

IDENTIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM VÍRUS DA POLIEDROSE NUCLEAR
DA LAGARTA *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Fernando H. Valicente¹

Maria José V. de V.D. Peixoto¹

Edilson Paiva¹

Elliot W. Kitajima²

ABSTRACT

Identification and purification of a nuclear polyhedrosis virus of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

The fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) is one of the most important pests of corn in Brazil, and its control is made basically with chemical pesticides. To reduce the problems caused by chemical control, alternatives such as bio-control with viral insecticides have been considered by the National Center for Corn and Sorghum Research (CNPMS/EMBRAPA) and a granulosis virus was already identified. More recently, a nuclear polyhedrosis virus (NPV) was obtained from one field collected larva in Sete Lagoas, Minas Gerais State which was successfully transmitted and maintained in the laboratory. Polyhedra from NPV infected *S. frugiperda* larva were purified by differential centrifugation followed by sucrose gradient density centrifugation, and used in infectivity tests. Three, six and seven-day old larvae, fed on leaves treated with inclusion body (PIB) polyhedra suspensions (2×10^6 or 2×10^5 PIB/ml), for 24 or 48 hs, had a very high mortality rate (practically 100%), except for the 7 day-old larvae at the lower

Recebido em 12/10/88

¹ CNPMS/EMBRAPA/EPAMIG. Caixa Postal 151, 35700 Sete Lagoas, MG.

² Universidade de Brasília, 70910 Brasília, DF.

PIB concentration, which resulted in about 70% mortality. Light microscopy of extracts from infected larvae easily demonstrated the presence of the polyhedra, but the adequate identification as a MENPV was made by electron microscopy of tissues from ectoderm, fat body and tracheocytes consistently contained large amount of polyhedra, occluded in which there were rod-shaped particles, several of them surrounded by a common membrane.

RESUMO

A lagarta-do-cartucho é considerada uma das principais pragas da cultura do milho e seu controle tem sido feito basicamente pelo uso de inseticidas químicos. O CNPMS/EMBRAPA considerando as possibilidades de um controle biológico desta praga, tem procurado por vírus que sirvam como bioinseticidas, tendo já encontrado um vírus de granulose. Recentemente isolou-se, a partir de uma lagarta do campo, um vírus de poliedrose nuclear (VPN), que tem sido mantido em larvas em condições de laboratório, causando nestas sintomas idênticos ao observado no campo. Poliedros puderam ser purificados a partir de extratos de lagartas infectadas através de centrifugação diferencial e em gradiente de densidade de sacarose. Testes de infectividade mostraram que larvas de *S. frugiperda*, criadas artificialmente, de 3, 6 e 7 dias de idade, alimentadas com suspensões de poliedros, em concentrações de 2×10^6 ml, tiveram alta taxa de mortandade (praticamente 100%), exceto as de 7 dias, na menor dose cuja mortandade foi da ordem de 70%. Exames de extrato das lagartas infectadas mostraram a presença de grande número de poliedros, mas a identificação adequada de que se tratava de um vírus de poliedrose nuclear, do tipo "multi-enveloped", (MECPN) só pode ser feita através de exames de secções ultrafinas ao microscópio eletrônico: núcleos da ectoderma, tecido adiposo e traqueócitos continham grande número de poliedros e, ocluídas nestes, partículas baciliformes, em geral várias delas envolvidas por um envoltório comum.

INTRODUÇÃO

Entre os fatores que contribuem para uma baixa produtividade de milho incluem-se as pragas e, dentre elas, a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). A lagarta alimenta-se basicamente em todas as fases de crescimento desta cultura, sendo mais freqüentemente encontrada no cartucho de plantas novas, podendo causar reduções de até 34% na produção, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta

(CARVALHO, 1970). Em alguns casos, pode haver a destruição do ponto de crescimento da planta, ocasionando sua morte.

