

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Fernanda de Oliveira

Mapeamento do genoma do baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV-19)

Mogi das Cruzes, SP  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Fernanda de Oliveira

Mapeamento do genoma do baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV-19)

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em biotecnologia.  
Área de Concentração: Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff

Mogi das Cruzes, SP

2006

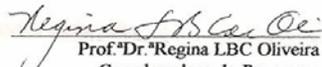
**ADENDO**

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**

Às quatorze horas e trinta minutos do dia vinte e dois de setembro de dois mil e seis, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Mapeamento do genoma do baculovírus Spodoptera frugiperda múltiplo nucleopoliedrovírus (SfMNPV-19), um isolado geográfico que apresenta alta virulência contra larvas de Spodoptera frugiperda" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Fernanda de Oliveira**.

Em adendo, o título da dissertação, conforme sugestão da banca, foi alterado para "Mapeamento do genoma do baculovírus Spodoptera frugiperda múltiplo nucleopoliedrovírus (SfMNPV-19)", o que deverá constar nas cópias definitivas da dissertação.

Mogi das Cruzes, 22 de setembro de 2006

  
Prof.ª Dr.ª Regina LBC Oliveira  
Coordenadora do Programa  
Pós-Graduação em Biotecnologia

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Oliveira, Fernanda de

Mapeamento do genoma do baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV-19) / Fernanda de Oliveira. – 2006.

92 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff

1. Baculovírus 2. *Spodoptera frugiperda* 3. Controle biológico 4. SfMNPV I. Título II. Wolff, José Luiz Caldas

CDD 579.2436

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas e trinta minutos do dia vinte e dois de setembro de dois mil e seis, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Mapeamento do genoma do baculovirus Spodoptera frugiperda múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV-19), um isolado geográfico que apresenta alta virulência contra larvas de Spodoptera frugiperda" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Fernanda de Oliveira**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores José Luiz Caldas Wolff e Wellington Luiz de Araújo da Universidade de Mogi das Cruzes e Fernando Hercos Valicente da Embrapa Milho e Sorgo, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovado por unanimidade  
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/majoria)

Mogi das Cruzes, 22 de setembro de 2006

Comissão Examinadora

Julgamento

José Luiz Wolff  
Prof. Dr. José Luiz C. Wolff

Aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

Wellington Luiz de Araújo  
Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo

Aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

F. Valicente  
Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente

Aprovado  
(aprovado(a)/reprovado(a))

**Aos meus pais**

José Lázaro de Oliveira

Elisabete de Oliveira

pelo apoio, confiança e exemplo de vida

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de iniciar e terminar mais esta importante jornada e por nunca me abandonar pelo caminho.

Ao Professor Doutor José Luiz Caldas Wolff pela amizade, dedicação, paciência e incentivo.

Aos funcionários e pesquisadores do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NBI) e Núcleo de Ciências Ambientais (NCA) da Universidade de Mogi da Cruzes.

À Secretária do Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Mogi da Cruzes, pela atenção e paciência.

Aos funcionários da Biblioteca da Universidade de Mogi da Cruzes pela ajuda indispensável.

Aos meus amigos que contribuíram para o andamento deste trabalho, que se não diretamente porém não menos importante contribuíram com sua amizade e atenção para que tornasse esta caminhada mais breve.

Em fim a todos que com uma palavra amiga vieram a nos enriquecer o caráter.

“Obrigada”

## RESUMO

Neste trabalho foi construído um banco de clones com fragmentos de DNA do isolado geográfico 19 do baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV-19). 28 clones específicos foram selecionados de forma que quase todo o genoma viral ficasse representado nestes clones. Esta seleção de fragmentos genômicos clonados formaram um arcabouço que está sendo usado no sequenciamento completo do genoma do SfMNPV-19. A análise das seqüências das extremidades dos clones selecionados mostrou que as ORFs do SfMNPV-19 apresentam alto grau de similaridade com as ORFs de três baculovírus cujo genoma completo já foi determinado o *Spodoptera exigua* MNPV, *Mamestra configurata* MNPV-A e *Mamestra configurata* MNPV-B. Além disso, verificamos que a maioria dos genes destes 4 baculovírus estão distribuídos de forma colinear. A seqüência de uma região de 8.5 kbp, que abrange as ORFs de 1a a 6, foi determinada e os genes da *poliedrina*, *1629*, *pk-1*, *Hoar*, *ORF 5* e *eODV-E56* foram identificados neste segmento do genoma viral. Observou-se que a ORF 5 tem alta variabilidade genética entre os baculovírus de espécies diferentes. Para verificar se esta variabilidade existia dentro da mesma espécie foi determinada a seqüência desta mesma região em dois outros isolados de SfMNPV. Os resultados preliminares mostram que a seqüência da ORF 5 é idêntica nos diferentes isolados de SfMNPV sugerindo que este não é um segmento sujeito a um maior grau de variabilidade intraespecífica e que esta região pode estar relacionada com a especificidade em relação ao hospedeiro.

Palavras-chave: baculovírus, genoma, *Spodoptera frugiperda*, SfMNPV

## ABSTRACT

A bank of clones was constructed with fragments of DNA of baculovirus *Spodoptera frugiperda* multicapside nucleopolyhedrovirus isolate 19 (SfMNPV-19). Specific clones had been selected of form that almost all the viral genome was represented in these clones. These selected clones used in the complete sequencing of the genome of the SfMNPV-19. The analysis of the sequences of the selected extremities of clones showed that the ORFs of the SfMNPV-19 presents high degree of similarity with the ORFs of three baculovirus whose complete genome was already determined the *Spodoptera exigua* MNPV, *Mamestra configurata* MNPV-A and *Mamestra configurata* MNPV-B. Moreover, it was observed that the majority of genes of these four baculovirus is distributed of form to colinear. The sequence of a region of 8.5 kbp, that it encloses the ORFs of 1a 6, was determined and the genes of the poliedrina, 1629, pk-1, Hoar, 5 ORF eODV-E56 had been identified in this segment of the viral genome. It was observed that the ORF5 has high genetic variability between baculovirus of Group II. It raised the possibility of this region that also can present high genetic variability between different isolated geografic of the SfMNPV. To verify this hypothesis was the sequence of this same region in two others isolated of SfMNPV. The results show that the sequence of ORF 5 is identical in differents isolates of SfMNPV suggesting that this is not a segment subject to a higher degree of variability intraspecific.

Keywords: baculovirus, genome, *Spodoptera frugiperda*, SfMNPV

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Relação dos genes presentes nos 13 genomas de baculovírus (HERNIOU <i>et al.</i> , 2003).....	31
<b>Tabela 2</b> Genoma dos Baculovírus.....	32
<b>Tabela 3</b> Primers desenhados para sequenciar as regiões internas dos clones PstI 4 e PstI43.....	40
<b>Tabela 04</b> Número de clones únicos das bibliotecas <i>Bgl</i> II, <i>Eco</i> RV, <i>Hinc</i> II, <i>Hind</i> III, <i>Kpn</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Sal</i> I e <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II e número de clones selecionados para construção do arcabouço de SfMNPV-19.....	44
<b>Tabela 5</b> Sequenciamento das extremidades dos clones selecionados para construção do arcabouço genômico de SfMNPV-19 e ORFs similares dos baculovírus SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B. ....	48
<b>Tabela 6</b> Função das proteínas codificadas por ORFs localizadas nas extremidades dos clones de SfMNPV-1.....	50
<b>Tabela 7</b> Sequenciamento das extremidades das regiões obtidas por PCR e ORFs similares dos baculovírus SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B.....	55
<b>Tabela 08</b> Descrição da Região de 8.5 kbp de SfMNPV-19 seqüenciada.....	57
<b>Tabela 09</b> Similaridade da ORF 1 A ORF 6 de SfMNPV-19 com ORFs de oito baculovírus.....	37
<b>Tabela 10</b> Comparação da região corresponde a ORF 5 de três baculovírus.....	71

