

## ATIVIDADE BIOLÓGICA DE TOXINAS E DE UM ISOLADO DE BACULOVÍRUS (SNPV) CARACTERIZADO MOLECULARMENTE, EM *Helicoverpa armigera* E *Helicoverpa zea*

SOSA-GÓMEZ, D.R.<sup>1</sup>; RIBEIRO, B.M.<sup>2</sup>; ARDISSON-ARAÚJO, D.M.P.<sup>2</sup>; MELO, F.L.<sup>2</sup>; CARVALHO, R.A.<sup>3</sup>; MARTINELLI, S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Soja, Caixa Postal 231, Londrina, PR daniel.sosa-gomez@embrapa.br; <sup>2</sup>Universidade de Brasília, Programa em Patologia Molecular, Brasília, Distrito Federal; <sup>3</sup>Monsanto do Brasil; <sup>4</sup>MonsantoCompany.

A utilização de baculovírus para o controle de pragas é de grande relevância. Suas características mais importantes como inseticidas microbianos residem na sua especificidade, elevada virulência e doses reduzidas para o controle eficiente de pragas que apresentam elevada suscetibilidade. Na América do Sul vários programas de manejo de pragas tem apresentado sucesso no controle de lepidópteros com vírus. Alguns exemplos são o MVPNAg no controle da lagarta-da-soja, o vírus de granulose do mandarová da mandioca, o NPV do mandarová-da-erva-mate, *Perigonia lusca* (SOSA-GÓMEZ et al., 1994; MOSCARDI, 1999). No caso das principais lagartas do complexo da subfamília Heliothinae os vírus são componentes essenciais do manejo integrado de pragas. Além disso, com a recente adoção de plantas Bt e a recomendação de uso de áreas de refúgio para o manejo da resistência, os vírus representam uma importante ferramenta para o manejo das populações nessas áreas de refúgio. Isto é devido a que os vírus apresentam modo de ação diferente ao da toxina Cry1Ac.

Um dos componentes mais importantes dos agentes de controle microbiano é a virulência, porque permite inferir se o agente possui potencial de controle ou não. Portanto, neste trabalho visamos caracterizar comparativamente as resposta de populações brasileiras de *H. armigera* e *H. zea* a um vírus de Heliothine autóctone, um vírus de HzNPV comercial e a toxina Cry1Ac presente na soja Bt.

O isolado do vírus afetando *Helicoverpa armigera*, foi identificado por meio de estudos de microscopia eletrônica e estudos dos perfis de restrição realizados na Universidade de Brasília. A produção do vírus foi realizada mediante a infecção de lagartas de *H. armigera* mantidas em laboratório com dieta artificial de Greene et al. (1976). A identificação das espécies de *Helicoverpa* foi realizada seguindo as técnicas de PCR e "restriction fragment length

polymorphism analysis" (PCR-RFLP) propostas por Behere et al. (2007)

Diluições seriadas do vírus e da toxina Cry1Ac foram realizadas para determinar as CL<sub>50</sub> e CL<sub>99</sub> do patógeno (corpos de oclusão poliédricos (OB).mL<sup>-1</sup>) e da toxina (µg de i.a.mL<sup>-1</sup>) em lagartas de terceiro instar (vírus) e neonatas (toxina) de *H. armigera* e *H. zea*, respectivamente. O vírus comercial não foi quantificado, foi diluído na dieta conforme a concentração de OB definidos no rótulo.

As lagartas forma inoculadas por meio de diluição dos agentes na dieta artificial sem formol a 50°C. Lagartas neonatas foram alimentadas com a dieta contendo a toxina Cry1Ac e lagartas de terceiro instar foram alimentadas com a dieta contendo os corpos de oclusão do NPV. Grupos de lagartas (n=40-60) sem tratar com o SNPV ou Cry1Ac foram utilizadas como testemunha, em cada bioensaio.

A mortalidade foi avaliada após 48 horas, os dados foram corrigidos e analisados mediante o programa Polo Plus (LEORA, 2003).

Ambos, perfil de restrição e microscopia eletrônica classificaram o vírus como um isolado da espécie *Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus* (HzSNPV), por isso chamado HzSNPV-Brazilian. Proveu-se ainda o sequenciamento total do genoma usando a plataforma 454 de alto desempenho. Em análise preliminar, o isolado brasileiro apresentou tamanho de 129.687 pb com aproximadamente 140 genes putativos codificando proteínas com pelo menos 150 aminoácidos de extensão. Por alinhamento de nucleotídeos, HzSNPV-Brazilian apresentou identidade de 99% com o vírus HzSNPV previamente sequenciado. Apenas uma única região de alta repetição nucleotídica, chamada região homóloga divergiu do vírus previamente sequenciado. HzSNPV-Brazilian apresenta uma deleção de aproximadamente 1200 pb nesta região.

Os resultados dos bioensaios indicam que *H. zea* apresentou maior suscetibilidade aos

vírus de poliedrose nuclear provenientes de *H. armigera* e de *H. zea* (Gemstar®) comparativamente a *H. armigera*. A lagarta do velho-mundo tolerou doses 4,6 a 4,7 vezes maiores que *H. zea*. A atividade do vírus comercial foi semelhante a do vírus de ocorrência natural.

Entretanto, a suscetibilidade de *H. armigera* foi 31 vezes maior a toxina Cry1Ac quando comparada com *H. zea*. Indicando potencial para utilização de ambos os vírus em áreas de refúgio ou como controle alternativo das duas espécies de *Helicoverpa*.

## Referências

- BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSEL, D.A.; HECKEL, D.G.; APPLETON, B.R.; KRANTHI, K.R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.1-10, 2007.
- GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar (Lepidoptera Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p. 487-488, 1976.
- LEORA SOFTWARE. **POLO-Plus 1.0 Probit and Logit analysis**. LeOra Software, Petaluma, California. 2003.
- MOSCARDI F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v.44, p. 257-289, 1999.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; KITAJIMA, E.W. & ROLÓN, M. First record of entomopathogenic diseases in Paraguay tea agroecosystem in Argentina. **Florida Entomologist**, v.77, n.3, p.378-382, 1994.

**Tabela 1.** Susceptibilidade (CL<sub>50</sub> e CL<sub>99</sub>) de espécies de Heliiothinae a toxinas e HzSNPV (OB. ml de dieta<sup>-1</sup>), Embrapa Soja, Londrina, PR, 2014.

Inseto	Número insetos	CL <sub>50</sub>	IC 95%	CL <sub>99</sub>
		OB.ml <sup>-1</sup> de dieta		OB.ml <sup>-1</sup> de dieta
<i>H. armigera</i>	482	987	660,13 – 1.555,29	75.370
<i>H. armigera</i>	283	1022 <sup>(1)</sup>	470,85 – 2150,31	nc
<i>H zea</i>	197	215	75,37 – 400,49	13.031
		µg de Cry1Ac.ml <sup>-1</sup> de dieta		µg de Cry1Ac.ml <sup>-1</sup> de dieta
<i>H. armigera</i>	336	0,175	0,138 – 0,219	4,27
<i>H. zea</i>	736	5,48	0,374 – 26,446	50313

<sup>(1)</sup> = Gemstar® | nc = não calculado