



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
SAIN Parque Rural Asa Norte - Caixa Postal 02372 CEP.: 70.770-900 Brasília-DF  
Fone: (061) 340 - 3600 FAX: (061) 340 - 3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>

## COMUNICADO TÉCNICO

Nº 26, Jul/98, p. 1-7



### IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE BACULOVÍRUS COM POTENCIAL PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE *Spodoptera frugiperda*

Marlinda L. de Souza<sup>1</sup>  
Maria Elita B. de Castro<sup>1</sup>  
William Sihler<sup>2</sup>  
Eliane S. Nakamura<sup>3</sup>

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepdoptera- Noctuidae), é responsável por danos significativos causados à cultura do milho, com ocorrência generalizada em todo o Brasil, América do Sul, América Central, Ilhas do Caribe e América do Norte. No Brasil, em condições de campo, a lagarta-do-cartucho é a praga mais importante do milho, podendo reduzir a produtividade dessa cultura em até 34% e, em média, 20%. Larvas de aproximadamente 10 mm alimentam-se das folhas raspando-as e, à medida que crescem, dirigem-se para o cartucho da planta. Conforme Valicente & Cruz (1991), a planta do milho é mais sensível ao ataque da praga quando a infestação inicia entre 40 e 45 dias de idade. Lagartas acima de 2 cm de comprimento podem destruir todo o cartucho do milho.

Vários isolados pertencentes aos gêneros *Nucleopolyhedrovirus* e *Granulovirus*, com potencial para o uso no controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, já foram encontrados em Minas Gerais e Paraná (Valicente & Cruz 1991).

Em geral, as lagartas mortas por vírus são facilmente identificadas no campo. As larvas infectadas sobem até a extremidade das plantas, por apresentar um certo tropismo pela luz, onde, ao morrerem, encontram-se penduradas pelos pseudópodes traseiros.

<sup>1</sup> Bióloga, PhD., Embrapa - Cenargen  
<sup>2</sup> Biólogo, M.Sc., Embrapa - Cenargen  
<sup>3</sup> Bióloga, B.Sc., bolsista do CNPq



O corpo torna-se muito flácido, com total descoloração, devido à grande quantidade de poliedros e conseqüente destruição dos órgãos.

A literatura relata (extensiva revisão é apresentada por Bilimoria, 1991) que os Nucleopoliedrovírus (NPVs) apresentam nucleocapsídeos, baciliformes visiculados de 50 a 60 nm por 250 a 300 nm, oclusos em uma estrutura protéica em forma de poliedro, que tem como principal proteína componente, a poliedrina, com peso molecular variando de 26.000 a 33.000 daltons. Os poliedros (PIBs) variam de 1,0 a 15,0  $\mu\text{m}$  e são facilmente observados em células infectadas com um microscópio de contraste de fase. Enquanto os Granulovírus possuem forma oval e apresentam somente um nucleocapsídeo por envelope (variam de 0,25 a 0,5  $\mu\text{m}$ ). Sua principal proteína de oclusão é a granulina com peso molecular variando de 25.000 a 30.000 daltons. Esses vírus têm sido pouco estudados devido à dificuldade em encontrar células susceptíveis para a multiplicação desses vírus em cultura *in vitro*.

Tendo-se em vista a dimensão dos danos causados pela lagarta *Spodoptera frugiperda*, tornam-se cada vez mais necessários programas que visem seu controle dentro de um manejo integrado de pragas.

Neste contexto, o Laboratório de Virologia de Insetos da Área de Controle Biológico da Embrapa - Cenargen, através do subprojeto "Caracterização e Conservação de Vírus Entomopatogênicos", tem contribuído principalmente para identificação e caracterização de isolados virais provenientes de programas de controle biológico bem como de vírus isolados como agentes causais de doenças em insetos nas lavouras ou em laboratórios de criação de insetos.