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> Divisão de gêneros da família.....	15
<b>Figura 2</b> Nucleopoliedrovírus.....	16
<b>Figura 3</b> Análise filogenética do gene da poliedrina de nucleopoliedrovirus.....	17
<b>Figura 4</b> Ciclo da infecção por baculovírus.....	22
<b>Figura 5</b> Budded virus e corpos de oclusão.....	23
<b>Figura 06</b> pGEM 3Z (+).....	37
<b>Figura 7</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca <i>HindIII</i> digeridos com a enzima de restrição <i>HindIII</i> .....	44
<b>Figura 8</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca <i>PstI</i> digeridos com a enzima de restrição <i>PstI</i> . ....	45
<b>Figura 9</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca <i>KpnI</i> digeridos com a enzima de restrição <i>KpnI</i> . ....	45
<b>Figura 10</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca <i>BglII</i> .....	46
<b>Figura 11</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca <i>EcoRV</i> .....	46
<b>Figura 12</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca <i>HincII</i> ....	47
<b>Figura 13</b> Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca <i>BamHI/BglII</i> .....	47
<b>Figura 14</b> Regiões obtidas por PCR que não estão presentes no conjunto de clones selecionados para construção do arcabouço do genoma viral de SfMNPV-19.....	36
<b>Figura 15</b> Clones selecionados para o sequenciamento da região das seis primeiras ORFs de SfMNPV-19.....	57
<b>Figura 16</b> Pareamento das seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene da poliedrina dos baculovírus SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se) e AcMNPV (Ac).....	60
<b>Figura 17</b> Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene da poliedrina de SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se), AcMNPV (Ac), CpGV (Cp) e NeSeMNPV (Ns).....	61

<b>Figura 18</b> Pareamento das seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene <i>pk-1</i> dos baculovírus SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se) e AcMNPV (Ac).....	64
<b>Figura 19</b> Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene <i>pk-1</i> de SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se), AcMNPV (Ac) e CpGV (Cp).....	64
<b>Figura 20</b> Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene <i>pk-1</i> de SfMNPV-19 (Sf) e <i>Aedes aegypti</i> (Aa).....	67
<b>Figura 21</b> Pareamento das seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene <i>ODV-E56</i> dos baculovírus SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se) e AcMNPV (Ac).....	68
<b>Figura 22</b> Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene <i>ODV-E56</i> de SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se), AcMNPV (Ac), CpGV (Cp) (Ns), NeSeMNPV e CuniNPV (Cn).....	69
<b>Figura 23</b> Eletroforese em gel de agarose das amostras de PCR de isolados geográficos do baculovírus SfMNPV para confirmação do fragmento correspondente a ORF 5.....	72
<b>Figura 24</b> Pareamento das seqüências de nucleotídeos da ORFs 5 dos isolados de SfMNPV da Flórida (Fl), Guatemala (Gm) e SfMNPV-19 (Sf) .....	72

## ABREVIACES

AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> múltiplo nucleopoliedrovírus
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> múltiplo nucleopoliedrovírus
AsMNPV	<i>Agrotis segetum</i> múltiplo nucleopoliedrovírus
BmMNPV	<i>Bombix mori</i> múltiplo nucleopoliedrovírus
BmSNPV	<i>Bombix mori</i> nucleopoliedrovírus simples
BV	Budded virus
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (enzima)
CuniNV	<i>Culex nigripalpus</i> nucleopoliedrovirus
CpGV	<i>Cydia pomonella</i> granulovírus
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EGT	proteína Ecdisteride UDP-Glicosil Transferase
Epagri	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extenso Rural de Santa Catarina
GmMNPV	<i>Galleria mellonella</i> múltiplo nucleopoliedrovírus
GV	Granulovrus
IPTG	isopropil tio- $\beta$ -D-galactosideoe
LdMNPV	<i>Lymantria dispar</i> múltiplo nucleopoliedrovírus
MbMNPV	<i>Mamestra brassicae</i> múltiplo nucleopoliedrovírus
MacoMNPV-A	<i>Mamestra configurata</i> múltiplo nucleopoliedrovírus-A
MacoMNPV-B	<i>Mamestra configurata</i> múltiplo nucleopoliedrovírus-B
MNPV	Múltiplo nucleopoliedrovírus
NeseNPV	<i>Neodiprion sertifer</i> nucleopoliedrovirus

NPV	Nucleopoliedrovirus
OB	Corpo de Oclusão
OpMNPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> múltiplo nucleopoliedrovirus
OpSNPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> nucleopoliedrovirus simples
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PfMNPV	<i>Panolis flammea</i> múltiplo nucleopoliedrovirus
PK-1	<i>protein kinase-1</i>
RR	<i>ribonucleotide reductase</i>
RR1	<i>ribonucleotide reductase</i> large subunit (rr1)
SeMNPV	<i>Spodoptera exigua</i> múltiplo nucleopoliedrovirus
SpliMNPV	<i>Spodoptera littoralis</i> múltiplo nucleopoliedrovirus
SfMNPV	<i>Spodoptera frugiperda</i> múltiplo nucleopoliedrovirus
SNPV	Nucleopoliedrovirus simples
X-gal	5-bromo-4 – cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosideo

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	Classificação e estrutura viral.....	29
1.2	Especificidade ao hospedeiro .....	34
1.3	Ciclo de infecção .....	35
1.4	Fases da expressão gênica .....	39
1.5	Baculovírus como vetor de expressão .....	41
1.6	Uso de baculovírus no controle de pragas no Brasil .....	42
1.7	Melhoramento genético de Baculovírus.....	43
1.8	Lagarta do cartucho do milho <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera, Noctuidae) 43	
1.9	<i>Spodoptera frugiperda</i> múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV) .....	44
1.10	Sequenciamento do genoma dos baculovírus.....	45
1.11	Variabilidade genética em baculovírus .....	48
2	OBJETIVOS.....	51
3	METODOLOGIA.....	52
3.1	Extração do DNA viral.....	52
3.2	Preparo do vetor .....	52
3.3	Construção de Bibliotecas Genômicas .....	53
3.4	Análise dos clones das bibliotecas .....	54
3.5	Seqüenciamento das Bibliotecas Genômicas .....	55
3.6	Análise das seqüências .....	55
3.7	Seqüenciamento completo da região das seis primeiras ORFs .....	56

3.8 Fechamento de Gaps.....	56
3.9 Análise da ORF 5 .....	57
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
4.1 Construção do arcabouço do genoma de SfMNPV-19.....	58
4.2 Fechamento das Gaps .....	69
4.3 Análise da região das seis primeiras ORFs de SfMNPV-19 .....	71
4.4 Análise da ORF 5 de SfMNPV-19 .....	85
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>103</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Classificação e estrutura viral

A família Baculoviridae é formada por vírus que infectam insetos, principalmente da Ordem Lepidóptera (O'REILLY *et al.*, 1992). Membros desta família são caracterizados morfológicamente por possuir um ou vários nucleocapsídeos em forma de bastão envoltos por uma membrana e imersos em uma matriz protéica cristalina (corpo de oclusão). Esta família compreende dois gêneros: Nucleopoliedrovirus e Granulovirus (VOLKMAN *et al.*, 1995).

Nos nucleopoliedrovirus (NPV) o corpo de oclusão (OB) mede entre 1 e 15 µm de diâmetro, é denominado poliedro e envolve vários vírions. O poliedro é constituído principalmente pela *poliedrina*, uma proteína com peso molecular em torno de 30.000 daltons (SUMMERS *et al.*, 1980) e corresponde a cerca de 95% do conteúdo protéico do poliedro (MARUNIAK, 1986) (Figuras 1 e 2). Podemos encontrar nucleopoliedrovirus simples (SNPV) que apresenta apenas um nucleocapsídeo por envelope e nucleopoliedrovirus múltiplo (MNPV) que apresenta vários nucleocapsídeos por envelope. Nos granulovirus (GV) o corpo de oclusão mede entre 400 a 600 nm de diâmetro e é denominado grânulo, constituído principalmente por uma proteína, a *granulina*, e envolve apenas um vírion (FAUQUET *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2002).

