



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

**ICB**  
INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**SAMUEL ARAUJO PRADO**

**CARACTERIZAÇÃO DO GRANULOVÍRUS SfGV E DO SEU EFEITO NO  
CONTROLE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO (*Spodoptera frugiperda*)**

**Goiânia-GO**

**2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## **TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

### **1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)**

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Samuel Araujo Prado

Título do trabalho: "Caracterização do granulovirus SfGV e do seu efeito no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*)"

**2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [ X ] SIM [ ] NÃO<sup>1</sup>**

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

#### **Casos de embargo:**

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

**Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Renata De Oliveira Dias, Professora do Magistério Superior**, em 11/12/2024, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samuel Araujo Prado, Discente**, em 11/12/2024, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5030454** e o código CRC **5EB31B75**.

---

Referência: Processo nº 23070.061423/2024-53

SEI nº 5030454

**SAMUEL ARAUJO PRADO**

**CARACTERIZAÇÃO DO GRANULOVÍRUS SfGV E DO SEU EFEITO  
NO CONTROLE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO (*Spodoptera  
frugiperda*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Renata de Oliveira Dias  
Coorientador: Alexandre Toshihiro Matugawa

**GOIÂNIA**

**2024**

Prado, Samuel Araujo  
CARACTERIZAÇÃO DO GRANULOVÍRUS SfGV E DO SEU  
EFEITO NO CONTROLE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO  
(Spodoptera frugiperda) [manuscrito] / Samuel Araujo Prado. - 2024.  
XXVIII, 28 f.

Orientador: Profa. Dra. Renata de Oliveira Dias; co-orientador  
Alexandre Toshihiro Matugawa.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade  
Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Ciências  
Biológicas, Goiânia, 2024.

Inclui abreviaturas, lista de figuras.

1. Baculovírus. 2. Controle Biológico. 3. Sintomatologia. 4. Pragas  
Agrícolas. I. Dias, Renata de Oliveira, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

### ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos nove dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Caracterização do granulovirus SfGV e do seu efeito no controle da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*)" de autoria de Samuel Araujo Prado, do curso de Ciências Biológicas Bacharelado, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Dra. Renata de Oliveira Dias - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Jaqueline Magalhães Pereira - Escola de Agronomia/ UFG e Danielle Alves Ferreira-IF Goiano. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de 10,0, tendo sido o TCC considerado aprovado.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Renata De Oliveira Dias, Professora do Magistério Superior**, em 09/12/2024, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Alves Ferreira, Usuário Externo**, em 09/12/2024, às 16:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaqueline Magalhaes Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 10/12/2024, às 14:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5018567** e o código CRC **36BE9900**.

Referência: Processo nº 23070.061423/2024-53

SEI nº 5018567

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida e por todas as oportunidades, alegrias e força que ele me tem dado.

Agradeço à Dra. Renata de Oliveira Dias por me orientar, auxiliar e incentivar quanto à elaboração deste trabalho.

Agradeço também à AgBiTech por ter proporcionado a oportunidade de estagiar e elaborar pesquisas em suas dependências, à Dra. Janayne Rezende e ao Dr. Fabricio Morgado por terem permitido e incentivado a execução deste projeto.

Especialmente, gostaria de agradecer ao Alexandre Toshihiro Matugawa por me orientar, supervisionar, e incentivar durante todo o período desta e demais pesquisas que conduzimos no laboratório. Assim como toda a equipe da AgBiTech que esteve comigo ao longo desses anos, em especial Larissa Rezende, Danielle Alves, Juliana Oliveira, Antônia Zaidem, Naria Dias, Dhiogo Neres, Carla Oliveira, Carolina Batista, e todos os demais colaboradores.

Por fim, gostaria de agradecer à minha mãe, Martha Araújo Batista Prado, ao meu namorado, Matheus Vilela Godoy, por me apoiarem e serem meu abrigo, onde me amparo nos momentos de dificuldades.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E UNIDADES.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1. Objetivos Gerais.....	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. Amplificação e purificação do SfGV.....	15
3.2. Caracterização molecular do SfGV.....	16
3.3. Bioensaio: Mortalidade em larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	17
3.4. Sintomatologia em <i>S. frugiperda</i> .....	17
3.5. Análises Estatísticas.....	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>18</b>
4.1. Caracterização molecular do SfGV.....	18
4.2. Sintomatologia das larvas de <i>S. frugiperda</i> após a infecção pelo SfGV.....	20
4.3. Infectividade do SfGV sobre lagartas de <i>S. frugiperda</i> .....	21
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>24</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>25</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de restrição do SfGV e dos genomas MH170055.1 (SfGV ARG, isolado da Argentina) e NC_026511.1 (VG008, isolado da Colômbia).....	19
Figura 2. Sintomatologia apresentada pelas lagartas de <i>S. frugiperda</i> durante a execução dos bioensaios.....	21
Figura 3. Curva de Dose-Resposta do SfGV.....	22
Figura 4. Sobrevivência de lagartas de <i>S. frugiperda</i> durante um período de 34 dias.....	23

## LISTA DE ABREVIACOES E UNIDADES

### ABREVIACOES

AgNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> Nucleopoliedrovirus.
BOD	Demanda Biológica de Oxignio.
CA	Califórnia.
DNA	cido Desoxirribonucleico.
GV	Granulovirus.
LD <sub>50</sub>	Dose Letal Mdia.
LT <sub>50</sub>	Tempo Letal Médio.
NaCl	Cloreto de Sódio.
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Sódio.
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information.</i>
NPV	Nucleopoliedrovirus.
OB	Corpo de Oclusão ( <i>Occlusion Body</i> ).
PCR	Reao em Cadeia da Polimerase.
pH	Potencial Hidrogeniônico.
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrio.
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio.
SfGV	<i>Spodoptera frugiperda</i> Granulovirus.
SfMNPV	<i>Spodoptera frugiperda</i> Múltiplo Nucleopoliedrovirus.
USA	Estados Unidos da América.

## UNIDADES

%	Por cento.
°C	Graus Célsius.
μL/mL	Microlitros por mililitros.
μm	Micrômetros.
μL	Microlitros.
M	Molar.
mg/mL	Miligrama por mililitro.
min	Minutos
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
rpm	Rotações por minuto.
V	Volts.

