

Caracterização de Baculovírus Utilizados no Controle de Pragas

Técnicas de caracterização de vírus de insetos

Marlinda Lobo de Souza, PhD,
Virologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen)
marlinda@cenargen.embrapa.br

Maria Elita Batista de Castro, PhD,
Virologia Molecular, Embrapa Cenargen

William Silher, Mestre,
Biologia Molecular, Embrapa Cenargen

Zilda Maria de Araújo Ribeiro, Mestre,
Fitopatologia, Embrapa Cenargen

Flávio Moscardi, PhD,
Entomologia, Embrapa Soja

Fotos cedidas pelos autores

Baculovírus são vírus DNA dupla fita que infectam invertebrados, sendo a maioria deles detectados na ordem Lepidoptera da classe Insecta. O uso de baculovírus como alternativa aos inseticidas químicos é devido às suas características que conferem total segurança à saúde humana e ao meio ambiente. Os baculovírus podem ser integrados em programas de

manejo de pragas, uma vez que não afetam insetos benéficos e outros organismos não-alvo.

Baculoviridae é uma grande família de vírus oclusos composta por dois gêneros: Os *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) que produzem estruturas poliédricas (poliedros variando de 0,5-15 μm) e os *Granulovirus* (GVs) os quais possuem corpos menores de oclusão (0,5 μm). Uma peculiaridade dos baculovírus é a produção de dois tipos de fenótipos denominados “budded virus” (BVs) e vírus derivados do corpo de oclusão (ODV).

Nas últimas duas décadas, os baculovírus têm sido comercializados para controle de diversas pragas: *Cydia pomonella* (CpGV), *Lymantria dispar* (LdNPV), *Spodoptera exigua* (SeNPV), *Trichoplusia ni* (TnNPV) *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* (ambos por HzNPV) nos Estados Unidos; *Spodoptera exigua* (SeNPV) e *Cydia pomonella* (CpGV), na Europa, e pragas de floresta tais como *Orgyia pseudosugata* (OpNPV), *Choristoneura fumiferana* (CfNPV) e *Neodiprion sertifer* (NsNPV) em vários países, incluindo Canadá, EUA e Reino Unido. O uso do Baculovírus anticarsia (AgNPV) no Brasil representa o maior programa com aplicação de pesticida viral. Ele tem sido aplicado anualmente para o controle da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) em mais de um milhão de hectares de soja.

Várias técnicas podem ser utilizadas na caracterização do baculovírus. A maioria delas requer inicialmente a purificação das partículas virais do corpo do inseto. Os processos de purificação são baseados em centrifugação diferencial, que consiste em períodos alternados de velocidades de sedimen-

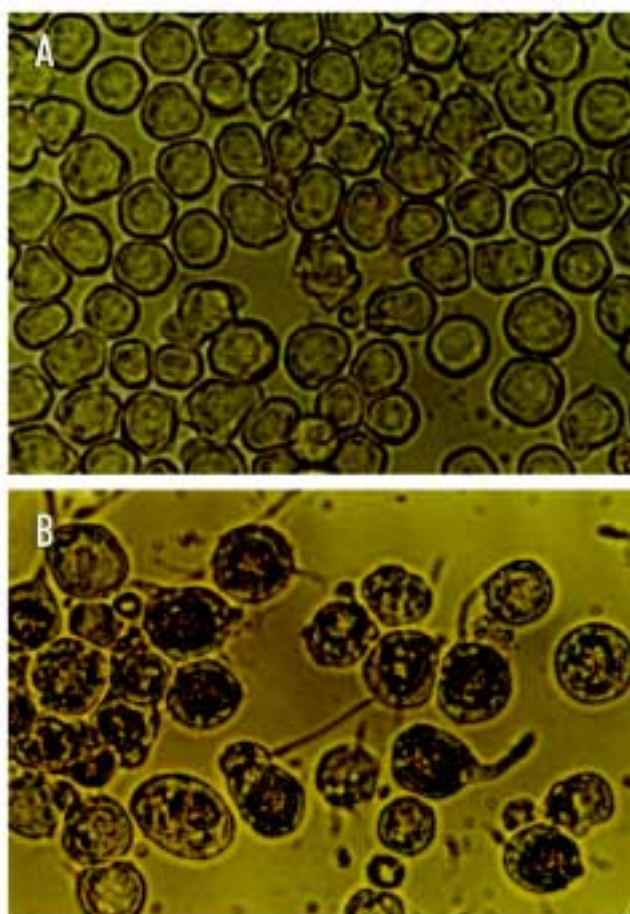


Fig 1- Visualização de células de inseto, por microscopia ótica, infectadas com Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV): A) Células controle; B) Células com morfologia típica de infecção apresentando hipertrofia celular e formação de corpos de oclusão no núcleo

tação, altas e baixas, permitindo separar vírus de outras misturas. Centrifugação em gradiente de sacarose é empregada quando se requer maior grau de pureza no isolamento de partículas virais (poliedros e “budded virus”).