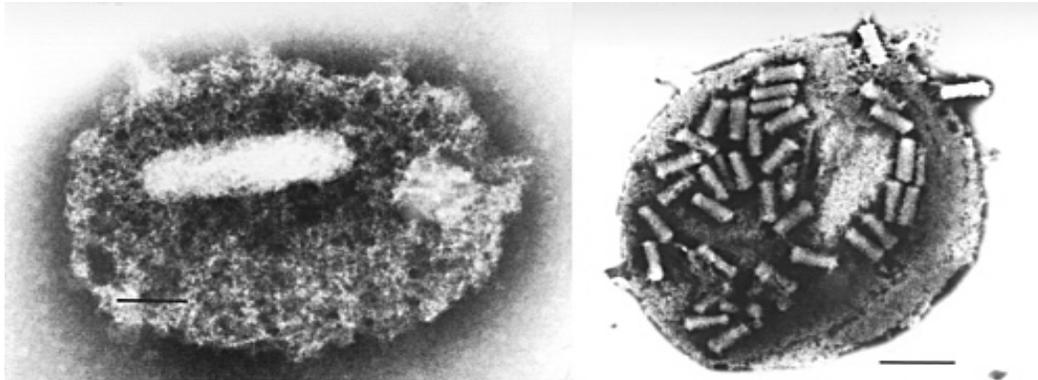
A nomenclatura das espécies de baculovirus inicia-se com o nome científico do hospedeiro do qual o vírus foi isolado pela primeira vez, seguido do gênero granulovirus o (GV) ou nucleopoliedrovirus (NPV). No caso dos NPVs, a denominação

múltiplo ou single antecede o gênero do baculovírus, múltiplo nucleopoliedrovirus (MNPV) ou single nucleopoliedrovirus (SNPV), de acordo com os critérios citados acima.

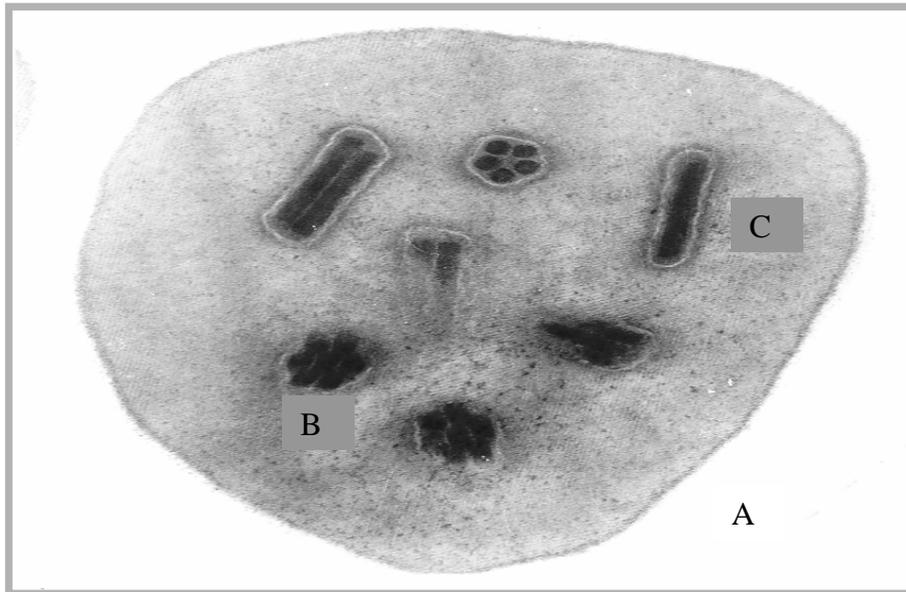
Estudos baseados na análise filogenética da seqüência de aminoácidos da *poliedrina* codificada e, posteriormente, com produtos de outros genes, dividiram os NPVs em dois grupos (NPVs I e NPVs II) (ZANOTTO *et al.*, 1993). Observou-se o agrupamento de *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), *Bombix mori* MNPV (BmMNPV), *Bombix mori* SNPV (BmSNPV), *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV), *Anticarsia gemmatalis* AgMNPV (AgMNPV), e possivelmente *Galleria mellonella* MNPV (GmMNPV) formando o Grupo I. Grupo II inclui *Mamestra brassicae* MNPV (MbMNPV), *Panolis flammea* MNPV (PfMNPV), *Spodoptera frugiperda* MNPV, *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) e *Orgyia pseudotsugata* SNPV (OpSNPV) (Figura 3).

Bulach *et al.*, (1999) analisando a filogenia do gene da *poliedrina* e do gene da *DNA polimerase* propuseram a subdivisão do Grupo II em três subgrupos (A, B e C). O Subgrupo II-A inclui os baculovírus *Mamestra brassicae* MNPV (MbMNPV), *Mamestra configurata* MNPV (MacoMNPV), *Panolis flammea* MNPV (PfMNPV), *Spodoptera exigua* MNPV, SpltNPV (Isolado da Índia), *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV). O Subgrupo II-B inclui os baculovírus *Spodoptera littoralis* NPV (SpliNPV), *Spodoptera litura* NPV (SpltNPV) (Isolado do Japão), *Spodoptera litura* NPV (SpltNPV) (Isolado Queensland). Os baculovírus *Orgyia pseudotsugata* SNPV (OpSNPV), OranNPV (tipo S) e *Buzura suppressaria* NPV (BusuNPV) (tipo S) formam o Subgrupo II-C (BULACH *et al.*, 1999).

Estudo mais recente, envolvendo a análise de genomas completos de 13 baculovírus mostram uma grande divergência entre NPVs que infectam lepidópteros e dípteros, sugerindo uma revisão da classificação da família (HERNIOU *et al.*, 2003).



**Figura 1: Divisão de gêneros da família *Baculoviridae*** - Granulovirus (a esquerda): apenas um nucleocapsídeo dentro do envelope; Nucleopoliedrovirus (a direita): vários nucleocapsídeos dentro de um único envelope. (Fonte: Dr Hans Ackermann, 2005)



**Figura 2: Nucleopoliedrovírus.** A) Poliedro contendo vírus envelopados no seu interior; B) Envelope viral contendo diversos nucleocapsídeos no seu interior; C) Nucleocapsídeo. (Fonte: Dr. Bryony Bonning, 2005)

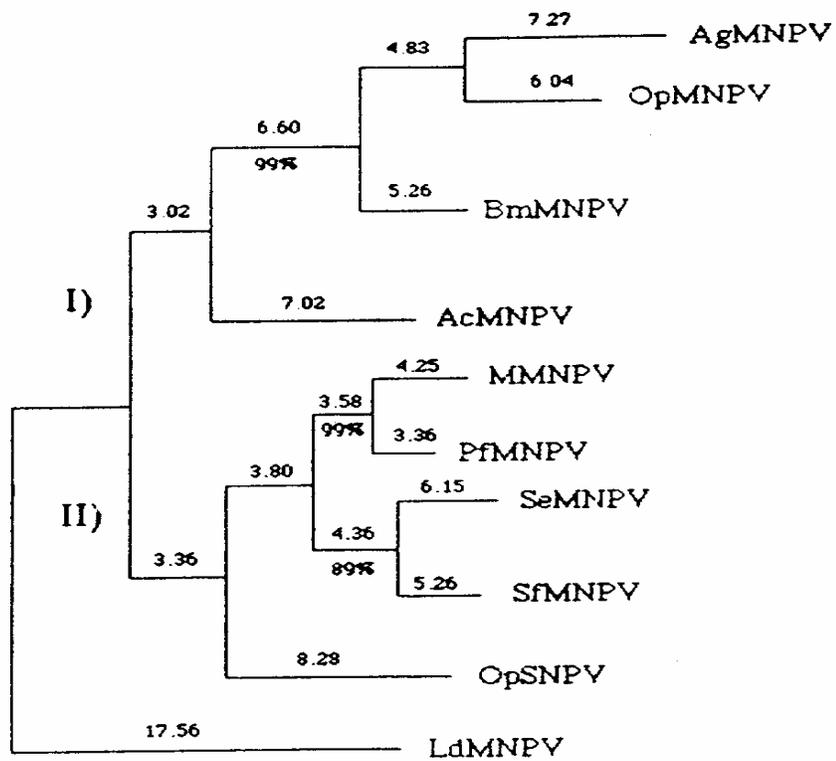


Figura 3: Análise filogenética do gene da poliedrina de nucleopoliedrovirus.  
 (Fonte: Zanotto *et al.*, 1993)

