UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

FCA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
UNESP | BOTUCATU

**ANDRÉ BALLERINI HORTA**

# USO DE VÍRUS E *Bacillus thuringiensis* Berliner NO CONTROLE DE *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)

**Botucatu**
**2017**

**ANDRÉ BALLERINI HORTA**

# USO DE VÍRUS E *Bacillus thuringiensis* Berliner NO CONTROLE DE *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

**Botucatu**

**2017**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO – DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP – FCA – LAGEADO – BOTUCATU (SP)**

Horta, André Ballerini, 1985-
H821u Uso de vírus e *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) / André Ballerini Horta. – Botucatu: [s.n.], 2017
89 p.: grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Carlos Frederico Wilcken
Inclui bibliografia

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. Lagarta desfolhada. 3. Pragas agrícolas - Controle biológico. 4. *Bacillus thuringiensis*. I. Wilcken, Carlos Frederico. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**Câmpus de Botucatu**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "USO DE VÍRUS E *Bacillus thuringiensis* Berliner NO CONTROLE DE *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)"

**AUTOR: ANDRÉ BALLERINI HORTA**
**ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas

Prof. Dr. BERGMANN MORAIS RIBEIRO
Biologia Celular / Universidade de Brasília / Brasília/DF

Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE
Depto de Proteção Vegetal / UNESP - Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu

Profa. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN
Departamento de Produção Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu/SP

Botucatu, 31 de maio de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Àquele ou àquilo que criou a tudo e a todos (tenha o nome que a crença de cada um escolher) pela oportunidade de viajar por um caminho tão bonito e desafiador e aos meus anjos da guarda, guias e protetores por terem me trazido sã e salvo até aqui.

À minha família, meus pais, Gil e Silvia, e minha irmã Débora, por todo o cuidado, pelos ensinamentos, pelo total apoio e por tantas lutas, me permitindo alcançar mais este sucesso nesta vida.

Aos meus grandes amores Larissa e Thiago, amigos, cúmplices, parceiros e sempre as razões de muita felicidade, enchendo minha vida de momentos maravilhosos. Da mesma forma a todos os meus amigos de Guaratinguetá, Jaboticabal, São Paulo, Brasília, Botucatu e aos perdidos de cada canto neste país maravilhoso.

Aos Professores Dr. Carlos Frederico Wilcken, Dr. Manoel Victor Franco Lemos e Dr. Bergmann Morais Ribeiro, primeiramente pelo privilégio da orientação. Foi uma honra trabalhar com os senhores. Obrigado pela oportunidade de tão gratificante experiência pessoal e profissional, pelo voto de confiança e paciência a mim concedidos, pela sabedoria compartilhada, pelas cobranças e puxões de orelha que só me fizeram crescer ainda mais.

Às Professoras Dra. Renate Krause Sakate e Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken pelas contribuições generosas feitas em meu exame de defesa de tese e também pelas orientações em geral ao longo do doutorado no Departamento de Proteção de Plantas.

Às técnicas laboratoriais Eliane, Fernanda e Lorena e aos colegas dos Laboratórios de Controle Biológico de Pragas Florestais (FCA – UNESP), Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (FCAV – UNESP) e Virologia e Microscopia Eletrônica (UnB), pela amizade, convívio, pelos ensinamentos pessoais e profissionais e pelo inestimável auxílio nas atividades ao longo deste trabalho.

Aos demais professores, servidores e colegas do Departamento de Proteção de Plantas, pelo convívio, pela amizade, pelos ensinamentos e auxílios, pelas parcerias e orientações em geral.

A todos aqueles que de alguma forma conviveram comigo nos últimos anos, compartilhando momentos ao longo da jornada e contribuindo para o meu crescimento, meu sincero obrigado, por TUDO.

*“My friend, I'll say it clear*
*I'll state my case, of which I'm certain*

*I've lived a life that's full*
*I've traveled each and every highway*
*But more, much more than this*
*I did it my way*

*Regrets, I've had a few*
*But then again, too few to mention*
*I did what I had to do*
*And saw it through without exemption*
*(...)*
*Yes, there were times, I'm sure you knew*
*When I bit off more than I could chew*
*But through it all, when there was doubt*
*I ate it up and spit it out*
*I faced it all and I stood tall*
*And did it my way*

*I've loved, I've laughed and cried*
*I've had my fill my share of losing*
*And now, as tears subside*
*I find it all so amusing*
*(...)*
*For what is a man, what has he got*
*If not himself, then he has naught*
*To say the things he truly feels*
*And not the words of one who kneels*
*The record shows I took the blows*
*And did it my way”*

*My Way* (Frank Sinatra; Paul Anka, 1969)

## RESUMO

O Brasil é atualmente líder mundial em produtividade no setor florestal graças ao eucalipto. Os plantios de eucalipto sofrem com severos ataques de insetos-praga, cujos danos comprometem seriamente a produtividade. O controle biológico é a principal estratégia adotada pelas empresas do setor florestal, envolvendo sistemas de monitoramento das populações de insetos-praga. Um dos mais importantes grupos de desfolhadores é o dos lepidópteros desfolhadores. Espécies nativas brasileiras se adaptaram às plantações de eucalipto ao longo dos anos e a mais notável é a lagarta parda do eucalipto, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Com ampla distribuição no território brasileiro, esta espécie se caracteriza pelos surtos nos períodos secos do ano, quando encontra condições favoráveis para expressar seu elevado potencial reprodutivo, causando severas desfolhas em grandes extensões. Medidas de controle são frequentemente necessárias, sendo realizadas pulverizações aéreas de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) e liberações de inimigos naturais. Entretanto, epizootias virais podem ser observadas como reguladores naturais de tais populações. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivos: (I) a análise da toxicidade de seis diferentes proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* sobre populações de *T. arnobia* e seu efeito na emergência de vírus latentes nestas populações; (II) sequenciamento do genoma completo, análise filogenética e caracterização ultraestrutural de um cypovirus encontrado em lagartas de *T. arnobia*. Os resultados obtidos mostram que doses subletais de proteínas Cry1 podem ter influência na ativação de vírus latentes presentes nas populações de *T. arnobia*, conduzindo a um quadro onde a mortalidade observada em diferentes níveis é ligada às infecções virais associadas à toxicidade das proteínas Cry1. Ainda, as análises do cypovirus encontrado revelaram sua proximidade com outros vírus pertencentes à espécie *cypovirus* 14. Dessa forma, de acordo com as normas definidas pelo Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus, este foi nomeado *Thyrinteina arnobia* cypovirus 14. O gene que codifica a poliedrina, principal proteína na composição dos poliedros observados, foi clonado com sucesso em um baculovirus recombinante, cuja infecção em linhagens celulares de insetos resultou na produção de cristais proteicos no citoplasma das células infectadas. Este dado indica a aptidão dos poliedros deste cypovirus como nanocarreadores para outras proteínas fusionadas à

poliedrina em estudos e aplicações biotecnológicas. Estudos futuros avaliarão ainda o potencial deste cypovirus no controle de populações de *T. arnobia* a campo, podendo se tornar mais uma ferramenta para a proteção dos plantios de eucalipto brasileiros.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus*, *Cypovirus*, proteínas Cry.

## ABSTRACT

Brazil is nowadays the global leader in productivity at forest sector due to *Eucalyptus*. *Eucalyptus* plantations suffer severe attacks from insect-pests, whose damages compromise seriously the productivity. Biological control is the main strategy adopted by the forest companies, involving pest population monitoring systems. One of the most important defoliators group is the lepidopterous defoliators. Native Brazilian species had adapted to the eucalyptus plantations over the years and the most remarkable one is the eucalyptus brown looper, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Spread all over Brazil's territory, this species is characterized by the outbreaks during the dry periods of the year, when it has good conditions to express its high reproductive potential, causing severe defoliation in large extensions. Control measures are frequently necessary, thus aerial spraying with *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) based bioinseticides and releases of natural enemies are carried out. However, sometimes viral epizootics can be observed acting as natural regulators for such populations. The interactions between *B. thuringiensis* and native entomopathogenic viruses are unknown to *T.arnobia* in eucalyptus plantations. In this context, the present work had as objectives: (I) the toxicity analysis of six different Cry1 proteins of *B. thuringiensis* on populations of *T. arnobia* and their effect on the emergence of latent viruses in these populations; (II) complete genome sequencing, phylogenetic analysis and ultrastructural characterization of a cypovirus found in *T. arnobia* caterpillars. The results show that sublethal doses of Cry1 proteins may have an influence on the activation of latent viruses present in the *T. arnobia* populations, leading to a context where the mortality observed at different levels is linked to the viral infections associated with the toxicity of Cry1 proteins. In addition, the analysis of the cypovirus found revealed its proximity to other viruses belonging to the cypovirus 14 species. Thus, according to the standards defined by the International Committee on Virus Taxonomy, it was named *Thyrinteina arnobia* cypovirus 14. The gene encoding polyhedrin, the main protein in the composition of the polyhedra observed, was successfully cloned in a recombinant baculovirus, whose infection in insect cell lines resulted in the production of protein crystals in the cytoplasm of the infected cells. This data indicates the suitability of the polyhedra of this cypovirus as nanocarriers for other proteins fused to polyhedrin in studies and biotechnological applications. Future

studies will also evaluate the potential of this cypovirus in the control of *T. arnobia* populations at the field and may become another tool for the protection of Brazilian eucalyptus plantations.

**Keywords:** *Eucalyptus*, *Cypovirus*, Cry proteins

**SUMÁRIO**

INTRODUÇÃO GERAL ..... 15
1. Revisão Bibliográfica ..... 21
1.1. O controle microbiano de insetos-praga ..... 21
1.2. O setor florestal e o eucalipto ..... 24
1.3. A lagarta-parda-do-eucalipto ..... 25
1.4. *Bacillus thuringiensis* e suas proteínas inseticidas ..... 27
1.4.1. Proteínas Cry1 e seus mecanismos de ação ..... 30
1.5. Vírus Entomopatogênicos ..... 32
1.5.1. O gênero *Cypovirus* ..... 34
CAPÍTULO 1 – Genoma completo e caracterização ultraestrutural de um cypovirus isolado de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) ..... 37
Resumo ..... 37
Abstract ..... 38
1. Introdução ..... 40
2. Material e métodos ..... 41
2.1. Origem das amostras ..... 41
2.2. Purificação e análise ultraestrutural ..... 42
2.3. Anticorpos ..... 42
2.4. Isolamento do RNA, sequenciamento genômico e análises ..... 43
2.5. Análise filogenética ..... 43
2.6. Amplificação do gene *polh* e clonagem ..... 43
2.7. Construção de um baculovirus recombinante ..... 44
3. Resultados ..... 45
3.1. Análises estruturais e ultraestruturais ..... 45
3.2. Sequenciamento genômico ..... 46
3.3. Análise filogenética e diversidade genômica ..... 50
3.4. Baculovirus recombinante com gene *polh* ..... 52
4. Discussão ..... 53
5. Conclusões ..... 59
Referências ..... 59

CAPÍTULO 2 – Proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* e seu efeito na emergência de vírus latentes em populações de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) ..... 64
Resumo ..... 64
Abstract ..... 65
1. Introdução ..... 67
2. Material e métodos ..... 68
2.1. Proteínas Cry1 ..... 68
2.2. Criação de *T. arnobia* ..... 69
2.3. Bioensaios com proteínas Cry1 ..... 70
2.4. Postulado de Koch para vírus emergentes ..... 71
2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão ..... 72
3. Resultados ..... 72
4. Discussão ..... 78
5. Conclusões ..... 80
Referências ..... 81
CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 83
REFERÊNCIAS ..... 84

## INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto chegou ao Brasil na segunda metade do século XIX, mas somente a partir de 1966, com a lei de incentivos fiscais a empreendimentos florestais, sua exploração como cultura ganhou impulso (MORA; GARCIA, 2000; CASTRO et al., 2016). Atualmente os cultivos de eucalipto ocupam 5,6 milhões de hectares, o que representa 71% da área total de florestas plantadas no país. Com menor tempo de rotação e maior volume de madeira produzido, o eucalipto é o principal responsável pela manutenção do Brasil como líder mundial em produtividade no setor florestal (IBÁ, 2016). Recentemente, o país se tornou o primeiro a liberar plantios comerciais de um eucalipto geneticamente modificado para aumento de produtividade (ISAAA, 2015; MCTI, 2015). Este evento é o marco histórico do início de uma nova era biotecnológica no setor florestal e coloca o Brasil em vantagem ainda maior frente aos demais produtores. Contudo, os extensos plantios, o cultivo intensivo e a uniformidade dos materiais genéticos criam condições favoráveis para estabelecimento, alimentação e reprodução de insetos-praga em elevados níveis populacionais (HURLEY et al., 2016), cujos danos causados aos plantios afetam diretamente a produtividade (ELEK; BAKER, 2017) e colocam em risco a liderança do país no setor.

No cenário florestal brasileiro as estratégias de controle de insetos-praga são bastante diversificadas e baseiam-se principalmente no controle biológico, diferentemente do que acontece no cenário das monoculturas agrícolas, onde o controle com inseticidas sintéticos ainda predomina nos dias atuais (UNSWORTH, 2010; PARRA, 2014). As razões para isto variam entre as diferenças estruturais dos cultivos até as pressões exercidas pela certificação da produção florestal, cuja ênfase na sustentabilidade das florestas plantadas limita o uso de inseticidas sintéticos e prioriza a adoção de estratégias de controle não-químicas (FSC, 2015).

O complexo de insetos-praga do eucalipto compreende dezenas de espécies, as quais se distribuem basicamente entre insetos desfolhadores (formigas cortadeiras, lagartas e besouros), sugadores (percevejos e psilídeos), rizófagos (cupins), galhadores (vespas) e broqueadores (besouros). Com relação à área

atacada, o grupo mais importante são as formigas cortadeiras, seguidas pelas pragas exóticas e depois pelo complexo de lepidópteros desfolhadores (IPEF[1]).

As estratégias de controle para formigas cortadeiras a partir de opções biológicas são escassas. Por isso os trabalhos neste grupo geram grandes desafios frente às entidades de certificação florestal, que cada vez mais restringem as permissões para uso de inseticidas sintéticos (ZANUNCIO et al., 2016). Quanto às pragas exóticas, de origem australiana, existem fortes opções no controle biológico clássico, mas a importação e a liberação de inimigos naturais exóticos encontram seus maiores obstáculos na adaptação dos mesmos às condições climáticas brasileiras e também na burocracia junto aos órgãos competentes do governo para se obter as autorizações necessárias para tais iniciativas (SCHÜHLI et al., 2016). Já o complexo de lepidópteros desfolhadores tem como principal estratégia de controle o uso de bioinseticidas a base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) (ZANUNCIO et al., 1992; MAPA, 2017), ocasionalmente associado com liberações de inimigos naturais (parasitoides de pupa e percevejos predadores), auxiliando no controle dos indivíduos sobreviventes às pulverizações (BARBOSA et al., 2016; HOLTZ et al., 2006), constituindo, portanto, um manejo integrado que se alinha às premissas da certificação florestal e dessa maneira não enfrenta maiores questionamentos por parte de tais entidades.

Mais de vinte espécies de lepidópteros desfolhadores se adaptaram ao eucalipto com a expansão da cultura pelo Brasil ao longo dos anos (ZANUNCIO et al., 1993). A grande maioria é observada nos plantios em baixos níveis populacionais, não sendo necessário controle. Outras espécies chegam a ocasionar surtos, mas de forma regional e esporádica, necessitando de controle apenas em casos específicos. Contudo, determinadas espécies frequentemente desenvolvem elevados níveis populacionais necessitando que medidas de controle sejam tomadas com maior frequência, como é o caso da lagarta-parda-do-eucalipto, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), considerada o principal lepidóptero desfolhador da cultura do eucalipto no Brasil (ZANUNCIO et al., 1993; GALLO et al., 2002; JESUS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Em geral estas populações não causam preocupação durante os períodos úmidos do ano, os quais apresentam condições adversas ao desenvolvimento das

[1] Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

mesmas, como o favorecimento de doenças microbianas, que suprimem estas populações naturalmente. A coexistência entre insetos e seus patógenos é a base do controle microbiano natural, um processo importantíssimo para a autorregulação dos níveis populacionais destas espécies, o qual é observado no campo na forma de enzootias (doenças microbianas que ocorrem com sazonalidade e predomínio de infecções crônicas) e epizootias (doenças microbianas que ocorrem esporadicamente e com predomínio de infecções letais). Nestas ocasiões a identificação destes entomopatógenos é oportunidade única de convertê-los em programas de controle microbiano aplicado, com seu desenvolvimento na forma de bioinseticidas (ALVES, 1998).

No Brasil, os surtos de lepidópteros desfolhadores em eucalipto ocorrem geralmente nos períodos secos do ano e em regiões com regimes pluviométricos menos intensos, cujas condições favorecem a reprodução e sobrevivência destes insetos em altos níveis populacionais. Nestas ocasiões, epizootias causadas por vírus entomopatogênicos já foram observadas algumas vezes, entretanto, os agentes causais não foram completamente caracterizados e com isso as pesquisas neste sentido não evoluíram (NASCIMENTO, 2001).

Bioinseticidas virais direcionados à proteção florestal são estudados e utilizados há décadas em países como Canadá, Estados Unidos e Japão (KUNIMI, 2007; LACEY et al., 2015; VAN FRANKENHUYZEN; LUCAROTTI; LAVALLÉE, 2015). Entretanto, esta é uma área de pesquisa muito recente no Brasil e possui apenas um caso de sucesso, no qual se utiliza um vírus de poliedrose nuclear para o controle da lagarta-do-álamo, *Condylorrhiza vestigialis* (Gueneé, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae). Após sua descoberta e devida caracterização, as pesquisas com este vírus evoluíram até seu desenvolvimento como bioinseticida, sendo registrado junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, permitindo sua aplicação comercial em plantios de álamo no sul do país (CASTRO et al., 2009). Para o eucalipto, apesar das epizootias observadas a campo, até o momento não há grande avanço neste sentido, considerando a ausência de isolados virais devidamente caracterizados. Recentemente, durante os experimentos prévios deste estudo (HORTA, 2012), um cypovirus foi encontrado em lagartas de *T. arnobia* mantidas em criação de laboratório (Figura 1), tornando sua identificação e completa caracterização molecular parte dos objetivos deste trabalho.

**Figura 1 – Gaiola de criação de *T. arnobia* com lagartas mortas pelo cypovirus encontrado. Em detalhe, lagarta morta pendurada à folha com bolo fecal ligado ao ânus, sintoma característico observado neste tipo de infecção.**




Nos anos de 2015 e 2016 o clima mais seco com poucas chuvas favoreceu a ocorrência de surtos populacionais da lagarta-parda-do-eucalipto (Figura 2) nos estados da Bahia, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (IPEF[2]).

**Figura 2 – Aspecto do desfolhamento causado por surto populacional de *T. arnobia* em plantio comercial de eucalipto (Agudos – SP, 2015).**




[2] Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

Nestas ocasiões a principal estratégia de controle adotada foi a pulverização aérea de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* (ZANUNCIO et al., 1992; MAPA, 2017). Formulações comerciais desta bactéria possuem como ingrediente ativo esporos e cristais proteicos produzidos pelas células bacterianas durante seu processo de esporulação. Estes cristais apresentam proteínas com atividade inseticida (toxinas) em sua composição, as quais sendo ingeridas pelas lagartas, encontram condições de pH alcalino no intestino médio das mesmas, sendo solubilizadas. A partir de então, sua interação com receptores específicos, presentes nas microvilosidades das células do epitélio intestinal, leva à formação de poros que alteram o equilíbrio osmótico das mesmas, culminando na ruptura de suas membranas e morte celular (MILNER, 1994; BRAVO et al., 2011).

O conhecimento a respeito do modo de ação destas toxinas sobre lepidópteros desfolhadores foi obtido ao longo de décadas de estudos dentro do cenário das monoculturas agrícolas. Diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo desenvolveram tais trabalhos, cada qual com foco nas mais importantes espécies de insetos-praga de suas localidades. Analisando o comportamento de diferentes populações expostas as toxinas desta bactéria foi possível chegar ao conhecimento hoje existente sobre *B. thuringiensis*. No início foram as formulações de bioinseticidas que mostraram o potencial da bactéria na supressão de populações a campo. A medida que a tecnologia do DNA recombinante se desenvolveu, seus genes foram clonados em plantas, de forma individual, nascendo assim a primeira geração de plantas transgênicas resistentes a insetos. Com o avanço da tecnologia e o melhor entendimento sobre os casos de populações de insetos resistentes às toxinas de *B. thuringiensis*, surgiram as plantas piramidadas, já na segunda geração de plantas transgênicas. Nestas plantas, dois ou mais genes codificadores de toxinas com diferentes mecanismos de ação foram introduzidos a fim de garantir ao menos duas vias distintas de combate aos insetos-alvo. Ainda, em alguns casos, estes genes foram associados a outros que conferiam às plantas resistência a herbicidas, favorecendo o manejo de plantas daninhas na condução da cultura. Mais recentemente, as plantas piramidadas passaram a ter outra tecnologia incorporada em sua engenharia genética. A tecnologia de RNA de interferência (RNAi), um mecanismo de silenciamento gênico que atua sobre importantes vias metabólicas nos insetos-alvo, foi incorporada em conjunto com as toxinas de *B. thuringiensis*, marcando a terceira geração de plantas transgênicas resistentes a

insetos (GORDON; WATERHOUSE, 2007; PRICE; GATEHOUSE, 2008; BURAND; HUNTER, 2013; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013; TABASHNIK et al., 2015).