## RESUMO

As larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) são consideradas uma das pragas mais prejudiciais no Brasil, pois atacam uma vasta gama de culturas, tais como milho, soja e sorgo. Uma forma de manejo dessa praga que vêm sendo muito utilizada ao longo dos anos é a utilização de baculovírus como bioinseticidas, devido sua alta especificidade, eficiência e mortalidade. Durante pesquisas de campo no nordeste brasileiro, a empresa AgBiTech Controles Biológicos LTDA encontrou uma lagarta de *S. frugiperda* infectada por um granulovírus natural, ainda desconhecido. Desta forma, este trabalho visou a caracterização deste novo baculovírus, denominado *Spodoptera frugiperda* granulovírus (SfGV), e a análise do seu efeito na infecção em lagartas desta espécie. Para isso, foi realizada uma caracterização molecular deste vírus, por meio do método de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), utilizando as enzimas *Bam* *HI*, *Eco* *RI*, e *Pst* *I*. Os bioensaios para testar a atividade viral foram feitos em duplicatas e os tratamentos com as partículas virais foram diluídos em oito diferentes doses. Durante a execução dos bioensaios, os sintomas das lagartas foram analisados e registrados fotograficamente. De acordo com os resultados obtidos, o baculovírus encontrado trata-se de um granulovírus ainda não descrito, causador de síndrome de infecção do tipo I, sendo um granulovírus de morte lenta. O SfGV apresentou capacidade de matar 100% das lagartas infectadas, conforme aumento gradativo de dose, manifestando um  $LT_{50}$  de 21 dias. Desta forma, o SfGV demonstrou potencial para uso em métodos de controle da *S. frugiperda*.

**Palavras-Chave:** Baculovírus; Controle Biológico; Sintomatologia; Pragas Agrícolas.

## ABSTRACT

The larvae of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) are considered one of the most damaging pests in Brazil, as they attack a wide range of crops, such as corn, soybeans, and sorghum. One form of pest management that has been widely used over the years is the use of baculoviruses as bioinsecticides, due to their high specificity, efficiency, and mortality rates. During field trials in northeast Brazil, the company AgBiTech Controles Biológicos LTDA has discovered a *S. frugiperda* caterpillar infected with a natural granulovirus, which is still unknown. Thus, this study aimed to characterize this new baculovirus, named *Spodoptera frugiperda* granulovirus (SfGV), and analyze its effect on the infection of larvae of this species. A molecular characterization of the virus was conducted using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method, with the enzymes *Bam* *HI*, *Eco* *RI*, and *Pst* *I*. Bioassays to test the viral activity were performed in duplicates, and treatments with viral particles were diluted into eight different doses. During the bioassay process, the symptoms of the larvae were analyzed and photographed. According to the results, the baculovirus found is a previously undescribed granulovirus that causes a type I infection syndrome, being a slow-kill granulovirus. The SfGV was able to kill 100% of the infected larvae, according with a gradual increase in doses, showing an  $LT_{50}$  of 21 days. Therefore, SfGV demonstrated potential for use in control methods for *S. frugiperda*.

**Palavras-Chave:** Baculovirus. Biological Control. Symptomatology. Agricultural Pests.

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma mariposa com ampla distribuição no continente Americano e nas Ilhas do Caribe (Souza *et al.*, 1998). As lagartas de *S. frugiperda*, popularmente conhecidas como lagarta-do-cartucho, são consideradas umas das pragas mais prejudiciais no território brasileiro, devido sua ampla gama de hospedeiros e por atacar plantas tanto em fase vegetativa quanto em fase reprodutiva (Hellwig *et al.*, 2013). *S. frugiperda* pode se alimentar de diversas plantas, tais como milho, arroz, trigo, algodão, sorgo e soja (Cruz *et al.*, 1999), sendo a grande disponibilidade de hospedeiros um dos fatores que podem contribuir para a dificuldade no seu controle (Barros *et al.*, 2010). Os ataques desta praga podem causar a redução de até 60% da produtividade e, para o Brasil, os prejuízos anuais são estimados em U\$400 milhões (Rosa, 2011).

Diante do alto dano econômico causado pela *S. frugiperda*, diversos inseticidas químicos vêm sendo avaliados e utilizados para o seu controle. No entanto, seu uso constante e indiscriminado causa diversos prejuízos à saúde humana, pode aumentar a resistência dos insetos aos seus compostos, afetar populações inimigas naturais, e causar contaminação do ambiente (Gelaye & Negash, 2023). Devido ao elevado custo socioeconômico, formas de manejos ecologicamente saudáveis, como o controle biológico, vêm sendo estudadas ao longo dos anos, e demonstrando características de fácil aplicação e produção, além de serem economicamente e ecologicamente viáveis (Hellwig *et al.*, 2013; Gelaye & Negash, 2023). O controle biológico é um serviço ecossistêmico derivado da ação de inimigos naturais para suprimir populações. Dessa forma, quando populações de plantas, insetos ou fitopatógenos demonstram um crescimento a nível de praga e são capazes de resultar em danos econômicos, seus inimigos naturais podem ser introduzidos como agentes de controle ambiental. Eles podem ser classificados em predadores, parasitóides e patógenos (Fontes *et al.*, 2020).

No caso da *S. frugiperda*, as vespas *Telenomus remus* e *Trichogramma spp.*, as tesourinhas, *Doru luteipes*, a bactéria *Bacillus thuringiensis*, o fungo *Metarhizium rileyi* e os baculovírus são comumente utilizados como agentes de controle (Cunha & Okura, 2018). Entre os entomopatógenos utilizados no controle biológico, um caso que repercutiu pelo Brasil e o mundo foi o uso do baculovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgNPV) para controlar a infestação da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) no estado do Paraná em 1982. Devido ao sucesso do uso do baculovírus, cinco empresas privadas começaram a produzir e comercializar formulações em pó molhável do AgNPV (Fontes *et al.*, 2020).

Os baculovírus são vírus de DNA circular de fita dupla, com vírions em formato de bastão e alta especificidade de infecção de artrópodes. Sua partícula viral é protegida por uma estrutura cristalina de matriz proteica, chamada corpo de oclusão (OBs, do inglês *occlusion bodies*), que o protege das condições ambientais. A família *Baculoviridae* pode ser classificada em quatro gêneros distintos. Os *Alphabaculovirus* são compostos pelos nucleopoliedrovírus (NPV), enquanto que os *Betabaculovirus* são formados pelos granulovírus (GV), sendo ambos específicos para infecção de lepidópteros. Já os *Gammabaculovirus* são os vírus de NPV com infecção específica para himenópteros. Por fim, os *Deltabaculovirus* são os vírus de NPV com infecção específica para os dípteros (Ferrelli & Salvador, 2023).