## 1.2 Especificidade ao hospedeiro

O processo que determina a especificidade dos baculovírus em relação ao hospedeiro ainda é pouco conhecido. Estudos utilizando linhagens de células de insetos têm sido realizados, mostrando que essas linhagens apresentam susceptibilidade variável quanto a permissividade para replicação viral, sendo que vários genes virais podem estar envolvidos neste processo (EVANS *et al.*, 1999; HAAS-STAPLETON *et al.*, 2005; YANASE *et al.*, 1998).

Algumas espécies de baculovírus apresentam um único hospedeiro outras espécies como por exemplo *Mamestra brassicae* nucleopoliedrovirus (MbNPV) infecta espécies em quatro famílias de lepidópteros e *Autographa californica* múltiplo nucleopoliedrovirus (AcMNPV) possui mais de 32 hospedeiros (CORY e MYERS, 2003).

A suscetibilidade de larvas e linhagens celulares dos baculovírus *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) e *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV) tem sido descrita, estudos com esse vírus têm sido realizados, na maioria, com linhagens celulares e larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* (DANYLUK e MARUNIAK, 1987; HINK, 1970; YANASE, *et al.*, 1998; HAAS-STAPLETON *et al.*, 2005). Estudos realizados por Danyluk e Maruniak (1987) com os baculovírus AcMNPV e SfMNPV infectando linhagens celulares e larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Trichoplusia ni* mostraram que todas as linhagens celulares e larvas derivadas destas espécies foram suscetíveis ao baculovírus AcMNPV. Por outro lado, linhagens celulares e larvas de *Trichoplusia ni* não foram suscetíveis ao baculovírus SfMNPV. Yanase *et al.*, (1998) estudaram linhagens celulares de *Spodoptera frugiperda* e *Spodoptera exigua* infectadas com o baculovírus AcMNPV e *Spodoptera exigua* MNPV

(SeMNPV), O baculovírus AcMNPV se replicou nas duas linhagens celulares, em contraste, o baculovírus SeMNPV se replicou eficientemente somente na linhagem celular de *S. exigua*. Simón *et al.*, (2004) estudaram os baculovírus *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV), *Spodoptera littoralis* MNPV (SpliMNPV) e SfMNPV por serem geneticamente similares e diferentes na especificidade em relação ao hospedeiro. A infecção para cada um dos três baculovírus se deu em larvas de *S. exigua*, *S. frugiperda* e *S. littoralis* e a infecção com SfMNPV e SpliMNPV foi letal a todos os hospedeiros. A infecção com SeMNPV foi letal mas as larvas não se desintegraram e a expressão dos genes foi mais lenta.

### **1.3 Ciclo de infecção**

O ciclo infectivo dos baculovírus inicia-se com a ingestão do alimento contaminado com poliedros ou grânulos. No ambiente alcalino do intestino médio da larva do inseto os corpos de oclusão são dissolvidos liberando os vírions que entram nas células epiteliais por meio de fusão mediada por receptores (HORTON e BURRAND, 1993). Após serem liberados no citoplasma, os nucleocapsídeos são transportados para o núcleo da célula onde os genes virais são transcritos e o genoma replicado. Na infecção viral, são produzidos dois tipos de vírions com genomas idênticos, porém diferentes em aspectos como: morfologia, infectividade e mecanismo de entrada em células (RIBEIRO *et al.*, 1998). Na fase inicial da infecção, o DNA viral é encapsulado no núcleo e conduzido à membrana plasmática, onde encontra uma proteína viral conhecida como GP64, e com esta abandona a célula por brotamento (WHITFORD *et al.*, 1989; ZHANG, *et al.* 2003). Estes vírions liberados por brotamento são chamados de “budded virus” (BVs) ou vírus extracelulares. Os BVs atingem a hemolinfa e o

sistema traqueal do inseto que servem de via de contaminação para outros tecidos do inseto (RIBEIRO *et al.*, 1998).

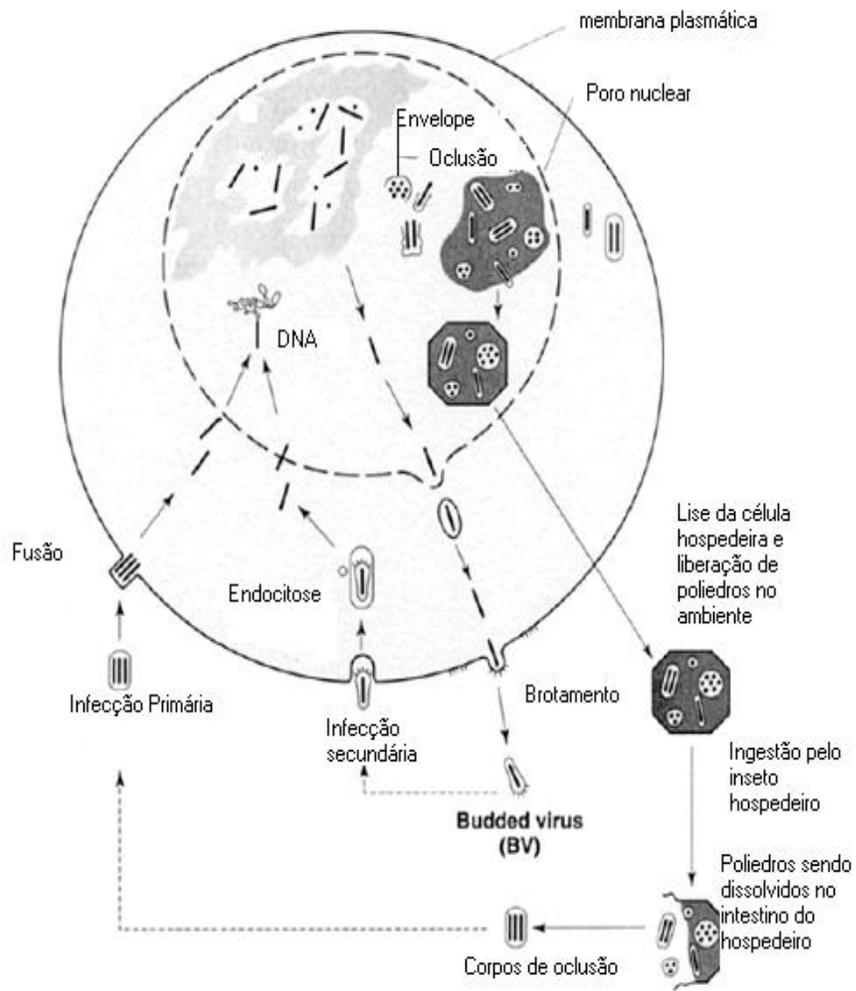
Na fase mais adiantada da infecção, os vírions produzidos são envelopados no núcleo e envolvidos pela proteína *poliedrina* (NPVs) ou *granulina* (GVs), que polimerizam no núcleo formando os corpos de oclusão (OB). A oclusão dos vírus em uma matriz protéica é um processo importante para garantir proteção às partículas infectivas na transmissão do vírus de inseto no ambiente (ROHRMANN, 1986). Assim como os esporos de bactérias ou fungos, as oclusões virais permitem aos baculovírus resistirem a condições ambientais fora do hospedeiro por longos períodos (ROHRMANN, 1986), exceto em condições de pH altamente alcalino, como encontrado no intestino médio das lagartas (aproximadamente 11) (RIBEIRO *et al.*, 1998).