Enquanto no cenário agrícola mundial o controle de insetos-praga através desta bactéria possui atualmente o mais alto nível de conhecimento disponível, no cenário florestal brasileiro a situação é oposta. Especificamente para o caso dos lepidópteros desfolhadores de eucalipto não existem estudos que abordem diretamente as toxinas presentes nos bioinseticidas, que são utilizados há décadas no controle destas populações a campo. Diferentes toxinas Cry estão presentes em suas formulações, entretanto, não está determinada a eficiência de controle de cada uma delas, a interação com os receptores presentes no intestino médio dos insetos, a existência de potencial de resistência cruzada entre as mesmas, entre outros tantos aspectos fundamentais da ciência que envolve esta bactéria.

A eficiência dos bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* na proteção dos plantios de eucalipto brasileiros é comprovada e até o momento se mantém estável. Contudo, exemplos da utilização desta tecnologia no cenário agrícola, em um passado não tão distante, nos mostram que a ausência deste tipo de conhecimento, quando combinada ao uso intensivo destes produtos, levou à evolução de populações resistentes a esta tecnologia (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Dessa maneira fica evidente a importância que tais pesquisas representam para a manutenção da eficiência de *B. thuringiensis* no controle de *T. arnobia* e o impacto que o enfraquecimento desta estratégia de controle poderia representar na proteção dos cultivos e consequentemente para a liderança brasileira no setor florestal.

Considerando-se o exposto sobre o contexto do controle microbiano de *T. arnobia* nos plantios brasileiros de eucalipto, o presente estudo foi realizado em duas frentes de trabalho paralelas, cujos objetivos foram:

- Sequenciamento do genoma completo, análise filogenética e caracterização ultraestrutural do cypovirus encontrado em lagartas de *T. arnobia*.
- Análise da toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa sobre lagartas de *T. arnobia* e observação de seu efeito na ativação de vírus latentes presentes em *T. arnobia*.

# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. O controle microbiano de insetos-praga

As interações existentes entre insetos e seus patógenos têm seus primeiros registros datados há milhares de anos. Enfermidades em bicho-da-seda e abelhas, na Ásia e na Europa, marcaram as primeiras observações de microrganismos como agentes causais de doenças em insetos. Em determinado momento, com a melhor compreensão de tais interações, os conhecimentos obtidos foram direcionados para o controle de insetos prejudiciais, nascendo assim o controle microbiano (ALVES, 1998).

Os principais microrganismos entomopatogênicos foram identificados entre o início do século XIX e a primeira metade do século XX. Entretanto, as pesquisas em torno do seu desenvolvimento como estratégias de controle perderam força a partir de 1940, com o surgimento dos primeiros inseticidas organossintéticos. O baixo custo e a elevada eficiência de controle das novas moléculas impulsionaram sua exploração por décadas, deixando os entomopatógenos e outros agentes de controle biológico em segundo plano (ALVES, 1998).

Com a expansão dos inseticidas químicos os efeitos adversos provocados pelo seu uso indiscriminado ficaram evidentes, sendo observados no meio ambiente, na biodiversidade e nos seres humanos, gerando grande preocupação à sociedade e à comunidade científica (CARSON, 1969). Entretanto, a elevada adesão dos produtores agrícolas e os interesses comerciais envolvidos neste mercado (altamente lucrativo) os mantiveram como principal estratégia adotada para as monoculturas agrícolas até os dias atuais. Pequenas mudanças neste cenário começaram quando algumas populações de insetos se mostraram resistentes. A redução na eficiência, o maior número de aplicações necessárias e principalmente a elevação do custo desta estratégia levou seus consumidores a procurar alternativas (UNSWORTH, 2010). O controle biológico, e dentro deste o controle microbiano, ganhou incentivo em pesquisas e atualmente apresenta projeções de expansão bastante promissoras para os próximos anos (PARRA, 2014).

Enquanto no cenário agrícola brasileiro predomina o controle químico, no cenário florestal é o controle biológico que ocupa tal posição de destaque no país. As grandes extensões dos plantios, a arquitetura das árvores e as tecnologias de

aplicação empregáveis nestas condições são aspectos que dificultam a utilização de inseticidas sintéticos. Entretanto, os fatores determinantes do sucesso do controle biológico no setor florestal são o baixo custo, a eficiência em médio e longo prazo, mas principalmente as pressões exercidas pela certificação da produção florestal, que prioriza a sustentabilidade dos plantios e cada vez mais restringe o uso de inseticidas sintéticos (FSC, 2015).

As alternativas oferecidas pelo controle biológico são várias e o sucesso na escolha entre uma ou outra opção depende de sua adequação no sistema que compreende o inseto-praga, sua planta alvo e o ambiente no qual eles interagem (PARRA et al., 2002).

No Brasil, os plantios florestais são compostos majoritariamente por árvores do gênero *Eucalyptus*. Nestes cultivos os principais grupos de insetos-praga com relação à área atacada são as formigas cortadeiras, as espécies exóticas e os lepidópteros desfolhadores. Para o primeiro grupo, as opções de controle biológico são escassas e desta forma o controle químico ainda é bastante utilizado, apesar dos obstáculos ao seu emprego junto às entidades certificadoras (ZANUNCIO et al., 2016). Para o segundo grupo as opções de controle biológico clássico são fortes, principalmente pela importação de parasitoides. Contudo, como estes também são exóticos, o primeiro obstáculo está no trâmite burocrático para sua importação. Após este, a adaptação da espécie importada ao novo ambiente de introdução é outro obstáculo dos mais importantes a ser avaliado (SCHÜHLI et al., 2016). Para o terceiro grupo, o controle microbiano com base na bactéria *B. thuringiensis* é o mais aplicado (ZANUNCIO et al., 1992; MAPA, 2017). Entretanto, doenças virais e fúngicas também são observadas (IPEF[3]) na forma de enzootias e epizootias, constituindo importante mecanismo natural de regulação das populações destes insetos a campo (ALVES, 1998).

O complexo de lepidópteros desfolhadores é composto por espécies nativas que se adaptaram aos plantios de eucalipto conforme a cultura se expandiu pelo país ao longo dos anos. Mais de vinte espécies têm ocorrência reportada, mas somente algumas poucas desenvolvem níveis populacionais elevados. Estes eventos são monitorados, sendo esta uma prática amplamente adotada pelas empresas do setor florestal (ZANUNCIO et al., 2014). As informações obtidas

[3] Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

revelam que em vários casos, os surtos são controlados naturalmente por mudanças meteorológicas (por exemplo, fortes chuvas) e/ou doenças favorecidas pelas mesmas (IPEF[4]). Contudo, uma ou outra espécie apresenta características que permitem o desenvolvimento de surtos populacionais com maior frequência e severidade que as demais, como é o caso da lagarta-parda-do-eucalipto (JESUS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Os surtos populacionais de *T. arnobia* ocorrem geralmente em períodos ou regiões mais secas, e se caracterizam pela frequência, severidade da desfolha, rápida dispersão e área de abrangência. Nestas situações sempre são observadas diversas espécies de percevejos predadores nativos, em níveis que acompanham as flutuações populacionais de lagartas desfolhadoras. Também já foram reportados vírus entomopatogênicos causando epizootias e regulando naturalmente tais surtos (NASCIMENTO, 2001), entretanto, nenhum destes foi completamente caracterizado e revertido em estratégia de controle microbiano aplicada. Mesmo com a observação de tais mecanismos de regulação natural, muitas vezes estas populações superam os níveis de controle adotados e necessitam que pulverizações de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* sejam feitas para evitar o dano econômico aos plantios.

*B. thuringiensis* produz uma série de proteínas com atividade inseticida (toxinas), possuindo cada grupo das mesmas um modo de ação e seletividade que lhe garantem destaque entre os microrganismos entomopatogênicos. Estas proteínas foram amplamente estudadas no controle dos principais insetos-praga de monoculturas agrícolas e tiveram seus mecanismos de ação elucidados a partir dos mesmos. Com isso foi possível entender os mecanismos pelos quais evoluem populações resistentes a estas proteínas e, portanto, melhor direcionar sua aplicação, inclusive na utilização das mesmas na engenharia genética de plantas modificadas para resistência a insetos (BRAVO et al., 2011; CARRIÈRE; FABRICK; TABASHNIK, 2016; TABASHNIK et al., 2015).

Enquanto as interações das proteínas de *B. thuringiensis* com os insetos-praga agrícolas possuem o mais alto nível de informação disponível, o cenário oposto é observado na interação desta bactéria com insetos-praga florestais no Brasil. Bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* são utilizados há décadas no

[4] Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

controle de lepidópteros desfolhadores em eucalipto, mas até o momento suas proteínas não foram avaliadas separadamente nas espécies deste complexo.

No passado, o uso de *B. thuringiensis* sem o devido conhecimento a respeito dos mecanismos envolvidos na sua toxicidade levou a evolução da primeira população resistente a esta tecnologia no campo. Posteriormente, os pesquisadores mostraram em laboratório que toda espécie, possuindo a devida variabilidade genética e exposta a pressão de seleção, pode evoluir para resistência a esta tecnologia, demonstrando assim a importância de se conhecer a fundo a ação destas proteínas em cada uma de suas espécies-alvo (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013).

## 1.2. O setor florestal e o eucalipto

A área de florestas plantadas no Brasil apresentou crescimento de 50% nos últimos dez anos, passando de 5,2 milhões de hectares em 2005 para 7,8 milhões de hectares em 2015. Dentre as espécies exploradas destaca-se o eucalipto, pela alta diversidade de produtos derivados e capacidade de adaptação a quase todos os cenários climáticos brasileiros. Com isto, sua representatividade também evoluiu no mesmo período, passando de 65% para 71% da área total cultivada (ABRAF, 2006; IBÁ, 2016).

Produtos da indústria de base florestal são utilizados pela sociedade em quase todos os segmentos: óleos essenciais destinados a fins alimentícios, em cosméticos e produtos de saúde; madeira para o setor moveleiro e construção civil; papéis na educação; embalagens no comércio; carvão como fonte de energia para siderúrgicas; ou ainda no mercado de créditos de carbono (IBÁ, 2016).

No mundo todo, a demanda por estes produtos sempre foi suprida pela exploração de florestas nativas, mas o alto consumo sem um planejamento de recuperação levou ao esgotamento da cobertura vegetal natural existente e de maneira irreversível em alguns países (BERTOLA, 2013).

Neste contexto as florestas plantadas brasileiras vêm desempenhando papel fundamental na preservação e recuperação de florestas nativas e no suprimento de matéria-prima, sendo atualmente responsáveis por 91% de toda madeira produzida para fins industriais no país (IBÁ, 2016).

Nativo da Austrália, o gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e possui mais de 600 espécies. Chegou ao Brasil em meados do século XIX, sendo inicialmente utilizado para fins ornamentais. Somente no início do século XX, por iniciativa da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, sua exploração comercial teve início, sendo alternativa para o suprimento de madeira (MORA; GARCIA, 2000; BERTOLA, 2013; CASTRO et al., 2016).

Em 1966, com a lei de incentivos fiscais a empreendimentos florestais, a área com plantios de eucalipto foi consideravelmente ampliada. Entretanto, falhas na legislação e na fiscalização dos recursos disponibilizados, além da falta de informações técnicas e insuficiência de trabalhos científicos realizados neste sentido, conduziram a um quadro de plantios desuniformes com baixa produtividade no passado (CASTRO et al., 2016).

Atualmente o eucalipto contribui para uma economia verde, tendo impacto positivo no desenvolvimento social e econômico das regiões onde está inserido, sendo o responsável pela sustentação da liderança mundial brasileira em produtividade do setor florestal, graças aos plantios clonais de altíssimo desempenho (36 $m^3$/ha.ano) e curto ciclo de rotação (IBÁ, 2016). O Brasil ainda foi o primeiro país a liberar recentemente o plantio comercial de um clone de eucalipto transgênico (ISAAA, 2015; MCTI, 2015). Neste evento, um gene de *Arabidopsis thaliana*, uma planta-modelo em estudos genéticos, foi introduzido em plantas de *Eucalyptus*. O gene em questão codifica a enzima endoglucanase, envolvida diretamente na formação química da celulose. As plantas transgênicas obtidas com esta transformação apresentaram produção de celulose até 20% superior ao seu respectivo material genético convencional, marcando assim o início uma nova era biotecnológica no setor florestal (SILVEIRA, 2013; LEDFORD, 2014).

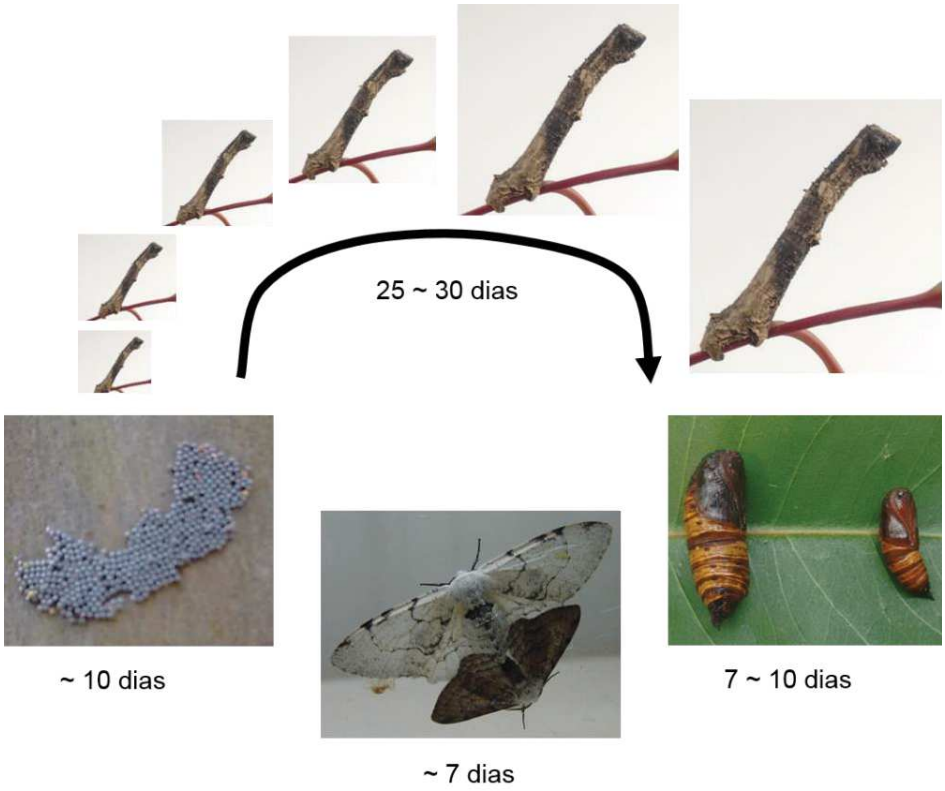
### 1.3. A lagarta-parda-do-eucalipto

Diversas espécies de ocorrência natural sobre mirtáceas nativas fazem parte do grupo de insetos que se adaptaram aos plantios de eucalipto conforme sua expansão pelo país ao longo dos anos. Dentre estes, a lagarta-parda-do-eucalipto, *T. arnobia*, é considerada a principal espécie de lepidóptero desfolhador da cultura no país (JESUS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Sua ocorrência é reportada em quase toda a América do Sul e em parte da América Central. No Brasil é observada em várias regiões, do sul ao norte do país, geralmente em regiões mais secas e em períodos de poucas chuvas, desenvolvendo altos níveis populacionais com maior frequência nestas condições. As mariposas fêmeas apresentam coloração branca, antenas filiformes e envergadura média das asas de 4,8 cm. Os machos são menores e apresentam coloração castanha variável, antenas bipectinadas e envergadura média das asas de 3,5 cm. Geralmente a cópula e as posturas de ovos são realizadas durante o período noturno, mas os machos, por serem mais ativos, também apresentam atividade de voo durante o dia. É uma espécie de elevada capacidade reprodutiva, sendo que cada fêmea pode colocar em média 750 ovos. O período embrionário gira em torno de 10 dias, com viabilidade acima de 90%. De acordo com o desenvolvimento do embrião, a coloração dos ovos fertilizados parte do verde acinzentado para tons avermelhados e logo antes da eclosão atinge tons negros metálicos. As lagartas apresentam seis instares, com duração média do período larval de 27 dias, podendo atingir até 5,0 cm de comprimento. Em repouso assumem posição ereta, mimetizando pequenos ramos secos nos galhos de eucalipto. Nos quatro primeiros instares a lagarta consome em torno de 12 cm² de área foliar, enquanto que nos dois últimos pode consumir 108 cm² em média. Por isso o ataque nos plantios só é notado quando as lagartas já atingiram os últimos instares. O período de desenvolvimento pupal dura de 7 a 10 dias, com os machos emergindo antes das fêmeas (ZANUNCIO et al., 1993).

Surtos populacionais de *T. arnobia* vêm sendo observados com maior frequência nos últimos anos, levando as empresas do setor florestal a articular programas de manejo cooperativo em suas localidades de atuação, de forma que os plantios próprios e os vizinhos sejam submetidos a ações integradas para supressão destas populações, prevenindo a expansão das áreas sob ataque.

**Figura 3 – Fases de desenvolvimento de *T. arnobia*. Representação da fase larval com seis instares e duração média de 25 dias para machos e 30 dias para fêmeas. Dimorfismo sexual em pupas: fêmea (maior à esquerda) e macho (menor à direita). Casal em cópula: fêmea (maior e branca acima) e macho (menor e marrom acinzentado abaixo). Postura de ovos próximos da eclosão (coloração cinza chumbo) sobre tronco de eucalipto.**




## 1.4. *Bacillus thuringiensis* e suas proteínas inseticidas

*B. thuringiensis* foi encontrado primeiramente no Japão no início do século XX por Shigetane Ishiwata, que associou a sua presença à mortalidade de lagartas de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e lhe deu seu primeiro nome, *Bacillus sotto*. Alguns anos depois, na região da Turíngia na Alemanha, Ernst Berliner encontrou a mesma bactéria associada à mortalidade de lagartas de *Anagasta kuehniella*, nomeando-a *Bacillus thuringiensis* em homenagem ao seu local de isolamento. Berliner foi o primeiro a sugerir que esta bactéria poderia ser útil no controle de insetos-praga e, provavelmente por esta razão, sua nomenclatura tenha prevalecido sobre a anterior (DAVIDSON, 2006).

*B. thuringiensis* é uma bactéria de ocorrência cosmopolita, naturalmente encontrada no solo, matéria orgânica, insetos mortos e resíduos de grãos armazenados. Esta bactéria é caracterizada pela produção de proteínas com atividade inseticida (toxinas) durante o seu desenvolvimento, sendo estas efetivas no controle de insetos de diversas ordens, mas principalmente Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Suas proteínas atuam após a ingestão, quando chegam ao intestino médio dos insetos e interagem com receptores nas microvilosidades das células epiteliais, desencadeando processos que levam à morte do inseto (MILNER, 1994).

As principais proteínas inseticidas exploradas para controle de insetos-praga são as proteínas Cry ("*Crystal*"), VIP ("*Vegetative Insecticidal Protein*") e Cyt ("*Cytolytic*") (PERALTA; PALMA, 2017).

Proteínas VIP são produzidas durante o crescimento vegetativo da bactéria, sendo secretadas em forma solúvel no seu substrato de desenvolvimento e sua aplicação no controle de insetos-praga foi possível pela inclusão de seus genes codificadores em plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos (PALMA et al., 2014).

Proteínas Cry e Cyt são produzidas durante o processo de esporulação que ocorre ao final do desenvolvimento bacteriano e se acumulam na forma de cristais, sendo estes o principal ingrediente ativo de formulações de bioinseticidas, juntamente com os esporos. Os genes *cry*, codificadores das proteínas Cry, foram os primeiros a serem introduzidos em plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

Atualmente, todas as plantas transgênicas resistentes a insetos possuem genes *cry* e/ou *vip* em sua constituição, os quais lhes conferem proteção contra os danos causados pela alimentação de seus principais insetos-praga. As toxinas codificadas por tais genes são expressas nestas plantas em elevadas doses, garantindo a morte dos insetos que dela se alimentarem, agindo logo no início dos danos prevenindo maiores perdas (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013).

A transgenia se tornou a tecnologia agrícola mais adotada na história moderna e cada vez mais ganha espaço. Os dados de mais de vinte anos de condução de culturas transgênicas a campo, obtidos em estudos envolvendo os maiores cientistas da área na atualidade, não deixam dúvidas sobre os benefícios da tecnologia (BROOKES; BARFOOT, 2013). Um longo caminho foi percorrido e o

ponto chave para o sucesso atual foi o conhecimento dos mecanismos de interação destas proteínas aos receptores e como tais mecanismos influenciam no manejo de insetos-praga, principalmente com relação à evolução de populações resistentes.

