

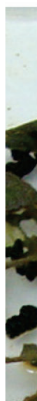
## Análise de patogenicidade de isolados de *Chrysodeixis includens* NPV para uso na produção de bioinseticidas



Plantação de Soja



Lagarta infectada  
morta por vírus



Vírus purificado

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

**BOLETIM DE PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO  
349**

**Análise de patogenicidade de isolados  
de *Chrysodeixis includens* NPV para  
uso na produção de bioinseticidas**

*Luis Arthur Versiane Moura Santos  
Zilda Maria de Araujo Ribeiro  
Letícia Santos Penna Fernandes  
Ana Catarina de Queiroz Ferreira  
Isabella de Souza Mota  
Ana Cristina Meneses Mendes Gomes  
Saluana Rocha Craveiro  
Maria Elita Batista de Castro*

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*

Secretária-Executiva  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

Membros  
*Antonietta Nassif Salomão; Bianca Damiani Marques; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Tavares da Silva; João Batista Teixeira; Maria Cléria Valadares-Ingles; Rosameres Rocha Galvão; Tânia da Silveira Agostini Costa*

Supervisão editorial  
*Ana Flávia do N. Dias Côrtes*

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  
*Maria Elita de Castro*

**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

Análise de patogenicidade de isolados *Chrysodeixis includens* NPV para uso na produção de bioinseticidas / Luis Arthur V. M. Santos et al ... – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2019.  
22 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 349).

ISSN: 0102-0110  
Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader  
Modo de Acesso: World Wide Web

1. Baculovírus. 2. Classificação taxonômica. 3. Controle biológico. 4. Patogenicidade. I. Santos, Luis Arthur V. M. II. Ribeiro, Zilda Maria A. III. Fernandes, Leticia S. P. IV. Ferreira, Ana Catarina Q. V. Mota, Isabella de Souza. VI. Gomes, Ana Cristina M. M.. VII. Craveiro, Saluana Rocha. VIII. Castro, Maria Elita B. VIII. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. IX. Série

## Sumário

---

Resumo .....	5
Abstract .....	6
Introdução.....	7
Material e Métodos .....	9
Resultados e Discussão .....	11
Conclusões.....	16
Agradecimentos.....	17
Referências .....	17



## Análise de patogenicidade de isolados de *Chrysodeixis includens* NPV para uso na produção de bioinseticidas

Luis Arthur Versiane Moura Santos<sup>1</sup>

Zilda Maria de Araujo Ribeiro<sup>2</sup>

Letícia Santos Penna Fernandes<sup>3</sup>

Ana Catarina de Queiroz Ferreira<sup>4</sup>

Isabella de Souza Mota<sup>5</sup>

Ana Cristina Meneses Mendes Gomes<sup>6</sup>

Saluana Rocha Craveiro<sup>7</sup>

Maria Elita Batista de Castro<sup>8</sup>

**Resumo** – *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) tem sido considerada uma praga severa em lavouras como a soja e o algodão, espécies de grande importância econômica para o Brasil. Inseticidas à base de baculovírus, um grupo de vírus patogênicos a insetos, têm sido usados com sucesso para controlar lepidópteros-praga na agricultura brasileira. A multiplicação em massa do vírus para a produção comercial deve partir da seleção de isolados virais com alta virulência para resultar em um produto com alta efetividade contra a praga no campo. Dois isolados virais, obtidos de lagartas infectadas de *Chrysodeixis includens* em plantações de soja em Buritis-MG, foram purificados, identificados, analisados e avaliados quanto à atividade biológica por meio de bioensaios em condições de laboratório. Análises ultraestruturais e bioquímicas demonstraram que esses isolados virais podem ser classificados como *nucleopolyhedrovirus* (NPV) pertencentes à família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus* e da espécie *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV). Esses isolados foram nomeados de ChinNPV-MG.A e ChinNPV-MG.B. Embora ambos os isolados, ChinNPV-

---

<sup>1</sup> Biólogo, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Mestre, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Graduação em Biomedicina, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Graduação em Biomedicina, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Bióloga, Mestre, analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>7</sup> Bióloga, Doutora, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>8</sup> Bióloga, Doutora, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

