. ni* (BTI-Tn-5B1-4) e *S. frugiperda* (IPLB-SF21AE e Sf9). As células foram mantidas a 27°C, em meio TNMFH (Gibco) suplementado com soro fetal bovino 10%, para experimentos em cultivo estático. Foram realizados ensaios de infecção com o ChinNPV isoladamente e em conjunto com o vírus AgMNPV. Avaliou-se neste a produção de vírus em três passagens subsequentes: P0, onde a infecção foi feita mediante uso de hemolinfa de lagarta previamente infectada, P1, na

qual utilizou-se como inóculo o sobrenadante da P0 e, por último, P2, na qual utilizou-se como inóculo o sobrenadante da P1.

Larvas de *A. gemmatalis* e *C. includens* (3^o /4^o ínstar) foram alimentadas com poliedros dos vírus AgMNPV e ChinNPV, respectivamente. Após o 4^o dia, a hemolinfa das larvas foi removida, tratada com cisteína, filtrada e adicionada à cultura de células separadamente (passagem P0). As células foram previamente semeadas numa densidade de 3×10^6 /frasco de 25cm², em meio TNMFH (Gibco) contendo soro fetal bovino.

Após o período de adsorção de 1h, o inóculo foi removido e as células foram mantidas em estufa a 28°C em meio de cultura. O sobrenadante contendo *Budded Virus* (BV) foi coletado 72h após infecção (passagem P1) e utilizado como inóculo na passagem seguinte e assim sucessivamente, utilizando o mesmo procedimento para infecção viral. Alíquotas dos cultivos foram removidas em diferentes períodos após infecção para visualização de alterações morfológicas, contagem do número de células infectadas, contagem do número de poliedros formados, extração do DNA a partir do sobrenadante (BVs) e qPCR.

2.7 Determinação da produção viral por Real-time PCR (qPCR)

Dois experimentos foram efetuados, sendo o primeiro com o DNA quantificado e padronizado na mesma concentração para todas as reações a fim de comparar a concentração viral nas passagens sucessivas. O segundo experimento foi efetuado padronizando-se a mesma quantidade de DNA para as reações de detecção de AgMNPV e ChinNPV para verificar-se qual dos vírus apresentou maior concentração em cada passagem.

Os poliedros obtidos nas passagens P0, P1 e P2 das co-infecções de ChinNPV e AgMNPV foram recolhidos através da metodologia descrita por Alves e Moraes (1998) e o DNA extraído a partir de 100 µl da suspensão de poliedros com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), de acordo com as recomendações da fabricante para posterior reação de qPCR.

2.8. Análise ultraestrutural

Para análise ultraestrutural de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas, amostras foram tratadas para visualização em microscopia eletrônica de acordo com Bozzola e Russel (1992). Inicialmente, as células foram fixadas em tampão de cacodilato de sódio 0,1M e glutaraldeído 2,5% e imersas em tampão de pós-fixação contendo tetróxido de ósmio. Em seguida, elas foram submetidas a uma série de desidratações em etanol 30%, 70%, 90% e 100%, e condicionadas em resina *spurr*. O material foi então cortado em seções finas com ultramicrotomo (navalha de diamante) e colocado sobre telinhas de cobre. Finalmente, as telinhas contendo as amostras foram coradas com acetato de uranila 2% e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (M.E.T.) 1011 (Bozzola e Russell, 1992).

2.9. Bioensaios

2.9.1. Criação de *C. includens*

Para o estabelecimento de criação de *C. includens*, foram realizadas coletas de larvas nas lavouras de soja nas áreas rurais do Distrito Federal, durante os meses de plantio (dezembro a fevereiro), através da técnica do pano de batida. As larvas foram mantidas em dieta artificial preparadas de acordo com Hoffmann-Campo et al. (1985) e todas as etapas da criação foram mantidas em estufa tipo B.O.D. com temperatura de 26°C +/- 1°C e fotofase de 13 horas e umidade relativa de 60%. Com os adultos obtidos destas larvas trazidas do campo, foi estabelecida uma criação padronizada para fornecimento de larvas para os testes em laboratório.