Os mecanismos de interação das proteínas de *B. thuringiensis* aos receptores nos insetos variam de acordo com os tipos de proteína (Cry, Cyt ou VIP) e os grupos aos quais fazem parte. Estes grupos são formados em função da identidade das sequências de aminoácidos codificadas por seus genes. Entre as proteínas Cry, quando a identidade entre as sequências se mostra inferior a 45% as mesmas recebem um número (1, 2, 3,...) que as diferencia em grupos (Cry1 até Cry74). Dentro de cada grupo, quando a identidade das sequências se mostra inferior a 78% é atribuída uma letra maiúscula (A, B, C,...) que diferencia tais sequencias em classes (Cry1A até Cry1N). Nestas classes, quando a identidade entre as sequências é inferior a 95%, uma letra minúscula (a, b, c,...) as diferencia em subclasses (Cry1Aa até Cry1Aj). Por fim, para cada sequência dentro de uma subclasse é atribuído novamente um número (Cry1Aa1 até Cry1Aa24) quando sua identidade com as demais supera 95%, diferenciando-as dentro do banco de dados em função de sua data de deposição ou publicação. Desta maneira, atualmente são conhecidas: 38 sequências de genes *cyt* dispostas nos grupos *cyt1*, *cyt2* e *cyt3*; 142 sequências de genes *vip* dispostas nos grupos *vip1*, *vip2*, *vip3* e *vip4*; 789 sequências de genes *cry* dispostas em 74 grupos (*cry1* a *cry74*) (CRICKMORE et al., 1998; CRICKMORE, 2017).

Como visto acima, os genes *cry* são muito mais abundantes e também os mais estudados. Suas proteínas codificadas possuem atividade inseticida direcionada a diferentes ordens de insetos dependendo do grupo a que pertencem. Proteínas do grupo Cry3 são conhecidas pela sua eficiência sobre insetos da ordem Coleoptera, enquanto proteínas do grupo Cry1 são igualmente conhecidas pela sua eficiência sobre insetos da ordem Lepidoptera. Este último grupo possui o maior número de genes descritos, sendo conhecidas 280 sequências distribuídas em 14 classes (*cry1A* até *cry1N*). Atuando sobre o complexo de insetos mais nocivos para a agricultura (os lepidópteros) foi por esta razão alvo do maior número de estudos, alcançando assim o mais completo nível de conhecimento com relação aos seus mecanismos de ação (CRICKMORE et al., 1998; TABASHNIK et al., 2015; CRICKMORE, 2017).

### 1.4.1. Proteínas Cry1 e seus mecanismos de ação

Os primeiros bioinseticidas desenvolvidos a base de *B. thuringiensis* carregavam proteínas Cry1 como principais ingredientes ativos em suas formulações. Relacionado diretamente ao controle de insetos da ordem Lepidoptera, este grupo de proteínas sempre atraiu mais atenção que os demais grupos, visto que esta ordem de insetos possui as principais e mais numerosas espécies danosas à agricultura (MILNER, 1994).

Os estudos que elucidaram os mecanismos de ação destas proteínas sobre insetos da ordem Lepidoptera conduziram ao conhecimento atual sobre dois modos de ação distintos.

O primeiro foi elucidado há mais tempo e reconhecido como o modelo clássico de ação da bactéria *B. thuringiensis*. Nele os cristais ingeridos pelas lagartas encontram no intestino médio das mesmas condições de pH alcalino, sendo solubilizados e liberando as protoxinas. Estas sofrem a ação de proteinases presentes no suco gástrico dos insetos e são clivadas. Parte dos fragmentos constitui a fração tóxica ativada e a outra parte não possui função atribuída neste mecanismo. Os fragmentos ativados atravessam a membrana peritrófica, ligando-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células do intestino médio dos insetos. Essa ligação leva a formação de poros, que alteram a permeabilidade da membrana, levando ao desequilíbrio osmótico. A célula passa a absorver mais água e de forma descontrolada, conduzindo à lise celular e, consequentemente, a ruptura e desintegração das células do intestino médio leva o inseto à morte (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

O segundo modo de ação foi comprovado mais recentemente a partir de trabalhos específicos com as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac no controle de populações de insetos resistentes às mesmas. Estas proteínas possuem duas porções distintas que definem suas protoxinas. A primeira porção, chamada de aminoterminal (N-terminal), corresponde aos domínios I, II e III da proteína e é relacionada ao seu modo de ação clássico, dando origem à fração tóxica ativada após a clivagem de sua protoxina pelas proteinases. A segunda porção, conhecida como carboxiterminal (C-terminal), corresponde aos domínios IV, V, VI e VII da proteína e acreditava-se que não possuía ação tóxica, até que, recentemente, descobriu-se que o segundo modo de ação se realiza com a sua participação. Os domínios V e VII da porção

carboxiterminal são muito parecidos estruturalmente aos domínios II e III da porção aminoterminal, mas apresentam uma diferença fundamental, se ligando diretamente aos receptores, sem a necessidade de sua clivagem para desencadearem toxicidade. (TABASHNIK et al., 2015).

Os bioensaios comparando as protoxinas da porção carboxiterminal e suas frações tóxicas ativadas da porção aminoterminal, em populações suscetíveis e resistentes, revelaram diferenças nas vias de ação com relação a tais populações. Em populações suscetíveis, a via tóxica primária se dá pela clivagem das protoxinas da porção aminoterminal, convertendo-as em frações tóxicas ativadas (modo de ação clássico). Neste modo, as protoxinas da porção carboxiterminal (não clivadas) causam mortalidade através de uma via secundária. Entretanto, em populações resistentes, para as quais a potência das frações tóxicas ativadas foi reduzida, justamente pela interrupção da via tóxica primária, as protoxinas não clivadas atuam através da via secundária, sendo mais potentes do que as frações tóxicas ativadas (TABASHNIK et al., 2015).

O entendimento sobre as interações destas proteínas com os receptores é fundamental para direcionar corretamente sua aplicação no controle de insetos-praga, prevenindo a evolução de populações resistentes às mesmas.

O desenvolvimento de populações de insetos-praga resistentes às proteínas de *B. thuringiensis* já foi verificada a campo e comprovadamente possível para outros casos em condições de laboratório. Assim como aconteceu para alguns inseticidas sintéticos, o uso contínuo de princípios ativos sem rotação dos mecanismos de ação conduziu a evolução de populações resistentes. No caso de *B. thuringiensis* diferentes proteínas podem atuar como um mesmo princípio ativo se possuírem afinidade de ligação aos mesmos receptores (potencial de resistência cruzada). Por isso a importância de se conhecer a ação de cada proteína com relação aos receptores presentes nos insetos, direcionando a escolha certa entre quais delas devem ser exploradas, seja através de um bioinseticida ou na sua expressão em transgênicos (MOAR et al., 2008; BRAVO et al., 2011).

## 1.5. Vírus Entomopatogênicos

Enfermidades causadas por vírus em insetos são observadas há milhares de anos, sendo os primeiros casos relatados em criações do bicho-da-seda na Ásia (ALVES, 1998). Contudo, somente na segunda metade do século XIX cientistas descreveram pela primeira vez corpos poliédricos associados às mesmas (CHRISTIAN; POSSEE, 2008).

Com dimensões muito inferiores aos demais entomopatógenos, estudos mais detalhados sobre as partículas virais só foram possíveis com a evolução das técnicas de microscopia e posteriormente com os avanços da biologia molecular, já na segunda metade do século XX (BRANDT, 1947; ROHRMANN; BEAUDREAU, 1977; ROHRMANN et al., 1978).

Doenças virais são eventualmente observadas em lepidópteros desfolhadores nos plantios florestais brasileiros, representando importante mecanismo natural para regulação dos níveis populacionais destas espécies. Estas ocasiões são oportunidades únicas nesta linha de pesquisa, possibilitando o isolamento e identificação de vírus entomopatogênicos que podem ser convertidos em produtos formulados, como foi o caso do *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopoliedrovirus* (CoveMNPV), primeiro bioinseticida viral utilizado pelo setor florestal no Brasil (CASTRO et al., 2009).

Estes eventos estão relacionados principalmente às estratégias que estes agentes infecciosos possuem para transmissão vertical e horizontal dentro das populações, podendo se manifestar na forma de enzootias ou epizootias (ALVES, 1998).

Atualmente grande diversidade de tipos de vírus entomopatogênicos é conhecida. Entretanto, somente alguns destes possuem uma característica fundamental que permite sua exploração no controle microbiano aplicado, que é a oclusão de suas partículas virais em corpos poliédricos de natureza protéica, também conhecidos como corpos de oclusão ou poliedros. Os demais vírus, que não apresentam tais estruturas, são predominantes e também possuem importância, contudo, em ocorrências naturais (não aplicadas), uma vez que ocorrem na forma de partículas livres, não protegidas no interior de poliedros, dificultando sua manipulação e principalmente sua persistência no ambiente fora de seus

hospedeiros, devido à exposição direta às condições ambientais (HARRISON; HOOVER, 2012).

Os vírus entomopatogênicos que apresentam partículas virais oclusas em poliedros são os baculovirus, entomopoxvirus e cypovirus.

Os baculovirus fazem parte da família Baculoviridae e compreendem os nucleopoliedrovírus (NPVs) e os granulovírus (GVs), sendo distribuídos em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (NPVs de lepidópteros); *Betabaculovirus* (GVs de lepidópteros); *Gammabaculovirus* (NPVs de himenópteros) e *Deltabaculovirus* (NPVs de dípteros). São os vírus mais estudados e aplicados no controle microbiano dos principais insetos-praga conhecidos atualmente. Seu genoma é composto por DNA fita dupla circular e seu tamanho pode variar entre 80 e 180 kpb. Sua patologia envolve uma infecção primária (mediada pelos corpos de oclusão) e outra secundária (mediada pelos nucleocapsídeos). Nos nucleopoliedrovírus os corpos de oclusão são chamados de poliedros e sua matriz protéica é a base de poliedrina, enquanto nos granulovírus os corpos de oclusão são chamados grânulos e sua proteína é chamada granulina. A poliedrina é uma proteína expressa em altos níveis na fase tardia da infecção viral e devido a sua alta expressão, a região do gene que a codifica é utilizada na construção de baculovirus recombinantes que são utilizados como vetores de expressão (CHRISTIAN; POSSEE, 2008).

Os entomopoxvirus pertencem à família Poxviridae (subfamília Entomopoxvirinae) e se distribuem em três gêneros: *Alphaentomopoxvirus* (ocorrência em coleópteros), *Betaentomopoxvirus* (ocorrência em lepidópteros e orthópteros) e *Gammaentomopoxvirus* (ocorrência em dípteros). Seu genoma é composto por DNA fita dupla linear, geralmente acima de 220 kpb. Apesar do número relativamente grande de isolados conhecidos, pouco se sabe sobre sua patologia ou ecologia (CHRISTIAN; POSSEE, 2008).

O gênero *Cypovirus* pertence à família Reoviridae e seus membros possuem genoma composto de RNA fita dupla segmentado. Recentemente lagartas de *T. arnobia* apresentaram mortalidade com sintomas de infecção viral e observações preliminares indicaram a presença de corpos de oclusão. A análise do material genético do vírus encontrado revelou tratar-se de um cypovirus.

### 1.5.1. O gênero *Cypovirus*

As primeiras observações de poliedros no citoplasma de células de insetos foram feitas em lagartas de *B. mori* ainda no século XIX (ISHIMORI, 1934). Tais vírus, atualmente denominados cypovirus, pertencem à família Reoviridae e compõe o único gênero desta família cujas partículas virais são oclusas em poliedros (COULIBALY et al., 2007).

A arquitetura dos poliedros observados em *Cypovirus* é semelhante àquela vista nos *Alphabaculovirus*, apesar da distância evolucionária e das diferenças fundamentais nos ciclos de vida dos mesmos (COULIBALY et al., 2007). Estes poliedros podem conter uma única partícula viral, várias ou nenhuma, medindo entre 0,1 µm e 10 µm de diâmetro e apresentando variações na simetria em função do isolado e do hospedeiro em questão. Mais de 95% de seu peso seco é correspondente à poliedrina, uma proteína de 25 a 37 kDa, expressa tardiamente na infecção e em quantidades muito superiores as demais proteínas virais, permanecendo seu mecanismo de controle de síntese ainda desconhecido (ICTV, 2011; HARRISON; HOOVER, 2012).

*Cypovirus* possuem material genético geralmente composto por dez segmentos de RNA fita dupla (*double stranded* RNA – dsRNA). Cada um destes segmentos é único e contém um complexo transcriptase. Dessa forma, estes vírus conseguem manter suas funções enzimáticas mesmo em condições onde ocorra quebra das partículas virais, como, por exemplo, repetidas ações de congelamento e descongelamento. Esta característica parece ser única deste grupo de vírus. A replicação e montagem das partículas ocorrem no citoplasma das células infectadas. Estas apresentam formato icosaédrico com 60 a 70 nm de diâmetro, não sendo envelopadas. Existem evidências de que a síntese do RNA viral possa ocorrer também no núcleo. Além disso, em se tratando de dez diferentes segmentos genômicos, o mecanismo pelo qual estes são selecionados e agrupados na formação das partículas ainda não está esclarecido (ICTV, 2011; HARRISON; HOOVER, 2012).

Sua ocorrência já foi registrada em centenas de insetos das ordens Lepidoptera, Díptera, Hymenoptera e Coleoptera, sendo reconhecidas dezesseis espécies-tipo segundo o Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* – ICTV). As diferentes espécies de *Cypovirus*

são hoje diferenciadas pelos padrões de migração eletroforética de seus segmentos e pela análise das sequências de nucleotídeos de seus segmentos, sendo este último critério ainda não muito bem definido entre os especialistas na área. Estudos mostram que a identidade de aminoácidos entre sequências de isolados de diferentes espécies de *Cypovirus* é por volta de 20 a 23%, enquanto que a identidade de aminoácidos entre sequências de isolados de uma mesma espécie pode ir de 89 a 98% (ICTV, 2011).

Infecções por *Cypovirus* se desenvolvem em geral de forma restrita ao intestino médio dos insetos, mas existem alguns casos relatados sobre infecções em outros tecidos ou compartimentos do intestino. Nas células infectadas o retículo endoplasmático é degradado progressivamente, as mitocôndrias se alongam e o citoplasma se torna altamente vacuolizado. Em alguns casos o núcleo mostra algumas alterações citopatológicas. Nos estágios finais, a hipertrofia celular é comum e as microvilosidades são reduzidas ou completamente ausentes. Um grande número de poliedros é produzido e devido à lise celular são liberados no lúmen, sendo então excretados. O pH do intestino é reduzido durante a infecção, prevenindo a dissolução da progênie de poliedros. A via de infecção principal se dá pela ingestão dos poliedros pelo alimento contaminado. Os sintomas começam dois a três dias após o início da infecção, quando as lagartas passam a diminuir sua alimentação e movimentação, tornando-se moribundas. Pequenas mudanças de coloração podem ser notadas e excrementos escuros (diarreia ou vômito) são observados com o avanço da doença. No momento da morte, as lagartas ficam penduradas aos ramos e folhas pelos pares de pernas posteriores (ZEDDAM et al., 2003).

A maioria das infecções por cypovirus produzem doenças crônicas, sem grandes taxas de mortalidade dos indivíduos, sendo que alguns chegam a fase adulta, mesmo que muito doentes. O tamanho e o peso das lagartas são reduzidos e o tempo de desenvolvimento pode aumentar até 1,5 vezes o ciclo normal. O tamanho das pupas doentes frequentemente é menor e os eventuais adultos apresentam dificuldades na emergência, deformações, dificuldades no voo e problemas na oviposição. Estes vírus também podem ser transmitidos verticalmente na superfície dos ovos, mas não foram observados casos de transmissão interna aos ovos (ICTV, 2011).

No ambiente extracelular, as partículas virais embebidas nestes poliedros podem resistir à dessecação, congelamento e degradação enzimática. Além disso, os poliedros toleram tratamentos químicos que causariam desnaturação a muitas proteínas, ainda preservando sua organização estrutural. Em contraste, estes poliedros se dissolvem com facilidade quando expostos a soluções com pH acima de 10,5 (COULIBALY, et al.,2007).

**CAPÍTULO 1 – Genoma completo e caracterização ultraestrutural de um cypovirus isolado de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)**

**AUTORES:** Horta, André B.; Ardisson-Araujo, Daniel M. P.; Silva, Leonardo A.; Melo, Fernando L.; Morgado, Fabrício S.; Lemos, Manoel V.F.; Ribeiro, Zulene A.; Boiça-Junior, Arlindo L.; Wilcken, Carlos F.; Ribeiro, Bergmann M.

## RESUMO

O Brasil é um dos principais produtores de árvores do gênero *Eucalyptus* no mundo e mantém a liderança mundial em produtividade florestal devido aos plantios clonais de materiais genéticos de alto desempenho. Surtos populacionais de insetos-praga frequentemente ocorrem nos plantios comprometendo seu desenvolvimento e medidas de controle são necessárias para redução dos danos. A lagarta-parda-do-eucalipto, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), é uma das espécies mais nocivas aos plantios brasileiros de eucalipto e seus surtos populacionais, ano após ano, causam severas áreas de desfolha com dezenas de milhares de hectares em extensão. Recentemente, um vírus patogênico a *T. arnobia* foi encontrado e poliedros foram isolados do macerado das lagartas mortas, despertando grande interesse pelo seu estudo e possível uso futuro como alternativa de controle para a lagarta-parda-do-eucalipto. O presente estudo teve por objetivos obter o genoma completo deste novo entomopatógeno e realizar sua análise filogenética e caracterização ultraestrutural. Poliedros purificados foram analisados por microscopia eletrônica, revelando corpos icosaédricos de oclusão com partículas virais não envelopadas em seu interior. O material genético extraído mostrou um padrão de migração eletroforética com dez segmentos de dsRNA em gel de agarose 1%. O sequenciamento do genoma viral completo confirmou a natureza do vírus encontrado como membro do gênero *Cypovirus*, pertencente à família Reoviridae. Análises filogenéticas indicaram sua maior proximidade aos vírus da espécie *cypovirus* 14. Na tentativa de melhor compreender sua biologia, o gene da poliedrina foi clonado e expresso em um baculovirus recombinante, cuja infecção em linhagens celulares de insetos resultou na produção de cristais proteicos no citoplasma das células infectadas, com formato e tamanhos diferenciados. De acordo com os

resultados, este isolado viral recebeu o nome *Thyrinteina arnobia cypovirus* 14 (TharCPV-14) como proposta de identificação. Estudos futuros avaliarão este vírus como mais uma alternativa de controle para lagartas de *T. arnobia* nos plantios de eucalipto brasileiros.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Cypovirus*; Proteção Florestal; Controle Biológico; *Eucalyptus*; *Thyrinteina arnobia*.

**ABSTRACT**

Brazil is one of the main producers of trees from the *Eucalyptus* genus in the world and maintains the world leadership in forest productivity due to clonal plantations of high performance genetic materials. Outbreaks of insect-pests frequently occur on plantations compromising their development and control measures are necessary to reduce damages. The eucalyptus brown looper, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), is one of the most harmful species of Brazilian eucalypt plantations and its outbreaks, year after year, have caused severe areas of defoliation with tens of thousands of hectares in extension. Recently, a pathogenic virus to *T. arnobia* was found and polyhedra were isolated from macerate of dead caterpillars, arousing great interest in its study and possible future use as an alternative of control for the eucalyptus brown looper. The present study aimed to obtain the complete genome of this new entomopathogen and perform its phylogenetic analysis and ultrastructural characterization. Purified polyhedra were analyzed by electron microscopy, revealing icosahedral occlusion bodies with non-enveloped viral particles inside. The extracted genetic material showed an electrophoretic migration patterns with ten dsRNA segments in agarose gel 1%. The sequencing of the complete viral genome confirmed the nature of the virus found as a member of the *Cypovirus* genus, belonging to the Reoviridae family. Phylogenetic analysis indicated their closer relation to the viruses from *cypovirus* 14 species. In an attempt to better understand their biology, the polyhedrin gene was cloned and expressed in a recombinant baculovirus, whose infection in insect cell strains resulted in the production of proteic crystals in the cytoplasm of infected cells, with differenced size and shape. According to the results, this viral isolate received the name *Thyrinteina arnobia* cypovirus 14 (TharCPV-14) as a proposal for identification.

Future studies will evaluate this virus as one more alternative of control for *T. arnobia* caterpillars in Brazilian eucalypts plantations.

**KEYWORDS:** *Cypovirus*; Forest Protection; Biological Control; *Eucalyptus*; *Thyrinteina arnobia*.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o líder mundial em produtividade florestal e movimentou uma receita de US$ 9,0 bilhões em exportações de produtos da indústria de base florestal no ano de 2015. O eucalipto é o principal responsável por este sucesso, ocupando aproximadamente 71% dos 7,8 milhões de hectares de florestas plantadas no país e apresentando plantios com produtividade média de 36 $m^3$/ha.ano (IBÁ, 2016). Entretanto, a atividade florestal brasileira tem enfrentado grandes desafios no controle de insetos-praga, cujos danos causados aos plantios afetam diretamente sua produtividade.

As condições oferecidas pela monocultura do eucalipto favorecem surtos populacionais de diversas espécies, devido aos plantios homogêneos com materiais genéticos de alto desempenho, mas baixa variabilidade genética por anos consecutivos nas mesmas áreas (HURLEY et al., 2016). Os lepidópteros desfolhadores constituem o terceiro maior grupo de insetos-praga atacando plantações de eucalipto no Brasil, atrás apenas dos complexos de formigas cortadeiras e espécies exóticas (IPEF[5]). A principal espécie de lagarta desfolhadora de eucalipto no Brasil é a lagarta-parda-do-eucalipto, *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae), que pode causar sérios danos às plantações (JESUS et al., 2015; RIBEIRO et al, 2016). Este inseto é principalmente controlado por bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, combinados em algumas ocasiões com liberações de inimigos naturais (parasitoides de pupa e percevejos predadores) para manter suas populações em baixos níveis de equilíbrio (BARBOSA et al., 2016; HOLTZ et al., 2006).