MG.A e ChinNPV-MG.B, tenham mostrado alto grau de patogenicidade (menores CL<sub>50</sub>) em larvas de *Chrysodeixis Includens*, o ChinNPV-MG.B foi o mais virulento entre todos os isolados avaliados, incluindo os 11 isolados de ChinNPV analisados em estudos anteriores. A expectativa é que, dentre os 13 isolados virais testados, os de maior patogenicidade, como ChinNPV-MG.B, ChinNPV-MG.A, ChinNPV-IA, ChinNPV-IF, ChinNPV-IE e ChinNPV-MT.B, possam ser usados como ingrediente ativo para produção de bioinseticidas virais e que os resultados obtidos possam encorajar futuros esforços para melhorar a eficácia de ChinNPV contra a praga *Chrysodeixis includens*.

**Termos para indexação:** *Chrysodeixis includens* NPV, classificação taxonômica, patogenicidade, controle biológico.

### **Pathogenicity analysis of *Chrysodeixis includens* NPV isolates for use in the bioinsecticide production**

**Abstract** – *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) is considered a serious pest in crops such as soybeans and cotton, species of great economic importance for Brazil. Insecticides based on baculoviruses, a group of insect-pathogenic viruses, have been successfully used to control lepidopteran pests in Brazilian agriculture. The mass multiplication of virus for commercial production must start with the selection of viral isolates with high virulence to produce a product with high effectiveness against the pest in the field. Two viral isolates obtained from infected *Chrysodeixis includens* caterpillars in soybean plantations in Buritis-MG were purified, identified, analyzed and their biological activity evaluated in bioassays under laboratory conditions. Ultrastructural and biochemical analyzes demonstrated that these viral isolates should be classified as nucleopolyhedrovirus (NPV) belonging to the family *Baculoviridae*, genus *Alphabaculovirus*. These isolates of the viral species *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) were named as ChinNPV-MG.A, and ChinNPV-MG.B. Although both isolates showed a high degree of pathogenicity (low LC<sub>50</sub>) in *Chrysodeixis includens* larvae, ChinNPV-MG.B was the most virulent among all isolates evaluated, including the 11 ChinNPV isolates analyzed in previous studies. The expectation is that among the 13 viral isolates tested, those with the highest pathogenicity, such as ChinNPV-MG.B, ChinNPV-MG.A, ChinNPV-IA, ChinNPV-IF, ChinNPV-IE, and ChinNPV-MT.B can be used for the production of virus-based bioinsecticides, and that the findings obtained can encourage future efforts to improve the efficacy of ChinNPV against the pest, *Chrysodeixis includens*.

**Index terms:** *Chrysodeixis includens* NPV, taxonomic classification, pathogenicity, biological control.

## Introdução

---

*Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) é uma lagarta, conhecida popularmente como lagarta falsa-medideira, devido ao seu deslocamento em mede-palmo. É uma praga polífaga, de ampla distribuição geográfica (Moscardi et al., 2012), encontrada em uma grande variedade de culturas de importância econômica (Specht et al., 2015), com destaque para as culturas de soja e algodão. Essa praga desfolhadora possui grande potencial destrutivo, requerendo cuidados durante todo o período de desenvolvimento das plantas. Os danos causados por essa praga durante a fase vegetativa e reprodutiva da soja têm trazido perda de produtividade com grandes prejuízos para os produtores (Bueno et al., 2007, 2011; Martins; Tomquelski, 2015). A forma mais utilizada para o controle da praga tem sido o controle químico. Porém, o uso indiscriminado e inadequado de inseticidas químicos tem favorecido a uma maior ocorrência de resistência de insetos a esses produtos. O aumento crescente dessa resistência tem forçado a busca de estratégias de controle mais eficazes e menos nocivas para o meio ambiente e seres humanos. Neste sentido, os baculovírus se apresentam como uma alternativa viável e atraente para uso no manejo integrado de pragas em sistemas agrícolas.