As pupas foram mantidas em gaiolas de polipropileno atóxico transparente, medindo 46,7 cm de comprimento, 32,3 cm de largura e 17,9 cm de altura (volume igual a 20 litros). As paredes da gaiola foram cobertas com folhas de papel sulfite, tamanho A4, cor rosa (para facilitar a observação das posturas de ovos) e fixadas com a tampa no fechamento da gaiola. A tampa apresentava uma abertura de 15 x 18 cm fechada com tecido tipo "voil". Nas gaiolas foram depositadas de 60 a 100 pupas. As mariposas emergidas, após seis a nove dias, foram alimentadas com dieta artificial líquida (Hoffmann-Campo et al., 1985). A partir do terceiro dia após a emergência, os adultos fazem as posturas no papel e os ovos foram recolhidos, diariamente, realizando-se a

troca da folha sulfite. A folha sulfite com os ovos foi dividida em seis ou oito partes que permaneceram acondicionadas em caixas incubadoras (33 cm de comprimento, 21,8 cm de largura e 10,3 cm de altura) com pequenos pedaços de dieta artificial, recolhidos quando as lagartas de segundo ínstar migravam para a dieta. Estas foram colocadas em recipientes de 50 mL transparentes e com um furo na tampa, que recebia um pequeno pedaço de algodão facilitando a troca de umidade com o ambiente externo. Cada recipiente comportava, aproximadamente, 50 indivíduos que foram fornecidos para os experimentos ou utilizados para a manutenção da criação.

As larvas de *A. gemmatalis* foram fornecidas pela Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, seguindo basicamente a mesma metodologia descrita acima.

2.9.2. Bioensaios para comprovação de co-occlusão

O ensaio, para constatar a presença de ambos os vírus no mesmo poliedro, foi baseado em estudo publicado por Arrizubieta et al. (2015) para comprovação de co-occlusão em genótipos de *H. armigera*. Uma suspensão de poliedros obtidos da passagem P0 das linhagens celulares infectadas simultaneamente com ChinNPV e AgMNPV foi preparada na concentração de 100 poliedros/ml.

Foram utilizadas 96 larvas de *C. includens* e 96 larvas de *A. gemmatalis* no estágio de 3º instar (tamanho de 10 a 13 mm de comprimento). Cada larva foi alimentada com folha de soja previamente inoculada com 10 µl da suspensão de poliedros (correspondente a dose estimada de 1 poliedro por larva) e mantidas em estufa B.O.D. a 26°C com fotofase de 13 horas. Após o segundo dia, as folhas de soja foram substituídas por dieta artificial e as larvas acompanhadas até 7 d.p.i. As larvas mortas e vivas foram coletadas para extração de DNA e detecção dos vírus através de qPCR.

As larvas de *A. gemmatalis* mortas no primeiro bioensaio foram utilizadas como inóculo em um segundo bioensaio. Foi realizada uma suspensão de 1:10 com as larvas maceradas. A suspensão foi oferecida a 24 larvas de *C. includens* mantidas na mesma condição do bioensaio anterior. Aos 7 d.p.i, as larvas foram coletadas para semi-purificação de poliedros, extração de DNA e qPCR para ambos os vírus.

Resultados e Discussão

3.1. Padronização e validação da metodologia de real-time PCR

3.1.1. Purificação de poliedros para padronização da reação

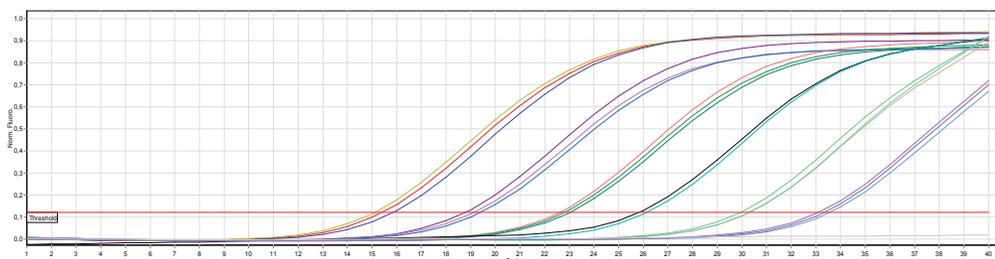
A purificação dos poliedros, a partir das lagartas infectadas, resultou em uma concentração de $9,7 \times 10^9$ poliedros/ml para ChinNPV e $5,3 \times 10^9$ poliedros/ml para AgMNPV. Após a extração de DNA, obteve-se uma concentração de 10 ng/ μ l para ambos os vírus através de quantificação em equipamento nano-drop (Thermo Scientific) e em gel de agarose utilizando o marcador de massa low DNA mass ladder (Invitrogen).

