

IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM VÍRUS-DE-GRANULOSE EM LAGARTAS-DO-CARTUCHO-DO-MILHO¹

FERNANDO H. VALICENTE², MARIA JOSÉ V. DE V. DINIZ PEIXOTO³,
EDILSON PAIVA⁴, ELLIOT W. KITAJIMA⁵

RESUMO - Foi constatada a presença de um vírus-de-granulose (VG) infectando lagartas-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Smith, 1797), VGSf, na região de Sete Lagoas, MG. Extratos de lagartas infectadas com vírus mostraram ser patogênicos, chegando a causar até 100% de mortalidade em lagartas de três dias de idade, criadas artificialmente em laboratório. A identificação do vírus foi feita através de microscopia eletrônica, e os resultados mostraram tratar-se de um vírus-de-granulose, o qual pertence ao gênero *Baculovirus* e caracteriza-se por apresentar suas partículas oclusas individualmente em uma cápsula de proteína, formando estruturas características chamadas "corpos de inclusão" (CIs). A purificação do vírus, feita através de centrifugações diferenciais e em gradientes de sacarose, mostrou ser possível obter cerca de 22 mg de (CIs) do vírus por lagarta infectada. Dada a sua patogenicidade, grande quantidade de CIs por lagarta infectada e facilidade de purificação, o vírus em estudo apresenta um grande potencial para ser utilizado como bioinseticida no controle da lagarta-do-cartucho.

Termos para indexação: *Zea mays*, patologia de insetos, milho, *Baculovirus*, corpos de inclusão.

IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF A GRANULOSIS VIRUS FOUND IN FALL ARMYWORMS

ABSTRACT - A virus was found infecting larvae of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Smith, 1797), in Sete Lagoas, MG, Brazil. Virus extracts from infected larvae were able to cause up to 100% mortality in three-day old larvae feeding in artificial diet. The identification of the virus, made by electron microscopy, showed that it was a granulosis virus, belonging to the genus *Baculovirus* and is composed of enveloped nucleocapsids which are occluded in proteinaceous inclusion bodies. Purifications by differential and sucrose gradient centrifugations yielded 22 mg of inclusion bodies per infected larva. Due to its pathogenicity, large number of inclusion bodies per infected larvae and simplicity of purification procedures, the identified virus shows a great potential to be used as a bioinsecticide in the biological control of the fall armyworm.

Index terms: *Zea mays*, insect pathology, corn, *Baculovirus*, inclusion bodies.

INTRODUÇÃO

O vírus-de-granulose (VG) pertence ao gênero *Baculovirus* e caracteriza-se por apresentar suas partículas (nucleocapsídeos) oclusas, individualmente em uma cápsula de proteína (granulina), formando estruturas características que são chamadas "corpos de inclusão" (CIs). As partículas do VG são alongadas e contêm fita dupla de DNA em seu genoma. Quando inclusas nos CIs, as partículas do vírus retêm sua virulência por anos, mas perdem rapidamente sua infectividade quando libera-

das das cápsulas de granulina (Gibbs & Harrison 1976, Payne & Kelly 1981).

A infecção das lagartas ocorre através da ingestão dos CIs, os quais são digeridos no intestino liberando as partículas do vírus. As cápsulas de granulina fixam-se às membranas das células do intestino, e as partículas do vírus passam para dentro das células, multiplicando-se em seus núcleos e espalhando-se por todo o corpo da lagarta, em uma intensidade tal, que, ao morrer, o que resta da lagarta é praticamente o tegumento envolvendo uma suspensão de CIs. A disseminação do vírus ocorre com a ruptura do tegumento da lagarta (Yamamoto & Tanada 1978, Harrap 1970, Summers 1971, Kawanishi et al. 1972, Tanada et al. 1975, Gibbs & Harrison 1976).

Os lepidópteros são os únicos hospedeiros conhecidos para o VG. Estudos têm demonstrado que partículas de VGs são incapazes de se multiplicarem em células de outros insetos ou em célu-

¹ Aceito para publicação em 7 de maio de 1987.