As plantações florestais brasileiras estão em sua maioria sob certificação pelo Forest Stewardship Council (FSC) (LEMES et al., 2016), cujas diretrizes visam a sustentabilidade das plantações, priorizando a supressão de surtos de insetos-praga através de estratégias de controle não-químicas, entre elas, principalmente aquelas baseadas no controle biológico (FSC, 2015).

Neste sentido, um vírus encontrado em lagartas mortas de *T. arnobia* despertou grande interesse, devido a observação de poliedros nas amostras obtidas. A produção de tais estruturas é uma das características fundamentais para o

[5] Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

desenvolvimento de vírus como bioinseticidas (ALVES, 1998; HARRISON; HOOVER, 2012). Também conhecidos pelo termo corpos de oclusão (*Occlusion Bodies* – OBs), tais poliedros carregam as partículas virais em seu interior, preservando sua capacidade infecciosa, além de garantir sua maior persistência no ambiente externo ao hospedeiro de origem e facilitar sua manipulação e formulação para fins comerciais. Entretanto, muito antes de se considerar o desenvolvimento de um bioinseticida, é necessário conhecer o entomopatógeno em seus aspectos mais básicos, começando pela sua correta identificação. Análises preliminares por eletroforese em gel de agarose, mostraram o material genético extraído com um padrão de migração eletroforética fragmentado, sendo observados dez segmentos de RNA dupla fita (*double stranded* RNA - dsRNA). A presença de corpos de oclusão, com material genético composto de dsRNA e presença de diversos segmentos é característica de vírus do gênero *Cypovirus* (CPVs), pertencente à família Reoviridae, subfamília Spinareovirinae, que são específicos de artrópodes (ICTV, 2011).

De acordo com o exposto, o presente estudo teve por objetivos o sequenciamento do genoma completo do cypovírus encontrado, sua análise filogenética e caracterização ultraestrutural dos poliedros observados.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Origem das amostras

Lagartas mortas de *T. arnobia* foram coletadas em criação mantida no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal. Os insetos eram mantidos com suprimento contínuo de folhas de *Eucalyptus camaldulensis* para alimentação, devidamente higienizadas em solução de hipoclorito de sódio 0,5% e disponibilizadas em gaiolas de acrílico em ambiente controlado (temperatura: 25±2$^{o}$C, umidade relativa: 70% e fotofase de 12h).

## 2.2. Purificação e análise ultraestrutural

As lagartas coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia e Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular na Universidade de Brasília. As amostras foram maceradas em solução salina tamponada com fosfato (PBS-1X, 137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.0 mM Na2HPO4, 2.0 mM KH2PO4, pH 7.4) para homogeneização, filtradas em camadas de gaze para retirada de partículas grosseiras e deixadas sob agitação magnética por 30min em solução de SDS 1%. Na sequência foram realizadas lavagens com SDS 1% e centrifugação a 7.000 xg por 10 min para clarificação por três vezes. Para a microscopia eletrônica de varredura 100 µl da suspensão filtrada contendo poliedros foi incubada com 300 µl de acetona a 25°C por 1 h. A solução foi colocada em suportes metálicos e deixada "overnight" a 37°C para secagem, sendo no dia seguinte revestida com ouro em aparelho "*Sputter Coater*" (Balzers) por 3 min e posteriormente observada em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 840 A at 10 kV. Para a microscopia eletrônica de transmissão, poliedros purificados foram submetidos a solução fixadora Karnovsky (2.5% glutaraldeido, 2% paraformaldeido, in 0,1 M, tampão cacodilato pH 7.2) por 2 h, pós fixação em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por 1 h e então incubação com 0,5% acetato de uranila, desidratados em acetona e emblocados em resina Spurr. Os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 2% e observados em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS TEM 109 at 80 kV.

## 2.3. Anticorpos

Corpos de oclusão purificados ($10^6$ OBs/ml) foram usados em injeções intramusculares em ratos machos com 8 semanas de idade (Gnotobiotic Sprague–Dawley linhagem CD). Os animais foram imunizados em um intervalo de 15 dias entre as injeções, sendo a primeira ministrada com Adjuvante completo Freund e OBs (na proporção 1:1), a segunda com Adjuvante incompleto Freund e OBs (na proporção 1:1) e a terceira somente com a suspensão de OBs. O antissoro contendo os anticorpos produzidos foi coletado após 15 dias da última injeção.

## 2.4. Isolamento do RNA, sequenciamento genômico e análises

A extração de RNA foi realizada com TRIZOL® (Invitrogen) de acordo com recomendações do fabricante usando 200 µl da suspensão de corpos de oclusão purificados. A qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio 0.01% e visualizado sob luz UV. O genoma viral de RNA foi enviado para sequenciamento na empresa Macrogen (Coréia do Sul) em plataforma HiSeq™ 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA). Os fragmentos gerados tiveram os oligonucleotídeos iniciadores e as regiões de baixa qualidade retirados, sendo alinhados pela ferramenta "*de novo assembly"* usando o software CLC Genome Workbench 6.5.2 (CLC bio, Denmark). Os alinhamentos obtidos foram comparados pela ferramenta tBLASTx (ALTSCHUL et al., 1990) com base no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A anotação do genoma e o mapeamento dos fragmentos foi realizado pelo software Geneious 7.1.8 (KEARSE et al., 2012).

## 2.5. Análise filogenética

O gene *polh*, que codifica a poliedrina, foi o escolhido para construção da árvore filogenética pela grande disponibilidade de sequências deste gene depositadas no banco de dados GenBank. Somente as sequências encontradas com "*e-value*" inferior a $1e^{-20}$ foram utilizadas. Sequências redundantes (identidade superior a 90%) foram omitidas nas análises. O método de alinhamento MAFFT (KATOH et al., 2002) foi conduzido com todos os genes da poliedrina de cypovirus publicamente disponíveis. A inferência filogenética foi realizada pelo método FastTree com suporte de ramo estimado pelos métodos de Shimodaira-Hasegawa (ANISIMOVA et al., 2011) e Bootstrap pelo software Geneious 7.1.8 (KEARSE et al., 2012).

## 2.6. Amplificação do gene *polh* e clonagem

Para amplificação do gene da poliedrina 100 ng de cDNA do cypovirus foram usados em reação de PCR usando os primers TharCPVPOLHHisTagF (5'-TATCGAGGGATCCATGCACCATCACCATCACCAT*CCATGG***ATG**GAGAACTCCGC

AAGACAAGTCGCGCAAGATA-3') e TharCPVPOLHR (5'-AAGCAC*AAGCTT*AATAA TGCGCATGGTGACGAAT-3'). Os sítios de restrição BamHI (GGATCC) e HindIII (AAGCTT) estão grafados em itálico e os códons his-tag estão sublinhados após o códon de início em negrito (ATG). A amplificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose (0.8%) e mostrou banda na altura esperada de 800 pb, sendo purificada usando o kit de purificação GFX PCR DNA Gel Band Purification (GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante. O DNA eluído e o vetor de transferência pFASTBAC-1 (Invitrogen) foram individualmente digeridos duplamente com as enzimas BamHI (Promega) and HindIII (Promega) e purificados em gel de eluição usando Kit illustra GFX PCR DNA Gel Band Purification (GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante. A ligação foi feita pela mistura de 100 ng do vetor digerido e 300 ng do fragmento de DNA de *polh* amplificado, usando T4 DNA ligase (Promega), seguindo-se de transformação em células competentes DH10B. O vetor de transferência resultante foi nomeado pFASTTharCPV6xHISPOLH (5452 bp).

### 2.7. Construção de um baculovirus recombinante

O vetor de transferência pFASTTharCPV6xHISPOLH (100 ng) foi usado na transformação de células competentes DH10BAC (Invitrogen) e as colônias resultantes foram selecionadas baseando-se na sua coloração e na detecção por PCR usando oligonucleotídeos universais M13F/R, de acordo com recomendações do Kit Bac-to-Bac (Invitrogen). As colônias positivas resultantes foram cultivadas por uma noite e o DNA viral foi isolado usando o sistema de purificação de DNA Wizard Plus SV Miniprep (Promega). O Bacmídeo [6] de DNA recombinante (500 ng), nomeado bTharCPV6xHISPOLH (ou BACTharCPV6xHISPOLH), foi usado para transfectar 2 x $10^5$ células de insetos Tn5B[7], usando FugeneHD (Promega) como veículo de transfecção[8]. A infecção foi conduzida por 5 dias e as células foram inspecionadas diariamente para verificação de efeitos citopáticos dos vírus. O

[6] Bacmídeo: plasmídeo (molécula de DNA circular) que carrega todo o genoma de um baculovirus, além das sequências que permitem sua replicação em células de *Escherichia coli*.
[7] Tn5B: linhagem celular obtida da espécie *Trichoplusia ni* (GRANADOS; DERKSEN; DWYER, 1986).
[8] Transfecção: técnica utilizada para transferência de ácidos nucléicos de origem viral para o interior de células receptoras. Neste caso, o gene da poliedrina do cypovirus foi clonado em um bacmídeo, o qual está sendo transferido para células de insetos, nas quais irá induzir nestas a formação de cristais devido a expressão do gene clonado.

sobrenadante das células Tn5B infectadas foi coletado, centrifugado (2000 x g / 10 min) para remoção de restos celulares e uma alíquota (100-500 µl) foi usada para infectar 5 x $10^6$ células de outra linhagem celular de insetos Sf21[9]. Depois de 5 dias de infecção, o sobrenadante desta infecção foi coletado, como descrito, titulado de acordo com O'Reilly, Miller e Luckow (1992) e aliquotado como primeira progênie estoque.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Análises estruturais e ultraestruturais

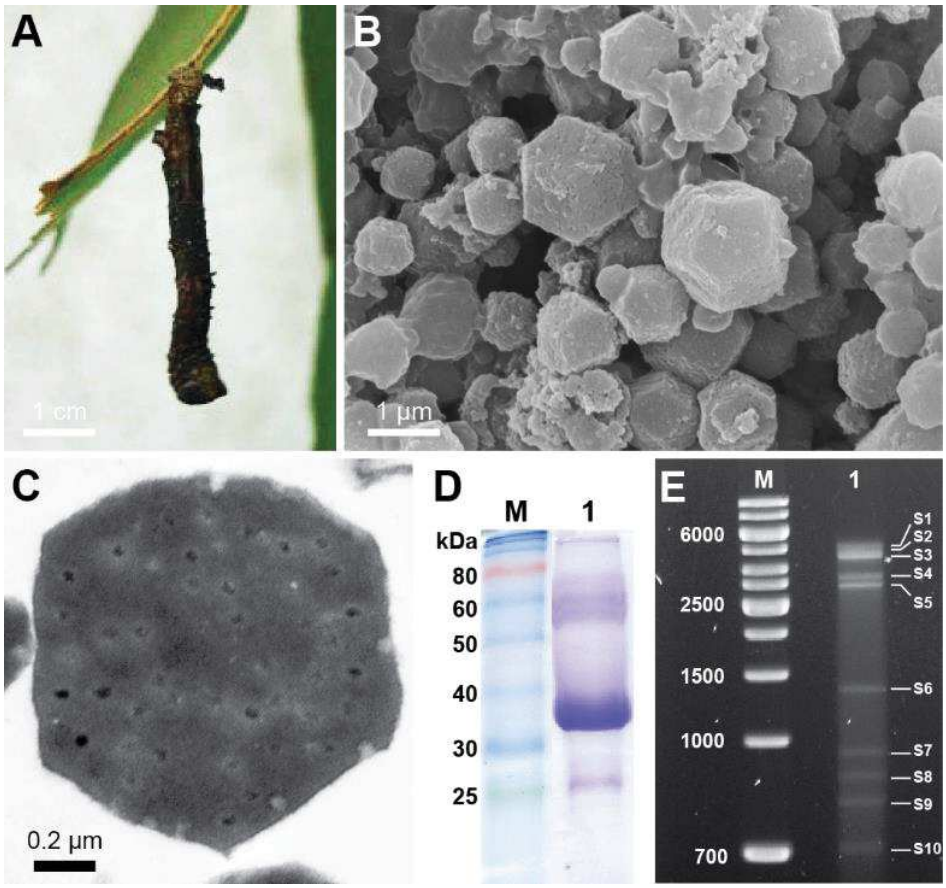
Durante vinte gerações lagartas de *T. arnobia* foram mantidas saudáveis em condições de criação em laboratório. Em julho de 2011, sintomas de infecção viral foram identificados e em menos de 15 dias após a primeira observação, centenas de lagartas entre o terceiro e quinto instar morreram penduradas pelas pernas posteriores e com o tegumento intacto (Figura 1A). A doença acabou por dizimar completamente a população mantida no laboratório.

Os extratos dos insetos mortos foram analisados por microscopia de luz e eletrônica. A microscopia de luz apontou partículas com estrutura similar à de poliedros. O material foi purificado e submetido a microscopia eletrônica de varredura e transmissão, confirmando a presença de corpos de oclusão com simetria icosaédrica e diversos tamanhos (Figura 1 B), apresentando várias partículas virais embebidas em sua matriz protéica (Figura 1 C).

Para confirmação da presença da poliedrina nos corpos de oclusão, os mesmos foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE e uma forte banda na altura de 30kDa foi observada (Figura 1 D). A extração do ácido nucléico dos poliedros revelou um padrão de migração eletroforética com dez segmentos (Figura 1 E). Os dados obtidos confirmam que o novo entomopatógeno pertence ao gênero *Cypovirus*.

[9] Sf21: linhagem celular obtida da espécie *Spodoptera frugiperda* (VAUGHN et al., 1977).

**Figura 1 – (A) Lagarta de quinto instar de *T. arnobia* morta pendurada à folha. (B) MEV do extrato de lagartas infectadas mostrando poliedros com simetria icosaédrica. (C) MET do corte de um poliedro mostrando em detalhe partículas virais oclusas na matriz proteica de poliedrina. (D) SDS-PAGE 5-12% da proteína total dos poliedros, mostrando banda intensa na altura de 30kDa. (E) Padrão de migração eletroforética com dez segmentos de dsRNA em gel de agarose 1%.**




### 3.2. Sequenciamento genômico

Ao todo, dez segmentos genômicos (S1-10) foram confirmados pelo sequenciamento, com sequências variando de 978 a 4466 nucleotídeos, para as quais ORFs ("*Open Reading Frames*") de 250 a 1305 aminoácidos foram identificadas. Seus códigos de acesso no banco de dados GenBank são exibidos no Quadro 1, bem como as demais características e funções pressupostas.

O primeiro e maior segmento (S1) contém uma longa ORF de 3918 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 1305 aminoácidos e massa molecular

em torno de 149 kDa. Sua sequência de aminoácidos apresenta 96% de identidade com a enzima RNA polimerase (RdRP) codificada pelo segmento 1 de *Lymantria dispar* cypovirus 14 (LydiCPV-14) (Código de acesso GenBank: NP_149135.1), 44% de identidade à RNA polimerase codificada pelo segmento 2 de *Bombyx mori* cypovirus 1 (BomoCPV-1) (Código de acesso GenBank: AAK20302.1) e 32% à RNA polimerase codificada pelo segmento 2 de *Thaumetopoea pityocampa* cypovirus 5 (ThpiCPV-5) (Código de acesso GenBank: AJC97790.1).

O segundo segmento (S2) possui uma ORF do nucleotídeo 59 ao nucleotídeo 3970, codificando uma proteína de 1303 aminoácidos com massa molecular de aproximadamente 148 kDa. Sua sequência de aminoácidos mostra identidade de 94% com a principal proteína do núcleo (VP1) codificada pelo segmento 2 de *Heliothis armigera* cypovirus 14 (HearCPV-14) (Código de acesso GenBank: ABD57841.1), 32% de identidade com a VP1 codificada pelo segmento 1 de BomoCPV-1 (Código de acesso GenBank: ALL27238.1) e 25% para VP1 codificada pelo segmento 1 de ThpiCPV-5 (Código de acesso GenBank: AJC97789.1).

O terceiro segmento (S3) contém uma ORF entre os nucleotídeos 34 e 3834 que codifica uma proteína com massa molecular próxima de 142 kDa e possui 91% de identidade de aminoácidos com uma proteína de função desconhecida também codificada pelo segmento 3 de HearCPV-14 (Código de acesso GenBank: ABD57842.1) e 90% de identidade com uma proteína hipotética codificada pelo segmento 3 de LydiCPV-14 (Código de acesso GenBank: NP_149137.1).

O quarto segmento (S4) apresenta uma ORF entre os nucleotídeos 46 e 3270 codificando uma proteína de 1074 aminoácidos e massa molecular de 123 kDa. Esta proteína possui 94% de identidade com uma proteína de função desconhecida de HearCPV-14 (Código de acesso GenBank: ABD57843.1) e 94% de identidade para uma proteína hipotética de LydiCPV-14 (Código de acesso GenBank: NP_149138.1).

O quinto segmento (S5) possui uma ORF entre o nucleotídeo 58 e o nucleotídeo 3009 que codifica uma proteína de 983 aminoácidos e massa molecular de 110 kDa. Esta sequência teve 69% de identidade com a proteína P109 codificada pelo segmento 5 de HearCPV-14 (Código de acesso GenBank: ABD57844.1).

O sexto segmento (S6) contém uma ORF entre os nucleotídeos 19 e 1671 que codifica uma proteína de 63 kDa. A sequência de aminoácidos mostra 93% de

identidade com a proteína 6 codificada pelo segmento 6 de HearCPV-14 (Código de acesso GenBank: AAY42142.1).

A proteína codificada pelo sétimo segmento (S7) possui massa molecular de 48 kDa e identidade de 90% com a proteína 7 codificada pelo segmento 7 de HearCPV-14 (Código de acesso GenBank: AAY34358.1) e 28% de identidade com uma proteína de função desconhecida codificada pelo segmento 7 de *Operophtera brumata* cypovirus 18 (OpbrCPV-18) (Código de acesso GenBank: ABB17217.1).

A proteína codificada pelo segmento 8 (S8) possui massa molecular de 42 kDa e identidade de 84% com a proteína 8 codificada pelo segmento 8 de HearCPV-14 (Código de acesso GenBank: AAY34357.1).

O nono segmento (S9) codifica uma proteína de 317 aminoácidos com massa molecular de 36 kDa aproximadamente. A identidade de aminoácidos é de 89% com a proteína 9 codificada pelo segmento 9 de HearCPV-14 (Código de acesso GenBank: AAY34356.1).

O décimo, último e menor segmento (S10) contém o gene *polh* que codifica a poliedrina. A sequência de 249 aminoácidos, codificante para uma proteína com aproximadamente 29 kDa de massa molecular, apresenta 98% de identidade de aminoácidos com a poliedrina codificada pelo segmento 10 de *Heliothis assulta* cypovirus 14 (HeasCPV-14) (Código de acesso GenBank: AAY96324.1) e 97% para a poliedrina de LydiCPV-14 (Código de acesso GenBank: NP_149144.1).

Os resultados obtidos mostram claramente que o vírus encontrado se relaciona diretamente à espécie *cypovirus* 14. Dessa forma, de acordo com as normas elaboradas pelo ICTV, o nome *Thyrinteina arnobia* cypovirus 14 (TharCPV-14) é proposto para identificação deste isolado.