Uma vez purificadas, essas partículas podem ser caracterizadas em diferentes níveis como caracterização morfológica, pela análise estrutural feita por visualização em microscopia eletrônica; caracterização bioquímica, através da análise dos peptídeos virais feita por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS; caracterização molecular, em geral pela análise do DNA através de endonucleases de restrição (REN) e caracterização biológica, feita através de ensaios de virulência.

A identificação morfológica do vírus é feita por microscopia eletrônica de transmissão e/ou de varredura. O nucleopoliedrovírus apresenta forma poliédrica e pode ser do tipo múltiplo (MNPV) ou simples (SNPV), de acordo com o número de capsídeos por vírion. O granulovírus apresenta forma ovalada e possui, em geral, um único vírion. Em microscopia eletrônica de transmissão são empregados corantes de rotina ou coloração negativa, formando uma região escura ao redor do vírus.

Proteínas estruturais do vírus são usualmente identificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Esse é um método

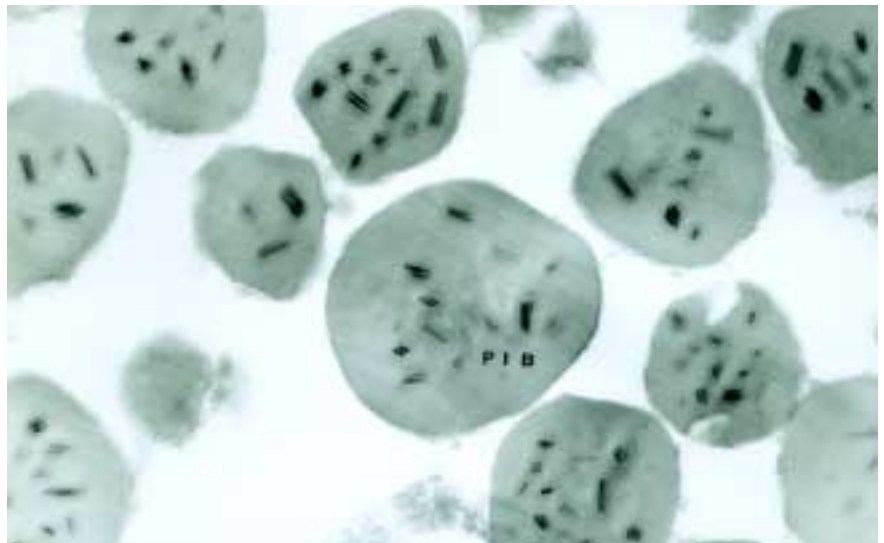


Fig. 2- Caracterização morfológica de Nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV): Micrografia eletrônica mostrando corpos de oclusão (poliedros - PIBs) contendo inúmeros vírions

simples e eficaz que permite a separação de proteínas, em um campo elétrico, de acordo com o tamanho das moléculas. As proteínas são analisadas após coloração do gel com “coomassie blue” ou nitrato de prata.

A identificação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE após marcação radioativa de peptídeos virais é também uma técnica importante de caracterização. Entretanto, isso só se tornou possível após o desenvolvimento da cultura de células de inseto.

O uso de microscopia imunoeletrônica com marcação “imunogold” e anticorpos mono-específicos, permitiram também a expressão temporal e a localização de proteínas virais em sistema *in vitro*.

O estabelecimento de linhagens de células de insetos que permitem a sua replicação viral resultou na purificação de clones virais através de ensaios em placa, e promoveu o avanço da biologia molecular de baculovírus. A maioria das pesquisas, desde então, têm-se concentrado no estudo do Nucleopoliedrovírus de *Autographa californica* (AcNPV) devido à sua fácil propagação e relativa estabilidade em cultura de células e ao seu amplo espectro de hospedeiros.