Dentre os métodos de controle desta praga, o químico tem sido o mais estudado e difundido. Mas, devido a problemas de desequilíbrio biológico, poluição do meio ambiente, riscos na aplicação e alto custo de inseticidas, o controle biológico, através do uso de vírus, pode se tornar uma alternativa viável para o controle da lagarta do cartucho, em substituição ao controle químico. Dentre os inimigos naturais, os vírus têm a vantagem de serem altamente específicos. O principal grupo de vírus que ataca insetos é o *Baculovirus* (BURGES *et al.*, 1980) e, neste grupo, incluem-se os vírus de granulose (VG) e os vírus de poliedrose nuclear (VPN). Vários autores relatam que os VPNS se destacaram pela sua eficácia e segurança, com um alto potencial como inseticida biológico (TANADA & REINER, 1962; IGNOFFO *et al.*, 1965; ALLEN *et al.*, 1966; WHITLOCK, 1977; KLEIN & PODOLER, 1978). BURGES *et al.* (1980) afirmam que os VPNS são inócuos ao ser humano e não se multiplicam em microorganismos, vertebrados, plantas e invertebrados não artrópodes. O maior programa do Brasil de uso de bioinseticida viral, ocorre na cultura da soja, através do uso do *Baculo virus anticarsia* no controle de *Anticarsia gemmatalis* (MOSCARDI, 1983).

A ocorrência de vírus em *S. frugiperda* já é conhecida em outros países, tendo HAMM & HARE (1982) demonstrado que a aplicação de VPN, através de água de irrigação por aspersão na cultura do milho, possibilitou o desenvolvimento de uma epizootia nesta praga, em condições de campo. FUXA (1982) menciona a ocorrência de VPN infectando a lagarta do cartucho em pastagens, com picos de até 68% de mortalidade, no estado da Louisiana, EUA.

AGUDELO *et al.* (1983) relatam que lagartas do cartucho foram encontradas infectadas por um VPN, em uma cultura de milho na Venezuela. Uma dose de 6×10^6 poliedros/ml, ingerida por lagartas de 7 e 10 dias de idade, causou uma mortalidade de 100%, com um tempo letal médio de 4,7 e 7,3 dias para cada grupo, respectivamente.

Em muitas espécies de *Spodoptera frugiperda*, os VPNS também têm sido eficientes em seu controle. Assim, a comparação de um MEVPN de *S. exigua* com os inseticidas metomil e permetrina, em condições de campo, mostraram que quando o VPN foi aplicado em uma dosagem mais elevada, a redução na população da *S. exigua* foi a mesma que aquela causada pelos inseticidas testados. Quando o vírus foi aplicado em uma dosagem mais baixa, o controle foi menos efetivo (GELERNTER *et al.*, 1986). Experimentos de campo, realizados por TOPPER *et al.* (1984), demonstraram que o dano causado por *S. littoralis* em parcelas pulverizadas pelo VPN foi menor do que o dano verificado nas parcelas não tratadas.

Dentro deste contexto, desenvolve-se no CNPMS/EMBRAPA, em Sete Lagoas, MG, um programa de encontrar um vírus com possibilidades de controle biológico da lagarta do cartucho. VALICENTE *et al.* (1988) encontraram um vírus de granulose e mais recentemente, outro de poliedrose nuclear. A descrição dos detalhes da identificação deste é o objetivo deste artigo.

Tanto VPN como VG foram encontrados em Sertaneja e Ponta Grossa, Paraná, em populações de *S. frugiperda* ocorrendo em soja (Sertaneja) e pastagens (Ponta Grossa) (MOSCARDI & KASTELIC, 1985; KASTELIC & MOSCARDI, 1987; MOSCARDI, 1987) e que, em biotestes com lagartas do inseto, estes isolados tiveram alta virulência, comparável à de outros isolados obtidos dos EUA, Guatemala e Argentina (KASTELIC & MOSCARDI, 1987). Estes todos histopatológicos do VPN em *S. frugiperda* foram realizados em Campinas (GARCIA, 1978).

MATERIAL E MÉTODOS

A lagarta de *S. frugiperda* originalmente encontrada em um campo de milho do CNPMS, em Sete Lagoas, MG, exibia sintomatologia que sugeria infecção viral (Fig. 5). Esta lagarta foi macerada com água destilada e o líquido resultante foi coado em gaze estéril. Este extrato foi avaliado inicialmente ao microscópio de luz, constatando-se a presença de poliedros (Fig. 6). O extrato foi então testado em 48 lagartas sadias, imergindo as folhas de milho nesta suspensão, deixando que as lagartas se alimentassem destas folhas durante 48 horas, sendo, em seguida, transferidas para dieta artificial. Observou-se nestas lagartas a mesma sintomatologia verificada na lagarta coletada a campo, sendo que a morte destas ocorreu aos 5 a 7 dias de infecção.

