

Caracterização de uma nova espécie de
Alphabaculovirus patogênico à lagarta
Automeris liberia (Lepidoptera: Saturniidae)



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

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
377**

Caracterização de uma nova espécie de
Alphabaculovirus patogênico à lagarta
Automeris liberia (Lepidoptera: Saturniidae)

*Elio Cesar Guzzo
Kelly Barbosa da Silva
Chryslane Barbosa da Silva
Gilson Sánchez Chia
José Malta de Souza
Ricardo Salles Tinôco
Juan Pablo Molina Acevedo
Henrique Fonseca Goulart
Antônio Euzébio Goulart Santana
Marlinda Lobo de Souza
Márcio Martinello Sanches*

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2022**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W5 Norte (Final)
CEP 70770-917 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700 / (61) 3448-4739
www.embrapa.br
<https://embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Unidade responsável pela edição

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Comitê Local de Publicações (CLP)

Presidente
Marcelo Lopes da Silva

Secretária executiva
Ana Flávia do Nascimento Dias

Membros
Andrielle Câmara Amaral Lopes
Bruno Machado Teles Walter
Débora Pires Paula
Edson Junqueira Leite
Marcos Aparecido Gimenes
Solange Carvalho Barrios Roveri José

Revisão de texto
Jackcelia Costa da Silva

Normalização bibliográfica
Rosameres Rocha Galvão (CRB-1/2122)

Projeto gráfico
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica e capa
Júlio César da Silva Delfino

Foto da capa
Juarisandro Cutrim Meireles

1ª edição
Publicação digital (2022): PDF

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, Superintendência de Comunicação

Caracterização de uma nova espécie de Alphabaculovirus patogênico à lagarta *Automeris liberia* (Lepidoptera:Aturnidae / Elio Cesar Guzzo... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2022. 26 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 377).

1. Controle biológico. 2. Biopesticida. 3. Patologia de insetos. I. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. II. Série.

632.96 CDD (21. ed.)

Rosameres Rocha Galvão(CRB-1/2122)

© Embrapa, 2022

Autores

Elio Cesar Guzzo

Biólogo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo, Rio Largo, AL.

Kelly Barbosa da Silva

Química, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió, AL.

Chryslane Barbosa da Silva

Bióloga, mestra em Proteção de Plantas, Doutoranda em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió, AL.

Gilson Sánchez Chia

Agrônomo, doutor em Agronomia, Grupo Agropalma S/A, Tailândia, PA.

José Malta de Souza

Grupo Agropalma S/A, Tailândia, PA.

Ricardo Salles Tinôco

Agrônomo, doutor em Entomologia Agrícola, PepsiCo – Fazenda KeroCoco, Petrolina, PE.

Juan Pablo Molina Acevedo

Engenheiro Agrônomo, doutor em Produção Vegetal, pesquisador da Corporación Colombiana de Investigación Agropecuária – AGROSAVIA, Cerete, Córdoba, Colômbia.

Henrique Fonseca Goulart

Químico, doutor em Biotecnologia, professor da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Rio Largo, AL.

Antônio Euzébio Goulart Santana

Farmacêutico e Bioquímico, doutor em Química, professor da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Rio Largo, AL.

Marlinda Lobo de Souza

Bióloga, doutora em Virologia/Ciências Naturais, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, marlinda.souza@embrapa.br.

Márcio Martinello Sanches

Biólogo, doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS.

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução.....	9
Material e Métodos	11
Obtenção do vírus	11
Purificação do vírus.....	12
Microscopia eletrônica de transmissão	13
Detecção molecular por PCR.....	13
Resultados e Discussão	14
Conclusões.....	21
Agradecimentos.....	21
Referências.....	22

Caracterização de uma nova espécie de *Alphabaculovirus* patogênico à lagarta *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae)

Resumo — Palmeiras (Arecaceae) são plantas com grande importância socioeconômica no mundo todo. Lagartas do gênero *Automeris* (Lepidoptera: Saturniidae) causam desfolhamento severo em palmeiras, bem como urticância quando em contato com a pele humana. Portanto, é extremamente importante a descoberta de inimigos naturais para tais pragas. O objetivo deste trabalho foi registrar e confirmar a ocorrência de uma nova espécie de baculovírus infectando *Automeris liberia*. Em maio de 2017, lagartas de *A. liberia* exibindo sintomas de infecção causada por baculovírus foram coletadas de dendezeais na Tailândia, PA, Brasil. Em laboratório, um macerado das lagartas mortas foi oferecido a lagartas sadias de *A. cinctistriga*, reproduzindo os sintomas e levando-as à morte (postulado de Koch). Após purificação por ultracentrifugação em gradiente de sacarose, o material foi observado sob microscópio eletrônico de transmissão, revelando a presença de corpos de oclusão virais contendo múltiplos nucleocapsídeos, compatíveis com *Alphabaculovirus* (*Baculoviridae*). A detecção molecular por PCR utilizando primers dos genes *polh*, *lef-8* e *lef-9* confirmou que o isolado pertence ao gênero *Alphabaculovirus*. Estudos filogenéticos demonstraram que o mesmo se difere das espécies já conhecidas. Até onde os autores puderam investigar, este é o primeiro registro de um baculovírus isolado de espécies do gênero *Automeris*, ou associado a elas. O nome *Automeris liberia nucleopolyhedrovirus* (AuliNPV) foi proposto para este novo vírus.

Termos para indexação: baculovírus, vírus entomopatogênico, patologia de insetos, controle biológico, biopesticida, *Automeris* spp.

