

Sete Lagoas, MG  
Dezembro, 2010

### Autores

**Fernando Hercos Valicente**

Agrônomo, doutor em entomologia - genética molecular, pesquisador em controle biológico, Embrapa Milho e Sorgo, valicente@cpnms.embrapa.br

**Edmar de Souza Tuelher**

Eng. agrônomo, mestre em entomologia, pesquisador associado, Du Pont do Brasil S.A. Divisão Pioneer Sementes, tuelher@pioneer.com

**Emerson Cristi de Barros**

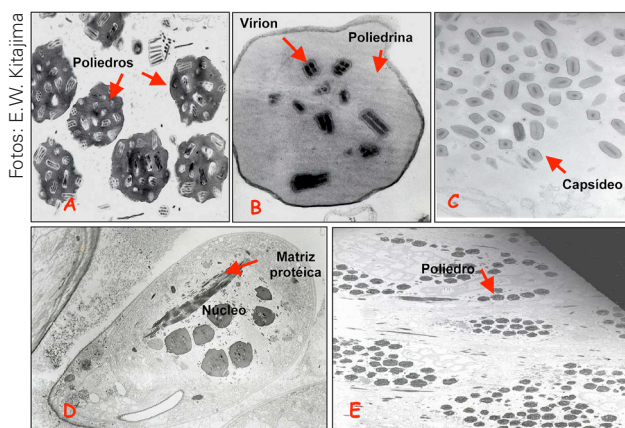
Doutorando em fitotecnia, bolsista FAPEMIG, emersoncristi@gmail.com

## Processo de Formulação do *Baculovirus Spodoptera* em Pó Molhável

### Baculovírus

Os baculovírus são o grupo mais estudado e mais comum dentre os grupos de vírus patogênicos a insetos. Estes vírus são os que possuem maior potencial para serem usados como agentes de controle biológico de pragas, sendo conhecidos mais de 20 grupos deles (MARTIGNONI; IWAI, 1986).

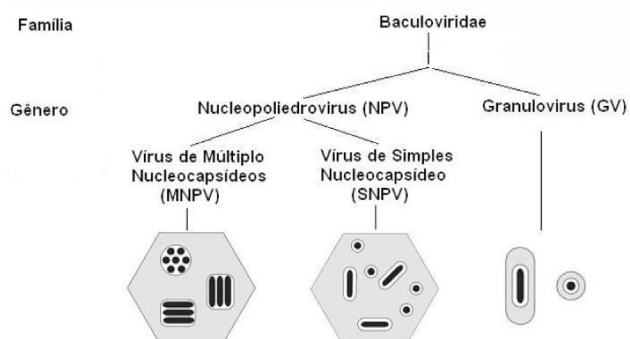
Os baculovírus pertencem à família Baculoviridae. Essa família é composta de vírus com uma simples fita dupla circular de DNA, que infectam um grande número de artrópodes e contêm os gêneros: nucleopoliedrovírus (NPV) e granulovírus (GV). Todos os baculovírus têm uma mesma estrutura básica: um capsídeo coberto de forma arredondada. O nucleocapsídeo é um "core" cilíndrico de DNA e proteína. Dentro do nucleocapsídeo, a fita dupla de DNA associa-se heterogeneamente com uma proteína básica e forma um "core" cilíndrico. A forma como os nucleocapsídeos são organizados dentro de cada envelope protéico gera dois grupos morfológicamente distintos dentro do gênero NPV: os "Vírus de Simples Nucleocapsídeo" - SNPV, em que apenas um capsídeo é encontrado por envelope, e aqueles chamados de "Vírus de Múltiplos Nucleocapsídeos" - MNPV, nos quais vários nucleocapsídeos são encontrados em um envelope comum (Figuras 1A e 1B). No caso dos GVs, estes possuem apenas um capsídeo por envelope e as oclusões virais são na forma de grânulo, contendo um e raramente dois ou mais vírions por grânulo (Figura 1C) (HUNTER-FUJITA et al., 1998). As figuras 1D e 1E ilustram tecidos de *S. frugiperda* infectada experimentalmente por um nucleopoliedrovírus. A oclusão das partículas virais em matriz protéica é uma característica extremamente importante, pois é o que garante proteção e possibilita a transmissão horizontal do vírus, ou seja, de um inseto para outro (BLISSARD; ROHRMANN, 1990). As oclusões virais, portanto, são estruturas de resistência, permitindo que os vírus mantenham a infectividade mesmo fora do hospedeiro (HUNTER-FUJITA et al., 1998). Além disso, permite a obtenção de formulações de bioinseticidas que podem ser armazenados até serem utilizados para o controle de pragas no campo.