² Eng. - Agr., Sec. da Agr., MG, à disposição do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Caixa Postal 151, CEP 35700 Sete Lagoas, MG.

³ Bioq., EMBRAPA/EPAMIG/CNPMS.

⁴ Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/CNPMS.

⁵ Eng. - Agr., Dr., Prof.-Titular da Univ. de Brasília, Dep. de Biol. Celular. IB. CEP 70910 Brasília, DF.

las de animais (Burges et al. 1980, Metcalf & Luckmann 1982).

O VG da lagarta do cartucho (VGSf) foi identificado primeiro por Steinhaus (1957), de larvas coletadas em milho, na Colômbia. Matignoni & Iwai (1981) citam vários patógenos da lagarta do cartucho dentre eles o VGSf e, Gardner & Fuxa (1980) fazem referências do VG infectando a *Spodoptera frugiperda* em sorgo nos Estados da Geórgia e Louisiana, nos EUA.

Ignoffo & Anderson (1979), Huger (1963) e Ignoffo (1968) afirmam que, dada a sua estabilidade, especificidade e virulência, vírus como o VG tornam-se candidatos promissores para o controle biológico de insetos, e Burges & Hussey (1971) afirmam que o VGSf é viável para ser usado como bioinseticida.

O objetivo do presente trabalho foi identificar o vírus-de-granulose em lagartas-do-cartucho-do-milho (*Spodoptera frugiperda*), testar sua virulência, e purificá-lo, visando sua utilização como bioinseticida para controle daquele inseto.

MATERIAL E MÉTODOS

O vírus em estudo foi obtido em uma lagarta-do-cartucho-do-milho (*S. frugiperda*) apresentando sintomas típicos de virose (tegumento esbranquiçado e translúcido) e coletada em milho, no município de Sete Lagoas, MG, ano agrícola de 85/86.

A preparação de extratos foi feita macerando a lagarta em 40 ml de água destilada. O homogeneizado obtido foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 1.600 g durante 25 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 200 ml de água destilada e identificado como extrato A. O sobrenadante apresentando cor branca leitosa foi identificado como extrato B.

A infectividade dos extratos assim preparados foi testada em lagartas sadias com três, seis e oito dias de idade, criadas individualmente em copos de plástico de 50 ml contendo 5 g de dieta artificial de Burton (1969).

Foram utilizadas 24 lagartas em cada um dos tratamentos, os quais consistiram de dieta contaminada pelos extratos A e B e dietas tratadas com água (controle). O volume de extrato e água utilizados nos tratamentos foi de 0,2 ml, distribuídos em duas aplicações diárias consecutivas de 0,1 ml cada, sobre a dieta.

Outro teste consistiu em ressuspender o vírus purificado e liofilizado em água e na aplicação de 0,2 ml da suspensão sobre a dieta artificial de 48 lagartas sadias recém-eclodidas.

A identificação do vírus foi realizada através de mi-

croscopia eletrônica. Os tecidos, removidos por dissecação de lagartas infectadas com extratos A e B, foram imediatamente fixados em uma mistura de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2. As amostras foram então pós-osmicadas em Os W₄ 1%, no mesmo tampão, desidratados e emblocados em meio de Spurr. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo equipado com navalha de diamante, e as secções foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, antes de serem examinadas em um microscópio eletrônico, Zeiss EM 9.