Characterization of a novel species of *Alphabaculovirus* pathogenic to *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae) caterpillar

Abstract—Palms (Arecaceae) are plants with great socioeconomic importance worldwide. Caterpillars from the genus *Automeris* (Lepidoptera: Saturniidae) cause severe palm defoliation, as well as urtication when in contact with human skin. Thus, the discovery of natural enemies of such pests is very important. This work aims to record and confirm the occurrence of a novel baculovirus species infecting *Automeris liberia*. In May 2017, caterpillars of *A. liberia* from an African oil palm plantation in Tailândia, PA, Brazil exhibited symptoms of infection by viruses. In the laboratory, a macerated of dead caterpillars was offered to caterpillars of *A. cinctistriga*, reproducing the same symptoms and leading them to death (Koch's postulates). After purification by ultracentrifugation on sucrose gradients, the sample was observed under the transmission electron microscope, which revealed the presence of viral occlusion bodies containing multiple nucleocapsids, compatible with *Alphabaculovirus* (*Baculoviridae*). Molecular detection by PCR with primers for genes *polh*, *lef-8* and *lef-9* confirmed that this isolate belongs to *Alphabaculovirus* genus whereas phylogenetic studies have shown that it is different from the already known species. As far as the authors were able to investigate, this is the first record of a baculovirus isolated from, or associated with, species of the genus *Automeris*. The name *Automeris liberia nucleopolyhedrovirus* (AuliNPV) is proposed for the new virus.

Index terms: baculovirus, entomopathogenic virus, insect pathology, biological control, biopesticide, *Automeris* spp.

Introdução

As palmeiras (família *Arecaceae*) são representadas por mais de 2.700 espécies, distribuídas em todo o mundo. Sua enorme diversidade fenotípica as torna ideais para usos paisagístico e ornamental (Lorenzi et al., 2010). Muitas espécies de palmeiras também são utilizadas por algumas populações indígenas e de baixa renda na América do Sul como fonte de alimentos, material de construção, entre outros (Clement et al., 2005; Lorenzi et al., 2010; Mesa; Galeano, 2013). Além da importância social das palmeiras, algumas delas, como o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) e o coqueiro (*Cocos nucifera* L.), são fontes de importantes produtos comercializados mundialmente. Ambas espécies são de grande importância econômica para o Brasil. O coqueiro é cultivado principalmente na região Nordeste, onde se encontram quatro dos seis principais estados produtores (Cuenca et al., 2018), seguida pela região Norte, a segunda maior produtora. O dendezeiro, por sua vez, é cultivado principalmente na região Norte, onde o estado do Pará, sozinho, responde por aproximadamente 88% da área com dendezeiros no país (Brandão et al., 2019).

Lagartas do gênero *Automeris* (Lepidoptera: Saturniidae) (Figura 1) atacam palmeiras em algumas partes da América tropical. A espécie *Automeris liberia* Cramer ocorre na América Central, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela e na Amazônia brasileira (Genty et al., 1978; Aldana de La Torre et al., 2010), enquanto *Automeris cinctistriga* Felder & Rogenhofer é a espécie presente no Nordeste do Brasil (Ferreira et al., 2018). Cada lagarta de *A. liberia* consegue consumir até 1.000 cm² de folhas durante o seu desenvolvimento (Genty et al., 1978). Além da considerável desfolha que causam quando em densas populações, estas lagartas também são perigosas para trabalhadores de viveiros e campo, devido às suas cerdas urticantes (Howard; Abad, 2001).

Inimigos naturais, como o fungo entomopatogênico *Metarhizium* sp. (Hypocreales: Clavicipitaceae), o percevejo predador *Alcaeorrhynchus grandis* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae), bem como vírus não identificados, já foram relatados para *A. liberia* (Aldana de La Torre et al., 2010). Os parasitoides *Pedinopelte gravenstii* (Guérin-Méneville, 1826) (Hymenoptera: Ichneumonidae), *Apanteles* sp. (Hymenoptera: Braconidae), *Plagiotachina* sp. e *Sturmia* sp. (Diptera: Tachinidae) também já foram



Figura 1. Lagartas de *Automeris* spp. A) *Automeris cinctistriga* sadias em coqueiro, Rio Largo, AL, Brasil; B) *Automeris liberia* morta com sintomas de infecção por baculovírus (descoloração, flacidez, ruptura da cutícula e corpo suspenso por uma das pernas abdominais) em dendezeiro, Tailândia, PA, Brasil. Fotos: A) Elio Cesar Guzzo e B) Juarisandro Cutrim Meireles.

encontrados parasitando o gênero *Automeris* (Ferreira et al., 2018). Ainda que os inimigos naturais normalmente mantenham estas pragas sob controle, elas ocasionalmente causam prejuízos aos dendezeiros e coqueiros (Howard; Abad, 2001).

Atualmente, não há inseticidas comerciais registrados para o controle de *Automeris* spp. em palmeiras no Brasil (Agrofit, 2021). Os baculovírus são vírus específicos de insetos, considerados uma ferramenta poderosa no manejo integrado de pragas (Valicente, 2019). Biopesticidas à base de baculovírus desempenham um importante papel no controle biológico, uma vez que podem ser usados isoladamente ou em combinação com outros pesticidas. Contudo, antes do desenvolvimento de um bioinseticida, é fundamental que se identifiquem as espécies e os isolados com potencial de controle biológico (Costa et al., 2019). A identificação e caracterização inicial de um novo baculovírus isolado de *A. liberia* em plantação de dendê no estado do Pará, Brasil, foi publicada recentemente (Guzzo et al., 2022).

No presente trabalho, o mesmo estudo é apresentado, porém, em língua portuguesa e complementado com informações que não puderam constar na publicação original, e que facilitam sua compreensão.