A introdução da técnica de análise por endonuclease de restrição (REN) para o estudo do genoma do baculovírus surgiu na década de 70 como importante ferramenta da biologia molecular. Essa técnica tem sido usada para identificar ou distinguir isolados particulares de baculovírus e caracterizar variação genotípica entre eles. Ela tornou-se importante na construção de mapas físicos dos vírus, a partir da ordenação dos fragmentos de DNA gerados, e na clonagem de genes.

Na década de 80 e início da década de 90, a maioria dos trabalhos de filogenia dos baculovírus incluíam técnicas de digestão com endonucleases de

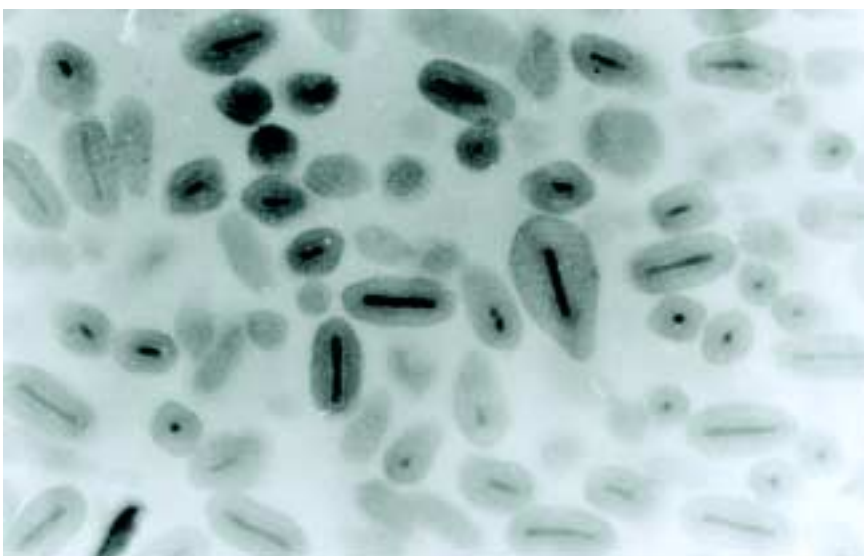


Fig. 3- Caracterização morfológica de Granulovírus de *Spodoptera frugiperda* (SfGV): Micrografia eletrônica mostrando corpos de oclusão (granulos) contendo apenas um vírion

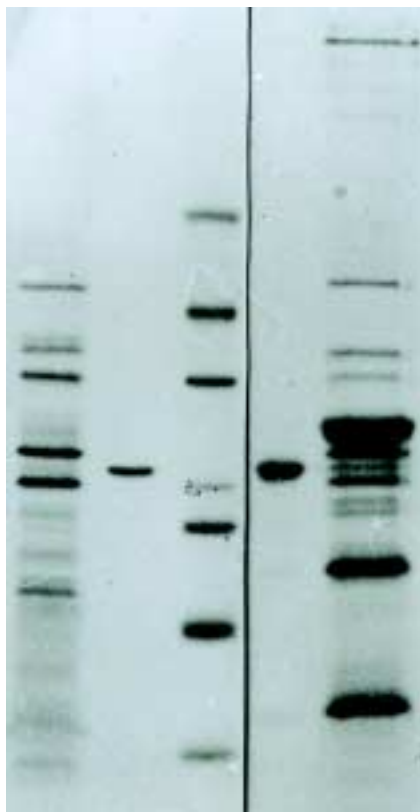


Fig. 4- Identificação de proteínas estruturais do Granulovirus de *Erinnis ello* (EeGV). Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS :
 1- Virions do isolado viral de EeGV coletado em Belém (PA)
 2- Granulos do isolado viral de EeGV coletado em Belém (PA)
 3- Marcador de peso molecular (MW-SDS-70L Kit - Sigma)
 4- Granulos do isolado viral de EeGV coletado em Itajaí (SC)
 5- Virions do isolado viral de EeGV coletado em Itajaí (SC)

restrição, hibridização e comparação de sequência de aminoácidos e nucleotídeos das poliedrinas. Porções definidas do genoma foram sequenciadas e funcionalmente analisadas. O primeiro gene completo de baculovírus a ser sequenciado foi o da poliedrina de AcMNPV. Desde então, numerosos estudos de genes individuais vêm fornecendo uma visão da complexidade do genoma de baculovírus. Muitos desses estudos incluem mapeamento transcricional e/ou análise funcional de sequências do DNA.