A purificação dos CIs do vírus foi com base em modificações da metodologia descrita por Yamamoto & Tana-da (1978), utilizando-se centrifugações diferenciais e centrifugações em gradientes de sacarose. Lagartas infectadas (10), com extratos A e B, congeladas, pesando em média 450 mg, foram homogeneizadas em 10 ml de gelo moído, filtrado em uma peneira 0,35 mm, diluído com água destilada para um volume final de 200 ml e centrifugado a 30.000 g durante 30 minutos. Em todo o processo foi usada água destilada, esterilizada e sem oxigênio livre. O precipitado foi ressuspenso em 200 ml de água, filtrado em organdi e centrifugado a 30.000 g por 30 minutos. Novamente o precipitado foi ressuspenso em 30 ml de água e centrifugado a 200 g por 15 minutos; o sobrenadante foi recuperado e submetido a três centrifugações de 6.000 g por 20 minutos, sendo que no último o precipitado foi ressuspenso em apenas 5 ml de água. Esta suspensão foi submetida a centrifugação em gradiente de sacarose, em tubos contendo 2 ml de solução 80% e 5 ml de solução 50% de sacarose, a 70.000 g por duas horas. Os CIs foram recolhidos na faixa divisória das soluções de 80% e 50% de sacarose, diluídos em quantidade suficiente de água para 40 ml e submetidos a três centrifugações de 6.000 g por 20 minutos. Após a última centrifugação o precipitado foi congelado e liofilizado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados provenientes da utilização de extratos da lagarta infectada empregados como fonte de inóculo nos experimentos de laboratório são apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado, os extratos foram eficientes como fontes de inóculo, chegando a causar até 100% de mortalidade no tratamento de lagartas mais novas (três dias de idade). A taxa de mortalidade decresceu à medida que se tentou infectar lagartas mais velhas. Nas condições de laboratório onde as lagartas foram criadas, o ciclo larval normalmente se completa em 14 dias à temperatura de 25°C. Lagartas infectadas não completaram o ciclo larval, e ao morrerem

TABELA 1. Efeito da contaminação da dieta com extratos do vírus, em lagartas de três, seis e oito dias de idade (24 insetos por tratamento).

Tratamentos	Idade das lagartas (dias)	Número de lagartas mortas pelo vírus	Número de lagartas mortas sintomas e estádios diferentes das infectadas com o vírus	Número de pupas normais
Dieta contaminada pelo extrato A	3	22	1	1
	6	4	0	20
	8	3	1	20
Dieta contaminada pelo extrato B	3	24	0	0
	6	7	0	17
	8	4	1	19
Dieta tratada com água	3	0	0	24
	6	0	0	24

possuíam volumes e pesos superiores aos de lagartas normais antes de se transformarem em pupas. Duas lagartas de oito dias de idade morreram com sintomas e estádios de crescimento diferentes das infectadas com vírus.

Das 48 lagartas alimentadas com o vírus purificado e liofilizado, 46 morreram apresentando sintomas típicos de virose, sendo observada em microscopia ótica a presença de uma grande quantidade de VGs.

Uma vez constatada a patogenicidade dos extratos, foram feitas tentativas de identificação do vírus através de microscopia ótica comum, pois acredita-se que se tratasse de um vírus de poliedrose nuclear (VPN). Como o resultado para o VPN foi negativo, partes do intestino e do tegumento das lagartas foram examinadas através de microscopia eletrônica. Os resultados mostraram tartar-se de um vírus de granulose do gênero *Baculovirus*. As Fig. 1, 2 e 3 apresentam fotomicrografias eletrônicas de seções ultra-finas de tecido adiposo de uma lagarta infectada com o vírus. Na Fig. 1 pose-se observar a grande quantidade de CIs presentes no citoplasma de uma célula infectada. As Fig. 2 e 3 mostram detalhes dos CIs onde se notam as partículas alongadas do vírus, oclusas individualmente, em cápsulas de proteína.

A quantidade de CIs recuperada após o processo de purificação foi de 22 mg por lagarta, o que

equivale a 1/3 da matéria seca da lagarta na ocasião de sua morte. Isto comprova a afirmação de Gibbs & Harrison (1976) de que, ao morrer, o que resta de uma lagarta infectada com VG é praticamente o tegumento envolvendo uma suspensão de CIs.

Os CIs purificados serão utilizados em testes de dosagens de inóculos e em testes imunológicos e eletroforéticos visando à quantificação, diagnose e caracterização do vírus.

CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos comprovam a ocorrência, em condições de campo, na região de Sete Lagoas, MG, de lagartas de *S. frugiperda* infectadas por um vírus de granulose.