Algumas proteínas estruturais tem sido identificadas como exclusivas dos vírus derivados dos OBs (MA *et al.*, 1993). Entre elas temos as proteínas *gp41*, considerada a principal glicoproteína dos OBs, *ODV-25*, *ODV-E66*, *ODV-E56*, *ODV-E18*, *ODV-E35* e *ODV-EC27* (HAYAKAWA *et al.*, 2000; WHITFORD e FAULKNER, 1992). A proteína *P74* foi identificada como essencial para a infectividade dos OBs (HAAS-STAPLETON *et al.*, 2004). Os vírions derivados dos corpos de oclusão liberados no lúmen do intestino aderem às microvilosidades do epitélio e entram no núcleo pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática, o que foi demonstrado como sendo mediado pela proteína *P74* que se liga a um receptor específico da célula hospedeira (HAAS-STAPLETON *et al.*, 2004).

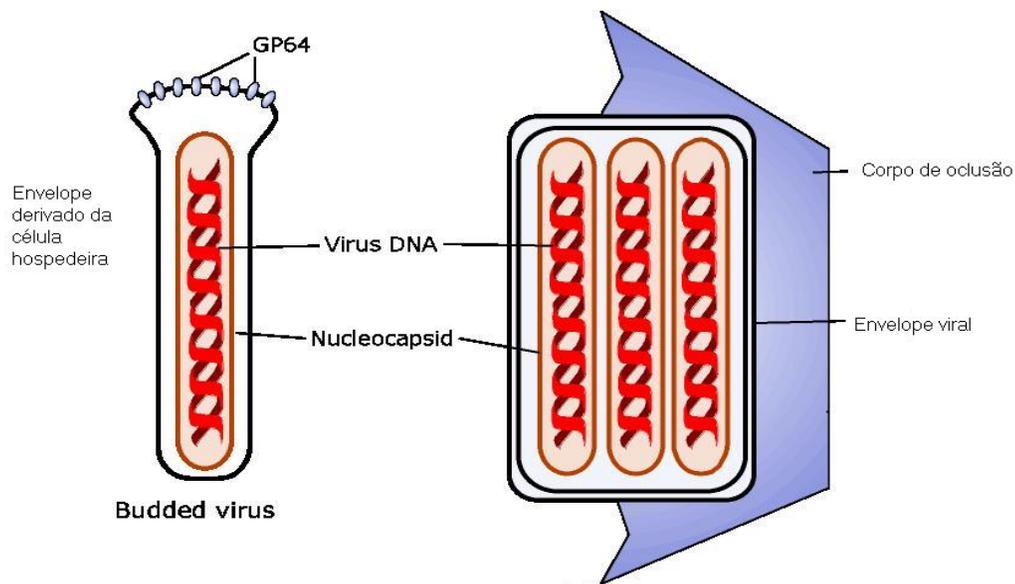
Estudos mostram que *P87capsid*, *VP39* e *VP1054* são proteínas estruturais comuns em BVs e OBs requeridas para a formação do nucleocapsídeo (LU *et al.*, 2002; LU e CARTENS, 1992; OLSZEWSKI e MILLER, 1997).

Na fase tardia da infecção celular as proteínas *quitinase* e a *catepsina* são secretadas e acumulam-se na larva hospedeira à medida que a infecção progride (HAWTIN *et al.*, 1995). Elas agem, provavelmente, na dissolução dos tecidos do inseto, e em particular da cutícula larval, que se rompe após a morte do hospedeiro, liberando os poliedros (HAWTIN *et al.*, 1997). Análises filogenéticas sugerem que os baculovírus adquiriram o gene da *quitinase* de uma bactéria, *Serratia marcescens*, através de transferência horizontal do gene. (HAWTIN *et al.*, 1995).

Lagartas doentes apresentam sintomas como perda de apetite, parada no desenvolvimento larval, geotropismo negativo, mudança na coloração das lagartas, que se tornam cor de creme, e na textura do tegumento, que se torna frágil (RIBEIRO *et al.*, 1998; VOLKMAN e KEDDIE, 1990). No final do processo infectivo o corpo do inseto geralmente se rompe liberando grande quantidade de corpos de oclusão no ambiente, servindo como inóculo para a transmissão (FUXA, 1991; MOSCARDI, 1999).



**Figura 4: Ciclo da infecção por baculovírus** (Fonte: The University of Queensland, Austrália, 2005).



**Figura 5: Budded virus e corpos de oclusão:** Nesta figura pode se observar o formato em bastão do “budded virus” (BV) dos baculovírus. O envelope viral e o corpo de oclusão (OB) podem ser observados no lado direito da figura. (Fonte: Virology: Baculoviruses, 2004)

## 1.4 Fases da expressão gênica

Estudos com AcMNPV mostraram que a expressão dos genes virais se sucedem em cascata onde os genes expressos em uma fase regulam a expressão de genes das fases seguintes (MILLER, 1997; RIBEIRO et al., 1998). A expressão dos genes pode ocorrer de uma forma intensa ou mais moderada dependendo do tipo de regulação comandada pela região promotora que também determina a fase que ocorrerá a transcrição (MILLER, 1997).

A expressão gênica pode ser dividida em duas fases: a fase precoce que ocorre antes da replicação e a fase tardia que se inicia com a duplicação viral (MILLER, 1997).

Na fase precoce os genes são expressos por volta de 2 a 7 h p. i., sendo que parte destes genes não necessita da síntese prévia de produtos virais para a sua expressão. Esta fase é subdividida em fase precoce imediata (immediate early phase) e fase precoce atrasada (delayed early phase) (RIBEIRO et al., 1998). Genes expressos nesta

fase são transcritos por uma RNA polimerase do hospedeiro, a *RNA polimerase II*, e são importantes para ativação e potenciação da expressão de diversos genes virais necessários para o estabelecimento da infecção (FRIESEN e MILLER, 1985; GUARINO *et al.*, 1998; HUH e WEAVER, 1990). Na fase precoce os baculovírus conseguem controlar a resposta de morte celular das células infectadas sintetizando proteínas inibidoras da apoptose. As proteínas *IAP* e *P35* conseguem inibir o processo apoptótico celular impedindo a ativação das caspases, tornando-se essenciais para o processo de infecção e multiplicação viral (CASTRO *et al.*, 1999; CLEM e MILLER, 1993; MANJI *et al.* 1997). Os baculovírus codificam também uma proteína, Ecdisteróide UDP-Glicosil Transferase (*EGT*), que inativa o hormônio da muda do inseto, desta forma os insetos infectados se mantêm mais tempo na fase de larva, mantendo o fornecimento de produtos metabólitos para a replicação do vírus (FLIPSEN *et al.*, 1995; TUMILASCI *et al.*, 2003).

A fase tardia é subdividida em fase tardia (late) e fase muito tardia (very late) (RIBEIRO *et al.*, 1998). Nesta fase temos os genes tardios (late genes), transcritos entre 6 e 24 h p. i., e os genes tardios hiperexpressos (hyperexpressed late genes), que ocorre a partir de 18 h p. i. até 72 h p. i., quando a célula é lisada (RIBEIRO, 1998; ROHRMANN, 1992).

Durante a fase tardia aparece uma *RNA polimerase* que pode ser diferenciada por cromatografia da *RNA polimerase II* (YANG *et al.*, 1991). Uma característica marcante da expressão de genes da fase tardia é a resistência à  $\alpha$ -amanitina, um inibidor da *RNA polimerase II* (HUH e WEAVER, 1990). Esta fase também é caracterizada pela inibição da expressão gênica do hospedeiro, ocorrendo a expressão de genes estruturais para a montagem de partículas. Genes expressos nesta fase da infecção apresentam com

frequência na sua região promotora uma seqüência conservada (“motif”) pentanucleotídica (A/T/G)TAAG (MORRIS e MILLER, 1994; XING *et al.*, 2005).