**Quadro 1 – Segmentos genômicos (S1 a S10), respectivos códigos de acesso no GenBank, características observadas, funções pressupostas para as proteínas codificadas e espécies de maior homologia para cada segmento.**

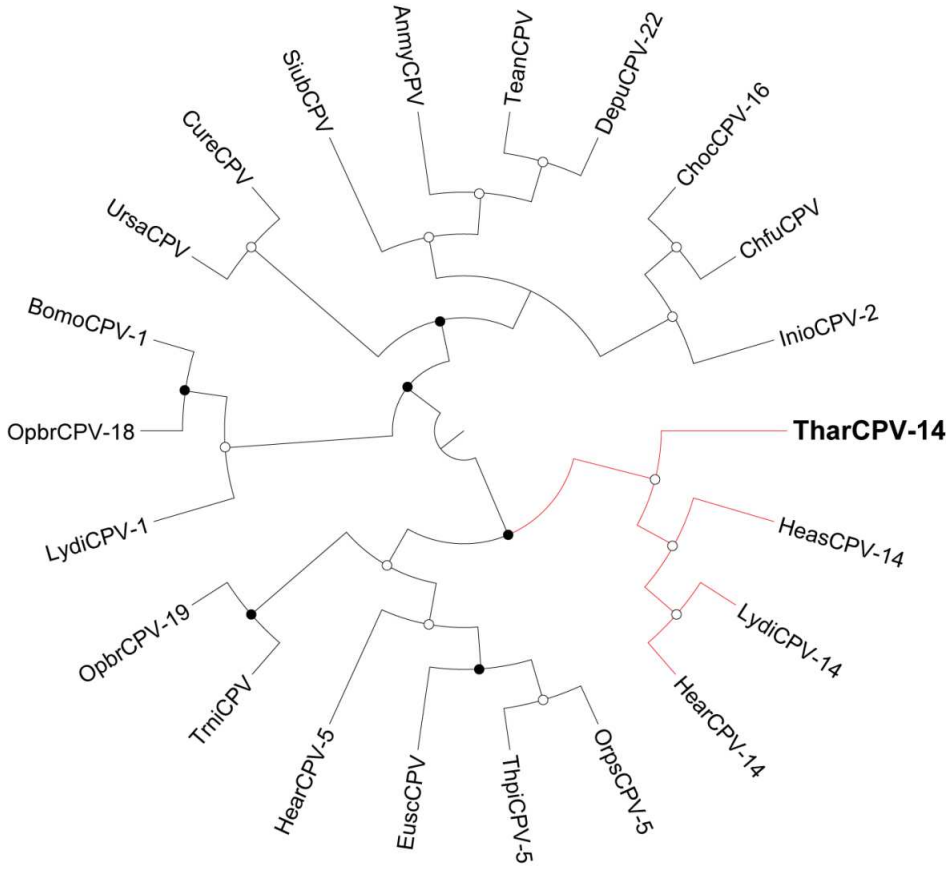
| Segmento | Acesso GenBank | Tamanho do segmento (nt[1]) | Posição da ORF (nt[1]) | Tamanho da proteína (aa[2]) | Função | Espécie de maior homologia | Cobertura (%) | Identidade de aminoácidos (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S1 | MF161423 | 4466 | 446 - 4363 | 1305 | RdRP | *Lymantria dispar* cypovirus 14 | 94 | 96 |
| S2 | MF161424 | 4075 | 59 - 3970 | 1303 | VP1 | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 99 | 94 |
| S3 | MF161425 | 3953 | 34 - 3834 | 1266 | desconhecida | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 99 | 91 |
| S4 | MF161426 | 3358 | 46 - 3270 | 1074 | desconhecida | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 99 | 94 |
| S5 | MF161432 | 3119 | 58 - 3009 | 982 | P109 | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 98 | 69 |
| S6 | MF161427 | 1772 | 19 - 1671 | 550 | Proteina 6 | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 99 | 93 |
| S7 | MF161428 | 1412 | 8 - 1279 | 423 | Proteina 7 | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 99 | 90 |
| S8 | MF161429 | 1332 | 43 - 1182 | 379 | Proteina 8 | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 99 | 84 |
| S9 | MF161430 | 1269 | 71 - 1024 | 317 | Proteina 9 | *Heliothis armigera* cypovirus 14 | 99 | 89 |
| S10 | MF161431 | 978 | 55 - 804 | 249 | PolH | *Heliothis assulta* cypovirus 14 | 99 | 98 |

[1] nt: nucleotídeos; [2] aa: aminoácidos.

### 3.3. Análise filogenética e diversidade genômica

A árvore filogenética gerada pela análise das sequencias do gene *polh* mostra a relação do cypovirus encontrado com os vírus HeasCPV-14, LydiCPV-14 e HearCPV-14. Resultado já esperado de acordo com os dados vistos no Quadro 1. De acordo com as sequências selecionadas para esta análise entre as disponíveis no GenBank, o segmento 10 de TharCPV-14 ainda apresenta um ancestral comum à espécie *cypovirus* 5 e se posiciona em um clado oposto às espécies *cypovirus* 1 e 2 (Figura 2).

**Figura 2 – Árvore filogenética de TharCPV-14 com relação a outros cypovirus baseando-se no gene *polh*.**




Os nomes dos isolados de cypovirus comparados nesta análise e os números de acesso para suas sequências no GenBank são: HeasCPV-14 (*Heliothis assulta* cypovirus 14/DQ077914.1), LydiCPV-14 (*Lymantria dispar* cypovirus 14/AF389461.1), HearCPV-14 (*Heliothis armigera* cypovirus 14/DQ010323.1), OrpsCPV-5 (*Orgyia pseudotsugata* cypovirus 5/KC588365.1), ThpiCPV-5 (*Thaumetopoea pityocampa* cypovirus 5/KP217042.1), EuscCPV (*Euxoa scandens* cypovirus/J04338.1), HearCPV-5 (*Heliothis armigera* cypovirus 5/DQ077912.1), TrniCPV (*Trichoplusia ni* cypovirus/NC_002565.1), OpbrCPV-19 (*Operophtera brumata* cypovirus 19/DQ192254.1),

LydiCPV-1 (*Lymantria dispar* cypovirus 1/AF389471.1), OpbrCPV-18 (*Operophtera brumata* cypovirus 18/DQ192250.1), BomoCPV-1 (*Bombix mori* cypovirus 1/ACX54964), UrsaCPV (*Uranotaenia sapphirina* cypovirus/AY876384.1), CureCPV (*Culex restuans* cypovirus/ DQ212785.1), SiubCPV (*Simulium ubiquitum* cypovirus/DQ834386.1), AnmyCPV (*Antheraea mylitta* cypovirus/AY21227), TeanCPV (*Teia anartoides* cypovirus/HQ901376.1), DepuCPV-22 (*Dendrolimus punctatus* cypovirus 22/NC_025838.1), ChocCPV-16 (*Choristoneura occidentalis* cypovirus 16/EU201043.1), ChfuCPV (*Choristoneura fumiferana* cypovirus/U95954.1), InioCPV-2 (*Inachis io* cypovirus 2/NC_023495.1).

Os dez segmentos de TharCPV-14, HearCPV-14 e LydiCPV-14 ainda foram comparados entre si para observação da diversidade de nucleotídeos existente entre suas sequências (Quadro 2).

**Quadro 2. Identidade de nucleotídeos entre os isolados TharCPV-14, HearCPV-14 e LydiCPV-14.**

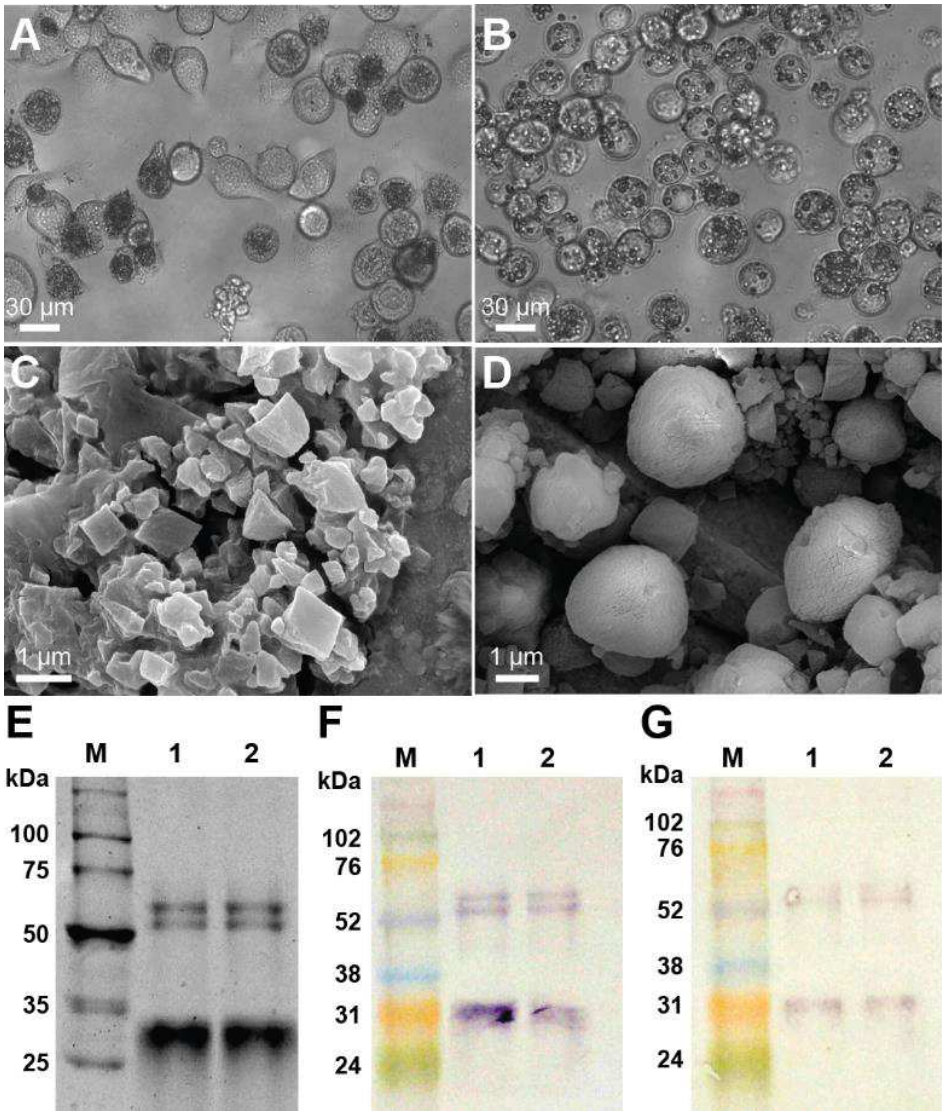
| Segmento | HearCPV/TharCPV | LydiCPV/TharCPV | HearCPV/LydiCPV |
|---|---|---|---|
| S1 | 84,5 | 83,6 | 97,5 |
| S2 | 84,3 | 84,3 | 97,7 |
| S3 | 81,8 | 81,7 | 98,6 |
| S4 | 83,2 | 83,1 | 98,4 |
| S5 | 65,2 | 65,0 | 97,9 |
| S6 | 84,0 | 83,9 | 99,3 |
| S7 | 80,5 | 79,8 | 94,1 |
| S8 | 81,3 | 81,2 | 99,0 |
| S9 | 79,9 | 81,0 | 95,8 |
| S10 | 88,0 | 87,9 | 98,5 |

O segmento 10 apresentou 88% e 87,9% de identidade, os maiores percentuais observados entre todos os segmentos comparados. Os segmentos S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8 e S9 apresentaram identidades variando de 79,8 a 84,5% e o segmento 5 apresentou a maior distância genética, com somente 65% de identidade com os outros dois isolados. A comparação entre segmentos dos isolados HearCPV-14 e LydiCPV-14 mostrou sua elevada proximidade, com percentuais de identidade sempre acima de 94,1% entre seus segmentos.

### 3.4. Baculovirus recombinante com gene *polh*

A clonagem e expressão do gene *polh* de TharCPV-14 foram confirmadas pela formação de cristais proteicos no citoplasma das células das linhagens Sf21 e Tn5B infectadas (Figura 3 A, B) com o baculovirus recombinante construído. Os cristais formados apresentaram tamanhos e formatos diferenciados em função da linhagem celular infectada (Figura 3 C, D). Os cristais obtidos em ambas as linhagens celulares foram purificados e solubilizados. A proteína observada em gel SDS-PAGE (Figura 3 E), foi marcada com os anticorpos específicos produzidos nos ratos imunizados com os poliedros selvagens (anti-TharCPV) e com os anticorpos comerciais para a cauda de histidina (anti-His) introduzida no gene *polh*, comprovando sua origem no gene *polh* extraído do isolado selvagem encontrado (Figura 3 F) e posteriormente clonado e expresso pelo baculovirus recombinante (Figura 3 G).

**Figura 3 – (A, B) Linhagens celulares Sf21 e Tn5B infectadas pelo AcMNPV recombinante com o gene *polh* de TharCPV produziram cristais proteicos no citoplasma das células após 72 horas de infecção. (C, D) Microscopia eletrônica de varredura mostrando em detalhe os cristais proteicos produzidos pelas linhagens Sf21 e Tn5B infectadas. (E, F, G) SDS-PAGE e Western-Blot das proteínas extraídas das linhagens celulares Sf21 e Tn5B marcadas com anticorpos específicos anti-TharCPV e anti-His, respectivamente, confirmando a expressão da poliedrina de TharCPV pelo AcMNPV recombinante.**




## 4. DISCUSSÃO

Atualmente são reconhecidas dezesseis espécies de cypovirus (1 a 16) pelo ICTV, havendo ainda algumas propostas em análise para inclusão de mais seis

espécies (17 a 22). Todas estas foram identificadas inicialmente em insetos da ordem Lepidoptera, mas alguns de seus isolados também foram encontrados em insetos das ordens Diptera, Hymenoptera e Coleoptera (ICTV, 2011). Os resultados obtidos neste estudo mostram que o TharCPV-14 apresenta a mesma quantidade de segmentos genômicos que outros isolados pertencentes às espécies *cypovirus* 1, *cypovirus* 2, *cypovirus* 5 e *cypovirus* 14. Ainda, os dez segmentos encontrados apresentaram as maiores identidades de suas sequências de aminoácidos exclusivamente para outros isolados da espécie *cypovirus* 14. A árvore filogenética construída com base nas sequências de genes *polh* confirma estes resultados e mostra a origem em comum entre TharCPV-14, HearCPV-14, HeasCPV-14 e LydiCPV-14, bem como um ancestral comum com a espécie cypovirus 5, que apresenta alguns isolados patogênicos a importantes lepidópteros desfolhadores de florestas no hemisfério norte, como *Orgyia pseudotsugata* e *Thaumetopoea pityocampa* (ICTV, 2011; JOHNS et al., 2016; KAUTZ et al., 2016).

Apesar das maiores distâncias genéticas observadas para o TharCPV-14 quando comparado aos outros isolados citados, seus percentuais de identidade de aminoácidos se aproximaram dos observados em outros estudos. Nestes, a análise do padrão de migração eletroforética é sustentada como parâmetro de diferenciação entre espécies de cypovirus e para o mesmo propósito são sugeridas as análises de diversidade genômica entre suas sequências, visto que a identidade de aminoácidos entre segmentos em isolados pertencentes a mesma espécie pode variar de 89 a 98%, enquanto a identidade de aminoácidos entre segmentos em isolados pertencentes a espécies diferentes pode variar entre 20 e 23% (MERTENS et al., 1999; ICTV, 2011; ZHOU et al., 2014).

As diferenças observadas na identidade de nucleotídeos para os dez segmentos, nas comparações dos arranjos TharCPV-14 x HearCPV-14 (65,2 a 88%) e TharCPV-14 x LydiCPV-14 (65 a 87,9%) explicam o posicionamento do TharCPV-14 em um ramo separado dos isolados HearCPV-14 e LydiCPV-14 na árvore filogenética. A mesma comparação realizada entre os isolados HearCPV-14 e LydiCPV-14 mostrou identidades superiores, variando de 94,1 a 99,3%, explicando a proximidade de seus ramos.

Dentre as dezesseis espécies de cypovirus reconhecidas pelo ICTV, nem todas possuem o genoma completo sequenciado. Apenas as espécies *cypovirus* 1,

*cypovirus* 2, *cypovirus* 5, *cypovirus* 14 e *cypovirus* 15 possuem todos os segmentos disponíveis na plataforma do NCBI[10] (ICTV, 2011).

Dessa forma, a comparação entre alguns dos segmentos de TharCPV-14 apresenta limitações pelo menor volume de informações publicadas. Os critérios taxonômicos estabelecidos pelo ICTV não estão completamente definidos e a classificação de novas espécies permanece em constante discussão pelos cientistas da área. Ainda hoje pouco se conhece sobre o gênero *Cypovírus*. De acordo com as últimas publicações na área, observa-se que alguns trabalhos abordando dados básicos da biologia destes vírus tiveram seu início há pouco tempo. Em um futuro próximo, é possível que tenhamos as informações que nos faltam hoje para melhor compreender a biologia e a genética de cypovirus, da mesma forma como ocorreu para os baculovirus no final do século XX e começo do século XXI (GRANADOS; DERKSEN; DWYER, 1986; BURDEN et al., 2000; BONNING et al., 2002; SZEWCZYK et al., 2006; VALICENTE et al., 2008; ARDISSON-ARAUJO et al., 2013;LACEY et al., 2015).

Os baculovirus passaram a ser melhor estudados desde a evolução das técnicas de biologia molecular, e hoje, devido ao grande volume de conhecimento disponível, servem como modelo para estudos genéticos e biotecnológicos entre os vírus que apresentam corpos de oclusão para suas partículas virais (RIBEIRO et al., 2015). A poliedrina, principal proteína dos poliedros de Cypovirus e Baculovirus, correspondendo a 95% do peso seco dos poliedros, é expressa pelo gene *polh* tardiamente na infecção viral e em quantidades muito superiores as demais proteínas virais (COULIBALY et al., 2007). Esta proteína é responsável pela formação da matriz protéica onde as partículas virais são oclusas, garantindo sua elevada estabilidade às condições adversas do meio extracelular. Sua resistência a algumas substâncias químicas também protege as partículas virais em seu interior, preservando sua integridade e patogenicidade por longos períodos no ambiente. Estas características são fundamentais à utilização de vírus na formulação de bioinseticidas altamente estáveis a campo (ALVES, 1998; HARRISON; HOOVER, 2012). Por estas razões o gene *polh* é um dos mais estudados e consequentemente possui grande número de sequências disponíveis nos bancos de dados.

**10** Plataforma NCBI disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome. Acesso: 25 maio 2017.

Contudo, os interesses em vírus entomopatogênicos vão além de sua exploração no controle de insetos-praga. Seus poliedros possuem aplicações biotecnológicas pela possibilidade de fusão da poliedrina com outras proteínas de interesse. A construção de vírus recombinantes e sua de capacidade de infecção a lagartas acaba por transformar estes insetos em biorreatores, que multiplicam em larga escala a proteína fusionada à poliedrina. Estes poliedros com proteínas fusionadas são de fácil purificação e não possuem grandes quantidades de outras proteínas que poderiam atuar como contaminantes (COULIBALY et al., 2007). Casos de sucesso já são conhecidos na área de saúde pública, com a utilização de baculovirus para expressão de epítopos[11] de proteínas de vírus infecciosos aos seres humanos, como o vírus da dengue e o da febre amarela. Tais vírus recombinantes ainda são totalmente seguros para manuseio em laboratório, devido as suas características infecciosas restritas a insetos (RIBEIRO et al., 2015).

Na tentativa de compreender melhor a biologia de TharCPV-14 e avaliar características necessárias ao seu desenvolvimento em aplicações biotecnológicas, foi construído um baculovirus recombinante expressando sua poliedrina marcada com uma cauda de histidina na porção aminoterminal. A infecção deste vírus recombinante em linhagens celulares (Tn5B e Sf21) resultou na produção de cristais proteicos com formato e dimensões variadas. Outros genes *polh* de cypovirus já foram inseridos em baculovirus recombinantes que expressaram cristais proteicos simples (GRAHAM et al., 2007) ou múltiplos (MORI et al., 1993) no citoplasma das células infectadas, indicando que a sequência do gene *polh* e, provavelmente, as proteínas da célula do inseto hospedeiro são responsáveis pela morfologia do cristal e sua montagem (COULIBALY et al., 2007).

Para confirmação da expressão da poliedrina de TharCPV-14 nos cristais obtidos nas linhagens celulares, os mesmos foram purificados e analisados em gel SDS-PAGE, revelando uma banda intensa na altura esperada para poliedrina. A confirmação da origem do gene *polh* utilizado na construção do vírus recombinante foi feita pela técnica de Western-Blot com a marcação da proteína observada no gel com anticorpos específicos anti-TharCPV e anti-His. As marcações foram bem-

[11] Epítopo é a menor fração do antígeno capaz de gerar uma resposta imunológica. Esta porção da molécula do antígeno se liga aos receptores das células no hospedeiro e também aos anticorpos. Os estudos sobre os epítopos de vírus ajudam na compreensão dos processos infecciosos que os mesmos desenvolvem e auxiliam no estudo de medidas preventivas ou tratamentos para as infecções virais (RIBEIRO et al., 2015).

sucedidas para ambos os anticorpos, confirmando que o gene expresso tinha origem no TharCPV-14. Ainda, a marcação também esclarece que as duas bandas de menor intensidade, vistas acima da banda correspondente à poliedrina, tratam-se de oligômeros da própria poliedrina de TharCPV-14 de difícil rompimento durante a desnaturação térmica e química. Dessa forma confirma-se que não existem contaminantes celulares ou virais em meio à proteína analisada, destacando sua aptidão como nanocarreador para proteínas de interesse.

Poliedros como os observados em Cypovirus também são vistos em outros tipos de vírus entomopatogênicos, como baculovirus e entomopoxvirus, permitindo a exploração destes agentes infecciosos de forma mais prática, seja no campo ou em laboratório (ALVES, 1998; HARRISON; HOOVER, 2012). Apesar das distâncias evolutivas e das diferenças fundamentais existentes entre os ciclos de vida destes vírus, estudos mostram que a estrutura e a composição de tais poliedros são de tal forma semelhantes, que claramente os poliedros representam uma ligação evolutiva entre cypovirus e baculovirus. Entretanto, permanece desconhecido até o momento, se ambos vieram de um ancestral comum ou se suas estratégias convergiram para isto (COULIBALY et al., 2007).

O surgimento repentino da infecção que o TharCPV-14 provocou em laboratório não teve suas razões determinadas. Acredita-se que o vírus já estava na população desde a sua coleta no campo e se manteve presente pela sua transmissão vertical, resultado da reprodução de insetos com infecção crônica não apresentando sintomas. Diversos estudos apontam que Cypovirus podem desenvolver comumente doenças crônicas e com efeitos subletais (ROTHMAN; MYERS, 1996; PAYNE, 1981; MERTENS; RAO; ZHOU, 2004; LI et al., 2006; GREEN et al., 2006; GRAHAM et al., 2007; ICTV, 2011). Em determinado momento, por razão desconhecida, o vírus se manifestou de forma letal atingindo 100% dos insetos (lagartas entre o terceiro e sexto instares, pupas e até mesmo adultos), exterminando a população mantida em laboratório.