Os baculovírus são um grupo de vírus de ocorrência natural, específicos para artrópodes, que infectam larvas de insetos (Herniou et al., 2003). A maioria dos baculovírus que infecta as larvas de lepidópteros tem alta virulência e especificidade apresentando faixa estreita de hospedeiros tendo apenas uma ou algumas espécies hospedeiras. O nome baculovírus deriva do latim *baculum*, que se refere à morfologia em forma de bastonete de seus nucleocapsídeos (Friesen, 2007). Na classificação taxonômica, esses vírus são pertencentes à família *Baculoviridae*, que é dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus*, respectivamente nucleopolyhedrovirus (NPV) e granulovirus (GV), que infectam insetos da ordem *Lepidoptera*, e *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus*, vírus que infectam insetos das ordens *Hymenoptera* e *Diptera*, respectivamente (Williams et al., 2017, Harrison et al., 2018). Os NPVs podem apresentar apenas um nucleocapsídeo (SNPV: *single nucleopolyhedrovirus*) ou vários (MNPV: *multiple nucleopolyhedrovirus*) por envelope. Esses vírus possuem genomas de DNA de fita dupla circular, variando de 80-180 kbp que codificam 90-180 genes (Rohrmann, 2013). Os genomas apresentam 38 *core genes*, que são altamente conservados entre todos baculovírus até então sequenciados (Garavaglia et al., 2012; Javed et al., 2017).

O ciclo de infecção dos baculovírus é bifásico, pois resulta na produção



de dois diferentes fenótipos virais: BV (*budded virus*) e ODV (*occlusion-derived virus*). Os do tipo BV, chamados de vírions brotados ou vírus extracelulares, são os responsáveis pela propagação sistêmica da infecção (célula a célula) dentro do inseto hospedeiro e pela infecção em cultivos celulares de inseto. Os ODVs, chamados vírus derivados do corpo de oclusão, e os OBs (corpos de oclusão) são responsáveis pela infecção oral e pela transmissão horizontal do vírus, de inseto para inseto. Esse ciclo, basicamente consiste da ingestão de partículas OBs pela larva que se alimenta da folha com vírus, que ao atingir o intestino médio, sua matriz proteica é dissolvida nas condições alcalinas (pH 9,5-11,5) e ação de proteases do meio, liberando ODVs. Os ODVs atravessam a membrana peritrófica e infectam as células epiteliais por fusão de membranas (nucleocapsídeos virais/microvilosidades), iniciando assim a infecção primária. Os nucleocapsídeos são transportados para o núcleo da célula e iniciam a replicação. Alguns nucleocapsídeos migram do citosol para a membrana celular que, por brotamento, formam as partículas BVs. Durante o estágio final da infecção, os nucleocapsídeos no núcleo são envelopados resultando em ODVs, que são oclusos em uma matriz proteica cristalina formando os OBs.

Os baculovírus têm sido usados como agentes de controle biológico por possuírem características bastante favoráveis, são específicos e apresentam alta infectividade em seus hospedeiros, oferecendo segurança aos humanos e compatibilidade com outros inimigos naturais. Esses vírus, quando usados de forma adequada, controlam eficientemente insetos pragas no campo, sem poluir o meio ambiente (Valicente; Tuelher, 2009; Moscardi et al., 2011).

Diante disso, o Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem realizando estudos de caracterização, avaliação e seleção de isolados virais de alta virulência e patogenicidade em seus insetos hospedeiros visando (a) aumentar a eficiência do controle biológico em sistemas de manejo integrado de pragas e (b) dar suporte à pesquisa e ao desenvolvimento de formulações de inseticidas a partir do ingrediente ativo baculovírus.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de dois isolados de ChinNPV, obtidos de lagartas falsa-medideira mortas, em plantações de soja, no estado de Minas Gerais; comparar os parâmetros de mortalidade com os de outros 11 isolados virais de diferentes regiões geográficas; e, então, selecionar os isolados mais virulentos para disponibilização de uso no controle biológico da praga *Chrysodeixis includens*.

## Material e Métodos

### Obtenção e isolamento de partículas virais

Larvas mortas de *Chrysodeixis includens*, com sintomas de infecção por vírus, foram coletadas em plantações de soja no município de Buritis (MG) e enviadas para o Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Esse material foi macerado em SDS 0,5 %, filtrado em quatro camadas de gaze com lã de vidro e centrifugado a 7000 g/ 15 min/ 4 °C. O *pellet* contendo os OBs foi novamente lavado em SDS 0,5%, seguido com SDS 0,1% e então com NaCl 0,5M, sendo cada uma dessas etapas intercalada de centrifugação nas mesmas condições anteriores. O material foi então ressuscitado em água Milli-Q autoclavada e a concentração viral foi estimada por contagem de número de poliedros em câmara de Neubauer e uso da fórmula (\*) de acordo com Moraes e Alves (1986). Alíquotas na concentração de  $1 \times 10^9$  OBs/mL foram depositadas na Coleção de Vírus de Invertebrados (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) (Tabela 1) e utilizadas nos experimentos deste trabalho.