Atualmente se encontram sequenciados o genoma completo dos seguintes baculovírus: *Autographa cali-*

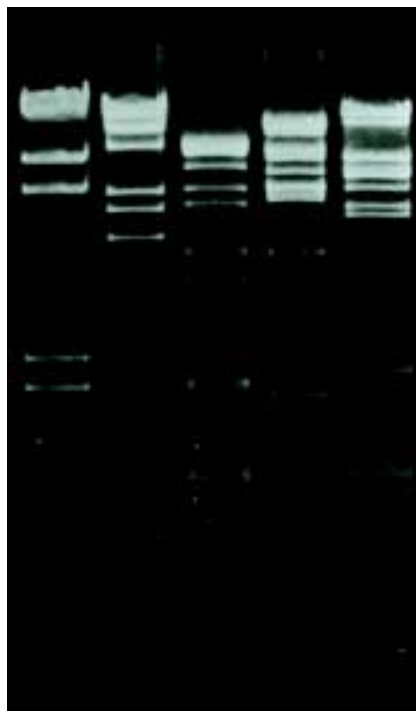


Fig. 5- Análise do DNA do Nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV). Eletroforese em gel de agarose após clivagem do DNA com enzimas de restrição.

- 1- Marcador de Peso molecular (Fago Lambda digerido com *Hind*III)
- 2- DNA viral digerido com *Bam*HI
- 3- DNA viral digerido com *Eco*RI
- 4- DNA viral digerido com *Hind*III
- 5- DNA viral digerido com *Pst*I

formica NPV, *Bombyx mori* NPV, *Orygia pseudosugata* NPV, *Lymantria dispar* NPV, *Spodoptera exigua* NPV, *Plutella xylostella* GV e *Xestia nigrum* GV.

A técnica denominada Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) também tem demonstrado potencial na identificação de baculovírus. O DNA do vírus é extraído diretamente de larvas infectadas ou de formulações comerciais e usado como molde em reações PCR. A técnica envolve o uso de pares de "primers" homólogos ao DNA molde, desenhados para amplificação de uma determinada região do genoma. As condições de PCR são então otimizadas para cada gene a ser amplificado. Um gene altamente conservado, como, por exemplo, o gene da poliedrina, pode ser amplificado para a detecção de NPVs, enquanto um gene específico pode permitir a identificação de um

isolado viral particular. Essa técnica também pode ser usada como uma ferramenta de monitoramento após liberação do vírus no campo.

Populações de vírus selvagem, na maioria das vezes, têm sido estudadas pelo perfil de restrição do DNA se seus isolados (REN). Isolados geográficos referem-se a ocorrência de vírus cujo hospedeiro fora coletado em diferentes áreas geográficas. Por outro lado, isolados temporais referem-se a amostras coletadas em uma mesma região onde o vírus fora aplicado em anos consecutivos, estando, em geral, relacionados a um programa de controle biológico. Variantes genotípicos podem ocorrer dentro e entre os isolados geográficos, bem como nos isolados temporais. O fenômeno é geral entre isolados de nucleopoliedrovirus e granulovirus.

O termo variantes genotípicos é usado para se referir a baculovírus com genomas muito similares, que podem ser distinguidos apenas por pequenas diferenças nos perfis de restrição. Tais variantes são facilmente reconhecidos pela presença de fragmentos submolares de DNA presentes nos perfis eletroforéticos (REN). A ocorrência de variantes genotípicos em isolados selvagens de populações de baculovírus é um fenômeno bem documentado. A recombinação entre os isolados naturais é um dos eventos que podem conduzir à formação desses variantes. Esse é um importante mecanismo para aumentar a diversidade em populações do vírus.

Adicionalmente às metodologias já descritas, a medida da atividade biológica pode também ser empregada na caracterização de baculovírus. Bioensaios são procedimentos usados rotineiramente para avaliação da patogenicidade do vírus em seu hospedeiro e/ou para investigação de seu espectro de hospedeiros. A patogenicidade de baculovírus tem sido caracterizada principalmente pela sua dose letal média (DL_{50}), uma estimativa da infectividade do vírus no inseto. Um outro importante medida de eficiência do vírus como agente de biocontrole é o tempo letal médio (TL_{50}), um parâmetro para a avaliação do tempo no qual o vírus causa a morte do inseto. †