2. Corpos de inclusão do vírus, em extratos de lagartas infectadas, e em suspensão do vírus purificado e liofilizado, mostraram ser patogênicos, chegando a causar até 100% de mortalidade em lagartas de três dias de idade e recém-eclodidas, respectivamente, criadas artificialmente em laboratório.

3. Dada a sua estabilidade, patogenicidade e grande quantidade de CIs por lagartas infectadas, o vírus em estudo apresenta grande potencial para ser utilizado como bioinseticida no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho.



FIG. 1. Vista parcial do citoplasma de uma célula do tecido adiposo da lagarta, mostrando grande quantidade de Cls (setas) dispersos entre gotículas de lipídeo.

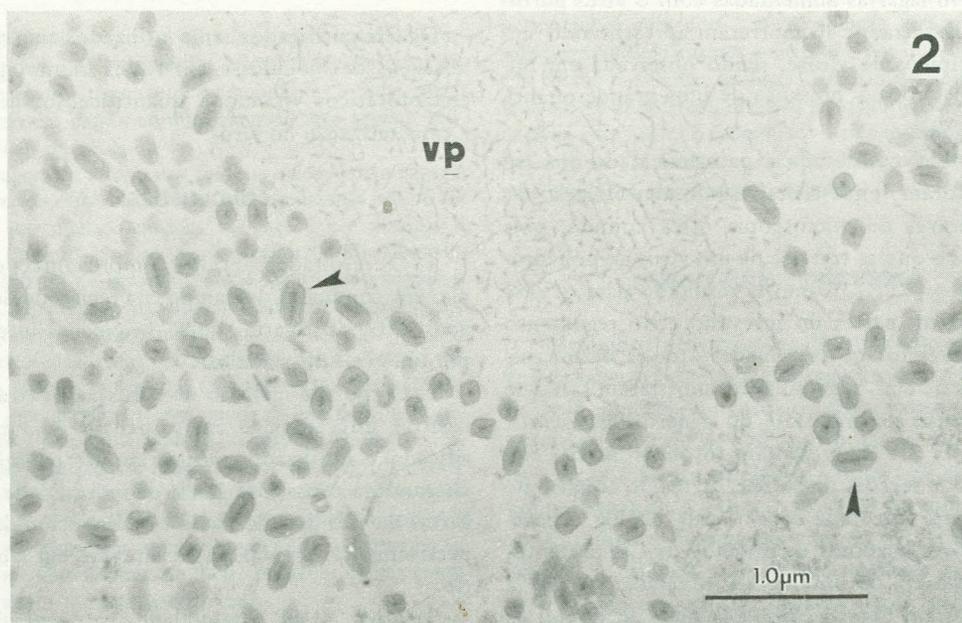


FIG. 2. Corpos de inclusão em detalhe maior (setas), mostrando a existência de uma partícula viral única, neles ocluída. Uma inclusão contendo material fibrilar, provavelmente um viroplasma (VP), aparece nas proximidades de um grupo de Cls.