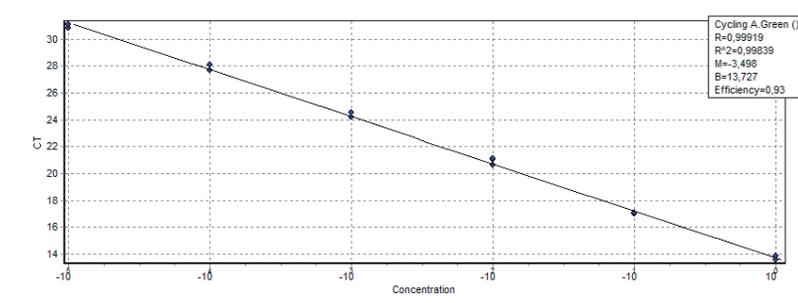
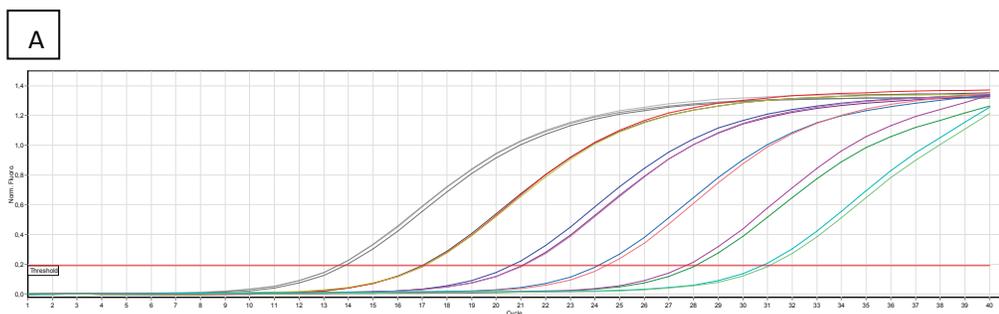
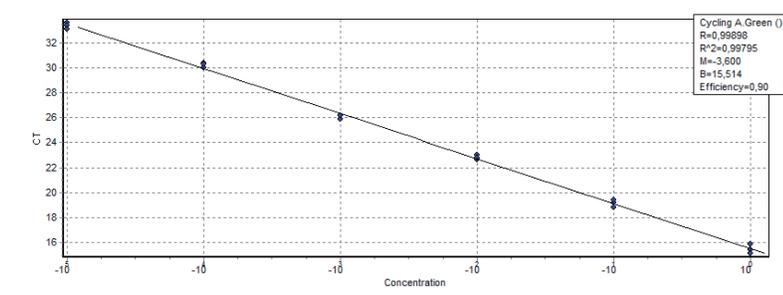
3.1.2. Padronização do método de real-time PCR

Dos quatro pares de *primers* desenhados, dois pares (gp64 para AgMNPV e photolyase para ChinNPV) foram utilizados para a padronização do método de real-time PCR em virtude do melhor desempenho de amplificação e ausência de dímeros de primers.

Foram testados dois kits: Rotor gene Sybr Green PCR master mix (Qiagen) e Platinum Sybr Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen), sendo escolhido o kit da Qiagen em virtude de melhor desempenho de amplificação.

Para a padronização da reação, utilizou-se o DNA obtido de poliedros em diluições seriadas. Os métodos apresentaram eficiência de reação de 0,90 e 0,93 para AgMNPV e ChinNPV, respectivamente (Figura 1). O método teve o limite de detecção de 10^{-5} ng de DNA para ambos os vírus, equivalente a dois poliedros de AgMNPV e quatro poliedros de ChinNPV.