Em geral, cypovirus são menos letais que os baculovirus e por este motivo o setor privado não apresenta tanto interesse no seu desenvolvimento como bioinseticida. Entretanto, existem casos bem-sucedidos de sua utilização a campo para o controle de insetos-praga através de iniciativas do setor público e bons exemplos foram vistos em países como Peru e Japão (KUNIMI, 2007; LACEY et al., 2015; ZEDDAM et al., 2003).

O controle microbiano viral é uma realidade em alguns sistemas produtivos, a partir de baculovirus de lepidópteros como estratégia para supressão de populações de insetos. Seu maior obstáculo ao sucesso comercial é sua produção em larga escala com eficiência e a um custo competitivo com os inseticidas sintéticos (MOSCARDI, 1999; MOSCARDI et al., 2011; GRZYWACZ, 2016).

Em relação às florestas plantadas, outro obstáculo está junto aos produtores, que preferem o uso de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, pois são produzidos em escala industrial e possuem menores custos, maior disponibilidade, alto desempenho, maior espectro de ação em lepidópteros e menor tempo letal (MOREAU; LUCAROTTI, 2007; VAN FRANKENHUYZEN; REARDON; DUBOIS, 2007), tornando menos atrativos os investimentos em pesquisas com outros entomopatógenos.

No Brasil, TharCPV-14 é o primeiro vírus patogênico ao principal lepidóptero desfolhador de eucalipto a ter o genoma completamente caracterizado. A partir dos conhecimentos básicos obtidos neste trabalho, estudos adicionais devem ser conduzidos para se alcançar o seu desenvolvimento na forma de um bioinseticida. Entretanto, para o sucesso de um produto desta natureza na proteção dos plantios de eucalipto é necessário considerar as demais espécies de lepidópteros desfolhadores, que ocorrem nos plantios do sul ao norte do país. Controlar apenas uma espécie de inseto significa apenas liberar o espaço em um nicho ecológico para que outras espécies se tornem dominantes. Sendo assim, encontrar outros isolados virais patogênicos às demais espécies de lepidópteros desfolhadores e inserir tais vírus na formulação de um bioinseticida viral de maior espectro de ação seria a melhor estratégia. Algumas destas espécies, como *Glena* spp. (Lepidoptera: Geometridae), *Iridopsis* spp. (Lepidoptera: Geometridae), *Nystalea nyseus* (Lepidoptera: Notodontidae) e *Sarsina violascens* (Lepidoptera: Noctuidae: Lymantriinae) foram observadas a campo com sintomas de infecções virais[12], mas estes vírus não foram identificados até o momento, indicando pela frente um longo caminho a ser percorrido.

[12] Amostras pessoalmente coletadas nos plantios de eucalipto visitados nos anos de 2015 e 2016.

## 5. CONCLUSÕES

Um vírus patogênico a *T. arnobia* foi encontrado, sendo confirmada a presença de poliedros no macerado das lagartas mortas. Seu genoma apresenta dez segmentos de RNA fita dupla e suas partículas virais não envelopadas estão inseridas em uma matriz protéica composta de poliedrina. Todos os segmentos obtidos possuem regiões codificantes com elevada identidade de aminoácidos a proteínas encontradas em diferentes isolados virais, todos pertencentes à espécie *cypovirus* 14. A árvore filogenética construída com base no gene *polh* confirma a proximidade genética do vírus encontrado com os isolados HearCPV-14, HeasCPV-14 e LydiCPV-14. Um baculovirus recombinante construído com o gene *polh* foi capaz de produzir cristais de poliedrina no citoplasma das linhagens celulares Sf21 e Tn5B, comprovando a validade do estudo *in silico* realizado e evidenciando o potencial de utilização deste vírus como plataforma de expressão para proteínas heterólogas. Com base nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que o vírus encontrado se trata de um isolado pertencente à espécie cypovirus 14 e, de acordo com as diretrizes de nomenclatura estabelecidas pelo Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus, o nomeamos *Thyrinteina arnobia* cypovirus 14 (TharCPV-14). Estudos futuros avaliarão o seu potencial de exploração como bioinseticida viral para o controle de lagartas de *T. arnobia* em plantios de eucalipto.

## REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, n. 3, p. 403-410, Out. 1990. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998.

ANISIMOVA, M. et al. Survey of Branch Support Methods Demonstrates Accuracy, Power, and Robustness of Fast Likelihood-based Approximation Schemes. **Systematic Biology,** [s.l.], v. 60, n. 5, p.685-699, 3 maio 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syr041.

ARDISSON-ARAUJO, D. M. P. et al. A New theraphosid Spider Toxin Causes Early Insect Cell Death by Necrosis When Expressed In Vitro during Recombinant Baculovirus Infection. **Plos One,** [s.l.], v. 8, n. 12, p.1-14, 13 dez. 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0084404.

BARBOSA, R. H. et al. Foraging Activity of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) at Various Densities on Pupae of the Eucalyptus Defoliator *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera. **Florida Entomologist**, [s.l.], v. 99, n. 4, p.686-690, dez. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1653/024.099.0417.

BONNING, B. C. et al. Genetic enhancement of baculovirus insecticides. In: UPADHYAY, K. **Advances in microbial control of insect pests**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 109-126

BURDEN, J. P. et al. Infectivity, Speed of Kill, and Productivity of a Baculovirus Expressing the Itch Mite Toxin Txp-1 in Second and Fourth Instar Larvae of *Trichoplusia ni*. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 75, n. 3, p.226-236, Apr. 2000. DOI: http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1999.4921.

COULIBALY, F. et al. The molecular organization of cypovirus polyhedra. **Nature,** [s.l.], v. 446, n. 7131, p.97-101, 1 mar. 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nature05628.

FOREST STEWARDSHIP COUNCIL - FSC. **FSC Principles and Criteria for Forest Stewardship**. Bonn, 2015. Disponível em: <https://ic.fsc.org/en/what-is-fsc-certification/principles-criteria>. Acesso em: 08 dez. 2016.

GRAHAM, R. I. et al. Characterization and partial sequence analysis of two novel cypoviruses isolated from the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae). **Virus Genes**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.463-471, 2 jun. 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s11262-007-0113-0.

GRANADOS, R. R.; DERKSEN, A. C. G.; DWYER, K. G.. Replication of the *Trichoplusia ni* Granulosis and Nuclear Polyhedrosis Viruses in Cell Cultures. **Virology**, v. 152, p.472-476, 1986.

GREEN, T. B. et al. Molecular and biological characterization of a Cypovirus from the mosquito *Culex restuans*. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.27-34, jan. 2006. http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2005.10.007.

GRZYWACZ, D. Basic and applied research: baculovirus. In: LACEY, L. A. **Microbial control of insect and mite pests**: from theory to practice. Amsterdam: Academic Press, 2016. p. 27-46.

HARRISON, R.; HOOVER, K. Baculoviruses and Other Occluded Insect Viruses. **Insect Pathology,** [s.l.], p.73-131, 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384984-7.00004-x.

HOLTZ, A. M. et al. É possível a associação *Podisus nigrispinus* e espécies de *Trichogramma* em um programa de controle biológico em florestas? **Idesia (arica)**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.85-88, ago. 2006. DOI: http://dx.doi.org/10.4067/s0718-34292006000200010.

HURLEY, B. P. et al. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions,** [s.l.], v. 18, n. 4, p.921-933, 26 fev. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s10530-016-1081-x.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Relatório Anual 2016**. Brasília, 2016. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2017.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV -. **ICTV 9th Report**: Virus Taxonomy. Leiden, 2011. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae>. Acesso em: 14 mar. 2017.

JESUS, F. G. et al. Resistance of *Eucalyptus* spp. genotypes to eucalyptus brown looper *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). **Australian Journal Of Crop Science,** v. 11, n. 9, p.1016-1021, 2015.

JOHNS, R.c. et al. Population studies of tree-defoliating insects in Canada: a century in review. **The Canadian Entomologist**, [s.l.], v. 148, n. 1, p.558-581, 25 jan. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.4039/tce.2015.69.

KATOH, K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p.3059-3066, 2002.

KAUTZ, M. et al. Biotic disturbances in Northern Hemisphere forests - a synthesis of recent data, uncertainties and implications for forest monitoring and modelling. **Global Ecology And Biogeography**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.533-552, 22 dez. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1111/geb.12558.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 28, n. 12, p.1647-1649, 27 abr. 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199.

KUNIMI, Y. Current status and prospects on microbial control in Japan. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.181-186, jul. 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.03.007.

LACEY, L. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 132, p.1-41, nov. 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009.

LEMES, P. G. et al. Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy and integrated pest management in certified tropical plantations. **Environmental Science And Pollution Research,** [s.l.], v. 24, n. 2, p.1283-1295, 22 out. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7729-3.

LI, Y. Identification and genome characterization of *Heliothis armigera* cypovirus types 5 and 14 and *Heliothis assulta* cypovirus type 14. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 87, n. 2, p.387-394, 1 fev. 2006. DOI: http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.81435-0.

MERTENS, P. P. C. et al. A comparison of six cypovirus isolates by cross-hybridisation of their dsRNA genome segments. **Archives Of Virology**, v. 144, p.561-576, 1999.

MERTENS, P. P. C.; RAO, S.; ZHOU, H.. *Cypovirus*, Reoviridae. In: FAUQUET, C. M. et al. **Virus Taxonomy**: VIIIth Report of the ICTV. London: Elsevier Academic Press, 2004. p. 522-533.

MOREAU, G.; LUCAROTTI, C. J.. A brief review of the past use of baculoviruses for the management of eruptive forest defoliators and recent developments on a sawfly virus in Canada. **The Forestry Chronicle,** v. 83, n. 1, p.105-112, 2007.

MOSCARDI, F. et al. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review Of Entomology**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.257-289, jan. 1999. DOI: http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.257.

MOSCARDI, F. et al. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. **Microbes and Microbial Technology**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 415-445.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors**: a laboratory manual. New York: Freeman And Company, 1992. 347 p.

PAYNE, C. C. Cytoplasmic polyhedrosis viruses. In: DAVIDSON, E. W. **Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases**. Totowa: Allanheld, Osmun & Co, 1981. p. 61-100.

RIBEIRO, B. M. et al. Baculovírus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos. In: RESENDE, R. R.; SOCCOL, C. R. **Biotecnologia Aplicada à Saúde** São Paulo: Blucher, 2015. v. 2, cap. 7. p. 255-306.

RIBEIRO, G. T. et al. Constancy, Distribution, and Frequency of Lepidoptera Defoliators of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) in Four Brazilian Regions. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.629-636, 2 jun. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s13744-016-0410-1.

ROTHMAN, L. D.; MYERS, J. H. Debilitating Effects of Viral Diseases on Host Lepidoptera. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.1-10, jan. 1996. DOI: http://dx.doi.org/10.1006/jipa.1996.0001.

SZEWCZYK, B. et al. Baculoviruses — re-emerging biopesticides. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.143-160, mar. 2006. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.001.

VAN FRANKENHUYZEN, K.; REARDON, R. C.; DUBOIS, N. R. Forest defoliators. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. **Field manual of techniques in invertebrate pathology**: application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. 2. ed. Dordrecht: Springer, 2007. p. 481-504.

VALICENTE, F. H. et al. A New Baculovirus Isolate that does Not Cause the Liquefaction of the Integument in *Spodoptera frugiperda* Dead Larvae. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.77-82, 30 abr. 2008. DOI: http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v7n1p77-82.

VAUGHN, J. L. et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.213-217, abr. 1977.DOI: . http://dx.doi.org/10.1007/bf02615077.

ZEDDAM, J. et al. A cypovirus from the South American oil-palm pest *Norape argyrrhorea* and its potential as a microbial control agent. Biocontrol, [s.l.], v. 48, n.1, p.101-112, 2003. DOI: http://dx.doi.org/10.1023/a:1021234700472.

ZHOU, Y. et al. Genomic and Biological Characterization of a New Cypovirus Isolated from *Dendrolimus punctatus*. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.1-19, 24 nov. 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0 113201.

**CAPÍTULO 2 – Proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* e seu efeito na emergência de vírus latentes em populações de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)**

**AUTORES:** Horta, André B.; Lemos, Manoel V. F.; Ribeiro, Bergmann M.; Wilcken, Carlos F.

## RESUMO

O setor florestal brasileiro é líder mundial em produtividade florestal e se destaca no cenário internacional, fornecendo 91% de toda a madeira produzida para fins industriais no país, contribuindo para preservação de florestas nativas. Os plantios de eucalipto compõem aproximadamente 71% da área total cultivada com florestas e frequentemente sofrem ataques de insetos-praga, cujos danos afetam diretamente o desenvolvimento das árvores e o rendimento da indústria de base florestal. Uma das espécies mais expressivas neste contexto é a lagarta-parda-do-eucalipto, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Seu controle é normalmente realizado com bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* e eventualmente são observadas epizootias virais nos plantios, contribuindo para o controle natural de suas populações. As diferentes toxinas de *B. thuringiensis* presentes nos bioinseticidas possuem níveis de ação que variam em função da espécie do inseto-alvo. Entretanto, até o momento não são conhecidas suas toxicidades de forma isolada sobre este inseto-praga. Desta forma, o presente trabalho buscou determinar as concentrações letais de seis proteínas Cry1 sobre as populações de *T. arnobia* dos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo. Os resultados obtidos não permitiram a determinação dos efeitos isolados para cada uma das toxinas, pois vírus latentes nas populações emergiram durante os experimentos. Esta observação sugere que doses subletais de proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* podem contribuir na sensibilização das lagartas de *T. arnobia*, favorecendo infecções virais que acabam dominando o organismo do inseto conduzindo-o à morte. Uma linhagem “saudável” de *T. arnobia* foi selecionada e sobre a mesma foi obtida uma curva de concentração letal para a proteína Cry1Ab. Entretanto, ao final das avaliações, vírus foram novamente observados nas amostras, indicando que mesmo este resultado pode ter sofrido a interferência de

infecção viral em algum momento. Desta forma, a curva determinada não expressa somente a toxicidade da proteína Cry1Ab, mas sua associação ao vírus, cuja expressão não foi quantificada no experimento. Interações de diferentes entomopatógenos já foram vistas para insetos-praga de outras culturas agrícolas, como a interação de vírus e fungos entomopatogênicos para a lagarta-da-soja no Brasil. Entretanto, para a espécie *T. arnobia* na cultura do eucalipto, este tipo de interação entre entomopatógenos ainda não havia sido documentado, sendo esta a primeira observação.

**PALAVRAS-CHAVE:** vírus entomopatogênicos, lagarta parda do eucalipto, proteínas Cry, *Eucalyptus.*

**ABSTRACT**

The Brazilian forest sector is the world leader in forest productivity and stands out in the international scene, providing 91% of all the wood produced for industrial purposes in the country, contributing to the preservation of native forests. Eucalyptus plantations occupy approximately 71% of the total area planted with forests and often suffer attacks by insect-pests, whose damage directly affects the development of trees and the yield of the forest based industry. One of the most expressive species in this context is the eucalyptus brown looper, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Their control is usually carried out with *B. thuringiensis* based biopesticides and eventually viral epizootics are observed in the plantations, contributing to the natural control of their populations. The different *B. thuringiensis* toxins present in biopesticides have action levels that vary depending on the species of the target insect. However, untill now, its isolated toxicities are not known to this insect-pest. Thus, the present work aimed to determine the lethal concentrations of six Cry1 proteins on the populations of *T. arnobia* from the states of Bahia, Minas Gerais and São Paulo. The results obtained did not allow the determination of the isolated effects for each of the toxins, as latent virus in the populations emerged during the experiments. This observation suggests that sublethal doses of Cry1 proteins of *B. thuringiensis* may contribute to the sensitization of *T. arnobia* caterpillars, favoring viral infections that domain the insect's organism leading to death. A healthy strain of *T. arnobia* was selected and a lethal concentration curve

for the Cry1Ab protein was obtained. However, at the end of the evaluations, viruses were again observed in the samples, indicating even this result may have undergone the interference of viral infection at some point. Thus, the curve determined not only expressed the toxicity of the Cry1Ab protein, but its association with the virus, whose expression was not quantified in the experiment. Interactions of different entomopathogens have already been seen for insect-pests from other agricultural crops, such as the interaction of viruses and entomopathogenic fungi for the soyben caterpillar. However, for *T. arnobia* in eucalyptus, this type of interaction between entomopathogens has not yet been documented, and this is the first observation.

**KEY WORDS:** entomopathogenic viruses, Eucalyptus brown looper, Cry proteins, *Eucalyptus*.

## 1. INTRODUÇÃO

As florestas plantadas no Brasil fornecem atualmente 91% de toda madeira utilizada para fins industriais no país. O eucalipto é o principal gênero de árvores cultivado ocupando 71% da área total, o que corresponde a 5,6 milhões de hectares. Os estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul são os maiores produtores e o incremento nas áreas de cultivo com árvores deste gênero é a tendência atual (IBÁ, 2016). As extensas e contínuas áreas com uniformidade de materiais genéticos criam condições ideais para alimentação e reprodução de insetos-praga em elevados níveis populacionais (HURLEY et al., 2016). Dezenas de espécies, nativas e exóticas, causam danos aos plantios que afetam diretamente seu rendimento, sendo o momento e a frequência das desfolhas causadas por estes insetos os fatores-chave que influenciam no desenvolvimento das árvores em longo prazo (ELEK; BAKER, 2017). Neste contexto, o complexo de lepidópteros desfolhadores é um dos mais importantes, sendo a lagarta-parda-do-eucalipto, *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), o principal lepidóptero desfolhador desta cultura no país (RIBEIRO et al., 2016).

Encontrada em todo o território brasileiro, *T. arnobia* costuma atingir níveis populacionais elevados nos períodos mais secos do ano e em regiões com regimes pluviométricos menos intensos. Nos anos de 2015 e 2016, severos surtos populacionais desta espécie foram observados nos estados da Bahia, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (IPEF[13]), sendo a pulverização de bioinseticidas a base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) a principal estratégia de controle adotada há décadas (ZANUNCIO et al., 1992; MAPA, 2017).

*B. thuringiensis* se caracteriza pela produção de proteínas inseticidas, as quais se acumulam na forma de cristais durante a sua esporulação. Conhecidas como proteínas Cry, estas proteínas se distribuem em diferentes grupos e apresentam elevada especificidade devido ao seu mecanismo de ação, baseado na ligação das mesmas a receptores específicos localizados nas células do epitélio intestinal dos insetos (BRAVO et al., 2011). O grupo de proteínas Cry1 é o mais abundante e estudado no controle de lepidópteros desfolhadores de monoculturas agrícolas, sobre os quais foram determinados seus mecanismos de ação

[13] Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

(TABASHNIK et al., 2015; CRICKMORE, 2017). Utilizadas inicialmente como bioinseticidas, a evolução da tecnologia e os conhecimentos adquiridos ao longo de décadas de estudos viabilizaram sua aplicação na engenharia genética de plantas tornando-as resistentes a insetos, tecnologia agrícola mais adotada na história moderna (BROOKES; BARFOOT, 2013).

Enquanto no cenário dos insetos-praga das monoculturas agrícolas temos o mais alto nível de conhecimento disponível sobre a ação das várias proteínas de *B. thuringiensis* e sua aplicação biotecnológica na proteção de cultivos (TABASHNIK et al., 2015), no cenário dos insetos-praga da cultura do eucalipto a situação é oposta. Mais precisamente sobre o complexo de lepidópteros desfolhadores, apesar de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* serem utilizados há décadas no controle dos mesmos, até o momento, estudos sobre os efeitos individuais de cada uma das toxinas presentes nos mesmos não foram publicados.

Desta maneira, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa sobre lagartas neonatas de *T. arnobia* em bioensaios de dose-resposta, bem como identificar nas amostras das populações analisadas a ocorrência de vírus, cujas infecções foram observadas ao longo dos experimentos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Proteínas Cry1

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa foram produzidas a partir do cultivo de linhagens recombinantes de *Escherichia coli* XL-1 Blue expressando uma única proteína cada. Estas linhagens foram cedidas pelo Dr. Juan Ferré, da Universidade de Valência, Espanha através do convênio de pesquisa firmado com o Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal. Cada um dos cultivos foi realizado em três estágios de acordo com Herrero et al. (2004) em meio TB (Terrific Broth) (12 g de triptona; 24 g de extrato de levedura; 2,31 g de $KH_2PO_4$; 12,54 g de $K_2HPO_4$; 4 mL de glicerol; q.p.s. 1000 mL) mais ampicilina (100 µg/mL). No primeiro estágio o cultivo foi realizado em placas de Petri (90x15 mm) com meio TB + glicose (2% v/v) e ágar (1,5% v/v) por 24 h a 30ºC. No

segundo estágio, uma colônia foi transferia para um erlenmeyer com capacidade de 250 mL contendo 20 mL de meio TB + glicose (2% v/v), com incubação a 37°C por 12 horas sob agitação de 200 rpm. No terceiro e último estágio, um volume de 2,5 mL deste cultivo foi transferido para um erlenmeyer com capacidade de 1.000 mL contendo 250 mL de meio TB e incubado durante 60 h a 28°C sob agitação de 200 rpm. Os cultivos foram coletados por meio de centrifugação a 17.400 x g por 8 min. Os "pellets" obtidos foram pesados e congelados a -20°C "overnight". A ruptura celular foi realizada em tampão 50mM Tris/HCl pH 8,0 contendo 5mM de EDTA e 100mM de NaCl com lisozima (800 µg/g de pellet). Na sequência a suspensão foi tratada com desoxicolato de sódio e solução de DNAseI (1 mg/mL). Após a ruptura das células, foram realizadas três lavagens do material com 20mM Tris/HCl pH7,5 contendo 1M de NaCl e 1% de Triton X100. Na sequência mais três lavagens foram feitas com solução salina tamponada com fosfato - 10mM Na2HPO4/KH2PO4, pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (p/v) NaCl. Por último a solubilização das proteínas Cry foi feita em tampão 50 mM NaHCO3 pH 10,0 contendo 100 mM NaCl + 10 mM DTT (adicionado logo antes do uso), deixando-se sob agitação horizontal a temperatura ambiente por 3 h. Esta etapa foi seguida de centrifugação por 15 min a 18.000 rpm a 4°C. O sobrenadante contendo a pró-toxina solubilizada teve uma alíquota coletada para quantificação e o restante foi mantido em geladeira a 4°C até a realização dos bioensaios. A qualidade e quantificação das proteínas foram verificadas por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo docecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI et al., 1970). A quantificação de proteínas totais foi feita por curva de densitometria, com um gradiente de cinco concentrações (0,05; 0,11; 0,22; 0,44; 0,88 $mg.ml^{-1}$) de soroalbumina bovina (BSA) como padrão de referência para determinação da concentração final das proteínas Cry, sendo visualizadas em gel SDS-PAGE e analisadas pelo software Bionumerics (Applied-Maths).