Os baculovírus com infecção específica para lepidópteros podem ser diferenciados através da morfologia de seus OBs. O corpo de oclusão do NPV apresenta um formato de poliedro, com tamanho variando de 1-2µm, é constituído por uma proteína chamada poliedrina e possui múltiplos nucleocapsídeos. No caso do GV, seu corpo de oclusão apresenta um formato ovicilíndrico, com tamanho em torno de 0,5µm, sendo constituído principalmente de proteína granulina e possui apenas um nucleocapsídeo (Rohrmann, 2019).

Diversos estudos demonstram a eficácia dos baculovírus no controle da *S. frugiperda*, como no caso do SfMNPV que pode apresentar mortalidades superiores a 80% (Behle & Popham, 2012; Gómez *et al.*, 2013; Cuartas-Otálora *et al.*, 2019). Assim, por sua alta especificidade de infecção, mortalidade e resistência às condições ambientais, os baculovírus vêm sendo explorados como bioinseticidas no manejo de pragas agrícolas. Entretanto, os GVs vêm sendo pouco estudados, em comparação aos NPVs (Wan *et al.*, 2021). Ainda assim, estudos de coinfeção demonstram que os GVs possuem uma tendência de melhorar a infectividade dos NPVs (Cuartas-Otálora *et al.*, 2019; Ferrelli & Salvador, 2023; Shapiro, 2000; ). Este efeito sinérgico, conhecido como efeito *enhancer*, vêm sendo atribuído a enzima presente nos OBs dos granulovírus, uma metaloproteinase capaz de degradar a membrana peritrófica que reveste o intestino médio das lagartas, facilitando a infecção pelos baculovírus (Lepore *et al.*, 1996; Ricarte-Bermejo *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2017).

Recentemente, a AgBiTech Controles Biológicos LTDA encontrou um novo granulovírus (SfGV) infectando lagartas de *S. frugiperda* durante pesquisas de campo no nordeste do país, o qual ainda não havia sido descrito em literatura. Desta forma, o presente

trabalho teve como objetivo caracterizar o SfGV e investigar os seus efeitos na infecção de lagartas de *S. frugiperda*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Caracterizar o granulovírus SfGV e analisar seus efeitos na sintomatologia e mortalidade de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho).

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Amplificar e purificar cepa do SfGV;
- Caracterizar molecularmente o SfGV;
- Analisar a infectividade do SfGV sobre lagartas de *S. frugiperda*;
- Encontrar a LD<sub>50</sub> e a LT<sub>50</sub> sobre larvas de *S. frugiperda*;
- Descrever os sintomas de infecção da lagarta pelo SfGV.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Amplificação e purificação do SfGV**

Para a amplificação do vírus, foram utilizadas lagartas de 2° *instar* selecionadas da sala de criação da AgBiTech. O método utilizado para a infecção das lagartas foi o de contaminação de superfície de dieta artificial, sendo esta elaborada a base de feijão, proteína de soja e gérmen de trigo, adaptada da metodologia proposta por Greene *et al.* (1976). Após a aplicação, as lagartas foram incubadas na câmara de climatização BOD a 28°C com fotoperíodo de 14 horas para que o vírus se propague e infecte os hospedeiros completamente.

Os grânulos de partículas virais foram purificados conforme metodologia adaptada de Eberle *et al.* (2012). Deste modo, as lagartas mortas foram coletadas em um tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de SDS 1% e maceradas com um pistilo. Filtrou-se a amostra utilizando uma seringa com filtro de algodão para separar restos de lagartas mortas do líquido. Após o processo de filtração, a amostra foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min. Finalizada a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 25 mL de NaCl, centrifugando novamente a 4000 rpm por 10 min. Por fim, o sobrenadante foi

descartado e o *pellet* ressuspensionado com 10 mL de solução tampão TE + glicerol 50% 10 mM e armazenado a -18°C.

### 3.2. Caracterização molecular do SfGV

A caracterização molecular do SfGV foi feita através da técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RLFP). Para isso, as bandas obtidas para o SfGV foram comparadas com aquelas previstas pelo software Geneious Prime v. 2023.2.1 para dois genomas de isolados de países próximos ao Brasil, um da Argentina (MH170055.1) e outro da Colômbia (NC\_026511.1), ambos disponibilizados pelo NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Assim, a metodologia se seguiu pelos seguintes passos: Extração do DNA Genômico do SfGV; Clivagem do DNA; Corrida em Gel de Eletroforese; e Análise e Comparação das bandas de restrição, conforme descrito a seguir.

O processo de extração e purificação do DNA genômico dos OBs (corpos de oclusão, do inglês *occlusion bodies*) foi adaptado de O'Reilly *et al.* (1993). Inicialmente, adicionou-se 0,1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em um tubo eppendorf de 2 mL contendo 500 µL da amostra purificada, incubando a temperatura ambiente por 30 min para a dissolução dos OBs. Em seguida, acrescentou-se 0,1 M de tampão Tris-HCl com pH 7,2 para neutralizar a solução e centrifugou-se a 13.000 rpm por 5 min. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuspensionado com água, adicionado 100 µL de *Virus Disruption Buffer* e 4 µL enzima Proteinase K com concentração de 20 mg/mL, e incubado a 37°C durante toda a noite. Posteriormente, centrifugou-se a amostra e o sobrenadante foi submetido a ciclos de fenol saturado com cloreto de sódio 5 M (1:1), fenol/clorofórmio/álcool isopropílico (25:24:1) e clorofórmio/álcool isopropílico (24:1). Logo após, resfriou-se a amostra a -10°C para precipitar o sobrenadante contendo DNA. Por fim, foram adicionados 10% de 3 M de acetato de sódio (pH 5.2) e dois volumes de 96% de etanol, centrifugando a solução a 12.000 rpm por 10 min. O *pellet* formado foi lavado com 70% de etanol e ressuspensionado em 50 µL de água.

A clivagem do DNA genômico viral para obtenção dos perfis de restrição foi realizada com as enzimas Anza™ *Bam*HI, *Eco*RI e *Pst*I conforme instruções da Invitrogen. A digestão de cada enzima foi feita com o volume total de 20 µL, sendo 6 µL de DNA, 2 µL de Tampão 10X *Red Buffer* (Invitrogen), 0,3 µL da enzima e 11,7 µL de água ultrapurificada, e incubada a 37°C durante toda a noite.