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

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

Isolado Viral	Nº de Acesso Código CVI	Inseto Hospedeiro	Data de Coleta	Local de Coleta	Cultura
ChinNPV-MG.A	BRM 050760 CVI 130	<i>Chrysodeixis includens</i>	18/02/2014	Buritis-MG	Soja
ChinNPV-MG.B	BRM 050761 CVI 131	<i>Chrysodeixis includens</i>	18/02/2014	Buritis-MG	Soja

### Produção de estoques virais

A criação e manutenção da colônia de insetos *Chrysodeixis includens*, conduzidas sob condições controladas de temperatura ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $70 \pm 10\%$ ) e fotoperíodo (14 h), foram realizadas para suprir ensaios de multiplicação viral e patogenicidade. Lagartas em 4º instar de

*Chrysodeixis includens* foram utilizadas para produção de estoques virais. Cubos de dieta artificial (Greene et al., 1976), distribuídos em copos plásticos de 30 mL com 3 larvas/copo, foram contaminados em sua superfície com 100 µL de suspensão viral na concentração de  $1 \times 10^6$  OBs/mL. O experimento foi monitorado diariamente e as larvas mortas foram coletadas, armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  para posterior purificação das partículas virais (OBs).

### **Microscopia eletrônica de transmissão - MET**

Amostras virais purificadas foram preparadas para MET de acordo com o procedimento descrito em Costa et al. (2017). Basicamente, consistiu de fixação e pós-fixação do material, desidratação em série graduada de etanol e inclusão em resina de Epon 812©, seguindo o protocolo do fabricante. Secções ultrafinas (40 nm) foram contrastadas com acetato de uranila 5% e então examinadas e fotodocumentadas ao microscópio eletrônico de transmissão (MET – Zeiss modelo EM 109).

### **Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante-SDS**

OBs purificados das amostras virais de Minas Gerais foram preparados em tampão amostra (2X: 125 mM de Tris-HCl pH 6,7; 30 % de glicerol; 4 % de SDS; 0,002% de bromophenol blue e 10 % de  $\beta$ -mercaptoetanol), fervidos por 5 min, resfriados em gelo por 15 min, e submetidos à 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 h, e em seguida descorado (metanol 40%, ácido acético 7,5% e água destilada) por 1 h e 30 min e fotografado.

### **Purificação de DNA e clivagem com enzimas de restrição**

Alíquotas de 200 µL da suspensão viral na concentração de  $2 \times 10^{10}$  OBs/mL foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em solução de 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  por 30 min para liberação dos vírions no meio aquoso (O'Reilly et al., 1994). Em seguida, o DNA foi extraído usando o Kit de purificação *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen) seguindo o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi estimado por fluorescência em Qubit (Invitrogen) e concentrado por centrifugação a vácuo, por 1 h em temperatura ambiente. Parte desse material foi usado para clivagem com enzimas de restrição. Os sistemas de digestão foram preparados consistindo de 1-2 µg de DNA viral e incubados com as enzimas

*EcoRI*, *HindIII* e *PstI*, separadamente, a 37°C, *overnight*. Para interromper a reação, foi usado 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 60 V por 4 h, utilizando o tampão TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0). O DNA 1 Kb *plus Ladder* (Invitrogen) foi utilizado como marcador molecular. O gel foi corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio, visualizado e fotografado em UV – fotodocumentador (Lab Trade- Wealtec).