B

Figura 1. Padrão de amplificação e eficiência da reação do real-time PCR para AgMNPV (A) e ChinNPV (B) com DNA obtido de poliedros em diluições seriais em incrementos de 10.

3.1.3. Validação do método de real-time PCR

A extração de DNA das misturas foi quantificada através de equipamento nanodrop (Thermo Scientific) e em gel de agarose utilizando

o marcador de massa low DNA mass ladder (Invitrogen). Foram obtidos os valores de 5 ng/μl para as misturas 1 e 2 e de 1 ng/μl para a mistura 3. Os vírus foram eficientemente detectados em ambas as repetições, e na faixa de *Cycle threshold* (Ct) esperada. Ocorreu uma variação em relação ao padrão absoluto utilizado (tabela 1) que pode ser considerado normal, em virtude das variações intrínsecas à natureza dos poliedros (número de vírions variável), bem como das variações intrínsecas ao método de extração de ácidos nucleicos, como observado em outros trabalhos (Barrera et al., 2016; Botelho et al., 2016).

Tabela 1. Quantificação dos genes photolyase e gp64 através de real-time PCR (qPCR) a partir de DNA obtido de misturas de poliedros de ChinNPV e AgMNPV

Amostra	Quantificação do gene viral (ng/μl)	
	ChinNPV – photolyase	AgMNPV- gp64
Experimento 1		
Mistura1	9,12	1,67x10 ⁻³
Mistura2	1,79x10 ⁻⁴	16,0
Mistura 3	2,79x10 ⁻²	6,22x10 ⁻²
Experimento 2		
Mistura1	7,05	2,08x10 ⁻³
Mistura2	6,15x10 ⁻⁴	12,6
Mistura 3	3,90x10 ⁻²	5,55x10 ⁻²

3.2. Co-Infecção de linhagens celulares com ChinNPV e AgMNPV

Experimentos preliminares com sete linhagens celulares, *Bombyx mori* (BM-5), *Lymantria dispar* (IPLB-LD-625Y), *T. ni* (BTI-Tn-5B1-4 e Tn-368), *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) e *S. frugiperda* (SF21 e Sf9), demonstraram que o vírus ChinNPV produziu poliedros apenas nas linhagens SF21, Sf9 e Tn-5B1-4, sendo que as células Tn-5B1-4 apresentaram maior quantidade de células infectadas quando observadas ao microscópio óptico (Figura 2). Essas linhagens celulares também são produtivas para o vírus AgMNPV e, portanto, foi testada também a co-infecção com ambos os vírus. Verificou-se após sucessivas passagens (P1 e P2) que a infecção com

ChinNPV diminuiu em todas as linhagens celulares, fato este comprovado pelas análises de real-time PCR a partir do sobrenadante contendo *Budded virus* (BVs) (Tabela 2).

Nos experimentos com a co-infecção, foi possível verificar a presença de células infectadas com ambos os vírus (Tabela 2), porém como esperado as células infectadas apresentaram Ct mais alto para ChinNPV comparado a AgMNPV ou seja, a quantidade de vírus AgMNPV é maior do que ChinNPV, e a tendência é de aumento da quantidade de AgMNPV e diminuição na quantidade de ChinNPV com as sucessivas passagens (P1 e P2).

Através da M.E.T., verificou-se presença de células com poliedros contendo partículas envelopadas com nucleocapsídeos *multiple* e *single* indicando provável co-infecção por ambos os vírus (figura 3). Verificou-se também a presença de ambos os vírus nos poliedros coletados das co-infecções in vitro (Tabela 3). O mesmo padrão das reações a partir de BVs foi observado nos poliedros, com predominância de AgMNPV em todas as passagens e diminuição na quantidade de ChinNPV após sucessivas passagens.