O gel de agarose foi preparado de acordo com Sambrook *et al.* (2001), com uma concentração de 0,8% de agarose em tampão TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato e 0,002 M de EDTA). Em seguida, introduziu-se nos poços os marcadores da 1kbp da Kasvi e as amostras com fragmentos de DNA e tampão azul de bromofenol e glicerol. Logo após, realizou-se a corrida eletroforética com voltagem constante de 80 V. Finalizada a corrida, o gel foi retirado da cuba e posto no Fotodocumentador Transiluminador L-Pix Touch onde foram feitas as análises e visualização das bandas.

### **3.3. Bioensaio: Mortalidade em larvas de *S. frugiperda***

Foram realizados bioensaios de dose-resposta para averiguar a mortalidade das lagartas contaminadas pelo SfGV, determinar a dose letal média do vírus ( $LD_{50}$ ) e o tempo letal médio ( $LT_{50}$ ). Conforme Eberle *et al.*, 2012, o método de contaminação de dieta artificial pode ser utilizado para determinação da  $LD_{50}$  devido a quantidade de dieta contaminada que pode ser consumida pelas lagartas em um curto espaço de tempo. Para isso, o bioensaio utilizou de lagartas no segundo *instar* (L2) da espécie *Spodoptera frugiperda* (Jones, 2000) e dieta artificial conforme a metodologia de Greene *et al.* (1976).

Para cada tratamento foram utilizados 30 copos de acrílico contendo uma lagarta de *S. frugiperda* e dieta artificial, com aplicação de 100  $\mu$ L de solução contendo água, corante e o isolado de SfGV nas doses  $1 \times 10^2$   $\mu$ L/mL,  $1 \times 10^1$   $\mu$ L/mL,  $1 \times 10^0$   $\mu$ L/mL,  $1 \times 10^{-1}$   $\mu$ L/mL,  $1 \times 10^{-2}$   $\mu$ L/mL,  $1 \times 10^{-3}$   $\mu$ L/mL,  $1 \times 10^{-4}$   $\mu$ L/mL, e  $1 \times 10^{-5}$   $\mu$ L/mL. A solução do tratamento de controle consistiu apenas de água e corante. Foram feitas duplicatas para todos os tratamentos. Após a montagem do experimento, incubou-se em uma câmara climatizada do tipo BOD a 28 °C com 14 horas de fotoperíodo, sendo avaliado por um período de 34 dias, anotada as mortalidades de lagartas e foto documentando a aparição de sintomas característicos da infecção por granulovírus.

### **3.4. Sintomatologia em *S. frugiperda***

A sintomatologia das larvas após a infecção foi categorizada de acordo com os três tipos de patologias descritas por Adams e Bonami (1992). De acordo com essa classificação, as lagartas com a síndrome de tipo I serão aquelas que apresentarem sintomas de perda de apetite, mudança de cor progressiva para amarelada ou palidez, inchaço corporal, letargia, e surgimento de pontuações pretas e pele amarronzada quando estiver próxima da morte. Na síndrome do tipo II, os sintomas observados são similares à infecção por NPV, em

que as lagartas exibirão perda de apetite, flacidez, e morrem com o rompimento do tegumento devido à fragilidade da hipoderme, tendo um período letal menor que a síndrome de tipo I. Já no tipo III, serão exibidos sintomas de perda de apetite, coloração do intestino, mudança de cor para marrom ou preto, flacidez e diarreia.

### **3.5. Análises Estatísticas**

Os bioensaios foram conduzidos em dias diferentes com duplicata, os valores de mortalidade foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. A curva de dose-resposta, o cumulativo de sobrevivência e os dados de LD<sub>50</sub> e LT<sub>50</sub> foram obtidos com GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Caracterização molecular do SfGV**

O perfil de restrição (RFLP) foi obtido pela clivagem do DNA genômico com as enzimas *Bam HI*, *Eco RI* e *Pst I*. Na clivagem da enzima *Bam HI* foi observado um total de 7 fragmentos de restrição, enquanto que na do *Eco RI* foram apresentadas 8 bandas de restrição. Por fim, a enzima *Pst I* apresentou um total de 18 bandas de restrição (Figura 1).

Com a utilização do software Geneious Prime v. 2023.2.1 ainda foi gerado o RFLP para dois genômas, MH170055.1 e NC\_026511.1, referentes a dois isolados, respectivamente, SfGV ARG (Argentina) e VG008 (Colômbia), disponibilizados no NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Para o SfGV ARG (Ferrelli *et al.*, 2018) foram observados 12 fragmentos de restrição para a enzima *Bam HI*, 11 bandas para a enzima *Eco RI*, e 20 fragmentos para a enzima *Pst I*. Já para o VG008 (Cuartas *et al.*, 2015), foram observados 7 fragmentos de restrição para a enzima *Bam HI*, 9 bandas para a enzima *Eco RI*, e 20 fragmentos para a enzima *Pst I* (Figura 1).