### Bioensaios

A atividade biológica desses isolados foi determinada por meio da realização de bioensaios, conduzidos conforme metodologia descrita por Morales e Moscardi (1993). Os isolados ChinNPV-MG.A e ChinNPV-MG.B foram testados nas concentrações de  $1,0 \times 10^4$ ,  $4,0 \times 10^4$  e  $1,6 \times 10^5$  OBs/mL de dieta. O vírus foi incorporado em dieta artificial (Greene et al., 1976) sem formol (Vail et al., 1968), após ter sido resfriada para 50-55°C. Os bioensaios foram realizados em triplicata, com 40 larvas *Chrysodeixis includens* de 3° instar por tratamento (2 larvas/copo de 30mL), mantidos em câmara B.O.D na temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa (UR) de  $70 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 horas. Os ensaios foram monitorados e a mortalidade foi registrada diariamente a partir de 3dp.i. até todas as larvas morrerem por infecção viral ou atingirem o estágio de pupa. Os dados obtidos foram submetidos à análise de Probit (Finney, 1971), para calcular valores de concentração letal média ( $CL_{50}$ ) e parâmetros associados (limites de confiança de 95 % e regressão). A média do tempo de morte (TM) foi calculada de acordo com protocolo descrito por Morales et al. (2001). Os parâmetros de mortalidade, como taxa de mortalidade (%), tempo de morte (TM) e  $CL_{50}$ , foram analisados para teste de significância estatística entre os isolados.

## Resultados e Discussão

---

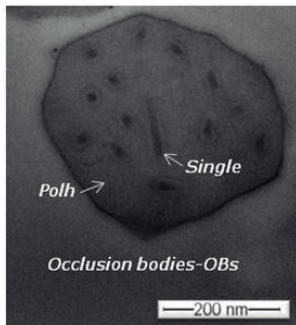
### Estabelecimento da criação de insetos – *Chrysodeixis includens*

O procedimento para criação de insetos *Chrysodeixis includens* foi estabelecido, conforme descrito em material e métodos. Observações foram feitas durante o desenvolvimento da criação, confirmando dados similares

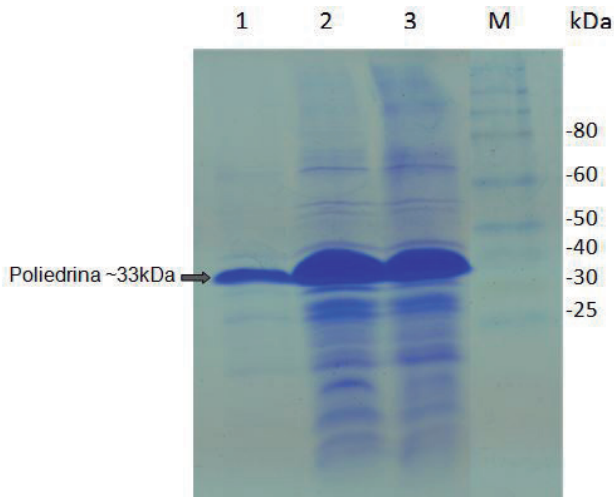
aos descritos na literatura (Carvalho et al., 2012; Moscardi et al., 2012), tais como: desenvolvimento embrionário larval, cerca de 2,5 dias; período larval, cerca de 12 a 15 dias, ocorrendo mudanças de coloração da larva nos diferentes instares, e após seis instares ela se transforma em pupa; período de pupa de 9 a 12 dias, até a emergência de adultos. Ao final da 5ª geração da colônia, foram adicionadas novas pupas para evitar declínio populacional por endocruzamentos.

### **Análise morfológica e ultraestrutural**

Alíquotas da suspensão do material obtido a partir de larvas *Chrysodeixis includens* infectadas e coletadas no município de Buritis (MG), observadas primeiramente em microscópio óptico com contraste de fase, exibiram partículas refringentes, típicas de poliedros, comprovando que a infecção e a morte do inseto devem ter sido causadas por vírus. Embora os OBs (poliedros) variam em tamanho de 0,4 a 2,5 µm de diâmetro e geralmente podem ser facilmente vistos sob microscópio de luz, essas amostras foram também examinadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para observação de sua ultraestrutura. Secções transversais mostraram vários vírions contendo um único nucleocapsídeo por envelope (single nucleopolyhedrovirus: SNPV), formando corpos de oclusão (OBs), com morfologia poliédrica, os chamados poliedros (Figura 1). A presença de poliedros foi também confirmada pela detecção de uma intensa banda de ~33 kDa correspondente à poliedrina em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (Figura 2). A poliedrina é uma proteína estrutural que constitui a matriz proteica cristalina dos corpos de oclusão dos NPVs. Essas análises demonstraram que os dois isolados virais em estudo são NPVs pertencentes ao gênero *Alphabaculovirus* da família *Baculoviridae* (Harrison et al., 2018), similares aos isolados da espécie *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV) classificados em estudos anteriores (Craveiro et al., 2015, 2016; Costa et al., 2017). Esses isolados virais foram, então, nomeados de ChinNPV-MG.A e ChinNPV-MG.B, tendo sido adicionado MG por serem provenientes do estado de Minas Gerais.