Material e Métodos

Obtenção do vírus

Em maio de 2017, uma infestação de *A. liberia* foi observada em plantação comercial de dendê pertencente ao Grupo Agropalma S/A (Silva, 2019), localizada no município de Tailândia, estado do Pará, região Norte do Brasil (2°31'16"S; 48°46'25"W) (Figura 2). A área possui 120 ha e 17.170 plantas (densidade de 143 plantas/ha), variando de três a cinco anos, e pertencentes aos híbridos Deli × Ghana, Deli × La Mé, Deli × Nigeria e Deli × Yangambi. As lagartas foram coletadas, levadas ao laboratório e alimentadas com folíolos de coqueiro. Observou-se que, tanto no campo quanto no laboratório, algumas das lagartas morreram apresentando sintomas típicos de infecção por baculovírus (descoloração, flacidez, ruptura da cutícula e corpo suspenso pelas pernas abdominais) (Figura 1B). A fim de identificar possíveis patógenos e estabelecer a relação causal, foi executado o protocolo dos postulados de Koch. Lagartas mortas com os sintomas foram maceradas com água estéril e filtradas em um funil com algodão. A suspensão foi aplicada em folíolos de coqueiro limpos e oferecidas a lagartas de *A. cinctistriga*. Esta espécie foi utilizada pelo fato de que o procedimento experimental foi realizado em Alagoas, na região Nordeste do Brasil, onde *A. liberia* não ocorre. Assim, recorreu-se à espécie alternativa *A. cinctistriga*, por ser do mesmo gênero e ocorrer na região, sendo que a identificação de ambas as espécies foi feita pelo taxonomista Dr. Amabilio José Aires de Camargo, da Embrapa Cerrados. Um grupo controle foi mantido em folíolos sem aplicação de vírus. As lagartas mortas foram então coletadas e armazenadas em freezer a 0°C.

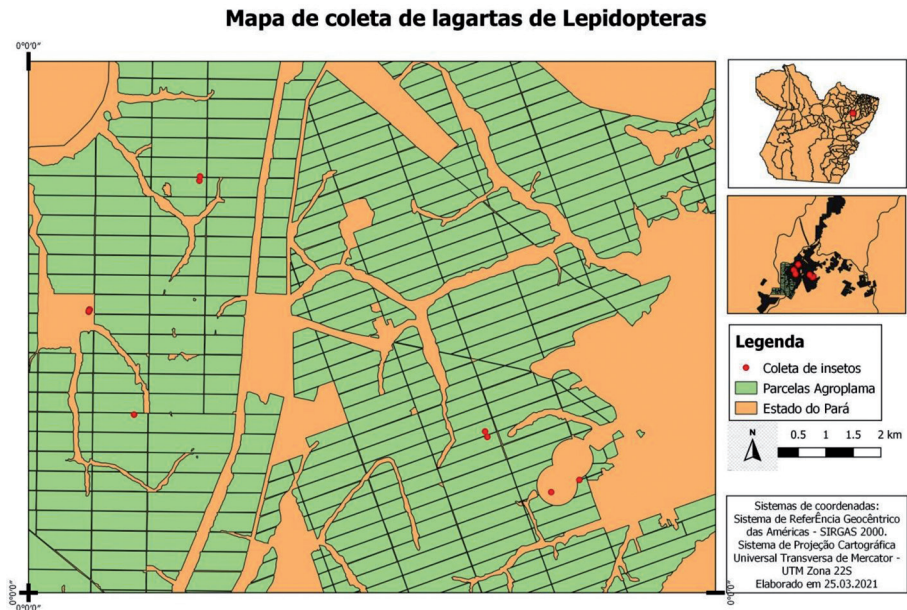


Figura 2. Mapa do estado do Pará, Brasil, mostrando a localização do município de Tailândia, as áreas de cultivo de dendezeiros do Grupo Agropalma, e os locais onde foram realizadas as coletas de insetos com sintoma de infecção por vírus. Foto: Gilson Sánchez Chia.

Purificação do vírus

A purificação dos corpos de oclusão (OBs) do vírus, também denominados poliedros, seguiu a metodologia descrita por Maruniak (1986), com modificações. Os cadáveres das lagartas infectadas foram homogeneizados em solução tampão (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; M Tris 0,01, pH 7,8; M EDTA 0,001, pH 8,0), filtrada com três camadas de gaze e centrifugada ($7.000 \times g$ por 10 min). O pellet foi suspenso em solução tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM, pH 8,0) e centrifugado novamente ($7.000 \times g$ por 10 min). Os passos de diluição e centrifugação foram repetidos quatro vezes. O pellet foi carregado em gradiente contínuo de sacarose de 1,17 a 1,30 g/mL, e centrifugado a $104.000 \times g$ por 40 min a 4 °C. A banda de OBs foi coletada, diluída 4 vezes em tampão TE, e centrifugada a $7.000 \times g$ por 15 min a 4 °C. O pellet final (OBs) foi suspenso em água destilada e armazenado a -20 °C. O vírus foi depositado na Coleção de Vírus de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil, sob número BRM063639.

Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras do vírus foram preparadas para microscopia de acordo com Bozzola e Russell (1992). As partículas purificadas (OBs) foram inicialmente fixadas em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, subsequentemente pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas por meio de uma série de concentrações crescentes de etanol (30%, 70%, 90% e 100%), e montadas em resina de Spurr (Spurr, 1969). Secções de 50 nm foram cortadas em ultra-micrótomo com lâmina de diamante, montadas em telas de cobre, coradas com acetato de uranila 2% e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011.

Deteção molecular por PCR

Para confirmação da etiologia viral, foi realizada inicialmente a detecção molecular dos genes da poliedrina (gene *polh*), fator de expressão tardio 8 (gene *lef-8*) e fator de expressão tardio 9 (gene *lef-9*) baseando-se na degeneração dos primers para estes genes, desenhados a partir de uma variedade de espécies de *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus* (Tabela 1) (Jehle et al., 2006).

Tabela 1. Pares de primers degenerados para a detecção e identificação de baculovírus, de acordo com Jehle et al. (2006).