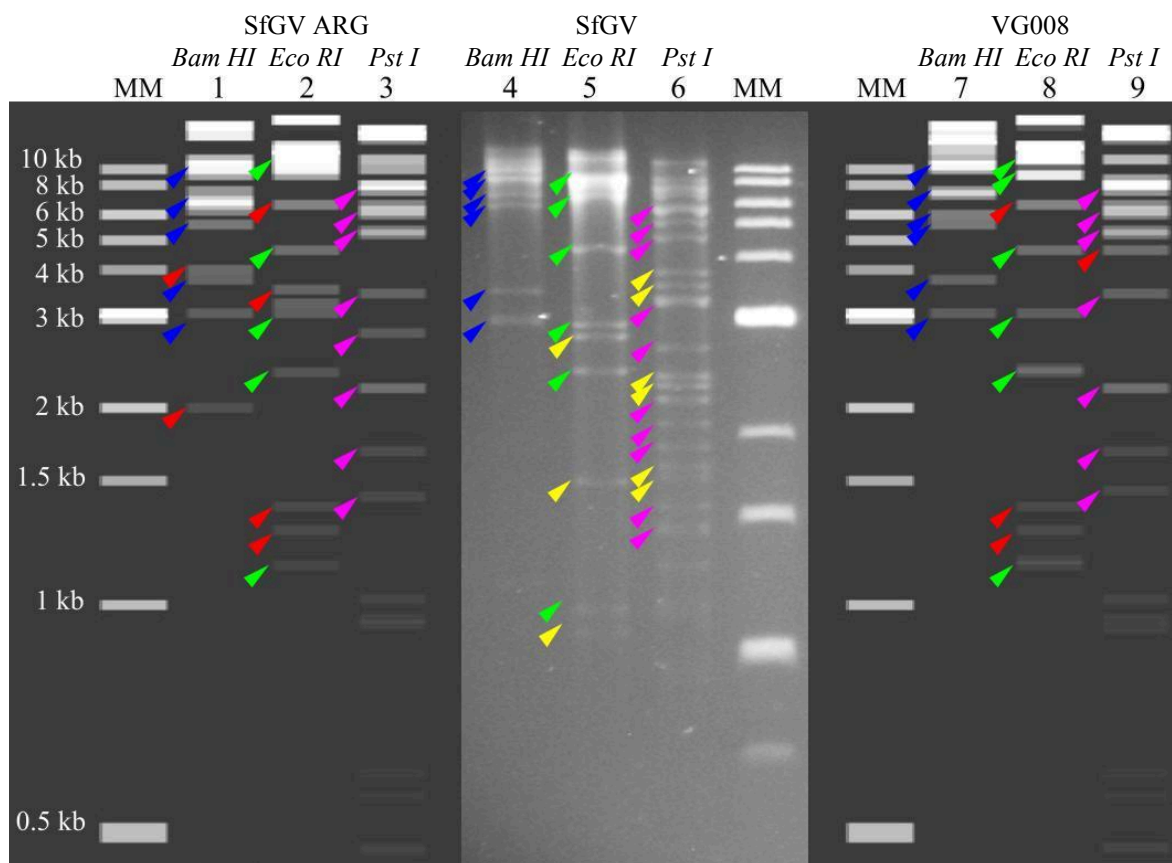


Figura 1. Perfil de restrição do SfGV e dos genomas MH170055.1 (SfGV ARG, isolado da Argentina) e NC\_026511.1 (VG008, isolado da Colômbia). Legenda: MM - Marcador molecular da Kasvi 1kb; 1- DNA de SfGV ARG clivado com BamHI; 2- DNA de SfGV ARG clivado com EcoRI; 3 - DNA de SfGV ARG clivado com PstI; 4 - SfGV clivado com BamHI; 5 - SfGV clivado com EcoRI; 6 - SfGV clivado com PstI; 7 - VG008 clivado com BamHI; 8 - VG008 clivado com EcoRI; 9 - VG008 clivado com PstI; Setas azuis, verdes e rosas representam bandas semelhantes para as enzimas *Bam HI*, *Eco RI* e *Pst I*, respectivamente; Setas vermelhas representam bandas diferentes não encontradas no SfGV; Setas amarelas representam bandas diferentes encontradas apenas no SfGV. Fonte: SfGV - do autor; SfGV ARG e VG008 - disponibilizado pelo *National Center of Biotechnology Information* e esquematizado no *Geneious Prime*.

As setas azuis, verdes e rosas presentes na Figura 1 representam similaridades encontradas nos perfis de restrição dos três vírus para as enzimas *Bam HI*, *Eco RI* e *Pst I*, respectivamente. Desta forma, pode-se constatar que o vírus estudado é provavelmente um granulovírus de *S. frugiperda* (SfGV). Entretanto, as setas amarelas presentes nas enzimas *Eco RI* e *Pst I* indicam fragmentos de restrição existentes apenas no SfGV, o que demonstra que este granulovírus é diferente dos catalogados no NCBI para regiões próximas ao Brasil. As setas vermelhas indicam fragmentos incompatíveis com o perfil de restrição do SfGV, sendo possível evidenciar uma maior proximidade com o isolado da Colômbia (VG008) do que o da Argentina (SfGV ARG), uma vez que o último apresentou um maior número de bandas divergentes das encontradas no SfGV.

#### **4.2. Sintomatologia das larvas de *S. frugiperda* após a infecção pelo SfGV**

Durante a condução dos bioensaios, pode ser observado o surgimento de alguns sintomas nas lagartas infectadas. Todas as lagartas foram fotografadas e analisadas com o auxílio de Estereomicroscópio, comparando-se os sintomas das lagartas tratadas com SfGV com as lagartas do tratamento de controle (Figura 2.A). Desta forma, verificou-se que após a infecção, as lagartas apresentaram uma mudança de coloração para a cor amarelada (Figura 2.B), onde algumas ainda sofreram uma descoloração, empalidecendo-se (Figura 2.C), e também pode-se notar sintomas de letargia e redução de apetite. Ainda foi observado que as lagartas se tornaram mais flácidas e suas colorações foram escurecendo rapidamente durante a morte (Figura 2.D). Outro sintoma constatado, foi o aspecto branco leitoso e pastoso da hemolinfa das larvas infectadas por GV, sendo que a lagarta saudável possui hemolinfa transparente líquida (Figura 2.E). Por fim, as lagartas ainda apresentaram uma dificuldade na realização da ecdise, em que algumas ficavam estranguladas pelo tegumento durante a troca (Figura 2.F). Uma hipótese levantada pelo autor, é que esse estrangulamento possa ser resultante de uma supressão da produção de quitinase. Diante dos sintomas apresentados, pode-se constatar que o granulovírus avaliado trata-se de um SfGV de morte lenta, com síndrome característica do Tipo I (Adams & Bonami, 1992).