Fotos: E.W. Kitajima

**Figura 1.** Micrografia eletrônica de tecido de lagartas-do-cartucho, *S. frugiperda*, infectadas experimentalmente. (A) e (B): infecção por um isolado de nucleopoliedrovírus (MVPN), podendo-se observar os poliedros, os vírions e a matriz protéica de poliedrina. Notar que vários nucleocapsídeos estão envoltos por uma membrana comum; (C): granulovírus (VG), onde se é observado apenas um capsídeo por envelope protéico; (D) e (E): tecidos infectados por nucleopoliedrovírus, podendo-se observar células contendo em seus núcleos vírions e poliedros.

Essa divisão da família Baculoviridae segue a classificação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTVdB, 2006) e está representada esquematicamente na Figura 2.

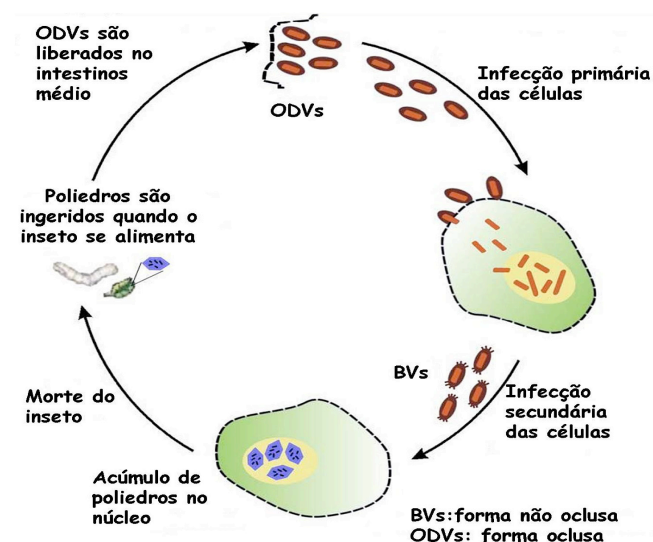


**Figura 2.** Representação esquemática da classificação dos baculovírus (modificada de ALMEIDA, 2005). A divisão dos NPV em MNPV e SNPV são apenas para a visualização da morfologia das oclusões virais.

## Infecção e modo de ação dos baculovírus

Os baculovírus possuem dois tipos de “progênes” infecciosas: uma forma oclusa do vírus responsável pela transmissão de inseto para inseto, e outra, chamada de forma não oclusa, é responsável pela transmissão de célula para célula, em um mesmo indivíduo (GRANADOS; FEDERICI, 1986). A rota principal de infecção dos baculovírus é via ingestão dos poliedros e a penetração dos vírus, através das células epiteliais do intestino médio dos insetos. Com a ingestão dos poliedros pelos insetos, a matriz protéica é dissolvida no intestino médio devido ao pH ser fortemente alcalino (8-11). Com a dissolução da matriz protéica, há a liberação dos vírions no lúmen digestivo e as partículas infectivas penetram nas células epiteliais do intestino médio, mediada por receptores específicos. Os nucleocapsídeos são transportados ao núcleo, liberando o seu DNA, iniciando o processo de replicação viral. A replicação do vírus produz a forma não oclusa do vírus, que passa a infectar os demais tecidos. A forma oclusa somente é produzida nos estágios finais da infecção viral onde os vírions são “envelopados” e produzidos os poliedros. Nos estágios finais, ocorre a ruptura das células e a liberação dos poliedros. É onde acontece a morte do inseto seguida da liquefação dos tecidos (FEDERICI, 1997, 1999). Os sintomas típicos da infecção vão desde mudanças comportamentais a morfológicas e que levam à morte do inseto após alguns dias. Pode ser