Na região de Bom Jesus do Amparo, MG, foram coletadas, em cultura de milho, lagartas de *Spodoptera frugiperda* com sintomatologia de virose. Essas lagartas foram enviadas para o Laboratório de Virologia de Insetos da Área de Controle Biológico da Embrapa - Cenargen, que, posteriormente, foram identificadas como Granulovírus de *Spodoptera frugiperda* (SfGV). Também foram enviados, para o nosso laboratório, cinco isolados virais provenientes da região de Sete Lagoas, MG, pelo Centro Nacional de Pesquisa Milho e Sorgo (CNPMS). Esses isolados analisados inicialmente por microscopia ótica foram identificados como NPVs, e foram, então, denominados de SfNPV Epamig 1, SfNPV Epamig 2, SfNPV Epamig 3, SfNPV Epamig 4, SfNPV Epamig 5.

Com o objetivo de identificar e iniciar os estudos de caracterização dos isolados virais recebidos, tais isolados foram amplificados, purificados e submetidos à análise das proteínas estruturais de suas partículas virais. Assim, lagartas foram maceradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%, SDS 2%, tris 0,01M pH 7,8, EDTA 0,001M) e o líquido foi filtrado em gaze estéril e lâ-de-vidro. O extrato obtido foi, então, utilizado para constatação da presença de poliedros (PIBs) bem como para purificação dessas partículas (PIBs) e dos ARVs (vírions liberados por álcali). Análise dessas partículas foram feitas através de microscopia ótica e eletrônica e eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% (PAGE-SDS). Para isso, o extrato foi centrifugado (10.000rpm por 15min) e o sedimento ressuspenso em tampão TE (Tris 0,001M pH 7,8, EDTA 0,001M) e submetido a uma centrifugação em gradiente de sacarose 1,17-1,30 (24.000rpm/40min/4°C).

Bandas de poliedros (ou grânulos) foram formadas, conforme detecção observada em eletroforese de poliacrilamida (PAGE-SDS). Os ARVs, obtidos a partir da solubilização dos poliedros puros (ou grânulos) com solução alcalina pH 10,9 (carbonato de sódio 0,3M, NaCl 0,5 M, EDTA 0,03M) e centrifugação em gradiente de sacarose (1,17-1,26 , 24.000rpm/60min/4°C), também foram detectados por eletroforese (PAGE-SDS).

A análise através de microscopia eletrônica do isolado proveniente de Bom Jesus do Amparo revelou tratar-se de um GV, apresentando forma oval e apenas um nucleocapsídeo por corpo de inclusão (grânulo) (Fig. 1A). Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% demonstrou ter a granulina, principal componente da matriz protéica, peso molecular de 29.0000 (Fig. 2). Este peso está de acordo com o citado na literatura para baculovírus. Os ARVs apresentaram 13 bandas cujo peso molecular foi calculado em aproximadamente 76.900, 70.000, 67.000, 60.000, 55.000, 46.100, 44.200, 42.300, 41.000, 37.500, 33.700, 26.500 e 23.800 (Fig. 2).

Quanto à análise dos outros cinco isolados por microscopia eletrônica, esta permitiu a sua identificação como sendo NPVs. Todos os isolados visualizados ultra-estruturalmente revelaram a presença de vírions, contendo de um a vários nucleocapsídeos por envelope, imersos em corpos de oclusão de forma poliédrica. O padrão morfológico de todos isolados é mostrado na Fig. 1B. A fração dos poliedros analisada por PAGE-SDS mostrou uma proteína predominante nos cinco isolados, que foi identificada como sendo a poliedrina com peso molecular em torno de 32.000 daltons (Fig. 3A). Isto era esperado, uma vez que o gene desta proteína é o mais altamente conservado em baculovírus. Na fração dos vírions (ARVs), observou-se um perfil eletroforético similar para os cinco isolados, com pequenas diferenças qualitativas.

Foram identificadas dez proteínas, com pesos moleculares de 35.000, 37.000, 41.000, 45.000, 46.000, 50.000, 57.000, 72.000, 74.000 e 80.000 (Fig. 3B). Nos isolados SfNPV Epamig1, SfNPV Epamig 2 e SfNPV Epamig 3, foi detectada uma banda extra de cerca de 30.000 daltons. Presumivelmente, este peptídeo representa uma característica fenotípica dos três isolados ou, então, trata-se de um produto de degradação de algum peptídeo de peso molecular mais elevado. Ou ainda, pode tratar-se de contaminação com a poliedrina. Embora os resultados indiquem similaridade entre os cinco isolados, é necessária a futura identificação do seu material genético, através da análise do DNA viral dos mesmos, após clivagem com diferentes enzimas de restrição.