Pares de primers	Sequências (5' – 3')	TM (°C)	Tamanho de amplificação (genoma AcMNPV)*
prPH-1 prPH-2	TGTA AACGACGGCCAGTNR CN GARGAYCCNTT CAGGAAACAGCTATGACCDGGNGCRAAYTCYTT	38-54	540pb
prL8-1 prL8-2	CAGGAAACAGCTATGACCCAYGGHGARATGAC CAGGAAACAGCTATGACCAYRTASGGRTCYTCSGC	38-60	715pb
prL9-1 prL9-2	CAGGAAACAGCTATGACCAARAAYGGITAYGCBG TGTA AACGACGGCCAGTTTGTCDCCRTCRCARTC	40-57	295pb

*AcMNPV= *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*; pb= pares de bases.

As suspensões (100 µL), purificadas ou semi-purificadas provenientes de lagartas infectadas, foram dissolvidas em solução alcalina (carbonato de sódio 0,1 M) antes da extração do DNA com kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O DNA viral foi usado como molde para a amplificação pela PCR, de acordo com Jehle et al. (2006). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% usando tampão 1 × TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 20 mM, EDTA 1 mM) contendo brometo de etídio (Sambrook et al., 1989). O gene do fator de expressão tardio 8 (gene *lef-8*) de *Alphabaculovirus* foi selecionado para sequenciamento e posterior construção da árvore filogenética. Os *amplicons* do tamanho esperado foram sequenciados diretamente pela empresa MacroGen (Coreia) em ambas as direções e a sequência consenso foi depositada na base de dados GenBank com o código MZ780958.

As comparações dos nucleotídeos (nt) e da sequência predita de aminoácidos (aa) do gene *lef-8* de AuliNPV com as sequências dos *Alphabaculovirus* mais próximos foram realizadas de acordo com uma análise inicial Blastx através do programa Geneious (Kearse et al., 2012). Para a análise filogenética, a sequência de *Cydia pomonella granulovirus* foi usada como grupo externo. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram alinhadas usando *ClustalW* integrado ao programa Geneious, com os parâmetros-padrão. As árvores filogenéticas *Neighbor-joining* geradas a partir do alinhamento das sequências de aminoácidos foram preparadas com 1.000 repetições de bootstrap. As matrizes de distância dos alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram determinadas usando o cálculo da distância *Pairwise*, aplicando-se o modelo Kimura 2 parâmetro, usando o programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013).

Resultados e Discussão

Todas as lagartas de *A. cinctistriga* alimentadas com os folíolos contaminados com a suspensão obtida das lagartas de *A. liberia* mortas e maceradas apresentaram os mesmos sintomas típicos de infecção por baculovírus anteriormente verificados nestas. As lagartas não inoculadas (controle) não apresentaram os sintomas e permaneceram vivas até a pupação.

Visualização por microscopia eletrônica de transmissão revelou corpos de oclusão (OBs) com formato poliédrico, medindo aproximadamente 1 μm , com vírions ocluídos na matriz proteica. Em cortes transversais, foi possível observar até quatro nucleocapsídeos envelopados no mesmo vírion (Figura 3). Nucleocapsídeos são capsídeos em forma de bastão que encapsulam a molécula do genoma viral, no interior dos vírions (Zhao et al., 2019).

A morfologia dos OBs (poliedros) contendo vírions com múltiplos nucleocapsídeos foi compatível com multiple nucleopolyhedrovirus (MNPV), gênero *Alphabaculovirus*, família *Baculoviridae* (Funk et al., 1997; Moscardi et al., 2011; Harrison et al., 2018), sendo o mesmo aqui nomeado como AuliNPV.

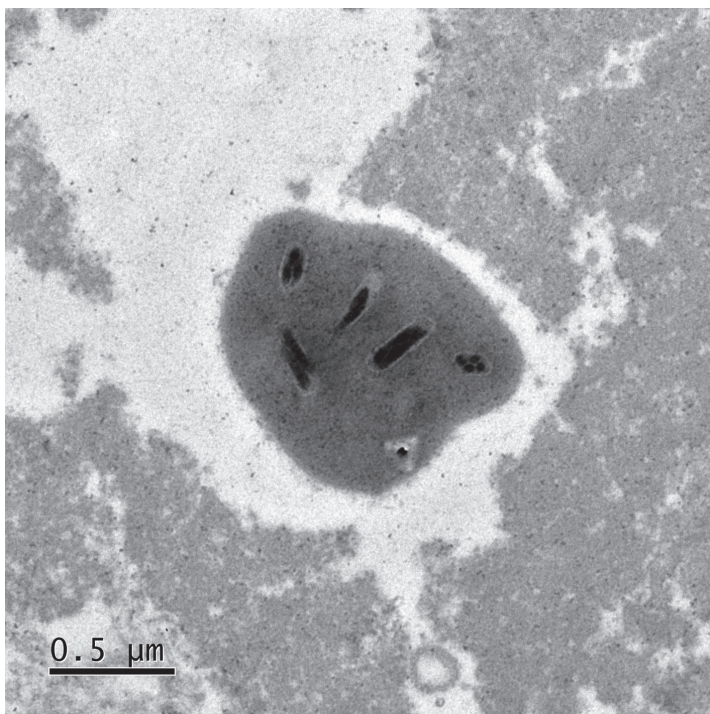


Figura 3. Micrografia eletrônica de transmissão de *Alphabaculovirus* isolado de lagartas de *Automeris liberia* e multiplicado em lagartas de *Automeris cinctistriga*. Corpo de oclusão (OB) poliédrico contendo vírions com múltiplos nucleocapsídeos.