Os genes tardios hiperexpressos são fortemente expressos no final da infecção quando ocorre a síntese de poliedrina e produção dos corpos de oclusão. A *poliedrina* é o principal componente do corpo de oclusão. Outra proteína sintetizada nesta fase é a *P10*. Estruturas fibrilares formadas pela proteína viral *P10* podem estar relacionadas com a desintegração celular (FAKTOR *et al.*, 1997). Estudos mostram que a partir dessa fase há um bloqueio na síntese de proteínas celulares (CASTRO *et al.*, 1999).

## **1.5 Baculovírus como vetor de expressão**

O maior conhecimento do genoma de baculovírus permitiu sua manipulação genética. Dentre as vantagens para a utilização de baculovírus como vetores de expressão estão a existência de promotores fortemente ativos durante a fase tardia da infecção não interferindo no ciclo viral, simplicidade de manipulação e a expressão adequada de proteínas exógenas em um ambiente eucarioto. Esse sistema permite a clonagem de grandes inserções, sendo possível a clonagem de fragmentos de DNA de até 15.000 pares de base (O'REILLY *et al.*, 1992).

Baculovírus recombinantes podem ser construídos com a inserção de um ou mais genes de interesse no lugar de um gene não-essencial para replicação, sob comando de um promotor viral forte. A expressão dos genes de interesse ocorre mediante infecção de uma linhagem de células de inseto permissiva ao vírus recombinante. Durante a infecção viral, por recombinação homóloga, o gene original no vírus é substituído pelo gene de interesse contido no plasmídeo.

## 1.6 Uso de baculovírus no controle de pragas no Brasil

Desde o começo da década de 80 o baculovírus AgMNPV vem sendo utilizado como agente para controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*), principal inseto praga da cultura da soja no Brasil, cerca de 2 milhões de hectares de soja são tratados anualmente com um bioinseticida a base do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV) (MOSCARDI *et al.*, 2002).

Ainda na década de 80 um vírus patogênico ao mandarová (*Erinnyis ello* granulovirus) foi utilizado em programa de controle dessa praga. Esse programa foi implantado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), sendo o bioinseticida então denominado “Baculovirus erinnyis” (SOUZA *et al.*, 2006). Vários baculovírus no Brasil estão sendo utilizados no controle de pragas, entre eles o vírus *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV), utilizado no controle de pragas de hortaliças e plantas ornamentais nos EUA, Europa, Tailândia. (SOUZA *et al.*, 2002).

Outro baculovírus que tem grande potencial de utilização no Brasil é o baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo Nucleopoliedrovirus (SfMNPV). O SfMNPV infecta *Spodoptera frugiperda*, um lepidóptero que além de ser a principal praga da cultura de milho no Brasil também é uma importante praga do sorgo, do trigo e do arroz (GOMEZ *et al.*, 1999). Mais recentemente, a preocupação com a *Spodoptera frugiperda* se acentuou devido a ocorrência de resistência à pesticidas (CRUZ, 2002).

Uma limitação no uso do baculovírus no controle de pragas agrícolas é seu modo de ação lento, larvas infectadas continuam vivas e se alimentando pelo menos 2 a 4 dias após a infecção (RIBEIRO *et al.*, 1998) Por esse motivo, estratégias estão sendo estudadas a fim de aumentar sua eficiência no controle de pragas.

## **1.7 Melhoramento genético de Baculovírus**

Baculovírus geneticamente modificados já foram construídos com intuito de melhorar capacidade de controle de pragas agrícolas. Diversas modificações foram feitas para o baculovírus tipo AcMNPV. Por exemplo, Chang *et al.*, (2003) construíram um baculovírus que produzia corpos de oclusão que continham toxina de insetos retirada de *Bacillus thuringiensis*, aumentando a infectividade do baculovírus. McIntosh *et al.*, (2004) demonstraram que a inserção de proteínas fluorescentes no genoma viral protegeu os baculovírus dos efeitos da luz ultravioleta. Flipsen *et al.*, (1995) mostraram que a inativação do gene *EGT* resultou em baculovírus mais patogênicos. Esse vírus alterado foi aprovado nos Estados Unidos pela “*U.S. Environmental Protection Agency*” para ser utilizado no campo em caráter experimental (CASTRO, 2005).

No Brasil, Pinedo *et al.*, (2003) construíram um baculovírus AgMNPV recombinante que apresenta-se mais letal ao inseto hospedeiro, possuindo o gene *EGT* inativo. O gene *EGT* codifica uma enzima que inibe o hormônio ecdisona, responsável pela muda do inseto. Durante a infecção de larvas com o vírus melhorado geneticamente, o hormônio ecdisona do inseto não é inativado, desta forma as lagartas mudam de estágio mais rapidamente do que as infectadas pelo vírus selvagem e o dano que causam às plantas atacadas é menor, pois alimentam-se menos.

## **1.8 Lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae)**

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* é uma das principais pragas da cultura do milho, podendo causar danos de até 34% no rendimento de grãos.

(VALICENTE e CRUZ 1991; CRUZ 1995). No Brasil, *S. frugiperda* ataca amendoim, algodão e diversas gramíneas cultivadas (CRUZ, 2002; SALVADORI e RUMIATTO, 1982), incluindo o trigo cujas plantas consome cerca de 131,5 cm<sup>2</sup> de área foliar para completar a sua fase larval (SALVADORI e RUMIATTO, 1982).

O dano é causado pela lagarta que, no início, apenas raspa a folha, mas quando desenvolvida perfura a folha danificando-a por completo e destruindo o cartucho (CRUZ, 1995). A duração do período larval é de 12 a 30 dias, findo o qual a lagarta mede aproximadamente 50 mm de comprimento. Sua coloração varia de pardo escura, verde até quase preta (SILVIE *et al.*, 2001). Devido ao canibalismo é comum encontrar apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho.

Quando completamente desenvolvida, a lagarta sai do cartucho e penetra no solo, onde se transforma em pupa. O adulto é uma mariposa que tem em torno de 25 mm de comprimento e cerca de 35 mm de envergadura e possui longevidade de cerca de 12 dias (SILVIE *et al.*, 2001).

### **1.9 *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV)**

A utilização de inseticidas químicos tem sido o principal método de controle lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), porém, seu uso indiscriminado e incorreto tem diminuído sua eficiência, principalmente devido ao surgimento de populações de insetos resistentes e contaminação dos agricultores e do ambiente (CRUZ, 2002).

Entre os agentes de controle biológico de *S. frugiperda* o baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV) mostra potencial para ser usado como um bioinseticida. A utilização do SfMNPV no controle de *S. frugiperda* tem sido investigada principalmente no Brasil e na América central (ESCRIBANO *et*

*al.*, 1999; VALICENTE E CRUZ, 1991). Em estudo recente observou-se que vários isolados geográficos do baculovírus SfMNPV possuem diferenças biológicas e que um isolado da região de Sertaneja, Paraná, chamado de isolado 19 (SfMNPV-19) mostrou a maior virulência contra larvas de *S. frugiperda* (BARRETO *et al.*, 2005; GOMEZ *et al.*, 1999).

A ocorrência de SfMNPV em várias localidades e a análise destes isolados geográficos com enzimas de restrição mostrou a existência de isolados geográficos SfMNPV geneticamente distintos (LOH *et al.*, 1982; MARUNIAK *et al.*, 1984).

Uma limitação no uso de SfMNPV como bioinseticida é a produção do vírus em larga escala pois o corpo das lagartas infectadas é facilmente dissolvido. Com isso os vírus produzidos misturam-se na dieta causando dificuldades para a purificação dos poliedros virais.

### **1.10 Sequenciamento do genoma dos baculovírus**

O genoma dos baculovírus é composto por uma molécula de DNA, fita dupla, circular cujo tamanho varia de 80 a 180 Kb nas diferentes espécies virais, as análises do genoma sugerem que 100-200 proteínas podem ser codificadas (FAUQUET *et al.*, 2004).