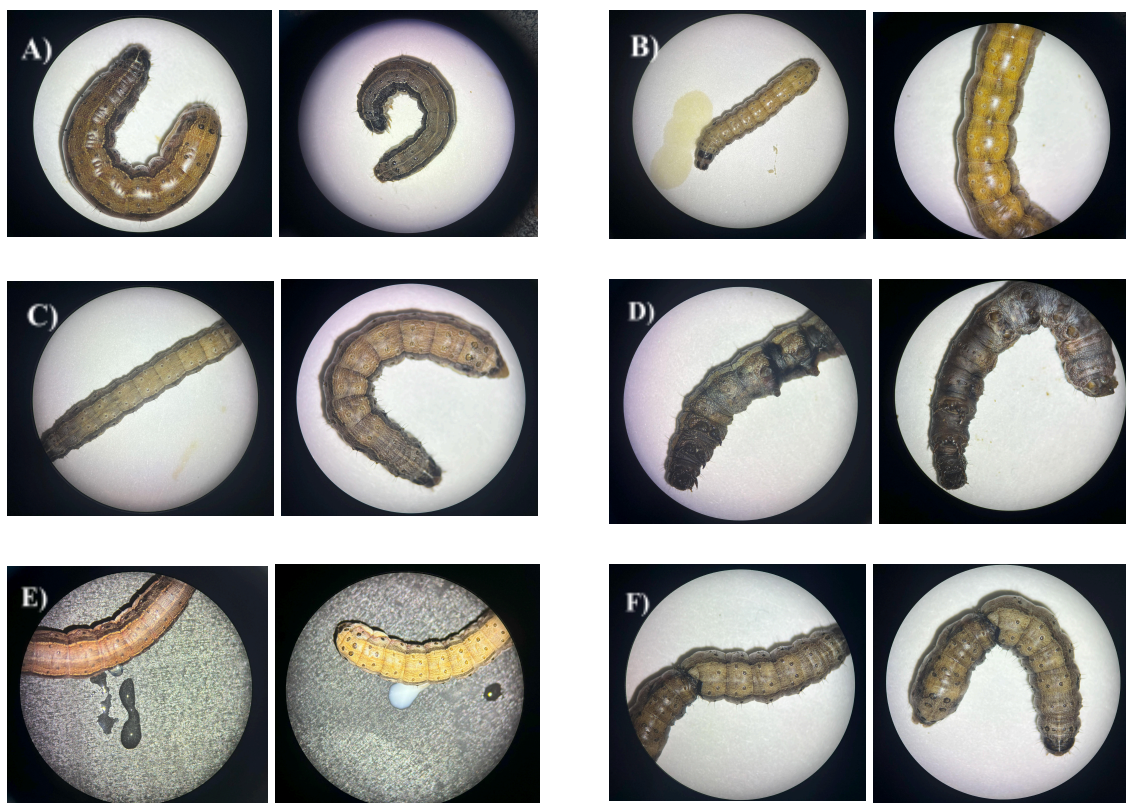


Figura 2. Sintomatologia apresentada pelas lagartas de *S. frugiperda* durante a execução dos bioensaios. Legenda: A) Lagartas saudáveis tratadas com solução de controle (sem vírus); B) Lagartas infectadas exibindo coloração amarelada; C) Lagartas infectadas apresentando descoloramento; D) Lagartas mortas; E) Hemolinfa da lagarta saudável e da infectada com SfGV, respectivamente; F) Estrangulamento durante ecdise. Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.3. Infectividade do SfGV sobre lagartas de *S. frugiperda*

A curva de dose-resposta para o SfGV, gerada pelo método de regressão não linear, demonstrou uma relação crescente entre dose e mortalidade (Figura 3). A dose letal média ( $LD_{50}$ ) do SfGV, dose necessária para causar mortalidade de 50% das lagartas, foi de 0,15  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . A curva apresentou um *Hillslope* de 0,8398 e coeficiente  $R^2$  de 0,97, o que torna a curva confiável em relação aos parâmetros de regressão não linear estabelecidos pelo GraphPad Prism.

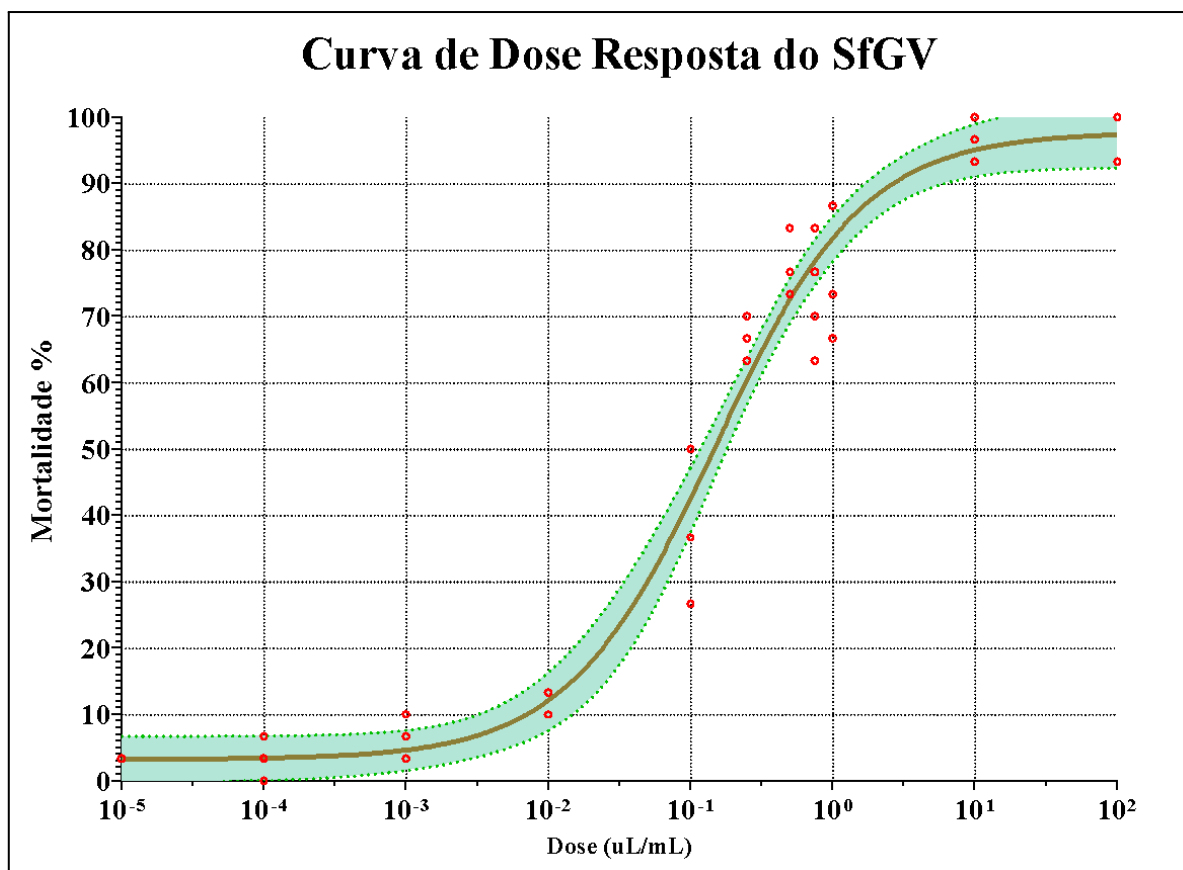


Figura 3. Curva de Dose-Resposta do SfGV. Fonte: Elaborado pelo autor.