Para experimentos quantitativos, procedeu-se a purificação dos poliedros, a partir de 72 lagartas, 6 dias após infectadas artificialmente com o VPN, segundo o Quadro 1. Suspensões de poliedros purificados foram diluídas em água destilada para uma concentração final de 2×10^6 poliedros/ml. As folhas de milho foram lavadas com hipoclorito de sódio a 0,5 % e depois em água destilada, sendo a seguir imersas na solução -inóculo, nas concentrações de 2×10^5 ou 2×10^6 pol./ml. O alimento assim contaminado foi oferecido a lagartas de 3, 6 e 7 dias de idade (72 a 96 indivíduos/tratamento) em copos plásticos (capac. de 50 ml), vedados com tampas de acrílico, por um período de 24 a 48 horas, após o que as lagartas passaram a ser alimentadas com dieta artificial não contaminada. Anotou-se, diariamente a mortalidade provocada pelo VPN, sendo o tempo letal médio calculado pelo método de próbitos.

QUADRO 1 - Purificação do vírus da poliedrose nuclear da *Spodoptera frugiperda* isolado no CNPMS em Sete Lagoas, MG. (Modificado de Yamamoto & Tanada, 1978).

LAGARTAS INFECTADAS

Macerado com água destilada
Filtrado em peneira 0,35mm
Volume completado para 200ml
Centrifugar a 30.000g (rotor Ti₄₅)/30 min.

SOBRENADANTE (DESCARTAR)

SEDIMENTO

Ressuspender em água destilada (160ml)
Filtrar em organdi
Completar volume para 200ml
Centrifugar a 30.000g/30 min.

SOBRENADANTE (DESCARTAR)

SEDIMENTO

Ressuspender em 5ml de água destilada
Centrifugações em gradiente de sacarose
1 ml de sacarose a 80, 60 e 40% e 5 ml a 20%, 1 ml da
solução contendo vírus
Centrifugar a 22.000 rpm/20 min. Rotor SW 28.1

BANDA DO VÍRUS (formada a 4,5 cm do menisco)

Retirar com pipeta Pasteur
Completar o volume para 100 ml com água destilada
Centrifugar a 30.000g (rotor Ti₄₅)/30 min.

SOBRENADANTE (DESCARTAR)

SEDIMENTO

Ressuspender em 5 ml de água destilada
Centrifugar em gradiente de sacarose
(1 ml a 80% e 5 ml a 50%) e 1 ml da solução contendo
vírus

BANDA DO VÍRUS (formada a 2,5 cm do menisco)

Retirar com pipeta Pasteur
Completar volume para 40 ml com água destilada
Centrifugar a 12.000 rpm/15 min. (repetir 2 vezes)

SOBRENADANTE (DESCARTAR)

SEDIMENTO

Ressuspender em 7 ml de água destilada
Liofilizar ou conservar em freezer (-20°C)

Para exames histológicos ao microscópio eletrônico, amostas de tecidos de lagartas obtidas por dissecação, no 5º dia após a infecção experimental, foram fixadas em uma mistura de paraformaldeído (2%) e glutaraldeído (2%) em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,2, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, emblocadas no meio de Spurr. As seções ultra-finas foram obtidas em ultramicrotomo LKB ultratome III, equipada com navalha de diamante, contrastadas com acetato de urânio e citrato de chumbo, e examinadas ao microscópio eletrônico JOEL JEM 100C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A natureza viral da enfermidade letal da lagarta do cartucho, constatada em Sete Lagoas, MG, pode ser demonstrada pelos bioensaios, confirmando-se sua identificação como sendo vírus de poliedrose nuclear do tipo "multiple enveloped", através de microscopia eletrônica.