A partir de ambas as amostras, de lagartas infectadas e também dos OBs purificados, foram amplificados os fragmentos esperados do gene *polh*, com cerca de 500 pares de bases (pb) (Figura 4), do gene *lef-8*, com aproximadamente 700 pb (Figura 5) e do gene *lef-9*, com aproximadamente 300 pb (Figura 6). A associação da sintomatologia causada nos insetos (Alves, 1998) com a estrutura observada ao microscópio eletrônico (Funk et al., 1997, Ribeiro et al., 1998) e o perfil eletroforético (PCR) permite concluir que este vírus pertence ao gênero *Alphabaculovirus*, conforme descrito anteriormente no trabalho de Guzzo et al. (2022).

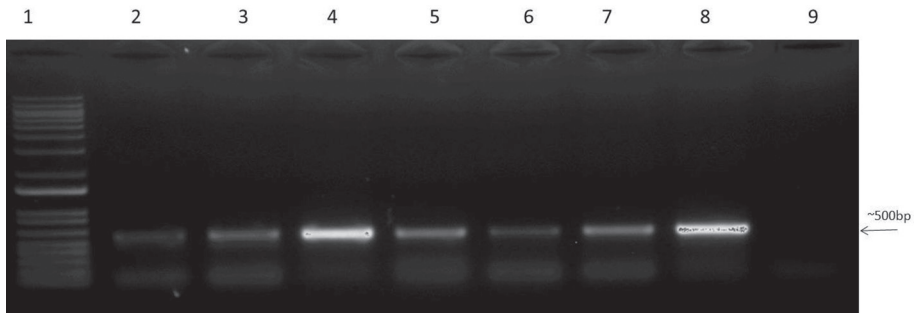


Figura 4. Análise do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose 0,8%: 1) marcador de peso molecular — 1kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific); 2 a 4) DNA extraído de lagartas de *Automeris liberia* sintomáticas; 5 a 7) DNA de OBs purificados de lagartas de *A. liberia*; 8) Controle positivo ChiNPV-Buritis; 9) controle negativo da PCR (sem o DNA molde). A seta indica o fragmento de PCR obtido pela amplificação usando primers para o gene *polh*.

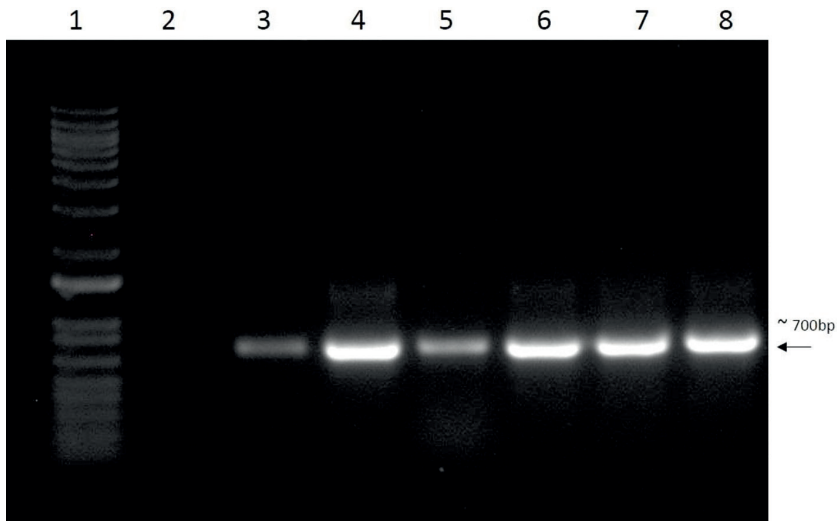


Figura 5. Análise do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose 0,8%: 1) marcador de peso molecular — 1kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific); 2) controle negativo da PCR (sem o DNA molde); 3 a 5) DNA extraído de lagartas de *Automeris liberia* sintomáticas; 6 a 8) DNA de OBs purificados de lagartas de *A. liberia*. A seta indica o fragmento de PCR obtido pela amplificação usando primers para o gene *lef-8*.

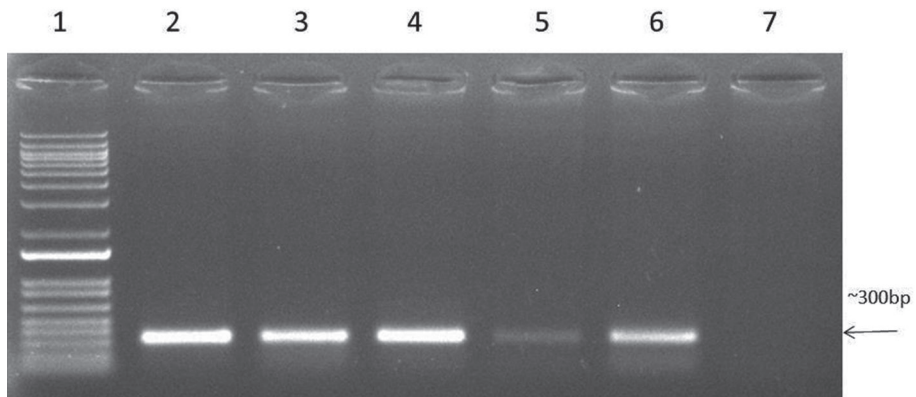


Figura 6. Análise do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose 0,8%: 1) marcador de peso molecular — 1kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific); 2 a 4) DNA extraído de lagartas de *Automeris liberia* sintomáticas; 5 e 6) DNA de OBs purificados de lagartas de *A. Liberia*; 7) controle negativo da PCR (sem o DNA molde) A seta indica o fragmento de PCR obtido pela amplificação usando primers para o gene *lef-9*.