O SfGV avaliado demonstrou capacidade de matar 100% das lagartas em dosagens altas (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), formando uma curva de dose resposta típica. Entretanto, ao analisar a inclinação (*Hillslope*), notou-se que a curva manifestou uma fase linear mais prolongada. Desta forma, foi necessário um aumento gradativo de doses para atingir o ponto crítico de mortalidade. No entanto, o valor de  $\text{LD}_{50}$  demonstra que, apesar disso, o granulovírus ainda é eficaz no controle de pragas agrícolas.

Um fator limitante para o desenvolvimento do trabalho foi a impossibilidade de realizar a quantificação dos corpos de oclusão de granulovírus no inóculo viral. Portanto, optou-se pela realização do bioensaio utilizando diferentes diluições do SfGV, tornando os resultados da curva de dose-resposta difíceis de serem comparados com os de outros estudos, uma vez que é mais usual conduzir pesquisas levando em conta a concentração do baculovírus.

A Figura 4 apresenta o cumulativo de sobrevivência das lagartas de *S. frugiperda* tratadas com solução controle e infectadas com as diferentes doses de SfGV, ainda sendo apresentado dados de infecção por um SfMNPV que foram disponibilizados pela AgBiTech

para viés de comparação. O tempo letal médio ( $LT_{50}$ ) foi estimado para os tratamentos que obtiveram mortalidade igual ou superior a 50%, sendo eles  $1 \times 10^2 \mu\text{L/mL}$ ,  $1 \times 10^1 \mu\text{L/mL}$ ,  $1 \times 10^0 \mu\text{L/mL}$ . Independente das doses citadas, o SfGV apresentou  $LT_{50}$  de 21 dias.

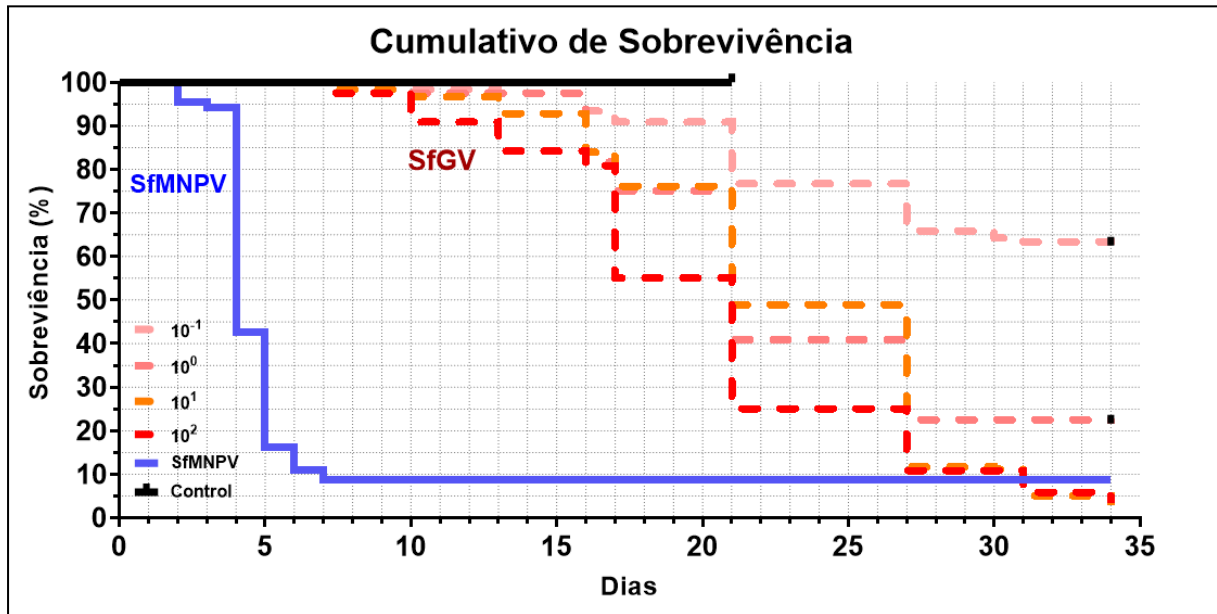


Figura 4. Sobrevivência de lagartas de *S. frugiperda* durante um período de 34 dias. Legenda:  $10^{-1}$ ,  $10^0$ ,  $10^1$ ,  $10^2$  são as doses de SfGV utilizadas. Fonte: Elaborado pelo autor.

A  $LT_{50}$  encontrada foi semelhante à esperada para o grupo dos granulovírus de morte lenta (síndrome patológica de tipo I), em que, pesquisas com outras cepas de SfGV apresentaram valores médios de 24, 29 e 33 dias (Ordóñez-García *et al.*, 2024; Cuartas *et al.*, 2014). Pode-se perceber que as lagartas infectadas pelo SfGV apresentaram um período larval maior, visto que as lagartas tratadas com solução controle empuparam com 21 dias, enquanto as infectadas apresentaram tempo de morte ou tempo para pupa superiores a esse período. Pesquisas demonstram que larvas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial e mantidas em condições controladas, costumam apresentar estágio larval ainda mais curto do que o observado para o nosso grupo controle, de 11 a 19 dias (Machado *et al.*, 2022), demonstrando que, de fato, as lagartas tratadas tiveram o seu estágio larval prolongado.

Analisando o gráfico da Figura 4, percebe-se que o SfGV possui um período letal menor em comparação ao SfMNPV, levando o quintuplo do tempo necessário para matar 50% das lagartas de segundo *instar* infectadas. Estudos indicam que infecções em *instars* menores, como neonatas, possuem tempo de letalidade ainda mais rápidos, levando a 50% de morte em 34~49 horas após infecção (Harrison *et al.*, 2008). Todavia, o SfGV ainda pode se apresentar como uma estratégia para controle biológico da *S. frugiperda*, em razão de não terem sido

avaliados efeitos subletais nas larvas sobreviventes, tais como a viabilidade na formação de pupas e na fertilidade dos adultos.

## **5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Ao finalizar a execução deste projeto pode-se concluir que o SfGV encontrado no Nordeste é um vírus ainda desconhecido, com sintomas característicos da síndrome de infecção do tipo I, sendo um granulovírus de morte lenta. As lagartas infectadas apresentaram um tempo de vida prolongado em relação às do controle, sendo necessárias doses altas do vírus para ter eficácia na mortalidade, podendo chegar a 100%. Portanto, para andamentos futuros do projeto, é necessário sequenciar o genoma completo do SfGV, o que permitirá estabelecer a filogenia do vírus e entender sua evolução, além de identificar primers específicos para ele. Estes primers poderão contribuir como um método de identificação para este SfGV.