observada redução na alimentação e diminuição do crescimento, descoloração do tegumento e, ao morrer, rompimento do tegumento do inseto, o que vem a liberar os poliedros no ambiente, possibilitando novos ciclos de infecção (FEDERICI, 1997, 1999). Uma visão simplificada do ciclo de infecção é mostrada na Figura 3.



**Figura 3.** Infecção de um inseto hospedeiro por baculovírus (adaptado de SZEWCZYK et al., 2006)

## *Baculovirus spodoptera* para o controle da lagarta-do-cartucho

Os trabalhos com o baculovírus para o controle da lagarta-do-cartucho na Embrapa Milho e Sorgo tiveram início em 1984. Foi realizado um levantamento dos principais inimigos naturais deste praga em diversas regiões representativas e produtoras de milho do Estado de Minas Gerais, incluindo o Sul de Minas, Vale do Rio Doce e Alto Paranaíba. Durante o levantamento, entre 1984 e 1989, foram coletadas mais de 14.000 lagartas, em que foram encontrados diversos parasitóides das ordens Diptera e Hymenoptera, incluindo várias lagartas mortas por vírus (VALICENTE, 1989). Este levantamento se estendeu até o Estado do Paraná, onde foi detectado um alto índice de lagartas parasitadas e mortas por vírus (VALICENTE; BARRETO, 1999). Atualmente, o banco de baculovírus conta com 22 isolados amostrados em diversas regiões do Brasil. Estes isolados foram estudados, caracterizados, e sua eficiência avaliada em relação à lagarta-do-cartucho (BARRETO et al., 2005). Dentre os isolados mais estudados e eficientes no controle desta praga, o isolado 19 já teve seu genoma totalmente seqüenciado (WOLFF et al., 2008). Este seqüenciamento

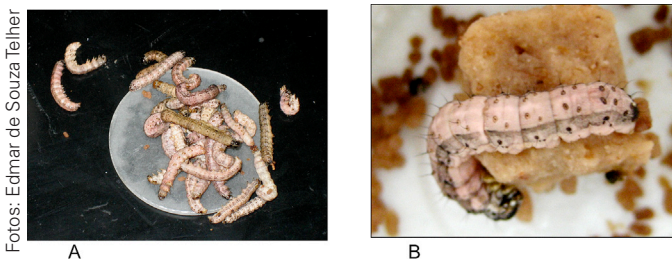
é muito importante para que se saiba a estrutura, seqüência e função de cada gene. Os isolados 6 e 18 são também muito importantes pela alta eficiência no controle da lagarta-do-cartucho do milho. O isolado 6 possui uma característica única pelo fato de não causar o rompimento do tegumento da lagarta morta imediatamente após a sua morte. Este é um dos fatores que mais facilitam o sistema de produção em larga escala. Após a morte das lagartas com o baculovírus, estas podem ser congeladas ou processadas imediatamente, dependendo do esquema de produção da biofábrica.

### Formulação do baculovírus em pó molhável

A formulação do baculovírus em pó molhável pode ser realizada em três etapas.

#### Seleção e coleta das larvas:

Lagartas mortas pela infecção causada pelo baculovírus são selecionadas pela cor e pelo aspecto externo. As características principais são a descoloração e o aspecto oleoso do tegumento das larvas mortas (Figuras 4A e 4B, respectivamente).