A sequência consenso do gene *lef-8* de AuliNPV possui 624pb, apresentando maior identidade de nucleotídeos (nt) (66,2%) com *Dirphia peruvianus nucleopolyhedrovirus* (DipeNPV) (GenBank AY706546.1) e maior identidade de aminoácidos (aa) (67,6%) com *Tineola bisselliella nucleopolyhedrovirus* (TibiNPV) (GenBank AAW49082.1). A árvore filogenética baseada em múltiplos alinhamentos da sequência deduzida de aa de parte do gene *lef-8* (Figura 7), mostra o AuliNPV em um ramo com TibiNPV, em um agrupamento separado com DipeNPV e *Lonomia obliqua nucleopolyhedrovirus* (LoobMNPV). Estes dois NPVs também infectam lagartas da família Saturniidae (Jehle et al., 2006; Aragão-Silva et al., 2016). As distâncias Kimura 2 parâmetros entre as sequências alinhadas de nt de *lef-8* de AuliNPV e de outros membros do gênero *Alphabaculovirus* são muito maiores que 0,05, sendo este o limiar para a demarcação de espécies na família *Baculoviridae* (Jehle et al., 2006).

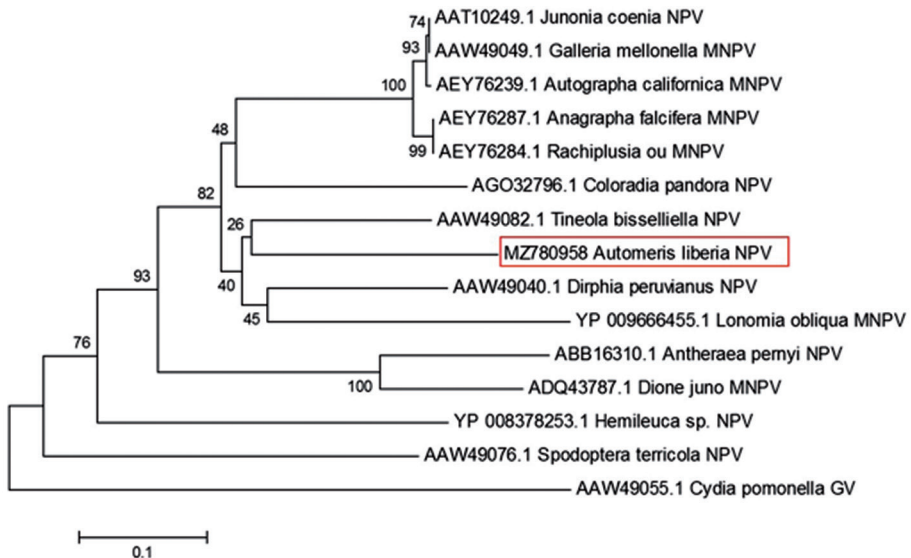


Figura 7. Árvore *Neighbor-joining* construída a partir da sequência parcial de aminoácidos do gene *lef-8* de *Automeris liberia nucleopolyhedrovirus* (em destaque) e de outros membros do gênero *Alphabaculovirus*. A sequência de *Cydia pomonella granulovirus* foi usada como grupo externo. Os valores nos ramos indicam a porcentagem de 1.000 repetições de bootstrap. O número do acesso no GenBank está indicado na árvore, seguido pelo nome do vírus. NPV= *nucleopolyhedrovirus*; MNPV= *multiple nucleopolyhedrovirus*; GV= *granulovirus*.

Infecções de *Automeris* sp. por vírus não identificados já foram relatadas na América Central (Mexzón; Chinchilla, 1991). Além disso, vírus foram previamente relatados para lagartas de diferentes espécies, incluindo *Automeris* sp., coletadas nas áreas da Agropalma, em Tailândia, PA, Brasil, atacando *E. guineensis* (Tinôco, 2008). Contudo, tais registros se baseiam somente nos sintomas da doença e a natureza do patógeno não foi identificada. Aldana de La Torre et al. (2010) também mencionam que um bom controle natural de *A. liberia* por vírus foi registrado na Colômbia. Contudo, dentre as 55 espécies de *Alphabaculovirus* válidas atualmente, apenas algumas poucas (*Actias selene nucleopolyhedrovirus*, *Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus*, *Dirphia peruvianus nucleopolyhedrovirus*, *Hemileuca species nucleopolyhedrovirus*, *Lonomia obliqua nucleopolyhedrovirus* e *Samia cynthia nucleopolyhedrovirus*) foram descritas a partir de espécies de insetos da família Saturniidae, nenhuma descrita a partir do gênero *Automeris* ou associada a ele. Portanto, até onde os autores puderam investigar, este é o primeiro registro de um *Alphabaculovirus*, ou mesmo de um membro da família *Baculoviridae*, infectando *Automeris* spp. Jehle et al. (2006) afirmam que a região *lef-8* é adequada para estudos filogenéticos de baculovírus, embora tradicionalmente a taxonomia de baculovírus seja elucidada com este gene em conjunto com as regiões *polh* e *lef-9*. A presença no novo hospedeiro sugere consistentemente que se trate de um novo membro do gênero *Alphabaculovirus*. Com base nestas considerações, os autores do presente trabalho propuseram o nome *Automeris liberia nucleopolyhedrovirus* (AuliNPV) para este novo vírus.

Esta descoberta é de grande relevância, uma vez que as lagartas de *Automeris* spp. causam danos a palmeiras de importância econômica, além de representarem risco às pessoas que trabalham com estas plantas, e que não existem agentes de controle comercialmente disponíveis no Brasil. Mesmo que algum inseticida químico pudesse ser usado contra estas pragas, inseticidas microbianos surgem como substitutos aos químicos no controle de pragas, devido à crescente pressão para a redução do uso de pesticidas sintéticos e seus resíduos no alimento e no ambiente (Hernández-Rosas et al., 2020). A alta especificidade dos baculovírus e sua segurança às pessoas e à vida silvestre têm feito com que esta seja a única família de vírus explorada como biopesticidas (Szewczyk et al., 2006).