Os isolados virais estão armazenados a -20°C ("freezer"), para posteriormente dar continuidade aos estudos de caracterização incluindo análise de DNA viral e testes de patogenicidade, que muito contribuirá para o programa já existente de utilização do baculovírus no controle da lagarta-do-cartucho.

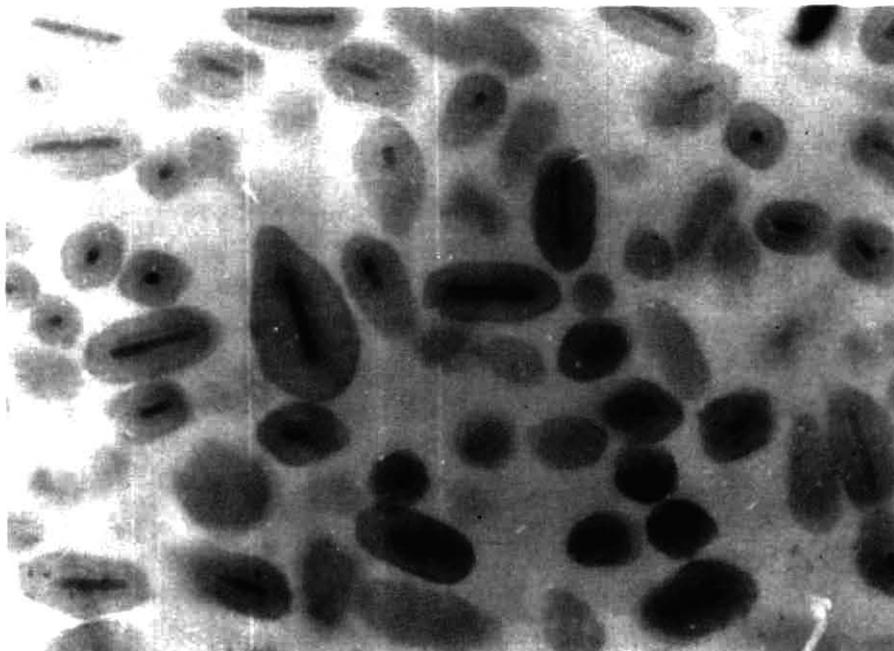
É importante que os agricultores e extensionistas não deixem de coletar lagartas que apresentem sintomas indicadores de virose e que esse material seja enviado para a devida análise e avaliação. Dessa forma poderemos identificar diferentes isolados do vírus, favorecendo uma comparação qualitativa entre eles e uma indicação do grau de patogenicidade sobre a lagarta-do-cartucho. Isso permitirá selecionar isolados virais, que potencialmente apresentam maior eficiência para o controle da praga. Além disso, é interessante fazer uma avaliação constante e periódica dos níveis de infecção atingidos,

uma vez que se tem conhecimento de que o sistema do NPV de *Spodoptera frugiperda* é bastante dinâmico com relação à susceptibilidade pelo hospedeiro, podendo a lagarta tornar-se resistente ao seu NPV com considerável rapidez (Fuxa & Richter, 1989).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E., ed. **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. p.1- 72.
- FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Reversion of resistance by *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.53, p.52-56, 1989.
- VALICENTE, H.V.; CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas, MG: Embrapa-CNPMS, 1991. 23p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 15).