### 2.2. Criação de *T. arnobia*

Diferentes populações de *T. arnobia* foram submetidas aos bioensaios de dose-resposta. Para isto, pupas foram coletadas em plantios clonais de *Eucalyptus* nos estados da Bahia, Minas Gerais e São Paulo, sendo conduzidas ao Laboratório de Controle Biológico de Pragas Florestais (LCBPF) na Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Campus de Botucatu. Estas populações foram mantidas

separadamente sob as mesmas condições controladas de temperatura (25 ± 2ºC), umidade relativa (60 ± 10%) e fotofase (12 h). As pupas foram dispostas em potes plásticos forrados com papel toalha até a emergência dos adultos, quando estes foram transferidos para gaiolas de PVC de 20 cm de diâmetro por 30 cm de altura, revestidos internamente por papel pardo. A parte superior do tubo foi revestida por uma tela de tecido “voil” para impedir a fuga dos adultos e na base foi colocada uma bandeja plástica forrada com papel toalha para servir de suporte. As massas de ovos obtidas no papel foram recortadas e higienizadas em solução de formaldeido a 5% por 15 min, seguindo-se do tratamento em solução de sulfato de cobre a 5% por 5 min e enxágue final em água destilada autoclavada. Na sequência as massas de ovos foram separadas, dispostas sobre folhas de papel toalha e deixadas em câmara de fluxo unidirecional para secagem, sendo acondicionadas posteriormente em potes plásticos de 145 ml até a eclosão das lagartas. Parte das lagartas de cada população foi mantida com alimentação a base de folhas de *Eucalyptus urophylla* (clone I144) obtidas em plantas mantidas no arboreto do LCBPF e outra parte foi mantida em dieta artificial semi-sólida, conforme metodologia adaptada de Wilcken e Berti Filho (2006). As pupas obtidas na dieta natural (folhas) foram misturadas àquelas obtidas na dieta artificial em todas as gerações subsequentes obtidas em laboratório para preservação da variabilidade genética.

### 2.3. Bioensaios com proteínas Cry1

Lagartas de *T. arnobia* obtidas das populações Bahia, Minas Gerais e São Paulo foram expostas às seis proteínas Cry1 nas primeiras 24 h após sua eclosão. Para montagem dos bioensaios, dieta artificial semi-sólida foi depositada em potes plásticos, formando uma camada de 5 mm de espessura, sobre a qual tubos plásticos com 2 cm de altura e 1 $cm^2$ de área interna foram posicionados, formando células, nas quais foram aplicados 50 µL de cada uma das soluções correspondentes aos tratamentos. Após a aplicação das soluções, os potes foram deixados em câmara de fluxo unidirecional até a completa secagem das superfícies tratadas. A vedação das células foi feita com espuma fenólica autoclavada após a deposição das lagartas neonatas em seu interior (Figura 1). Os experimentos foram mantidos em câmara B.O.D a 25ºC e fotofase de 12 h. Para validação da metodologia de bioensaio desenvolvida para este trabalho, primeiramente foram

realizados testes com três tratamentos testemunha. O primeiro composto unicamente pela dieta artificial, o segundo composto pelo tampão de solubilização e o terceiro pelo lisado celular do cultivo de *E. coli* XL1-Blue padrão (não recombinante). O delineamento adotado foi inteiramente casualizado, sendo composto de seis proteínas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa), em sete diferentes doses dentro do intervalo de 10 ng/cm$^2$ até 4000 ng/cm$^2$, cada qual com apenas uma repetição de 42 lagartas neonatas individualizadas por dose. A mortalidade foi verificada a cada 24 h até o sétimo dia após a exposição das lagartas aos tratamentos, totalizando 168 h.

**Figura 1 – Método desenvolvido para os bioensaios de dose-resposta com lagartas de *T. arnobia*.**




## 2.4. Postulado de Koch para vírus emergentes

Lagartas mortas apresentando sintomas de infecção viral nos experimentos com as proteínas Cry1 foram coletadas separadamente para cada população e geração avaliadas, constituindo de uma amostra cada experimento. Estas foram mantidas a 4$^o$C até que as lagartas da mesma população e geração atingissem o terceiro instar. Folhas de *E. urophylla*, previamente higienizadas em solução de hipoclorito de sódio 1%, receberam um macerado grosseiro[14] das amostras acima descritas, sendo posteriormente acondicionadas em potes plásticos de 250 ml de

[14] Macerado de lagartas mortas filtrado em seringa através de camadas de gaze.

capacidade com o pecíolo imerso em água e dispostas em câmara de fluxo unidirecional para secagem do macerado sobre a superfície foliar. Lagartas de terceiro instar de *T. arnobia* foram colocadas nos potes, ficando sob observação até o aparecimento dos sintomas de infecção e/ou morte. Os testes foram mantidos a 25ºC e fotofase de 12 horas.

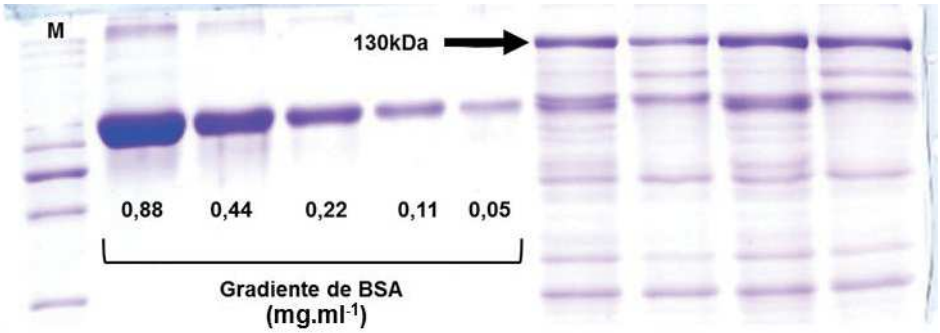
### 2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Gotas do macerado das lagartas mortas com sintomas foram depositadas sobre telas de níquel a temperatura ambiente. Em seguida, as telas foram lavadas com água destilada e contrastadas negativamente com acetato de uranila 2,5% por 5 minutos. Para detecção da presença de partículas virais a preparação foi observada sob microscópio ZEISS TEM 109 at 80 kV.

## 3. RESULTADOS

A expressão das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa foi confirmada em gel SDS-PAGE com a visualização de bandas intensas na altura de 130 kDa, dados semelhantes aos observados na literatura (Figura 2) (TABASHNIK et al., 2015).

**Figura 2 – Gel SDS-PAGE da quantificação das proteínas Cry1 por densitometria com gradiente de BSA.**




A validação da metodologia de bioensaios de dose-resposta foi aprovada. Lagartas neonatas das três populações foram expostas a três tratamentos testemunha: o lisado de células do cultivo de *E. coli* XL1-Blue padrão (não

recombinante - sem toxinas), o tampão de solubilização e a dieta artificial pura. A espuma fenólica utilizada para vedação das células experimentais garantiu a adequada aeração das mesmas. Desta forma, a qualidade da dieta artificial foi mantida com a preservação de sua umidade natural, permitindo a adequada alimentação das lagartas durante os experimentos. Ao mesmo tempo, evitou o acúmulo de umidade nas paredes da célula experimental, o que não foi detectado em nenhum momento em todos os experimentos. Nestas condições, as lagartas se desenvolveram normalmente durante um período de 7 dias. Baixas taxas de mortalidade foram observadas de forma variável entre os tratamentos testemunha e as populações, sempre entre 0% e 20% (dados não exibidos), acreditando-se ser a expressão natural da viabilidade das lagartas.

Os bioensaios com a população Minas Gerais foram realizados da segunda até a quinta geração (F2 – F5) obtidas em laboratório, no período de agosto a novembro de 2014. Para a primeira geração avaliada (F2) as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa tiveram resultados de toxicidade que se comportaram de forma aleatória ao aumento das doses das toxinas no experimento. Foram observadas doses inferiores (11 - 48 ng/cm$^2$), intermediárias (400 – 800 ng/cm$^2$) e superiores (2100 – 4200 ng/cm$^2$) apresentando toxicidades inferiores (0 – 35%), intermediárias (35 – 75%) e superiores (75 – 100%), não sendo detectado nenhum padrão estatisticamente adequável dentro das análises tradicionalmente executadas neste tipo de estudo (análise de Probit). Ainda, sintomas diferenciados foram observados na mortalidade das lagartas destes experimentos. Entre as lagartas anotadas como mortas, algumas se apresentavam aderidas a parede da célula experimental e aspecto viscoso, sintoma característico de morte por infecção viral. Para a proteína Cry1Ab as duas doses mais elevadas apresentaram 100% de mortalidade logo nas primeiras 48 horas de condução do experimento e nestas as lagartas anotadas como mortas se encontravam secas e soltas sobre a espuma fenólica de vedação da célula experimental, sintoma característico quando a morte é causada pela toxicidade direta de proteínas de *B. thuringiensis* (Quadro 1).

**Quadro 1 – Mortalidade de lagartas neonatas de *T. arnobia* em folhas de *E. urophylla* tratadas com diferentes doses das proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* para a segunda geração (F2) da população Minas Gerais (Experimento 1).**

| Dose (ng/cm²) | Mortalidade (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cry1Aa | Cry1Ab | Cry1Ac | Cry1Ca | Cry1Ea | Cry1Fa |
| Test. | 10 | 12 | 7 | 5 | 10 | 7 |
| 11 | 7 | 48 | 74 | 36 | 26 | 7 |
| 32 | 29 | 43 | 12 | 71 | 55 | 40 |
| 48 | 55 | 50 | 38 | 17 | 48 | 43 |
| 400 | 71 | 24 | 69 | 55 | 60 | 29 |
| 800 | 60 | 83 | 43 | 79 | 24 | 98 |
| 2100 | 45 | 100 | 43 | 90 | 60 | 48 |
| 4200 | 48 | 100 | 50 | 71 | 33 | 38 |

O mesmo experimento foi repetido nas gerações seguintes (F3 a F5) e os resultados mantiveram a aleatoriedade. O tratamento testemunha (dieta pura) apresentou mortalidades variáveis e inferiores a 20% em todos os experimentos. As lagartas mortas apresentando sintomas de infecção viral foram coletadas e armazenadas a 4ºC, sendo posteriormente maceradas, filtradas e aplicadas sobre folhas de *E. urophylla*. Estas folhas foram oferecidas a lagartas de terceiro instar provenientes da criação de manutenção e após o contato com tais folhas, passaram a exibir sintomas de infecção viral, morrendo penduradas as folhas ou fora delas com aspecto viscoso, em tempos variáveis entre 3 a 7 dias após a inoculação. Análises ao microscópio óptico não revelaram corpos de oclusão nesta população. Estas lagartas foram coletadas e armazenadas em duas remessas, uma mantida a -20ºC e outra a 4ºC durante trinta dias. Na geração seguinte foram novamente oferecidas sobre folhas para alimentação de lagartas de terceiro instar. A remessa mantida a -20ºC apresentou níveis de mortalidade inferiores a 40%, enquanto a remessa mantida a 4ºC apresentou níveis de mortalidade entre 60 e 80%. A população Minas Gerais foi perdida na passagem da quinta para a sexta geração por problemas de contaminação. As lagartas foram coletadas e armazenadas a 4ºC para posterior identificação do entomopatógeno.

Os bioensaios realizados com a população Bahia ocorreram na segunda e terceira geração (F2 e F3) obtida em laboratório. Estas gerações foram mantidas concomitantemente às gerações F4 e F5 da população Minas Gerais. Os resultados dos bioensaios nesta população seguiram o mesmo comportamento aleatório

(Quadro 2) observado na população Minas Gerais. As lagartas mortas nas cinco primeiras doses apresentavam predomínio de sintomas de infecção viral, semelhantes aos observados na população Minas Gerais. Já as lagartas mortas nas duas doses superiores morreram com predomínio de sintomas de toxicidade de proteínas de *B. thuringiensis*, estavam secas e soltas sobre a espuma fenólica de vedação da célula experimental. O tratamento testemunha (dieta pura) apresentou mortalidades variáveis e inferiores a 20% em todos os experimentos.

**Quadro 2 – Mortalidade de lagartas neonatas de *T. arnobia* em folhas de *E. urophylla* tratadas com diferentes doses das proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* para a terceira geração (F3) da população Bahia (Experimento 5).**

| Dose (ng/cm²) | Mortalidade (%) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cry1Aa | Cry1Ab | Cry1Ac | Cry1Ca | Cry1Ea | Cry1Fa |
| Test. | 5 | 7 | 10 | 7 | 7 | 10 |
| 11 | 17 | 60 | 12 | 36 | 29 | 43 |
| 32 | 24 | 71 | 38 | 55 | 43 | 40 |
| 48 | 79 | 48 | 24 | 17 | 24 | 29 |
| 400 | 90 | 29 | 43 | 79 | 50 | 98 |
| 800 | 98 | 48 | 98 | 55 | 48 | 45 |
| 2100 | 79 | 90 | 60 | 90 | 98 | 71 |
| 4200 | 100 | 79 | 90 | 98 | 90 | 98 |

O postulado realizado na população Bahia apresentou os mesmos resultados observados na população Minas Gerais. Análises ao microscópio óptico não revelaram corpos de oclusão nesta população. A população Bahia foi perdida na passagem da terceira para a quarta geração por problemas de contaminação. As lagartas mortas neste teste foram coletadas e armazenadas para posterior identificação do entomopatógeno.

Os bioensaios com a população São Paulo foram os últimos realizados, ocorrendo entre julho de 2015 e outubro de 2016. Com as observações de patógenos realizadas nas outras populações previamente analisadas, as condições de criação das lagartas de *T. arnobia* nesta população foram mais rigorosas quanto a assepsia e estratégias para descontaminação ou redução de inóculo de contaminantes na população. Os materiais utilizados passaram por esterilizações em molho com hipoclorito de sódio a 2% ou em autoclave por 20 min a 120ºC e 1 atm, quando possível. A sala e as gaiolas de criação passaram periodicamente pela

exposição à luz UV por no mínimo 1 hora. As posturas passaram a ser selecionadas pelas maiores quantidades de ovos e uniformidade na maturação e eclosão dos ovos. Da sexta geração em diante, parte da população mantida em dieta foi selecionada a partir de poucas posturas com 100% de eclosão de larvas, restringindo a variabilidade genética. Outra parte da população foi mantida com mistura de posturas para manutenção da variabilidade genética, mas ainda assim selecionando aquelas com uniformidade de maturação e eclosão.

Mesmo com todos os cuidados adicionais, os dados de mortalidade observados nos experimentos entre a segunda e a oitava geração se mantiveram aleatórios para as seis proteínas em todas as gerações, semelhantes aos resultados anteriores (Quadros 1 e 2). Os sintomas de infecção viral predominaram entre as cinco primeiras doses. Somente para as duas doses superiores da proteína Cry1Ab as lagartas morreram secas e soltas sobre a espuma fenólica. Resultado semelhante ao observado na segunda geração da população Minas Gerais. O tratamento testemunha (dieta pura) apresentou mortalidades variáveis e inferiores a 20% em todos os experimentos. O postulado realizado com as amostras da população São Paulo também apresentou resultados semelhantes aos observados nas populações Minas Gerais e Bahia.

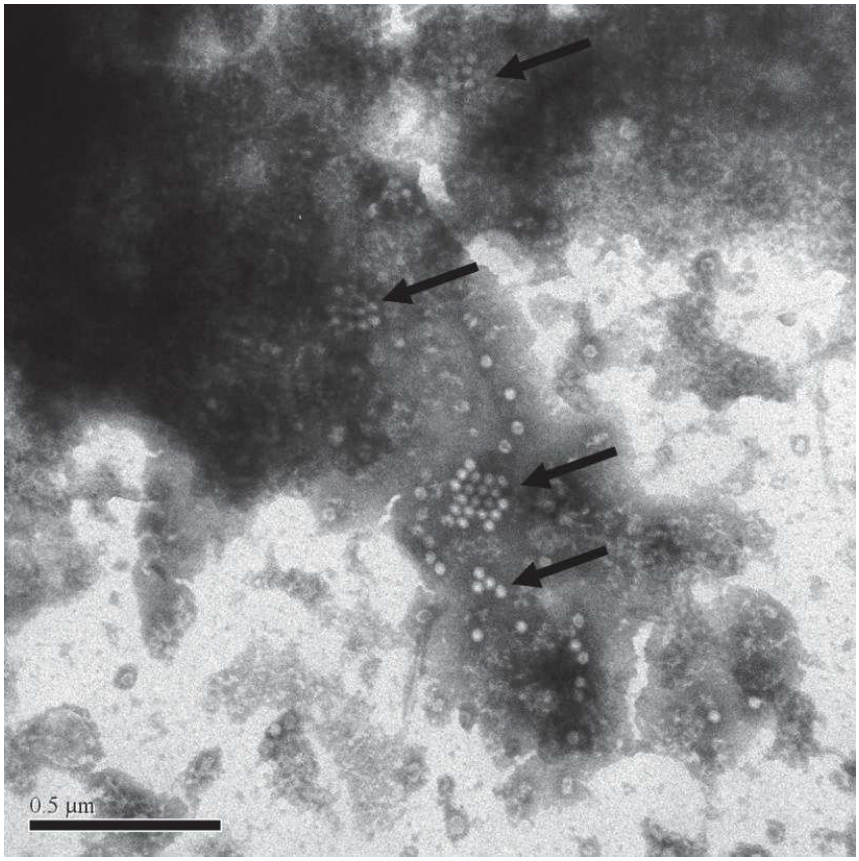
Um último experimento foi realizado somente com a proteína Cry1Ab na nona geração (F9) desta população, com lagartas obtidas de uma postura que apresentou 100% de eclosão de larvas. Foi o único bioensaio em que as mortalidades observadas seguiram um padrão de acordo com o aumento das doses da proteína durante as avaliações diárias dentro do período normal de avaliação do experimento (Quadro 3). Entretanto, o experimento foi acompanhado por mais dois dias extras, quando finalmente apareceram sintomas de infecção viral nas lagartas expostas as doses inferiores, da mesma forma observada anteriormente. O postulado realizado com as amostras coletadas neste experimento teve resultado positivo. A população São Paulo foi perdida na passagem da nona para a décima geração por problemas de contaminação, interrompendo os experimentos.

**Quadro 3 – Mortalidade de lagartas neonatas de *T. arnobia* em folhas de *E. urophylla* tratadas com diferentes doses da proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis* na nona geração (F9) da população São Paulo (Experimento 21).**

| Toxina Cry1Ab - População São Paulo - 9ª geração | |
|---|---|
| Dose (ng/cm²) | Mortalidade (%) |
| Testemunha | 12.50% |
| 10 | 25.00% |
| 30 | 43.75% |
| 50 | 50.00% |
| 400 | 62.50% |
| 800 | 87.50% |
| 2000 | 100.00% |
| 4000 | 100.00% |

A microscopia eletrônica da amostra de lagartas mortas com sintomas de infecção viral nos experimentos revelou a presença de vírus de partículas livres no material analisado (Figura 4).

**Figura 4 – Microscopia eletrônica de transmissão revelando vírus de partículas livres (não oclusos) presentes nas amostras dos postulados de Koch.**



## 4. DISCUSSÃO

As baixas mortalidades exibidas pelos tratamentos testemunha em todas as populações revelam uma mortalidade natural que incide sobre *T. arnobia* e ocorre de forma frequente ao longo das gerações, mas em níveis muito variáveis, que neste trabalho se mostraram sempre inferiores a 20% do número total de indivíduos analisados.

Paralelamente, os dados aleatórios de mortalidade obtidos para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa são atrelados às observações de lagartas mortas com sintomas de infecção viral, confirmada posteriormente pelos postulados de Koch e pela microscopia eletrônica, deixando clara a ação de microrganismos entomopatogênicos, que vieram a ser identificados como vírus de partículas livres em umas das amostras obtidas destas populações.