O Brasil tem implementado programas de controle biológico baseados em baculovírus para diversos lepidópteros-praga de importância econômica, como *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Erebidae), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Chrysodeixis includens* (Walker) (Noctuidae), *Erinnyis ello* (L.) (Sphingidae), *Condylorhiza vestigialis* (Guenée) (Crambidae) e, mais recentemente, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Noctuidae) (Valicente, 2019; Castro et al., 2020).

Os baculovírus são parasitas intracelulares obrigatórios que usam a maquinaria celular para replicar seu próprio material genético, com grande capacidade de multiplicação (Castro et al., 2020). O ciclo de infecção do baculovírus se inicia quando um hospedeiro suscetível ingere alimento contaminado com os corpos de oclusão (OBs). A matriz proteica que envolve os vírions é dissolvida no ambiente alcalino do intestino médio do inseto, liberando centenas de vírions. A matriz peritrófica do intestino médio é então degradada, permitindo que os vírions penetrem nas células por fusão com as microvilosidades do epitélio celular. Os nucleocapsídeos são liberados no citoplasma da célula, entrando, em seguida, no núcleo e liberando o genoma viral. Após a transcrição e replicação do genoma viral ocorre montagem de nucleocapsídeos e de novos vírions no núcleo celular. Os nucleocapsídeos são transportados ao citoplasma e emergem da membrana da célula, disseminando por endocitose a infecção para outras células e tecidos. No estágio final da infecção, a maioria dos nucleocapsídeos permanece no núcleo e passam a ser ocluídos em uma matriz proteica, para a formação da progênie dos OBs. Após a morte e liquefação do inseto infectado, os OBs são então liberados e, subsequentemente, iniciam um novo ciclo de infecção em outros hospedeiros (Moscardi et al., 2011; Haase et al., 2015; Valicente, 2019)

A despeito dos avanços na cultura de células e tecidos, a produção de baculovírus ainda é altamente dependente da criação de insetos para a produção in vivo. O melhoramento das dietas artificiais e das técnicas de criação de insetos vem impulsionando a produção de vírus, contudo, em alguns casos, é viável a produção de baculovírus em condição de campo, utilizando-se populações naturais das pragas (Moscardi et al., 2011). Como exemplo, na safra 1995/96, 11 toneladas de lagartas de *A. gemmatalis* mortas pelo *Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus* foram coletadas em lavouras de soja durante um mês, a quantidade foi o suficiente, para formular e pulverizar o vírus em 550.000 ha de soja na safra seguinte

(Moscardi; Sosa-Gomez, 1992; Alves et al., 1998). O programa chegou a atingir quase 2.000.000 de ha de soja no país, mas, devido a alterações nas práticas agrícolas e a alguns problemas técnicos relacionados à produção, atualmente, é utilizado em aproximadamente 300.000 ha por ano (Moscardi et al., 2011; Valicente, 2019).

Há um longo processo desde a descoberta de um vírus até que este possa ser utilizado comercialmente como um produto formulado. Após a identificação e caracterização inicial, é necessário investigar outros parâmetros, como o perfil genético do vírus, a dose letal média, o tempo letal médio, a produção de OBs por lagarta, o número e a massa de lagartas necessárias para se pulverizar 1 ha da cultura, dentre outros (Elvira et al., 2013; Castro et al., 2020). Além disso, a bioecologia dos hospedeiros naturais e/ou alternativos também deve ser bem conhecida, bem como, um protocolo otimizado para produção industrial necessita ser desenvolvido. O fato de outros baculovírus terem sido usados com sucesso como biopesticidas contra várias espécies de Lepidoptera, abre a perspectiva de que este *Alphabaculovirus* recém-descoberto possa ser utilizado no futuro como um agente biológico para o controle de *Automeris* spp., resultando em efeitos benéficos ao meio ambiente e à saúde humana.

Conclusões

O agente causal da morte das lagartas de *A. liberia* em dendezeiros na Tailândia, PA, Brasil, é um *nucleopolyhedrovirus* pertencente ao gênero *Alphabaculovirus*, da família *Baculoviridae*;

O vírus encontrado se difere das espécies já conhecidas, podendo ser considerado como uma nova espécie;

O nome *Automeris liberia nucleopolyhedrovirus* (AuliNPV) foi proposto para o novo vírus.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código

de Financiamento 001, e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) — Código 11.15.02.001.03.05.

Os autores também agradecem ao Grupo Agropalma S/A (Tailândia, PA), pelo auxílio na coleta de insetos no campo; ao Dr. Amabilio José Aires de Camargo, da Embrapa Cerrados (Planaltina, DF), pela identificação das espécies de *Automeris*; à Ana Cristina Meneses Gomes, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF), pelo processamento das amostras para microscopia eletrônica; e ao Dr. Bergmann Moraes Ribeiro, da Universidade de Brasília — UnB (Brasília, DF), pelo suporte na execução da microscopia eletrônica.