Além disso, outro aspecto que ainda precisa ser analisado é a quantificação do inóculo viral. Esses dados poderão ser futuramente obtidos pelo método da PCR em tempo real. Através dessa quantificação é possível definir se o SfGV tem capacidade de produzir grandes quantidades de corpos de oclusão, o que comprovaria sua eficácia no uso para o controle da *S. frugiperda*. Além disso, ainda seria possível avaliar o efeito *enhancer* que os granulovírus produzem na infectividade dos nucleopoliedrovírus, gerando material para novas estratégias de controle biológico de pragas agrícolas.

## 6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. R., BONAMI, J. R.. **Atlas of invertebrate Viruses**. Boca Raton: Crc Press, 1991. 697 p.
- BARROS, E. M. TORRES, J. B. BUENO, A. F. **Oviposição, Desenvolvimento e Reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Diferentes Hospedeiros de Importância Econômica**. Neotropical Entomology. v. 39, n. 6. nov.- dec., 2010.
- BEHLE, R. W. POPHAM, H. J. R. **Laboratory and field evaluations of the efficacy of a fast-killing baculovirus isolate from *Spodoptera frugiperda***. Journal of Invertebrate Pathology, v. 109, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2011.11.002.
- CRUZ, I. FIGUEIREDO, M. L. C., MATOSO, M. J. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos de *Trichogramma***. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1999. 40p. (EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica, 30).
- CUARTAS, P. E. *et al.* **The complete sequence of the first *Spodoptera frugiperda* Betabaculovirus genome: a natural multiple recombinant virus**. Viruses, v. 7, 2015. DOI: 10.3390/v7010394.
- CUARTAS, P. E. *et al.* **Characterisation of a Colombian granulovirus (Baculoviridae: *Betabaculovirus*) isolated from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae**. Biocontrol Science and Technology, v. 24, 2014. DOI: 10.1080/09583157.2014.933312.
- CUARTAS-OTÁLORA, P. E. *et al.* **Bio-inseticidal potential of nucleopolyedrovirus and granulovirus mixtures to control the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Viruses, v. 11, 2019. DOI: 10.3390/v11080684.
- EBERLE, K. E. *et al.* Basic techniques in insect virology. In: LACEY, Lawrence A. (ed.). **Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**. 2. ed. London: Academic Press, 2012. Cap. 2. p. 15-74.
- FERRELLI, M. L., SALVADOR, R. **Effects of mixed baculovirus infections in biological control: A comprehensive historical and technical analysis**. Viruses, v. 15, 2023. DOI: 10.3390/v15091838.
- FERRELLI, M. L. *et al.* **Genomic analysis of an Argentinean isolate of *Spodoptera frugiperda* granulovirus reveals that various baculoviruses code for Lef-7 proteins with three F-box domains**. PLoS ONE, v. 13, 2018. DOI:10.1371/journal.pone.0202598.
- FONTES, E. M. G., VALADARES-INGLIS, M. C. **Controle Biológico de Pragas da Agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. 510 p.
- GELAYE, Y. NEGASH, B. **The role of baculoviruses in controlling insect pests: A review**. Cogent Food & Agriculture, v. 9, n. 1, 2023. DOI: 10.1080/23311932.2023.2254139.
- GÓMEZ, J. *et al.* **Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Insecticidal activity and effect on arthropod population in maize**. Biocontrol Science and Technology, v. 23, 2013. DOI: 10.1080/09583157.2013.802288.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. **Velvetbea caterpillar: A rearing procedure and artificial medium.** Journal of Economic Entomology, Geneva, v. 69, n. 4, p. 488-497, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.

HARRISON, R. L., PUTTLER, B., POPHAN, H. J. R. **Genomic sequence analysis of a fast-killing isolate of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus.** Journal of General Virology, v. 89, 2008. DOI: 10.1099/vir.0.83566-0.

HELLWIG, L. *et al.* **Reavaliação do nível de dano de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho convencional.** In: 58° REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO MILHO 41° REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DO SORGO, 2013, Pelotas, Rio Grande do Sul. Resumos... Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 2013. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98494/1/Leticia-Hellwig.pdf>. Acesso em: 22 abril de 2024.

JONES, K. A. Bioassays of Entomopathogenic Viruses. In: NAVON, A., ASCHER, K. R. S. **Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes.** 1 ed. London: CABI Publishing, 2000. Cap. 3. p. 95-140.

LEPORE, L. S. *et al.* **Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 68, 1996. DOI: 10.1006/jipa.1996.0070.

MACHADO, L. C. *et al.* **Desenvolvimento de estágio larval de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em temperaturas sob condição padronizada.** Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, v. 15, 2022. DOI: 10.17765/2176-9168.2022v15n4e9668.

ORDÓÑEZ-GARCÍA, M. *et al.* **Morphological, Biological, and Molecular Characterization of Type I Granuloviruses of *Spodoptera frugiperda*.** Neotropical Entomology, v. 53, p. 917-928, 2024. DOI: 10.1007/s13744-024-01172-3.

O'REILLY, D. R. MILLER, L. K. LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual.** New York: Oxford University Press, 1994.

RICARTE-BERMEJO, A. *et al.* **Bacmid expression of granulovirus Enhancin En3 accumulates in cell soluble fraction to potentiate nucleopolyhedrovirus infection.** Viruses, v. 13, 2021. DOI: 10.3390/v13071233.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology.** 4. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information. 2019.

ROSA, A. P. S. A. **Monitoramento da lagarta-do-cartucho do milho.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2011.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ª ed. 1 Volumes, 2000.

SHAPIRO, M. **Effect of two granulosis viruses on the activity of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Economic Entomology, v. 93, 2000. DOI: 10.1603/0022-0493-93.6.1633.

SOUZA, M. L. *et al.* **Identificação e caracterização de isolados de baculovírus com potencial para controle biológico de *Spodoptera frugiperda*.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p. 1-7. (EMBRAPA-CENARGEN, Circular Técnica, 26).

WAN, J. *et al.* **Biology, invasion and management of the agricultural invader: Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Integrative Agriculture, v. 20, 2021. DOI: 10.1016/S2095-3119(20)63367-6.

YANG, S. *et al.* **Improving Baculovirus Infectivity by Efficiently Embedding Enhancing Factors into Occlusion Bodies.** Applied and Environmental Microbiology, v. 83, 2017. DOI: 10.1128/AEM.00595-17.