Logo, é possível considerar que a mortalidade natural observada seja, pelo menos em parte, a expressão natural destes entomopatógenos quando os insetos são mantidos em condições saudáveis. Ainda, é possível relacionar as proteínas Cry1 como fontes de estresse às lagartas, que já possuindo um entomopatógeno coexistindo dentro das populações, apresentaram maior suscetibilidade ao mesmo, elevando seus níveis de expressão, cuja aleatoriedade dos resultados pode estar relacionada a uma distribuição aleatória do entomopatógeno dentro da parcela diminuta de indivíduos analisados na população.

O resultado observado para a proteína Cry1Ab em suas doses mais elevadas pode ser interpretado como uma possível associação de maior toxicidade à *T. arnobia*, frente às demais proteínas testadas e, consequentemente, tempo letal inferior na dose avaliada, dessa forma não permitindo que o entomopatógeno tivesse tempo para se expressar e dominar o inseto, como foi visto nas doses inferiores desta mesma proteína e nos tempos adicionais de avaliação do último experimento da nona geração da população São Paulo.

A aleatoriedade dos resultados obtidos em todos os experimentos conduzidos não permitiu a identificação de quaisquer padrões esperados dentro da normalidade para este tipo de experimento e para as análises estatísticas tradicionalmente adotadas para os mesmos (análise de Probit). Desta forma, as tentativas de análise

estatística realizadas pelo software PoloPlus® (ROBERTSON et al., 2007) chegaram a resultados inconsistentes e por este motivo não foram exibidas.

Com relação ao último experimento realizado na nona geração da população São Paulo, no qual os dados apresentaram um padrão esperado para um ensaio de dose-resposta, as observações no tempo extra revelaram a presença de outro entomopatógeno em atividade. A visualização de vírus de partículas livres pela microscopia eletrônica de transmissão comprova sua existência, mas para quantificação de sua influência nos resultados muitos outros estudos são necessários, começando pela sua completa identificação, caracterização e quantificação do inóculo.

Desta forma, qualquer análise estatística para determinação de uma curva de concentração letal referente a ação exclusiva da proteína Cry1Ab seria incorreta, visto que não existe quantificação do inóculo contaminante muito menos comprovação da natureza de sua interação com a proteína.

A observação de sintomas de infecção viral, confirmada nos postulados de Koch realizados, deixa clara a atuação de entomopatógenos presentes nas populações e podem explicar as contaminações que culminaram nas perdas das populações e interrupções dos trabalhos neste estudo.

Ainda, os resultados obtidos na nona geração da população São Paulo mostram que possivelmente as medidas de descontaminação mais rigorosas tenham surtido efeito, reduzindo o inóculo contaminante e possibilitando a obtenção de resultados dentro de um padrão comparável à literatura. Infelizmente isto não pode ser comprovado em gerações seguintes da população São Paulo, devido à perda inesperada da população.

Considerando-se as rigorosas medidas de descontaminação aplicadas, a perpetuação deste microrganismo ao longo das gerações em diferentes populações mantidas em diferentes épocas ainda permanece um mistério. Pode-se levantar a hipótese de transmissão vertical das mariposas fêmeas para sua progênie, via ovos, característica frequentemente observada em diversos tipos de vírus entomopatogênicos. Entretanto a perda das populações interrompeu tais iniciativas de esclarecimento.

Os resultados observados neste trabalho envolvendo vírus e *B. thuringiensis* não possuem literatura correspondente já relatada nos seguintes contextos:

- Os trabalhos envolvendo populações de insetos que apresentassem vírus latentes e persistentes pelas gerações não mencionam tal fato relacionado a algum efeito observado na interação com *B. thuringiensis* e/ou suas proteínas inseticidas;
- Os estudos envolvendo *B. thuringiensis* e/ou suas proteínas inseticidas não mencionam sua influência na emergência de vírus nas amostras das populações de insetos avaliadas;
- As pesquisas sobre transmissão vertical destes vírus em populações de insetos também não relatam o efeito desta bactéria na emergência de tais doenças nas populações.

Desta forma, os resultados de todos os bioensaios realizados neste estudo não possuem um balizamento em outros trabalhos já publicados.

O que se conhece de longa data neste sentido são os efeitos que tais viroses podem apresentar no controle microbiano aplicado de populações de insetos-praga, em ações de manejo isoladas ou conjuntas ao *B. thuringiensis*, existindo literatura neste contexto envolvendo os *Alphabaculovirus* (MAGHOLLI et al., 2013).

Interações da mesma natureza observada neste estudo já foram observadas no Brasil entre outros entomopatógenos. O programa de controle biológico da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), baseava-se na aplicação do vírus *Anticarsia gemmatalis Multiple Nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), mas sua interação com o fungo *Nomuraea rileyi* era conhecida (MOSCARDI; ALLEN; GREENE, 1981) e no campo sua combinação potencializava a eficiência de controle proporcionada, contribuindo para o sucesso deste programa de manejo, que foi e é até hoje um dos maiores exemplos de controle microbiano viral já realizados no mundo (MOSCARDI, 1999; MOSCARDI et al., 2011).

## 5. CONCLUSÕES

- A presença de entomopatógenos, como o vírus de partícula livre observado, exerce forte influência em experimentos com proteínas isoladas de *B. thuringiensis*, visto que nas condições observadas, não é possível distinguir os efeitos do entomopatógeno sobre a ação da toxina para *T. arnobia*;

- Populações geograficamente distintas de *T. arnobia* apresentam entomopatógenos coexistindo com suas populações, os quais agem como controle microbiano natural e a campo podem potencializar a ação de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* ou terem sua expressão estimulada pelo uso dos mesmos;
- A toxicidade da proteína Cry1Ab em doses elevadas, associada aos sintomas clássicos de morte por *B. thuringiensis* observados nas mesmas, indicam que esta toxina pode ser a mais tóxica entre as avaliadas para as populações Minas Gerais e São Paulo.

## REFERÊNCIAS

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 41, n. 7, p.423-431, jul. 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Key environmental impacts of global genetically modified (GM) crop use 1996–2011. **Gm Crops & Food,** [s.l.], v. 4, n. 2, p.109-119, abr. 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.4161/gmcr.24459.

CRICKMORE, N. **Bt Toxin Nomenclature**: Full list of delta-endotoxins. [s.l.], 2017. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 12 mar. 2017.

ELEK, J. A.; BAKER, S. C.. Timing and frequency are the critical factors affecting the impact of defoliation on long term growth of plantation eucalypts. **Forest Ecology And Management**, [s.l.], v. 391, p.1-8, maio 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2017.02.004.

HERRERO, S. et al. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 384, n. 3, p.507-513, 15 dez. 2004. DOI: http://dx.doi.org/10.1042/bj20041094.

HURLEY, B. P. et al. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions,** [s.l.], v. 18, n. 4, p.921-933, 26 fev. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s10530-016-1081-x.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Relatório Anual 2016.** Brasília, 2016. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2017.

LAEMMLI, U. K. et al. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, n. 5259, p.680-685, ago. 1970. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1038/227680a0.

MAGHOLLI, Z. et al. Interaction effects of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and single nuclear polyhedrosis virus on *Plutella xylostella*. **Journal Of Plant Diseases And Protection**, [s.l.], v. 120, n. 4, p.173-178, ago. 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/bf03356471.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Sistema Agrofit**: Consulta de Praga/Doença. 2017. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/!ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5052&p_tipo_janela=NEW>. Acesso em: 10 abr. 2017.

MOSCARDI, F.; ALLEN, G. E.; GREENE, G. L. Control of the velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact of treatments on the natural incidence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. **Journal Of Economic Entomology**, College Park, v. 74, n. 4, p.480-485, Aug. 1981.

MOSCARDI, F. et al. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.257-289, jan. 1999. DOI: http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.257.

MOSCARDI, F. et al. Baculovirus pesticides: present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F.; PICHTEL, J. **Microbes and Microbial Technology**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 415-445.

RIBEIRO, G. T. et al. Constancy, Distribution, and Frequency of Lepidoptera Defoliators of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) in Four Brazilian Regions. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.629-636, 2 jun. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s13744-016-0410-1.

ROBERTSON, J L. et al. **Bioassays with Arthropods**. 2. ed. [s.l.]: CRC Press, 2007. 224 p.

TABASHNIK, B. E. et al. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-10, 12 out. 2015. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1038/srep15107.

ZANUNCIO, J. C. et al. Eficiência de *Bacillus thuringieneis* e de deltametrina, em aplicação aérea para o controle de *Thyrinteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae) em eucaliptal no Pará. **Acta Amazonica,** [s.l.], v. 22, n. 4, p.485-492, dez. 1992. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921992224492.

WILCKEN, C. F.; BERTI FILHO, E. Biologia de *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) em dieta artificial (I) Seleção das dietas e influência da posição da dieta artificial no desenvolvimento das lagartas. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 81, n. 3, p.287-300, 2006.

## 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas possibilidades dentro das pesquisas sobre o controle microbiano de *T. arnobia* e também dos demais lepidópteros desfolhadores que ocorrem nos plantios de eucalipto brasileiros.

Em uma das vertentes deste estudo, o TharCPV-14 foi o primeiro vírus patogênico à principal lagarta desfolhadora de eucalipto no Brasil a ter seu genoma completamente sequenciado. O isolamento de um vírus que apresenta suas partículas virais oclusas em poliedros pode ser o começo de todo um plano de pesquisa, cujo resultado final seria o desenvolvimento de um bioinseticida viral.

Em outra vertente deste estudo, os testes com diferentes toxinas de *B. thuringiensis* encontraram um grande obstáculo inesperado, a presença de vírus de partículas livres nas populações testadas. A avaliação da toxidade de cada uma das toxinas separadamente não foi conclusiva, mas as observações realizadas durante os experimentos forneceram indícios talvez ainda mais interessantes. *B. thuringiensis* e suas toxinas talvez tenham influência na indução de doenças letais a partir da ativação de vírus latentes nas populações destes insetos. A confirmação desta hipótese evidenciaria a ação sinérgica existente entre vírus e *B. thuringiensis* já comprovada em outros estudos, mas ainda não exibida no contexto da cultura do eucalipto no Brasil.

Sendo uma linha de pesquisa muito recente no país, a exploração de vírus patogênicos a lepidópteros desfolhadores em florestas plantadas possui apenas um caso de sucesso, aplicado em cultivos de Álamo no sul do Brasil em uma área com algumas dezenas de milhares de hectares. Em contraste, países como Canadá, Estados Unidos e Japão utilizam bioinseticidas virais há décadas em áreas de florestas com centenas de milhares a milhões de hectares de extensão.

Neste contexto, o entendimento dos mecanismos envolvidos na interação destes vírus com a bactéria *B. thuringiensis* pode levar a melhorias nas estratégias de controle atualmente empregadas no campo, incrementando ou prolongando a eficiência das mesmas na supressão de surtos populacionais. Entretanto, um longo caminho precisa ser percorrido, visto que esta é uma área de pesquisa com pouca evolução no setor florestal brasileiro. Viroses em diferentes populações de lepidópteros desfolhadores de eucalipto têm ocorrências observadas de longa data,

mas até o momento outros vírus patogênicos a estas espécies não foram devidamente caracterizados.

Os estudos com toxinas de *B. thuringiensis* dependem do desenvolvimento de metodologias de criação que eliminem ou reduzam o inóculo deste tipo de entomopatógeno ou da seleção de linhagens destes insetos que sejam livres destes contaminantes ou ainda resistentes aos mesmos. Dessa forma, os experimentos para determinação das toxicidades destas toxinas e demais efeitos de suas interações sobre as lagartas, poderiam fornecer respostas sem interferências externas tão agravantes. Caso contrário, os efeitos observados nunca serão resultado direto da estratégia em teste, mas sim resultado da combinação da estratégia em teste com o entomopatógeno "contaminante", levando a insegurança quanto aos resultados encontrados.

Somente a partir da redução significante dos efeitos externos provocados por "contaminantes" inseridos nestas populações será possível determinar os verdadeiros potenciais de exploração do TharCPV – 14 e das proteínas de *B. thuringiensis* no controle de *T. arnobia*. Estas definições são importantes para o futuro do setor florestal brasileiro, que diante dos novos desafios que se anunciam com as projeções de expansão das áreas e do emprego da biotecnologia a campo, certamente enfrentará problemas no cenário do controle de insetos-praga, necessitando cada vez mais conhecer a fundo os mecanismos de ação de seus principais agentes de controle utilizados.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF. **Anuário Estatístico da ABRAF 2006.** [s.l.]**, 2006. Disponível em: <http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-ABRAF-2006.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.**

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998.

BARBOSA, R. H. et al. Foraging Activity of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) at Various Densities on Pupae of the Eucalyptus Defoliator *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera. **Florida Entomologist**, [s.l.], v. 99, n. 4, p.686-690, dez. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1653/024.099.0417.

BERTOLA, A. **Eucalipto - 100 anos de Brasil.** [s.l.], 2013. Disponível em: <http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto_100 anos de Brasil_Alexandre_Bertola.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2017.

BRANDT, H. Die Isolierung des Polyeder-Virus und die Natur der Polyeder. **Anzeiger Für Schädlingskunde**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.47-47, jun. 1948. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/bf02340920.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon,** [s.l.], v. 49, n. 4, p.423-435, mar. 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 41, n. 7, p.423-431, jul. 2011. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Key environmental impacts of global genetically modified (GM) crop use 1996–2011. **Gm Crops & Food,** [s.l.], v. 4, n. 2, p.109-119, abr. 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.4161/gmcr.24459.

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 112, p.568-574, mar. 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.012.

CARRIÈRE, Y.; FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to Bt Crops? **Trends In Biotechnology,** [s.l.], v. 34, n. 4, p.291-302, abr. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.011.

CARSON, R. **Primavera silenciosa.** São Paulo: Portico, 1969.

CASTRO, M. E. B. et al. Identification of a new nucleopolyhedrovirus from naturally-infected *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) larvae on poplar plantations in South Brazil. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.149-154, out. 2009. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.011.

CASTRO, C. A. O. et al. Brief history of *Eucalyptus* breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 46, n. 9, p.1585-1593, set. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150645.

CHRISTIAN, P. D; POSSEE, R. D. Insect Viruses. **Encyclopedia of Life Sciences,** [s.l.], p.1-12, 15 jul. 2008. DOI: http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0020712.

COULIBALY, F. et al. The molecular organization of cypovirus polyhedra. **Nature,** [s.l.], v. 446, n. 7131, p.97-101, 1 mar. 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nature05628.

CRICKMORE, N. et al. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CRICKMORE, N. **Bt Toxin Nomenclature**: Full list of delta-endotoxins. [s.l.], 2017. Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 12 mar. 2017.

DAVIDSON, E. W. **Big fleas have little fleas**: how discoveries of invertebrate diseases are advancing modern science. Tucson: University Of Arizona Press, 2006. 198 p.

ELEK, J. A.; BAKER, S. C. Timing and frequency are the critical factors affecting the impact of defoliation on long term growth of plantation eucalypts. **Forest Ecology And Management**, [s.l.], v. 391, p.1-8, maio 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2017.02.004.

FOREST STEWARDSHIP COUNCIL - FSC. **FSC Principles and Criteria for Forest Stewardship**. Bonn, 2015. Disponível em: <https://ic.fsc.org/en/what-is-fsc-certification/principles-criteria>. Acesso em: 12 mar. 2017.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GORDON, K. H. J.; WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.1231-1232, nov. 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nbt1107-1231.

HARRISON, R.; HOOVER, K. Baculoviruses and Other Occluded Insect Viruses. **Insect Pathology,** [s.l.], p.73-131, 2012. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384984-7.00004-x.

HOLTZ, A. M. et al. É possível a associação *Podisus nigrispinus* e espécies de *Trichogramma* em um programa de controle biológico em florestas? **Idesia (arica)**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.85-88, ago. 2006. DOI: http://dx.doi.org/10.4067/s0718-34292006000200010.

HORTA, A. B. **Seleção e caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)**. 2012. 30 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária/Biotecnologia Aplicada à Agropecuária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

HURLEY, B. P. et al. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions,** [s.l.], v. 18, n. 4, p.921-933, 26 fev. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s10530-016-1081-x.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Relatório Anual 2016.** Brasília, 2016. Disponível em: <http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf>. Acesso em: 11 jan. 2017.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. **ICTV 9th Report**: Virus Taxonomy. Leiden, 2011. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae>. Acesso em: 14 mar. 2017.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **GM *Eucalyptus* approved for commercial use in Brazil.** [s.l.]**,** 2015. Disponível em: <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=13275>. Acesso em: 15 abr. 2015.

ISHIMORI, J. Contribution à l'étude de la grasserie du ver à soie (*Bombyx mori*). **Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie**, v. 116, p.1169, 1934.

JESUS, F. G. et al. Resistance of *Eucalyptus* spp. genotypes to eucalyptus brown looper *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). **Australian Journal Of Crop Science,** v. 11, n. 9, p.1016-1021, 2015.

KUNIMI, Y. Current status and prospects on microbial control in Japan. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.181-186, jul. 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.03.007.

LACEY, L. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 132, p.1-41, nov. 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009.

LEDFORD, H. Brazil considers transgenic trees. **Nature**, [s.l.], v. 512, n. 7515, p.357-357, 27 ago. 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/512357a.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Sistema Agrofit**: Consulta de Praga/Doença. 2017. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/!ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5052&p_tipo_janela=NEW>. Acesso em: 10 abr. 2017.

MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.9-13, maio 1994. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/0167-8809(94)90014-0.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA E INOVAÇÃO - MCTI. **Extrato de Parecer Técnico nº 4408.2015**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/documents/566529/686100/Extrato+de+Parecer+nº 4408 .2015.pdf/c6d77d0d-5a38-4030-87a2-9c6fc6d41841>. Acesso em: 07 jul. 2015.

MOAR, W. et al. Field-evolved resistance to Bt toxins. **Nature Biotechnology,** [s.l.], v. 26, n. 10, p.1072-1074, out. 2008. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nbt1008-1072.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: SBS, 2000. 114 p.

NASCIMENTO, M. L. **Caracterização parcial e patogenicidade de um vírus isolado de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)**. 2001. 50 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal

Activity. **Toxins,** [s.l.], v. 6, n. 12, p.3296-3325, 11 dez. 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/toxins6123296.

PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no Brasil:** parasitoides e predadores. São Paulo: Manole, 2002.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola,** [s.l.], v. 71, n. 5, p.420-429, out. 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0167.

PERALTA, C.; PALMA, L. Is the Insect World Overcoming the Efficacy of *Bacillus thuringiensis*? **Toxins,** [s.l.], v. 9, n. 1, p.39-43, 18 jan. 2017. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/toxins9010039.

PRICE, D. R. G.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.393-400, jul. 2008. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.004.

RIBEIRO, G. T. et al. Constancy, Distribution, and Frequency of Lepidoptera Defoliators of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) in Four Brazilian Regions. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.629-636, 2 jun. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s13744-016-0410-1.

ROHRMANN, G. F.; BEAUDREAU, G. S.. Characterization of DNA from polyhedral inclusion bodies of the nucleopolyhedrosis single-rod virus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. **Virology**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.474-478, dez. 1977. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(77)90198-2.

ROHRMANN, G. F. et al. Genetic relatedness of two nucleopolyhedrosis viruses pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. **Virology**, v. 84, p.213-217, 1978.

SCHÜHLI, G. S. et al. A review of the introduced forest pests in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.397-406, maio 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2016000500001.

SILVEIRA, E. **Mais celulose por centímetro quadrado**. 2013. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2013/02/11/mais-celulose-por-centimetro-quadrado/>. Acesso em: 15 set. 2014.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology,** [s.l.], v. 31, n. 6, p.510-521, 10 jun. 2013. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2597.

TABASHNIK, B. E. et al. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-10, 12 out. 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1038/srep15107.

UNSWORTH, J. **History of Pesticide Use.** [s.l.], 2010. Disponível em: <http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31>. Acesso em: 10 abr. 2017.

VAN FRANKENHUYZEN, K.; LUCAROTTI, C.; LAVALLÉE, R. Canadian contributions to forest insect pathology and to the use of pathogens in forest pest management. **The Canadian Entomologist,** [s.l.], v. 148, n. 1, p.210-238, 25 jun. 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.4039/tce.2015.20.

ZANUNCIO, J. C. et al. Eficiência de *Bacillus thuringieneis* e de deltametrina, em aplicação aérea para o controle de *Thyrinteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae) em eucaliptal no Pará. **Acta Amazonica,** [s.l.], v. 22, n. 4, p.485-492, dez. 1992. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921992224492.

ZANUNCIO, J. C. **Manual de pragas em florestas:** Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993. 140 p.

ZANUNCIO, J. C. et al. Population Dynamics of Lepidoptera Pests in *Eucalyptus urophylla* Plantations in the Brazilian Amazonia. **Forests,** [s.l.], v. 5, n. 1, p.72-87, 10 jan. 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.3390/f5010072.

ZANUNCIO, J. C. et al. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. **Annals Of Forest Science**, [s.l.], v. 73, n. 2, p.205-214, 30 mar. 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/s13595-016-0548-3.

ZEDDAM, J. et al. A cypovirus from the South American oil-palm pest *Norape argyrrhorea* and its potential as a microbial control agent. **Biocontrol**, [s.l.], v. 48, n.1, p.101-112, 2003. DOI: http://dx.doi.org/10.1023/a:1021234700472.