Referências

- AGROFIT: consulta aberta. **Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 8 mar. 2022.
- ALDANA DE LA TORRE, R. C.; ALDANA DE LA TORRE, J. A.; CALVACHE GUERRERO, H.; FRANCO BAUTISTA, P. N. **Manual de plagas de la palma de aceite en Colombia**. 4 ed. Bogotá: Cenipalma, 2010. 198 p.
- ALVES, S. B. Microrganismos associados a insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 75-96.
- ALVES, S. B.; BOTELHO, P. S. M.; ALVES, L. F. A.; MOSCARDI, F. Produção de vírus entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 871-887.
- ARAGÃO-SILVA, C. W.; ANDRADE, M. S.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M.; FERNANDES, J. E.; MORGADO, F. S.; BÃO, S. N.; MORAES, R. H.; WOLFF, J. L.; MELO, F. L.; RIBEIRO, B. M. The complete genome of a baculovirus isolated from an insect of medical interest: *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). *Scientific Reports*, v. 6:23127, 2016. doi: 10.1038/srep23127.
- BRANDÃO, F.; CASTRO, F.; FUTEMMA, C. Between structural change and local agency in the palm oil sector: Interactions, heterogeneities and landscape transformations in the Brazilian Amazon. **Journal of Rural Studies**, v. 71, p. 156-168, 2019.
- CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, B. M.; CRAVEIRO, S. R.; INGLIS, P. W.; VALICENTE, F. H. Controle de artrópodes-praga com vírus entomopatogênicos. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020, p. 237-273.
- CLEMENT, C. R.; LLERAS, E.; VAN LEEUWEN, J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. **Agrociências**, v. 9, p. 67-71, 2005.
- COSTA, V. H. D.; SOARES, M. A.; DIMATE, F. A. R.; SÁ, V. G. M.; ZANUNCIO, J. C.; VALICENTE, F. H. Genetic identification and biological characterization of Baculovirus

isolated from *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Florida Entomologist**, v. 102, p. 59-64, 2019.

CUENCA, M. A. G.; FERREIRA, J. M. S.; MARTINS, C. R. Importância e evolução da cocoicultura no Brasil. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2018, p. 25-46.

ELVIRA, S.; IBARGUTXI, M. A.; GORRIA, N.; MUÑOZ, D.; CABALLERO, P.; WILLIAMS, T. Insecticidal characteristics of two commercial *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus strains produced on different host colonies. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, p. 50-56, 2013.

FERREIRA, J. M. S.; LIMA, M. F.; QUEIROZ, D. L.; TEODORO, A. V.; MOURA, J. I. L.; SOUZA, L. A. Insetos-praga. In: FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2018, p. 361-428.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. The viruses. Boston: Springer, 1997, p. 7-32.

GENTY, P.; DESMIER DE CHENON, R.; MORIN, J. P. Les ravageurs du palmier à huile en Amérique Latine. **Oléagineux**, v. 33, p. 325-419, 1978.

GUZZO, E. C.; SILVA, K. B.; SILVA, C. B.; CHIA, G. S.; TINÔCO, R. S.; SOUZA, M. L.; SANCHES, M. M.; ACEVEDO, J. P. M.; GOULART, H. F.; SANTANA, A. E. G. Isolation of a novel *Alphabaculovirus* (*Baculoviridae*) from *Automeris liberia* (Cramer, 1780) (Lepidoptera: Saturniidae) in African oil palms in Brazil. **Neotropical Entomology**, 2022. doi: 10.1007/s13744-021-00940-9.

HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. **Viruses**, v. 7, p. 2230-2267, 2015.

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. **The Journal of General Virology**, v. 99, p. 1185-1186, 2018.

HERNÁNDEZ-ROSAS, F.; FIGUEROA-RODRÍGUEZ, K. A.; GARCÍA-PACHECO, L. A.; VELASCO-VELASCO, J.; SANGERMAN-JARQUÍN, D. M. Microorganisms and biological pest control: an analysis based on a bibliometric review. **Agronomy**, v. 10, 1808, 2020.

HOWARD, F. W.; ABAD, R. G. Defoliators of palms. Lepidoptera. In: HOWARD, F.W.; MOORE, D.; GIBLIN-DAVIS, R. M.; ABAD, R. G. (Ed.). **Insects on palms**. Wallingford: CAB International, 2001, p. 34-81.

JEHLE, J. A.; LANGE, M.; WANG, H.; HU, Z.; WANG, Y.; HAUSCHILD, R. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. **Virology**, v. 346, p. 180-193, 2006.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics Applications Note**, v. 28, p. 647-649, 2012.

LORENZI, H.; NOBLICK, L. R.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 368 p.

- MARUNIAK, J. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of Baculovirus**. v.1. Boca Raton: CRC Press, 1986, p. 129-146.
- MESA, L.; GALEANO, G. Usos de las palmas en la Amazonia colombiana. **Caldasia**, v. 35, p. 351-369, 2013.
- MEXZÓN, R. G.; CHINCHILLA, C. M. Entomofauna perjudicial, enemigos naturales y malezas útiles en palma aceitera (*Elaeis guineenses*) J. en América Central. **Manejo Integrado de Plagas**, v. 20-21, p. 1-7, 1991.
- MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D. R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, L. G.; GREEN, M. B.; REES, R. T. (Ed.). **Pest management in soybean**. Dordrecht: Springer, 1992, p. 98-109.
- 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. (Ed.). **Microbes and microbial technology**. New York: Springer, 2011, p. 415-445.
- RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 481-507.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 3 vol, 1989.
- SILVA, K. B. Semioquímicos envolvidos na interação intraespecífica de *Eupalamides cyparissias* (Fabricius) (Lepidoptera: Castniidae) e *Automeris liberia* (Cramer) (Lepidoptera: Saturniidae) pragas de *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecaceae). Tese (Doutorado). Universidade Federal de Alagoas. 182 p.
- SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, p. 31-43, 1969.
- SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; SOUZA, M. L. Baculoviruses-- re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 143-160, 2006.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729 2013.
- TINÔCO, R. S. **Inimigos naturais e lepidópteros desfolhadores associados a *Elaeis guineensis* Jacq., na Agropalma, Amazônia brasileira**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
- VALICENTE, F. H. Entomopathogenic viruses. In: SOUZA, B.; VÁZQUEZ, L. L.; MARUCCI, R. C. (Ed.). **Natural enemies of insect pests in neotropical agroecosystems. Biological control and functional biodiversity**. Cham: Springer, 2019, p. 137-150.
- ZHAO, S.; HE, G.; YANG, Y.; LIANG, C. Nucleocapsid assembly of baculoviruses. **Viruses**, v. 11, 595, 2019.



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