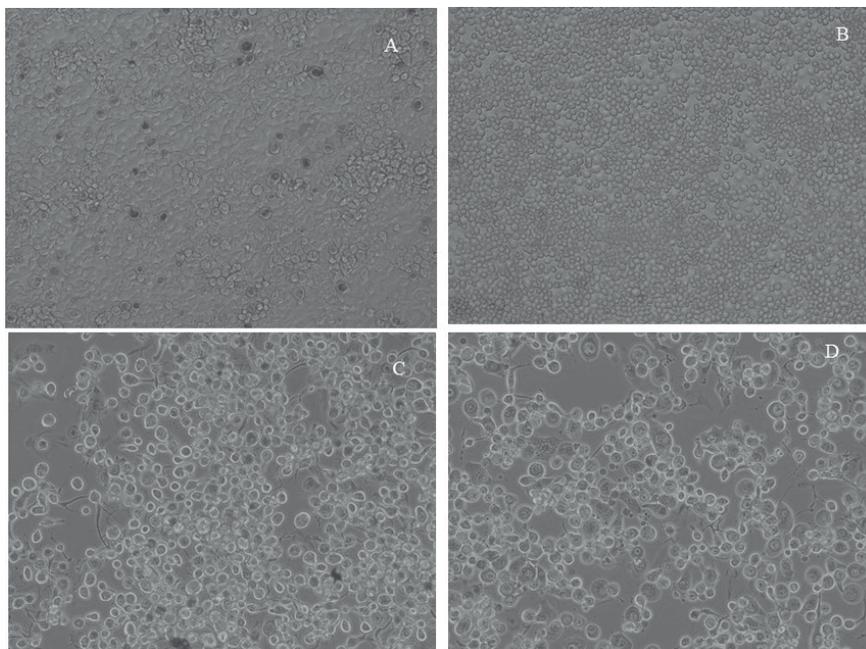


Figura 2. Células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com ChinNPV (A), Controle “mock infected” (B), co-infectadas com AgMNPV e ChinNPV (C), infectadas com AgMNPV (D). Infecção a partir da hemolinfa (P0), microscopia óptica aos 4 d.p.i (objetiva 10x).

Tabela 2. Cycle thresholds (Ct) obtidos em PCR em tempo-real para os genes photolyase de *Pseudoplusia includens* single nucleopolyhedrovirus (ChinNPV) e gp64 de *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) em diferentes passagens celulares e experimentos.

Passagem	Linhagem celular	ChinNPV	ChinNPV+AgMNPV	
		photolyase	photolyase	gp64
Experimento 1				
P0	Sf21	NT	27,6	18,7
	Sf9	NT	26,3	19,6
	Tn5B1-4	23	27,8	22,5
P1	Sf21	25,7	30	15,1
	Sf9	26,3	30,6	17,1
	Tn5B1-4	26,3	31	17
P2	Sf21	31,1	ND	17,5
	Sf9	32,8	ND	18
	Tn5B1-4	32,1	ND	19,3
Experimento 2				
P0	Sf21	NT	31,8	22
	Sf9	NT	31,7	23,4
	Tn5B1-4	27,9	32,4	21,1
P1	Sf21	31	ND	19,3
	Sf9	31,4	ND	20,9
	Tn5B1-4	33,2	ND	20
P2	Sf21	ND	ND	20,4
	Sf9	ND	ND	21,1
	Tn5B1-4	ND	ND	23,9
Experimento 3				
P1	Sf21	31,4	32	11,7
	Sf9	31,4	31,8	31,9
	Tn5B1-4	30,6	31,3	13,9
P2	Sf21	ND	ND	13,6
	Sf9	ND	33,1	30,5
	Tn5B1-4	ND	ND	18,6