**Figura 1.** Micrografia eletrônica de corpos de oclusão (OBS: poliedros) de isolados de *Chrysodeixis includens* NPV, com vírions contendo um único nucleocapsídeo por envelope (SNPV: single nucleopolyhedrovirus), inclusos em uma matriz proteica (Polh: poliedrina).

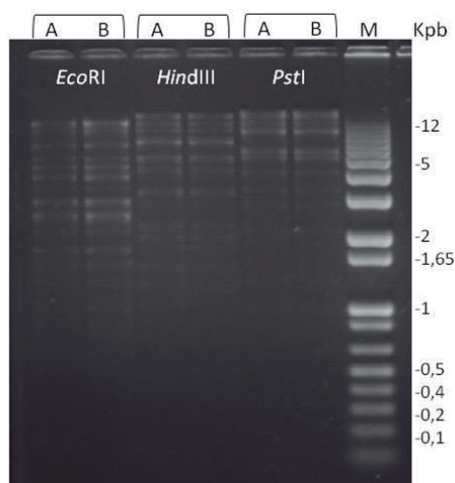


**Figura 2.** Análise de proteínas estruturais de *Chrysodeixis includens* NPV. Gel de poliacrilamida 16% (SDS-PAGE) corado com Coomassie brilliant blue. (1) OBS ChinNPV-IE (proteína Poliedrina ~33kDa: usada como referência comparativa), (2) OBS ChinNPV-MG.A, (3) OBS ChinNPV-MG.B, M: marcador BenchMark Protein Ladder (kDa) - Invitrogen.

### Análise de restrição de DNA de isolados ChinNPV-MG

Os DNAs purificados e clivados com as enzimas *EcoRI*, *HindIII* e *PstI* apresentaram perfis de restrição muito similares quanto aos tamanhos e números de fragmentos observados (Figura 3), sugerindo serem idênticos.

No entanto, essa técnica RFLP com essas três enzimas de restrição pode não ter sido suficiente para detecção de possíveis diferenças existentes entre os DNAs desses isolados. Ensaio de avaliação de patogenicidade desses isolados evidenciaram o ChinNPV-MG.B com maior atividade biológica do que o ChinNPV-MG.A. Esses resultados sugerem a necessidade do sequenciamento completo e a análise comparativa entre as sequências genômicas dos isolados virais, o que poderá trazer informações relevantes quanto à espécie e de fatores de virulência associados aos seus variantes genotípicos.



**Figura 3.** Comparação de padrões de perfis de restrição entre DNAs dos isolados (A) ChinNPV-MG.A e (B) ChinNPV-MG.B. M (kpb): marcador 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio.

### **Análises de mortalidade larval e patogenicidade**

Os isolados ChinNPV-MG.B e ChinNPV-MG.A, testados sob condições de laboratório, causaram alta mortalidade de larvas *Chrysodeixis includens*, atingindo 100% de larvas mortas quando alimentadas com dieta artificial em uma concentração viral de cerca de  $10^5$  OBs/mL de dieta e um tempo médio de morte (TD) de cerca de 6,1 – 6,2 dias. Não houve mortalidade no grupo controle. Análises estatísticas dos dados de taxas de mortalidade e tempo de morte nas três diferentes concentrações testadas não apresentaram diferenças significativas em nível de probabilidade de 5%

(teste T de Student) (Tabela 2).

O isolado ChinNPV-MG.B apresentou uma concentração letal média ( $CL_{50}$ ) de 1870 OBs/mL, mostrando requerer menor quantidade de vírus para matar 50% da população de insetos, mas não estatisticamente diferente do isolado ChinNPV-MG.A com  $CL_{50}$  de 2228 OBs/mL (Tabela 3A). Os valores de  $\chi^2$  relacionados aos dois isolados virais não foram significativos, indicando que os dados eram homogêneos para os dois isolados e ajustados ao modelo de análise Probit utilizado (Finney, 1971).