**Figura 4.** Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, morta pelo *Baculovirus spodoptera* (isolado 6). Observa-se a descoloração da larva - A, e o aspecto oleoso do tegumento da lagarta morta - B.

Estas larvas são coletadas com pinças e acondicionadas em recipientes plásticos limpos, para que possam ser congeladas, se necessário. Se houver disponibilidade de tempo, as larvas mortas podem ser processadas e formuladas imediatamente. Com este novo isolado de baculovírus, o rendimento de coleta de lagartas mortas e o armazenamento por homem/hora tornou a produção em larga escala viável economicamente.

#### Maceração de larvas:

As lagartas mortas pelo baculovírus serão maceradas usando liquidificador comum ou industrial (capacidade de 6L), com uma pequena quantidade de

água, o suficiente apenas para fazer girar as paletas do liquidificador. As larvas devem ser trituradas no liquidificador por aproximadamente 10 minutos, sem interrupção (Figura 5A). Neste passo, deve ser incorporado um inerte (caulim) que atua como agente de preenchimento e ajuda na secagem do produto na formulação em pó molhável (Figura 5B).



**Figura 5.** Maceração de larvas de *Spodoptera frugiperda* mortas pelo baculovírus (5A) e mistura do inerte (5B).

#### Secagem do Baculovírus formulado em pó molhável:

Após a trituração das larvas no liquidificador e a mistura com o inerte, todo o material é colocado em bandejas lavadas e limpas com álcool 70%, e secas em laboratório, com jato de ar forçado (Figura 6). Vale ressaltar que vários inertes podem ser testados e usados na formulação.



**Figura 6.** Material triturado e misturado com inerte é colocado em bandejas e secas em laboratório com jato de ar dirigido (Figs. 6A e 6B).

Após 3 a 4 dias, todo o material estará seco e deverá ser triturado com o uso de um moinho, e pode ser embalado em sacos plásticos transparentes ou sacos de papel alumínio-laminado (tipo embalagem de café). Esta embalagem é melhor porque evita a ação direta da luz sobre o produto. A Figura 7 mostra o baculovírus embalado em saco plástico transparente numa quantidade de 50g/ha. Esta quantidade é a recomendada para ser diluída em 250 litros de água/ha.



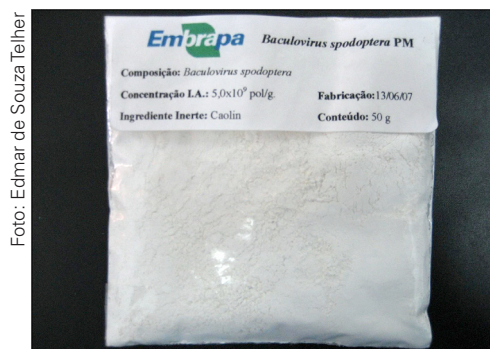


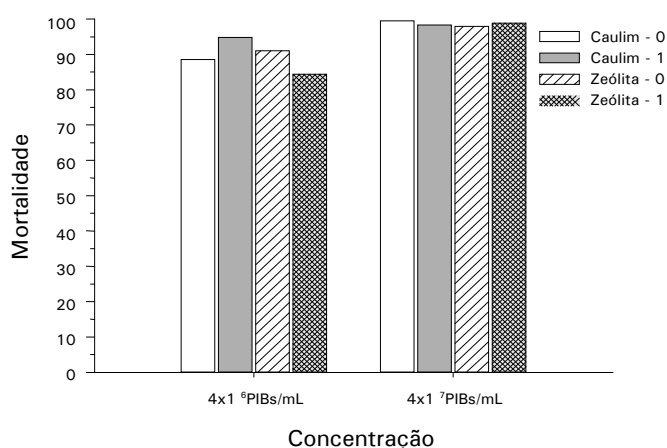
Foto: Edmar de Souza Telher

**Figura 7.** Baculovírus empacotado na formulação pó molhável, com a recomendação de 50g/ha. No rótulo deve conter a concentração e a data de empacotamento.