A



B

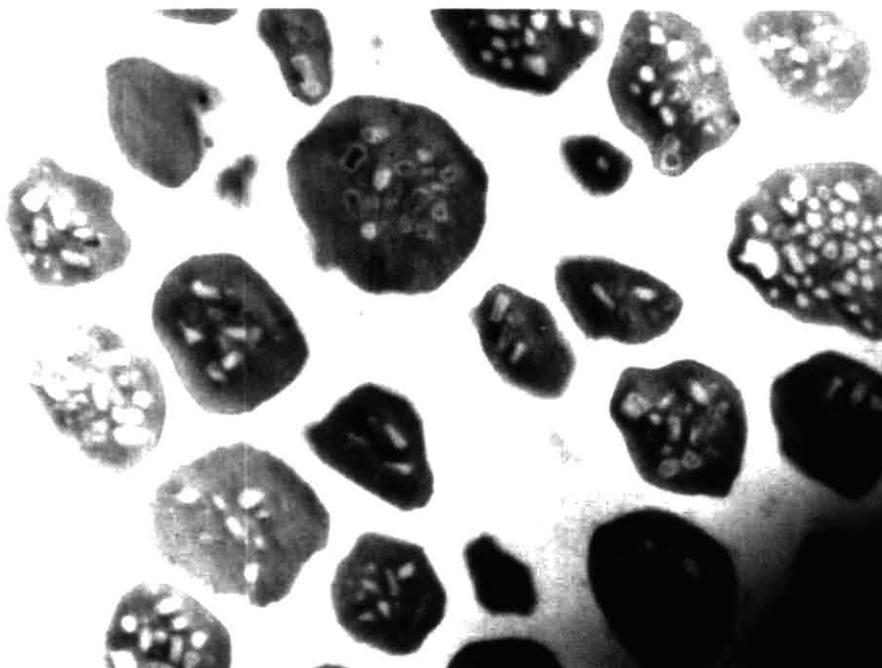


Fig. 1. Micrografia eletrônica de secções transversais de isolados de SfGV e de SfNPV. (A) morfologia de SfGV: forma oval com apenas um nucleocapsídeo por grânulo; (B) morfologia de SfNPV: forma poliédrica contendo um a vários nucleocapsídeos por corpo de inclusão.

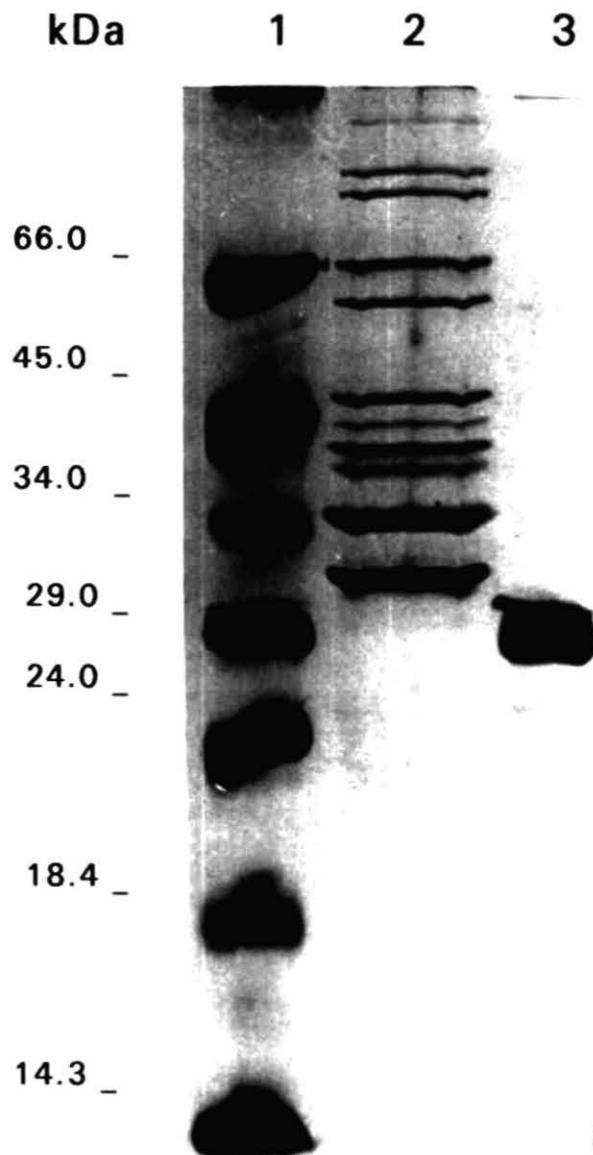


Fig. 2. Análise de proteínas estruturais dos vírions (ARVs) e dos grânulos de SfGV por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15% (coloração com "coomassie blue"). 1- marcador de peso molecular Sigma; 2- ARVs; 3- grânulos.