Dentre os 13 isolados avaliados quanto à patogenicidade, incluindo os isolados analisados por Alexandre et al. (2010) e Costa et al. (2017), o isolado ChinNPV-MG.B se apresentou com a menor  $CL_{50}$  (1870 OBs/mL, demonstrando alta virulência para larvas de *Chrysodeixis includens* (Tabelas 2 e 3).

**Tabela 2:** Determinação da porcentagem média e tempo médio de morte de larvas de (3° instar) *Chrysodeixis includens* infectadas com ChinNPV-MG

Isolado viral	Concentração OB/mL de dieta	Mortalidade média (%)	Tempo médio de morte TM (d.p.i)
ChinNPV-MG.A	1,6 x 10 <sup>5</sup>	100,0a	6,2 ± 0,12a
	4,0 x 10 <sup>4</sup>	91,7a	6,7 ± 0,43a
	1,0 x 10 <sup>4</sup>	72,5a	8,1 ± 0,67a
ChinNPV-MG.B	1,6 x 10 <sup>5</sup>	100,0a	6,1 ± 0,17a
	4,0 x 10 <sup>4</sup>	99,2a	6,9 ± 0,45a
	1,0 x 10 <sup>4</sup>	85,8a	9,0 ± 0,36a

Médias seguidas de letras iguais indicam que os isolados A e B não diferem dentro de cada concentração, para mortalidade e tempo médio de morte, segundo o teste T de Student, a 5% de probabilidade.



**Tabela 3A:** Concentração média letal (CL<sub>50</sub>) de isolados ChinNPV-MG em larvas de *Chrysodeixis includens* – análise Probit (Finney, 1971).

Isolado viral	CL <sub>50</sub>	Limites Fiduciais 95%		Slope ± SE	χ <sup>2</sup>
		Inferior	Superior		
ChinNPV-MG.A	2228a	993	4996	0,96±0,18	0,68ns
ChinNPV-MG.B	1870a	890	3930	1,46±0,17	0,94ns

**Tabela 3B:**

ChinNPV-IA*	2500a	1833	3408	2,07±0,31	0,00ns
ChinNPV-IF*	2811a	1855	3984	1,53±0,20	3,38ns
ChinNPV-IE*	2974a	1797	4500	1,21±0,17	3,00ns
ChinNPV-MT.B**	5305a	3106	9061	1,33±0,12	0,87ns

Dados de isolados ChinNPV extraídos de (\*) Alexandre et al., 2010 e (\*\*) Costa et al., 2017. Regiões geográficas (\*): IA- Guatemala; IF: Dourados (MT); IE: Iguaraçu (PR). (\*\*): MT-B: Primavera do Leste (MT). Isolados selecionados com base nos menores valores de concentração média letal (CL<sub>50</sub>) – Análise de Probit (Finney, 1971). Médias de CL<sub>50</sub> seguidas de letras iguais não diferem pela sobreposição do intervalo de confiança, a 95% probabilidade, de acordo com a análise de Probit.

## Conclusão

- ✓ Análises ultraestrutural e bioquímica dos isolados ChinNPV-MG demonstraram que os materiais observados, por MET e SDS-PAGE (proteínas estruturais), são vírus pertencentes ao grupo de baculovírus, evidenciados pela presença de corpos de oclusão (OBs), com morfologia poliédrica.
- ✓ Os isolados virais foram identificados e classificados como pertencentes à família *Baculoviridae*, nucleopolyhedrovirus (NPV) do gênero *Alphabaculovirus* e da espécie *Chrysodeixis includens nucleopolyhedrovirus* (ChinNPV).
- ✓ Análise comparativa entre os dois isolados virais mostrou que o

isolado ChinNPV-MG.B apresentou maior mortalidade larval nas concentrações virais testadas, porém não diferiu estatisticamente do isolado ChinNPV-MG.A.