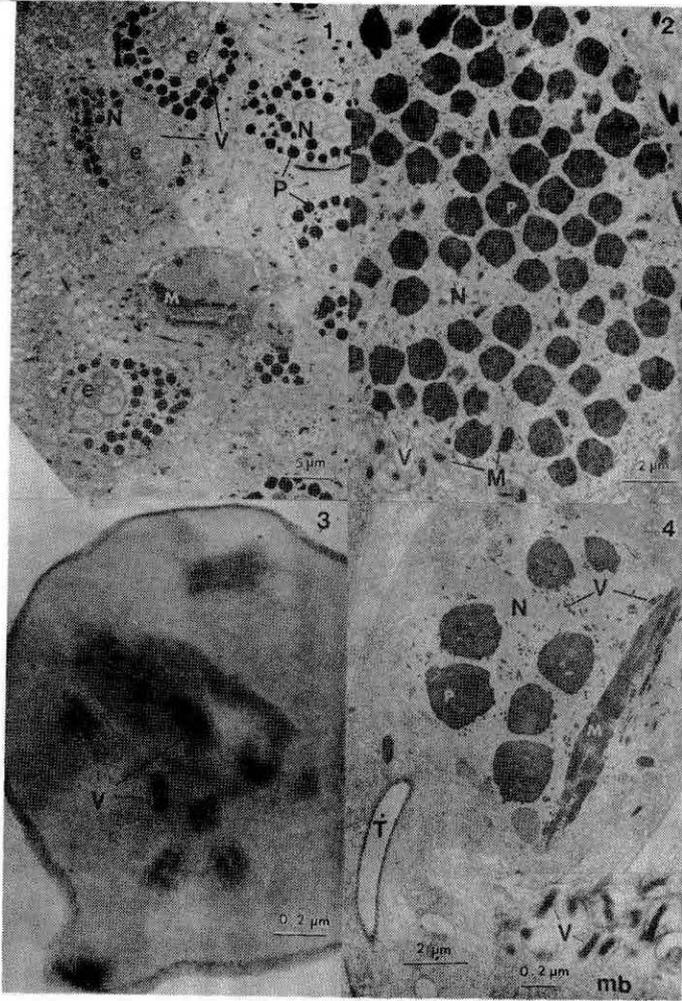
O esquema de purificação dos poliedros induzidos pelo VPN revelou-se eficiente e permitiu elaborar bioensaios quantitativos mais cuidadosos. Em condições experimentais, os poliedros purificados mostraram ser bastante infectivos e, nas concentrações de 2×10^5 e 2×10^6 pol/ml, foram letais para praticamente 100% das larvas infectadas, diminuindo um pouco a eficiência para larvas mais desenvolvidas (7 dias de idade), na menor dose (2×10^5 pol/ml) Quadro 2.

QUADRO 2 - Mortalidade da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o vírus da poliedrose nuclear. CNPMS, Sete Lagoas, MG, 1988.

Idade de lagarta	Tempo de exposição da lagarta com folhas contaminadas pelo vírus	Dosagem do vírus (poliedros/ml)	% de mortalidade
3 dias	24 horas	$2,5 \times 10^6$	100,0
	48 horas	$2,5 \times 10^6$	100,0
6 dias	24 horas	$2,5 \times 10^6$	97,0
	48 horas	$2,5 \times 10^6$	100,0
7 dias	48 horas	$2,5 \times 10^5$	71,3
	48 horas	$2,5 \times 10^6$	100,0

Exames de tecidos das lagartas infectadas mostraram que a maioria dos núcleos das células da ectoderme, tecido adiposo e traqueócitos estavam tomados por poliedros, de contorno poligonal, com 1-3 microns (μm) de diâmetro (Figuras 1-4). Ocluídos nos poliedros, notavam-se grupos de 2-6 partículas baciliformes, de aproximadamente 50nm x 250 - 300nm, envoltos por uma membrana comum, caracterizando este VPN como do tipo "multiple-enveloped". Nos núcleos, observou-se, além dos poliedros, nucleocapsídeos e vírions, dispersos ou associados a uma matriz, correspondente ao referido como estroma virogênico, e também, ocasionalmente, massas densas, paracristalinas, e alongadas, de natureza desconhecida. Material similar a este também foi observado no citoplasma. Em algumas células da ectoderme, notaram-se vírions associado à membrana basal ou a dobras da membrana plasmática, representando possivelmente a fase de penetração do VPN nestas células (inserção da Figura 4). O tempo letal médio (TL_{50}) foi de 5,1 dias.

Os resultados acima identificam este vírus da lagarta do cartucho como sendo de poliedrose nuclear. Pela eficiência que apresentou em bioensaios com lagartas, este parece ser promissor como inseticida viral, e exemplo do observado por KASTELIC & MOSCARDI (1987) com isolados de VPN de *S. frugiperda* obtidos do Paraná. Trabalhos estão em andamento para verificar sua eficiência em condições de campo, estudar aspectos moleculares deste vírus, para compará-lo com VPNs anteriormente descritos em *S. frugiperda* e estabelecer eventuais identidades. Será averiguada uma possível ação sinérgica deste VPN com o vírus da granulose, como descrito em *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (TANADA, 1959).