**A**

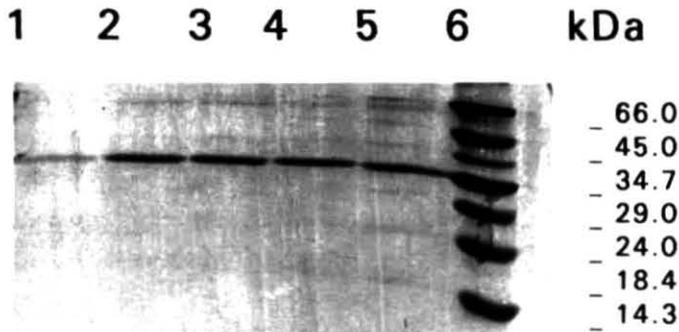
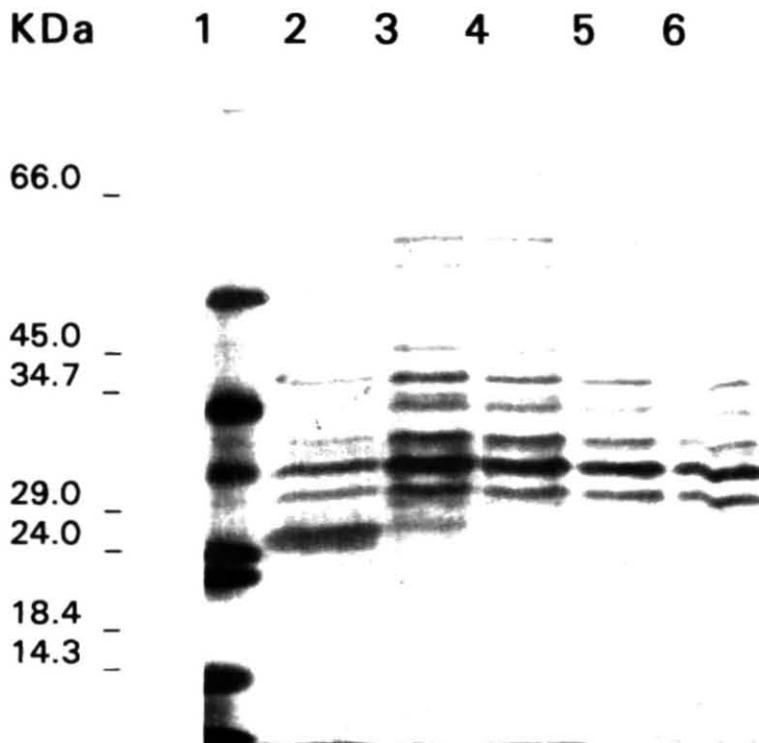


Fig. 3. Análise de proteínas estruturais de SfNPV por eletroforese em gel de poliacrilamida- SDS 15%.

(A)- poliedros de SfNPV Epamig 1, 2, 3, 4, 5 (poços 1, 2, 3, 4, 5 respectivamente); marcador de peso molecular Sigma (poço 6); (coloração com "coomassie blue").

**B**



(B)- marcador de peso molecular Sigma (poço 1); vírions (ARVs) de SfNPV Epamig 1,2,3,4,5 (poços 2, 3, 4, 5, 6 respectivamente); (coloração com nitrato de prata).

**Comitê de Publicações**

**Presidente:** Edna S. B. G. Costa Manso

**Secretária Executiva:** Miraci de Arruda Camara Pontual

**Membros:** Antônio Costa Allem

Dameres de Castro Monte

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Marcos Rodrigues de Faria

Maria Fernanda Diniz Ávidos

Maria Regina J. Soares

Marisa de Goes

Miguel Borges

**Suplentes:** Antônio Emídio Dias F. da Silva

Rui A. Mendes

**Editora Chefe :** Marisa de Goes

**Tratamento Editorial e**

**Normalização Bibliográfica:** Maria Regina Jorge Soares

Miraci de Arruda Camara Pontual

**Editoração Eletrônica:** Márcio Maeda Fukase