O maior conhecimento do genoma dos baculovírus pode abrir novas possibilidades de se aumentar a utilização e a eficiência do vírus como vetor de proteínas exógenas e bioinsetida. A construção dos mapas genéticos será apenas o início de um processo que deverá identificar todos os genes, conhecer suas funções e as proteínas que eles codificam.

O primeiro baculovírus a ser totalmente seqüenciado foi o baculovírus *Autographa californica* múltiplo nucleopoliedrovirus (AcMNPV), intensamente estudado e espécie tipo dos baculovírus (AYRES *et al.*, 1994). O primeiro baculovírus a ser seqüenciado no Brasil foi o baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV (OLIVEIRA *et al.*, 2006), seqüenciado no Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática (Lemb), da Universidade de São Paulo (USP) e no Laboratório de Virologia Molecular, da Universidade de Mogi das Cruzes (UMC).

Atualmente, existem sete genomas de granulovírus e 23 de nucleopoliedrovirus disponíveis no GenBank (NCBI, 2006). Os genomas recém seqüenciados são comparados com seqüências disponíveis no GenBank. Essa comparação busca seqüências semelhantes mostrando a existência de genes compartilhados, bem como o grau de similaridade entre esses genes, entre outras comparações.

O maior genoma de um baculovírus já seqüenciado até o momento é do granulovírus *Xestia c-nigrum* granulovirus (XcGV) que possui 178.733 pares de base (HAYAKAWA *et al.*, 1999). O maior genoma de um nucleopoliedrovirus seqüenciado até o momento é o do *Lymantria dispar* múltiplo nucleopoliedrovirus (LdMNPV) que possui 161.046 pares de bases (KUZIO *et al.*, 1999).

Herniou *et al.*, (2003) comparou o genoma de 13 baculovírus dividido em quatro grandes grupos (GVs, NPVs I, NPVs II e NPVs que infectam dípteros) e observou que existe 30 genes que estão presentes nos 13 genomas (Tabela 1). Esse grupo de genes foi chamado de genes “cerne” e estão divididos em genes que codificam proteínas estruturais e não-estruturais (HERNIOU *et al.*, 2003). As proteínas não-estruturais estão envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, replicação do DNA viral, regulação da expressão gênica, inibidores de apoptose, genes auxiliares (IJKEL *et al.*, 1999; LI, Q. *et*

*al.*,2002). As proteínas estruturais participam de uma série de funções tais como ligação do vírion na superfície celular, penetração, descapsidação e aquisição do envelope viral (HAYAKAWA *et al.*, 2000; IJKEL *et al.*, 1999; LI, Q. *et al.*,2002; ROHRMANN, 1992). Apesar da poliedrina ser altamente conservada entre os baculovírus, ela não está presente nos genes ‘cerne’ pois esta proteína não é codificada por baculovírus que infectam dípteros (AFONSO *et al.*,2001; HERNIOU *et al.*, 2003).

**Tabela 1: Relação dos genes presentes nos 13 genomas de baculovírus (HERNIOU *et al.*, 2003)**

<b>Função da proteínas codificadas</b>	<b>Genes presentes em todos os baculovírus</b>
Replicação	Lef-1 (ac14), lef-2 (ac6), dnapol (ac65), helicase (ac95)
Transcrição	P47 (ac40), lef-8 (ac80), lef-9 (ac62), vlf-1 (ac77), lef-4 (ac90), lef-5 (ac99)
Estrutural	ac23 (ld130), gp41 (ac80), odv-ec27 (ac144), odv-e56 (ac148), p6.9 (ac100), p74 (ac138), vp91/p95 (ac83), vp39 (ac89), vp1054 (ac54)
Auxiliar	Alk-exo (ac133)
desconhecida	38K (ac98), ac22, ac68, ac81, ac92, ac96, ac109, ac115, ac142

**Tabela 2: Genoma dos Baculovírus**

Vírus	Classificação	Tamanho (bp)	Nº provável de genes	Referência
<i>Autographa californica</i> MNPV	NPV-I Lepidopt.	133.894	153	AYRES <i>et al.</i> , 1994
<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	NPV-I Lepidopt.	118.584	136	HYINC <i>et al.</i> , 2002
<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	NPV-I Lepidopt.	133.000		OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2006
<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	NPV-II Lepidopt.	135.611	139	IJKEL <i>et al.</i> , 1999
<i>Lymantria dispar</i> MNPV	NPV-II Lepidopt.	161.046	163	KUZIO <i>et al.</i> , 1999
<i>Mamestra configurata</i> MNPV-A	NPV-II Lepidopt.	155.600	169	LI, Q. <i>et al.</i> , 2002
<i>Mamestra configurata</i> MNPV-B	NPV-II Lepidopt.	158.482	167	LI, L. <i>et al.</i> , 2002
<i>Cydia pomonella</i> GV	GV Lepidoptera	123.500	143	LUQUE <i>et al.</i> , 2001
<i>Culex Nigripalpus</i> NPV	NPV Díptera	108.252	109	AFONSO <i>et al.</i> , 2001
<i>Neodiprion sertifer</i> NPV	NPV Hymenoptera	86.462	90	MARUNIAK <i>et al.</i> , 2004

Nota: Classificação, tamanho do genoma e número provável de genes de alguns principais baculovírus cujo genoma já foi seqüenciado e está disponível no GenBank (NCBI).

### 1.11 Variabilidade genética em baculovírus

Em baculovírus a recombinação genética é um importante mecanismo que aumenta a diversidade genética e confere ao vírus uma maior adaptabilidade a mudanças ambientais (CORY *et al.*, 2005). Muitas diferenças de infectividade dos vírus podem estar associadas com pequenas mudanças na composição genética devido a erros na replicação (ESCRIBANO *et al.*, 1999).

Heldens *et al.*, (1996) estudaram um isolado americano de SeMNPV e após a análise com enzimas de restrição dos vírus gerados pela passagem da espécie selvagem em cultura de célula de inseto, obtiveram um vírus mutante. Este baculovírus mutante, que apresentou deleção de aproximadamente 20 kbp, não foi capaz de infectar larvas de *S. exigua* (HELDENS *et al.*, 1996).

A análise de isolados de MacoMNPV com enzimas de restrição revelou alta variabilidade genética da espécie. Li, L. *et al.*, (2002) analisaram o genoma de duas espécies de baculovírus isolados de *Mamestra configurata* e observaram que esses vírus são relativamente próximos, mas evoluíram em duas espécies separadas, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B. O baculovírus MacoMNPV-B se mostrou 3422 pb maior que MacoMNPV-A (LI, L. *et al.*, 2002). Li *et al.*, (2005) investigaram as diferenças genéticas entre dois variantes de MacoNPV-A, v90/2 e v90/4. O genoma de MacoNPV-A v90/4 foi menor 1404 bp do que MacoNPV-A v90/2. O variante MacoNPV-A v90/4 apresentou reduzida virulência no controle do inseto hospedeiro (LI *et al.*, 2005).

Maruniak *et al.*, (1984) obtiveram sete variantes de SfmNPV após a passagem deste vírus em células de inseto em cultura e análise do DNA viral com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. As diferenças entre os variantes, quando comparados com a espécie designada como o isolado clonal SfmNPV-2, se concentraram em quatro regiões do mapa físico de SfmNPV nas quais foram observadas inserções ou deleções de nucleotídeos (MARUNIAK *et al.*, 1984).

Escribano *et al.*, (1999) investigaram o perfil eletroforético gerado com enzimas de restrição de DNA obtido de quatro isolados americanos de SfmNPV (Flórida, Lousina, Argentina e Nicarágua). As análises indicaram que os quatro isolados são geneticamente similares, entretanto o isolado da Nicarágua mostrou algumas variações

quando comparados com os outros isolados. Em testes biológicos, o isolado da Nicarágua apresentou maior virulência indicando que pequenas diferenças genéticas podem ter conseqüências biológicas significativas (ESCRIBANO *et al.*, 1999).