FIGS. 1-4 - Micrografias eletrônicas de tecidos da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) infectada experimentalmente por um isolado do vírus da poliedrose nuclear (VPN). CNPMS. Sete Lagoas, MG, 1988. 1. Vista geral de parte da ectoderma, mostrando células com seus núcleos (N) contendo virions (V) e/ou poliedros (P). No núcleo situado na região central, ocorre uma proeminente massa densa alongada (M). Em vários outros núcleos ocorrem os chamados estromas virogênicos (E); 2. Detalhe de um núcleo (N) tomado pelos poliedros (P). Massas densas (M) podem ser vistas no núcleo ou no citoplasma adjacente. 3. Poliedro contendo virions (V). Notar que vários nucleocapsídeos aparecem envoltos por uma membrana comum, caracterizando este VPN como sendo do tipo "multiple enveloped"; 4. Traqueócito infectado pelo VPN. Vê-se em seu núcleo (N) poliedros (P), virions (V) e a massa densa alongada (M). T-traquéia. Na inserção, detalhes da parte basal de uma célula da ectoderma, mostrando virions (V) associadas a dobras da membrana plasmática junto a membrana basal (mb).

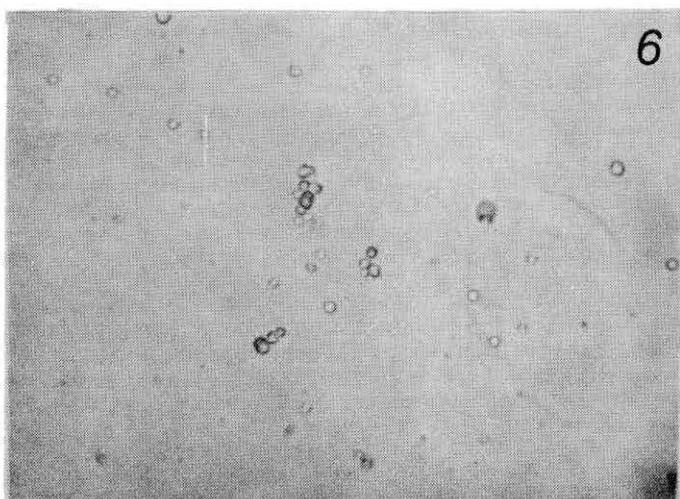
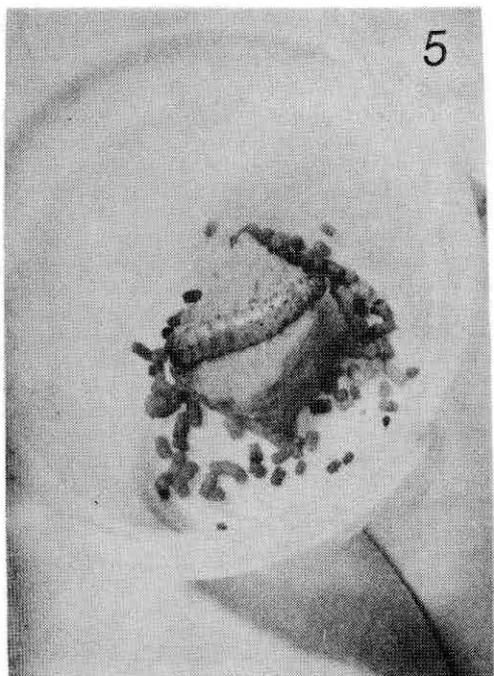


FIG. 5. Lagarta do cartucho morta pelo vírus da poliedrose nuclear (VPN). CNPMS. Sete Lagoas, MG. 1988.

FIG. 6. Vírus da poliedrose nuclear (VPN) fotografado em microscópio de luz (80x). CNPMS. Sete Lagoas, MG, 1988.