### Estabilidade de *B. spodoptera* formulado em pó molhável

As condições de armazenamento poderão afetar a infectividade do baculovírus. Assim, o tempo de prateleira de um produto biológico deve ser determinado a fim de que possa ser utilizado com segurança, obtendo-se a eficiência de controle desejada. Foi verificada a eficiência do baculovírus com a utilização de dois materiais inertes distintos: caulim e zeólita. Após um ano de armazenamento, foi observado que não houve diminuição da eficiência de controle de lagartas de *S. frugiperda*, não havendo diferença significativa entre os tempos de avaliação ou materiais inertes utilizados na formulação (Figura 8). Observou-se, na média, maior eficiência na concentração de  $4 \times 10^7$  poliedros/mL (89,7%) do que na de  $4 \times 10^6$  poliedros/mL (98,7%).

O tipo de formulação utilizada é a mais simples, sendo que o aprimoramento dela é uma das vertentes da pesquisa, com a adição de adjuvantes e protetores contra radiação ultravioleta que poderão contribuir para a melhor eficiência do bioinseticida no campo.



## Referências

ALMEIDA, A. F. **Avaliação preliminar da viabilidade de produção in vitro de um isolado brasileiro de Baculovirus Spodoptera frugiperda MNPV.** 2005. 97 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 67-75, 2005.

BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 35, p. 127-155, 1990.

ENTWISTLE, P. F.; EVANS, H. F. Viral control. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1986. p. 347-412.

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.) **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 33-59.

FEDERICI, B. A. Naturally occurring baculoviruses for insect pest control. In: HALL, F. R.; MENN, J. J. (Ed.). **Methods in biotechnology: biopesticides, use and delivery**. Totowa: Humana Press, 1999. v. 5, p. 301-320.

GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, 1986. v. 1.

**Figura 8.** Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* inoculadas com *B. spodoptera* formulado em pó molhável, em dois tipos de material inerte, mantido em condições de armazenamento durante um ano.

HUNTER-FUJITA F.; ENTWISTLE P. F.; EVANS H. F.; CROOK, N. E. (Ed.). **Insect viruses and pest management**. New York: Wiley, 1998.

ICTVdB Management. 00.006. Baculoviridae. In: BÜCHEN-OSMOND, C. (Ed.). **ICTVdB: the Universal virus database: version 3**. New York: Columbia University, 2006.

MARTIGNONI, M. E.; IWAI, P. J. **A Catalogue of viral diseases of insects, mites, and ticks**. 4. ed. Portland: USDA, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, 1986. 51 p. (General Technical Report PNW-195).

SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; SOUZA, M. L. Baculoviruses: re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 143-160, 2006.

VALICENTE, F. H. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 119-127, 1989.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, R. B. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 333-337, 1999.

WOLFF, J. L. C.; VALICENTE, F. H.; MARTINS, R.; OLIVEIRA, J. V. C.; ZANOTTO, P. M. A. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. **Journal of General Virology**, Cambridge, v. 89, n. 5, p. 1202-1211, 2008.

#### Circular Técnica, 156

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Milho e Sorgo**  
**Endereço:** Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151  
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG  
**Fone:** (31) 3027 1100  
**Fax:** (31) 3027 1188  
**E-mail:** sac@cnpms.embrapa.br  
1ª edição  
1ª impressão (2010): on line

**Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**



#### Comitê de publicações

**Presidente:** Antônio Carlos de Oliveira  
**Secretário-Executivo:** Elana Charlotte Landau  
**Membros:** Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo afonso Viana, João Hebert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

#### Expediente

**Supervisão editorial:** Adriana Noce  
**Revisão de texto:** Antonio Cláudio da Silva Barros  
**Normalização Bibliográfica:** Rosângela Lacerda de Castro  
**Tratamento das ilustrações:** Alexandre Esteves  
**Editoração eletrônica:** Alexandre Esteves