NT: não testado; ND: não detectado pelo método

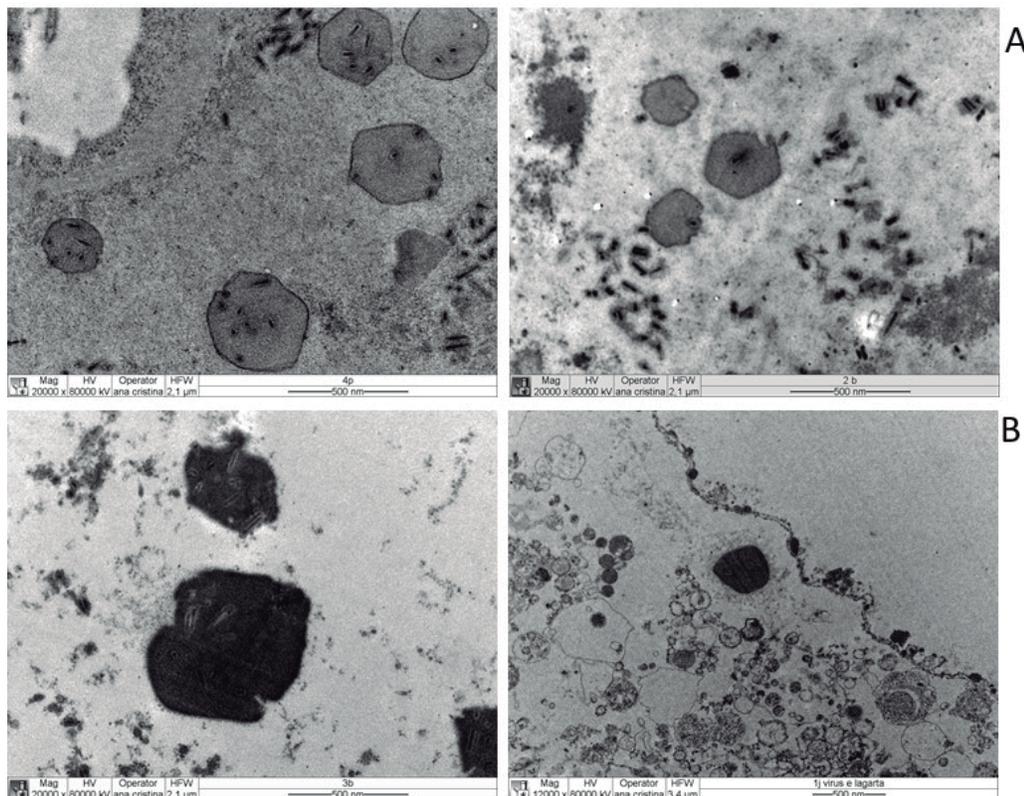


Figura 3. Micrografia eletrônica de células Tn5B1-4 infectadas com ChinNPV (A) apresentando poliedros com partículas *single* e co-infectada (B) com AgMNPV e ChinNPV aos 6 d.p.i., apresentando poliedros em formação com partículas *single* e *multiple*.

Tabela 3. Quantificação dos genes *photolyase* e *gp64* através de real-time PCR (qPCR) a partir de DNA obtido de poliedros provenientes de células co-infectadas com ChinNPV e AgMNPV

Amostra	Quantificação do gene viral (ng/μl)	
	ChinNPV – photolyase	AgMNPV- gp64
Experimento 1		
P0	3,4x10 ⁻⁴	3,46
P1	9,8x10 ⁻⁵	3,89
P2	7,17x10 ⁻⁶	1,97
Experimento 2		
P0	8,31x10 ⁻⁴	3,25
P1	3,04x10 ⁻⁴	4,06
P2	3,17x10 ⁻⁵	1,79

3.4. Bioensaio para comprovação de co-occlusão

Ocorreu baixa mortalidade nas lagartas infectadas com poliedros obtidos da co-infecção em linhagens celulares (P0) na dose estimada de 1 poliedro/larva. Resultado semelhante foi observado por Arrizubieta et al. (2015) com *H. armigera*, que obtiveram mortalidade de 12% com a mesma dose de poliedro/larva. Em *A. gemmatalis*, verificou-se a presença de 6 larvas mortas e em *C. includens* verificou-se 4 larvas mortas em um total de 96 larvas inoculadas de cada espécie. Ambas as espécies de lepidópteros apresentaram cerca de 10 larvas com aspecto doente, mas que permaneceram vivas até 7 d.p.i. As larvas mortas foram coletadas e maceradas individualmente para extração de DNA. As larvas consideradas doentes foram maceradas em conjunto para a extração de DNA.