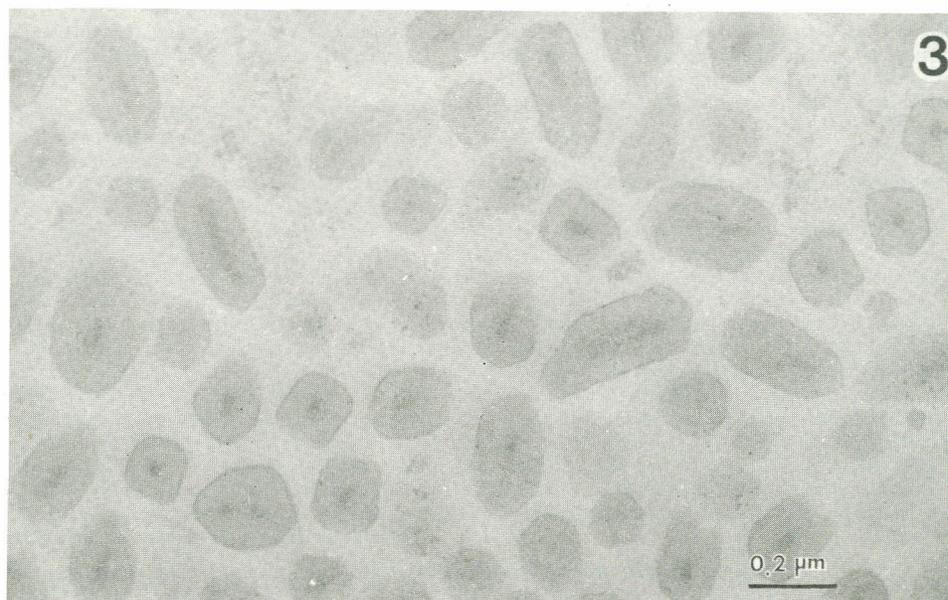


FIG. 3. Grupos de CIs em magnificação maior, mostrando detalhes das partículas alongadas do vírus, oclusas individualmente, em uma cápsula de proteína.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Técnico de Laboratório Miguel F.A. Reis pela dedicação e eficiência no auxílio dos trabalhos realizados.

REFERÊNCIAS

- BURGES, H.D.; CROIZIER, G.; HUBER, J. A review of safety tests on baculoviruses. *Entomophaga*, 25(4): 329-40, 1980.
- BURGES, H.D. & HUSSEY, N.W. Past achievements and future prospects. In: _____, ed. *Microbial control of insects and mites*. London, Academic, 1971. p.687-709.
- BURTON, R.L. *Mass rearing the corn earworm in the laboratory*. s. l., USDA, 1969. 8p. (ARS, 33-134)
- GARDNER, W.A. & FUXA, J.R. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. *Fla. Entomol.*, 63(4):439-47. 1980.
- GIBBS, A. & HARRISON, B. *Plant virology; the principles*. Camberra, E. Arnold, 1976. 292p.
- HARRAP, K.A. Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 42:311-8, 1970.
- HUGER, A. Granuloses of insects. In: STEINHAUS, E.A. *Insect pathology; an advanced treatise*. New York, Academic, 1963. v. 1, p.531-69.
- IGNOFFO, C.M. Specificity of insect viruses. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 14:265-76, 1968.
- IGNOFFO, C.M. & ANDERSON, R.F. Bioinsecticides. In: IGNOFFO, C.M. & ANDERSON, R.F. *Microbial technology*. 2. ed. New York, Academic, 1979. p.1-28.
- KAWANISHI, C.Y.; SUMMERS, M.D.; STOLTZ, D.B.; ARNOTT, H.J. Entry of an insect virus *in vivo* by fusion of viral envelope and microbillus membrane. *J. Invertebr. Pathol.*, 20:104-8, 1972.
- MARTIGNONI, M.E. & IWAI, P.J. A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In: BURGES, H.D. *Microbial control pests and plant diseases; 1970-1980*. New York, Academic, 1981. p.897-911.
- METCALF, R.L. & LUCKMANN, W.H. *Introduction to insect pest management*. New York, J. Wiley, 1982. 577p.
- PAYNE, C.C. & KELLY, D.C. Identification of insect and mite viruses. In: BURGES, H.D. *Microbial control pests and plant diseases; 1970-1980*. New York, Academic, 1981. cap. 5, p.61-91.
- STEINHAUS, E.A. New records of insect-virus diseases. *Hilgardia*, 26(7):417-30, 1957.

- SUMMERS, M.D. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplysia ni*. *J. Ultrastruct. Res.*, 35:606-25, 1971.
- TANADA, Y.; HESS, R.T.; OMI, E.M. Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, and the enhancement of a synergistic enzyme. *J. Invertebr. Pathol.*, 26:99-104, 1975.
- YAMAMOTO, T. & TANADA, Y. Biochemical properties of viral envelopes of insect baculoviruses and their role in infectivity. *J. Invertebr. Pathol.*, 32(2):202-11, 1978.