LITERATURA CITADA

- ALLEN, G.E.; GREGORY, B.G.; BRAZZEL, J.R. Integration of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus into a biological control program on cotton. *J. econ. Ent.* 59(6): 1333-1336, 1966.
- AGUDELO, F.; ROMANO, M.; WASSINK, H.; CUELLO DE UCATEGUI. Una poliedrosis de *Spodoptera frugiperda* en Venezuela. *Turrialba* 33(3): 219-222, 1983.
- BURGES, H.D.; CROZIER, G.; HUBER, J. A review of safety tests on *Baculoviruses*. *Entomophaga* 25(4): 329-340, 1980.
- CARVALHO, R.P.L. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo. Piracicaba, Brasil, ESALQ, 1970. 170p (Tese de Doutorado).
- FUXA, J.E. Prevalence of viral infections in population of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Southeastern Louisiana. *Environ. Ent.* 11: 239-242, 1982.
- GARCIA, M.A. Potencialidade de alguns fatores bióticos e abióticos na regulação populacional de *Spodoptera frugiperda* (ABBOT & SMITH, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae). Campinas, UNICAMP, 1979, 96p. Tese de Mestrado.
- GELERNTER, W.D.; TOSCANO, N.C.; KIDO, K.; FEDERICI, B.A. Comparison of a nuclear polyhedrosis virus and chemical insecticides of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on head lettuce. *J. econ. Ent.* 79: 714-717, 1986.
- HAMM, J.J. & HARE, W.W. Application of entomopathogens in irrigation water for control of fall armyworms and corn earworms (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *J. econ. Ent.* 75: 1074-1079, 1982.
- IGNOFFO, C.M.; CHAPMAN, A.J.; MARTIN, D.F. The nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (Fabricius). III. Effectiveness of the virus against field populations of *Heliothis* on cotton, corn and grain sorghum. *J. Invertebr. Pathol.* 7: 227-235, 1965.
- KASTELIC, J.G. & MOSCARDI, F. Comparação de isolados de Baculovírus obtidos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11, ENCONTRO DE MIRMECOLOGISTA, 8, ENCONTRO SOBRE MOSCA-DAS-FRUTAS, 1, Campinas, SP, 1987. p. 146. Resumos.
- KLEIN, M. & PODOLER, H. Studies on the application of a nuclear polyhedrosis virus to control populations of the egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* 32: 244-248, 1978.

- MOSCARDI, F. Utilização do *Baculovirus anticarsia* no controle de *Anticarsia gemmatalis*. Londrina. EMBRAPA/CNPSo, 1983. 13p. (EMBRAPA/CNPSo. Comunicado Técnico, 23).
- MOSCARDI, F. Uso de vírus no controle de pragas. In: ENCONTRO SUL-BRASILEIRO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS, 1, Passo Fundo, RS, REAPF, 1986. p. 191-262. *Anais*.
- MOSCARDI, F. & KASTELIC, J.G. Ocorrência de vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região do Sertaneja, PR. In: RESULTADOS DE PESQUISA DE SOJA, 1984/85. Londrina, PR. EMBRAPA/CNPSoja, 1985. 419p. (EMBRAPA-CNPSo-Documents, 15).
- TANADA, Y. Synergism between two viruses of the armyworm *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 1: 215-231, 1959.
- TANADA, Y. & REINER, C. The use of pathogens in the control of the corn earworm *Heliothis zea* (Boddie). *J. Invertebr. Pathol.* 4: 139-154, 1962.
- TOPPER, C.; MOAWAD, G.; MCKINLEY, D.; HOSNY, M.; JONES, K.; COOPER, J.; ELNAGAR, S.; EL-SKEIK, M. Field trials with a nuclear polyhedrosis virus against *Spodoptera littoralis* on cotton in Egypt. *Tropical Pest Manag.* 30(4): 372-378, 1984.
- VALICENTE, F.H.; PEIXOTO, M.J.V. de V.D.; PAIVA, E.; KITAJIMA, E.W. Identificação e purificação de um vírus de granulose em lagarta do cartucho do milho. *Pesqui. Agropec. Bras.* 23(3): 291-296, 1988.
- WHITLOCK, V.H. Simultaneous treatments of *Heliothis armigera* with nuclear polyhedrosis virus and a granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 29: 297-303, 1977.
- YAMAMOTO, T. & TANADA, Y. Biochemical Properties of viral Envelopes of Insect Baculoviruses and their Role in Infectivity. *J. Invertebr. Pathol.* 32(2): 202-211, 1978.