As larvas que permaneceram vivas sem aspecto de doença foram coletadas e maceradas conjuntamente e submetidas à semi-purificação de poliedros. Verificou-se a presença de poliedros em ambas as espécies de lepidópteros vivas submetidas a este procedimento. A suspensão de poliedros foi

submetida a procedimento de extração de DNA. A partir dos DNA extraídos das larvas mortas e vivas e da suspensão de poliedros foram efetuadas reações de qPCR em duplicata técnica para ambos os vírus.

No segundo bioensaio realizado com *C. includens*, tendo *A. gemmatalis* mortas do primeiro bioensaio como inóculo, verificou-se ausência de mortalidade de larvas. Todas as larvas do segundo bioensaio foram coletadas e submetidas à semi-purificação de poliedros. Observou-se a presença de poliedros na suspensão obtida e partiu-se para procedimento de extração de DNA e qPCR em duplicata técnica.

Os resultados das reações de qPCR (tabela 4) revelam que ocorreu a co-occlusão de ambos os vírus no mesmo poliedro. Surpreendentemente, ocorreu maior concentração de ambos os vírus nas larvas vivas, sem sintoma da doença. Foi possível verificar a presença apenas de ChinNPV nas larvas mortas (uma de *A. gemmatalis* e três de *C. includens*), porém em baixíssima concentração. Não foi detectada presença de ambos os vírus nas larvas vivas com sintomas de doença, provavelmente causadas por outros agentes. Já nas larvas mortas em que não houve detecção, pode ter ocorrido uma quantidade de vírus abaixo do limite de detecção do método, já que as larvas foram maceradas individualmente, e a própria quantificação do DNA, realizada previamente à reação de qPCR, apontou baixas concentrações (entre 1 a 5 ng/ μ l de DNA total).

Isto é reforçado pela presença de maior concentração de ChinNPV nas larvas de *C. includens* do segundo bioensaio. A quantidade de AgMNPV no segundo bioensaio também foi ligeiramente superior em relação às outras *C. includens* e *A. gemmatalis* do primeiro bioensaio. As diferentes proporções de vírus co-ocluídos também foram verificadas no trabalho de Arrizubieta et al. (2010) com genótipos de HaSNPV.

Tabela 4. Quantificação dos genes *photolyase* e *gp64* através de real-time PCR (qPCR) a partir de DNA obtido de larvas utilizadas nos bioensaios de comprovação da co-occlusão

Amostras	Quantificação do gene viral (ng/μl)	
	ChinNPV – photolyase AgMNPV- gp64	
Bioensaio 1		
(dose de 1 poliedro/larva)		
<i>A. gemmatalis</i> morta (1 larva)	1x10 ⁻⁵	ND
<i>A. gemmatalis</i> morta (1 larva)	ND	ND
<i>A. gemmatalis</i> morta (1 larva)	ND	ND
<i>A. gemmatalis</i> morta (1 larva)	ND	ND
<i>A. gemmatalis</i> morta (1 larva)	ND	ND
<i>A. gemmatalis</i> morta (1 larva)	ND	ND
<i>C. includens</i> morta (1 larva)	9,1x10 ⁻⁶	ND
<i>C. includens</i> morta (1 larva)	3,7x10 ⁻⁵	ND
<i>C. includens</i> morta (1 larva)	2,7x10 ⁻⁵	ND
<i>C. includens</i> morta (1 larva)	ND	ND
<i>A. gemmatalis</i> doentes (~10 larvas)	ND	ND
<i>C. includens</i> doentes (~10 larvas)	ND	ND
<i>C. includens</i> viva (~80 larvas – poliedro semi-puro)	3x10 ⁻⁴	5,7x10 ⁻⁵
<i>A. gemmatalis</i> viva (~80 larvas – Poliedro semi-puro)	2,1x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁵
Bioensaio 2		
(larvas de <i>A. gemmatalis</i> mortas com o inóculo 1:10)		
<i>C. includens</i> viva (24 larvas– poliedro semi-puro)	4,7x10 ⁻³	7x10 ⁻⁵