- ✓ Dentre os 13 isolados de ChinNPV analisados por bioensaios realizados em nosso laboratório, os isolados ChinNPV-MG.B, ChinNPV-MG.A, ChinNPV-IA, ChinNPV-IE, ChinNPV-IF e ChinNPV-MT.B foram os mais virulentos quando testados em seu hospedeiro original (*Chrysodeixis includens*). Esses isolados foram selecionados e indicados como excelentes candidatos para testes em campo.
- ✓ Apesar da importância deste patógeno como agente de controle biológico de pragas, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares e os fatores de virulência associados ao hospedeiro. Com base nisso, o sequenciamento e análise do genoma completo desses isolados ChinNPV já estão em andamento, para que os resultados obtidos no presente trabalho, associados às informações genômicas, tragam importante contribuição para maior conhecimento da espécie e de sua diversidade genética e de características relevantes ainda não conhecidas.

## Agradecimentos

---

Ao professor Dr. Braúlio Santos, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela doação de pupas de *Chrysodeixis includens* e à Joseane P. Silva (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa DTI (Programa de Apoio a Núcleos de Excelência PRONEX/FAPDF/CNPq-Universidade de Brasília-UnB/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) e bolsa PIBIC pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/ CNPq/ EMBRAPA.

## Referências

---

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

BUENO, R. C. O. F.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; PARRA, J. R. P.; HOFFMANNCAMPO, C.B. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**, v. 67, p. 170-174, 2011.

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

CARVALHO, L. C.; FERREIRA, F. M.; BUENO, N. M. Importância econômica e Generalidades para o controle da lagarta falsa-medideira na cultura da soja. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.1021, 2012.

COSTA, R. A. da; SANTOS, L. A. V. M.; RIBEIRO, Z. M. de A.; CRAVEIRO S. R.; GOMES, A. C. M. M.; SOARAES, C. M. S.; CASTRO, M. E. B. **Identificação morfológica e avaliação da infectividade de isolados virais em lagartas de *Chrysodeixis includens* e em cultivos de células de insetos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2017. 27 p. (Boletim de Pesquisa / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 328)

CRAVEIRO, S. R.; INGLIS, P. W.; TOGAWA, R. C.; GRYNBERG, P.; MELO, F. L.; RIBEIRO, Z. M. A., RIBEIRO, B. M.; BAO, S. N.; CASTRO, M. E. B. The genome sequence of *Pseudoplusia includens* single nucleopolyhedrovirus and an analysis of *p26* gene evolution in the baculoviruses. **BMC Genomics**, v. 16: n. 127, 2015.

CRAVEIRO, S. R.; SANTOS, L. A. V. M.; TOGAWA, R. C.; INGLIS, P. W.; GRYNBERG, P.; RIBEIRO, Z. M. A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B. Complete genome sequences of six *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus isolates from Brazil and Guatemala. **Genome Announcements**, v. 4, n. 6, 2016.

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

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

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

GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 487-488, 1976.

HARRISON, R. L.; HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A.; THEILMANN, D. A.; BURAND, J. P.; BECNEL, J. J.; KRELL, P. J.; van OERS, M. M., MOWERY, J. D.; BAUCHAN, G. R.; ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Baculoviridae*, **Journal of General Virology**, v.99 p.1185-1186. doi: 10.1099/jgv.0.001107. 2018.

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

JAVED, M. A.; BISWAS, S.; WILLIS, L. G.; HARRIS, S.; PRITCHARD, C.; van OERS, M. M.; DONLY, B. C.; ERLANDSON, M. A.; HEGEDUS, D. D.; THEILMANN, D. A. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus Ac83 is a *per os* infectivity factor (PIF) protein required for occlusion-derived virus (ODV) and budded virus nucleocapsid assembly as well as assembly of the PIF complex in ODV envelopes. **Journal of Virology**, v. 91. pii: e02115-16, 2017.

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

MORAES, S. A.; ALVES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1986. p. 278-288.

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

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

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. cap.4, p. 213-309.

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

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York: Oxford. Oxford University Press, Inc, 1994. 349 p.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. 3.ed. Bethesda, Maryland: National Center for Biotechnology Information, 2013.

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

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

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

WILLIAMS, T.; BERGOIN, M.; VAN OERS, M. M. Diversity of large DNA viruses of invertebrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 147, p. 4–22. 2017



---

*Recursos Genéticos e  
Biotecnologia*



CGPE: 15314