Conclusões

1. A co-infecção dos vírus ChinNPV e AgMNPV tem a possibilidade de ser obtida em cultivos de células de insetos, porém não é viável para o desenvolvimento de futuro biopesticida, em função da diminuição do título do vírus ChinNPV após sucessivas passagens em cultivo celular.
2. A metodologia de real-time PCR (qPCR) desenvolvida se provou eficaz na quantificação dos vírus em co-infecção em cultivos in vitro, e também em larvas infectadas.
3. A metodologia de bioensaio utilizada se mostrou eficaz para a comprovação da co-occlusão viral.

Agradecimentos

À Fundação de apoio à pesquisa do DF (FAP-DF) pelo suporte financeiro (PPP/FAPDF/CNPq 193.000.661/2015).

Referências

- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ. 1998. p. 765-777.
- ARRIZUBIETA, M.; SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. A novel binary mixture of *Helicoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus genotypic variants has improved insecticidal characteristics for control of cotton bollworms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 3984 – 3993, 2015. doi:10.1128/AEM.00339-15
- BARRERA, G.; MURCIA, J.; CERÓN, J.; CUARTAS, P.; GUZMÁN, C.; VILLAMIZAR, L. PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 18, n. 2, p. 24-31, 2016. <https://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61514>.
- BOTELHO, S. R. A.; MARTINS, T. P.; DUARTE, M. F.; BARBOSA, A. V.; LAU, D.; FERNANDES, F. R.; SANCHES, M. M. Development of methodologies for virus detection in soybean and wheat seeds. **MethodsX**, v. 3, p. 62-68, 2016.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**: principles and techniques for biologists. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992. 542 p.
- 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. (org) **Plantas geneticamente modificadas**: desafios e oportunidades para regiões tropicais. v. 1. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 347–390.
- CRAVEIRO, S. R. ; MELO, F. L. ; RIBEIRO, Z. M. A. ; RIBEIRO, B. M. ; BÃO, S. N. ; INGLIS, P. W. ; CASTRO, M. E. B. Pseudoplusia includens single nucleopolyhedrovirus: Genetic diversity, phylogeny and hypervariability of the pif-2 gene. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 258-267, 2013.
- EMATER-DF. Informações agropecuárias do Distrito Federal. Brasília, DF: Secretaria de Estado de Agricultura e Desenvolvimento Rural – DF, 2017. 20 p.
- EMBRAPA. **Ações emergenciais propostas pela Embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas**. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 19 p.

HAMBLIN, M.; VAN BEEK, N. A. M.; HUGHES, P. R.; WOOD, H. A. Co-Occlusion and persistence of a baculovirus mutant Lacking the polyhedrin gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3057-3062, 1990.

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

JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2D) DNA. **Journal of General Virology**, v. 70, p. 1877–1883, 1989.

KRELL, P. J. Passage effect of virus infection in insect cells. **Cytotechnology**, v.20, p.125-137. 1996.

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

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: agricultural and environmental applications**. Springer, 2011. p. 415-445.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

SOUZA, M. L. de; SIHLER, W.; SANCHES, M. M.; SCHMIDT, F. G. V.; BENITO, N. P.; SILVA, M. L. da; FARIA, M. R. de; LOPES, R. B. **Ocorrência de baculovírus em larvas de *Chrysodeixis includens* em cultivo de soja na região do Cerrado**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2016. 19 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 313)

WOOD, H. A.; HUGHES, P. R.; SHELTON, A. Field studies of the co-occlusion strategy with a genetically altered Isolate of the *autographa californica* Nuclear *Polyhedrosis Virus*. **Environmental Entomology**, v.23, n.2, p.211-219, 1994.

ZWART, M. P.; VAN OERS, M. M.; CORY, J. S.; VAN LENT, J. W. M.; VAN DER WERF, W.; VLAK, J. M. Development of a quantitative real-time PCR for determination of genotype frequencies for studies in baculovirus population biology. **Journal of Virological Methods**, v.148, p.146–154, 2008.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



CGPE 14369