Simón *et al.*, (2004) obtiveram 9 genótipos diferentes a partir de SfmNPV isolado na Nicarágua. Alguns destes variantes apresentaram deleções de alguns genes quando comparados com a espécie selvagem e possuíam maior eficiência no controle das lagartas.

## **2 OBJETIVOS**

Com o objetivo de se conhecer melhor o genoma de SfMNPV-19 foi construído neste trabalho um banco de clones com fragmentos de DNA do SfMNPV-19. O seqüenciamento das extremidades destes clones serviu para montagem de um arcabouço que está servindo para o seqüenciamento completo do genoma de SfMNPV-19. A seqüência completa das seis primeiras ORFs foi determinada e a região de alta variabilidade localizada na ORF 5 foi comparada com outros isolados geográficos de SfMNPV.

O maior conhecimento do genoma deste baculovírus, a identificação todos os seus genes, suas funções e as proteínas que eles codificam servirá de ferramenta para desenvolver estratégias que visam aumentar a eficiência deste vírus como bioinsetida.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Extração do DNA viral

Os poliedros de SfMNPV-19 foram obtidos de um extrato bruto de larvas infectadas fornecido pelo Dr. Fernando Valicente do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (Embrapa; Sete Lagoas, MG). O procedimento utilizado para extração de DNA viral a partir de poliedros foi uma adaptação do método de O'Reilly *et al.*, 1992 (Anexo A).

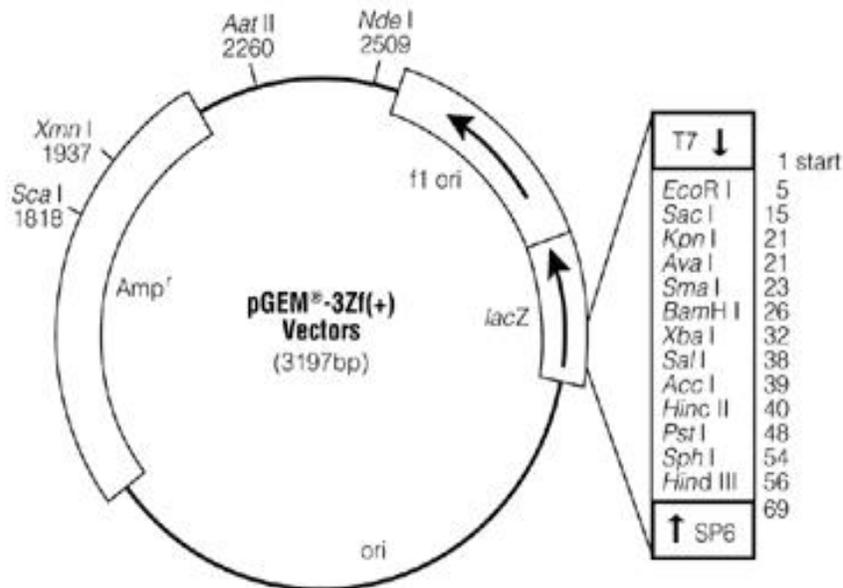
### 3.2 Preparo do vetor

Utilizou-se o plasmídeo pGEM 3Z(+) como vetor. Este plasmídeo possui o gene AMP<sup>r</sup>, que confere resistência ao antibiótico ampicilina, as bactérias que possuem este plasmídeo são capazes de sobreviver em um meio de cultura contendo ampicilina. Este plasmídeo também possui o gene *LacZ* que codifica a  $\beta$ -galactosidase. Dentro da região do gene *LacZ* existem sítios únicos de reconhecimento de enzimas de restrição (Figura 5).

Os plasmídeos pGEM 3Z(+) foram linearizados com as enzimas de restrição *Bgl*III, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I separadamente, e tratados com a enzima fosfatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase- CIAP*) de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Esta enzima tem a função de remover o grupo 5-fosfato das extremidades evitando o reanelamento. Após tratamento com a CIAP, os plasmídeos foram

submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%), recortados do gel e purificados com o Kit GFX (Amersham).

**Figura 6: pGEM 3Z** - Representação circular do mapa físico do vetor pGEM 3Z contendo 3.197bp



(Fonte: Promega, 2005)

### 3.3 Construção de Bibliotecas Genômicas

O DNA viral foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl*II, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I, separadamente, e foi submetido a dupla digestão com as enzimas *Bam*HI e *Bgl*II de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. O objetivo da dupla digestão foi reduzir o tamanho dos fragmentos obtidos com as enzimas *Bam*HI e *Bgl*II, facilitando a clonagem. As enzimas de restrição *Hinc*II e *Eco*RV produzem terminações “cegas”, por essa razão os fragmentos gerados com estas enzimas podem ser clonados em plasmídeos linearizados com outra enzima. Após a

digestão o DNA foi purificado com Kit Omega (Omega Bio-Tec) seguindo as instruções do fabricante. Para reação de ligação, utilizou-se a enzima T4 ligase (Invitrogen). A quantidade do DNA viral e do DNA plasmidial foi estimada por visualização das bandas resultantes da eletroforese em géis de agarose (0,8%). Após a ligação, bactérias competentes (*Escherichia coli*, DH5 $\alpha$ ) foram transformadas com o material ligado seguindo o método de choque térmico (SAMBROOK, 1999). O material foi inoculado em placas com ágar LB contendo ampicilina, o indutor IPTG (isopropil tio- $\beta$ -D-galactosideo) e o composto cromogênico X-gal (5-bromo-4 – cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosideo) que possibilita diferenciar colônias nas quais o plasmídeo reanelou (coloração azul) daquelas que possuem fragmentos inseridos nos plasmídeos (coloração branca). Bactérias provenientes das colônias com coloração branca foram multiplicadas em meio LB líquido contendo ampicilina e cultivadas 16 horas a 37° C com agitação constante. O DNA plasmidial destes clones foi extraído pelo método de extração alcalina (BIRNBOIM & DOLY, 1979).

### **3.4 Análise dos clones das bibliotecas**

O DNA plasmidial recombinante das bibliotecas *Bgl*III, *Hinc*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I e com a dupla digestão *Bam*HI/*Bgl*III foi digerido com enzima de restrição. Após a digestão, o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose (0,8%) para estimativa da quantidade de DNA a ser usada na reação de sequenciamento.

### **3.5 Seqüenciamento das Bibliotecas Genômicas**

A seqüência das extremidades dos clones selecionados das bibliotecas *Bgl*III, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I e *Bam*HI/*Bgl*III foi determinada com os *primers* universais T7 e SP6. Os *primers* utilizados se encontram no plasmídeo, na região que flanqueia o fragmento clonado (Figura 5). O seqüenciamento foi realizado segundo o método de interrupção de cadeia (SANGER *et al.*, 1977) utilizando-se o kit BigDye v.3 (Applied Biosystems). Após a reação, o material foi analisado no equipamento de seqüenciamento automático *ABI Prism 377 Sequencer* (Applied Biosystems) do Laboratório de Virologia Molecular, Universidade de Mogi da Cruzes (UMC).

### **3.6 Análise das seqüências**

As seqüências obtidas foram inicialmente analisadas no programa *Códon Code Aligner* (CodonCode Corporation). Este programa utiliza o sistema Phed/Pharp para aferir a qualidade de cada base seqüenciada e tem a capacidade de remover tanto as seqüências provenientes do vetor assim como as seqüências de baixa qualidade, um processo chamado de "trimagem". Após passarem pela trimagem, as seqüências obtidas dos clones foram submetidas à análise pelo programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) que vasculhou o banco de dados Genbank a procura de ORFs com similaridade aquelas encontradas nos clones seqüenciados. Para melhor análise das proteínas putativas de SfMNPV-19 foi utilizado o programa CLUSTAL 1.83 (<http://align.genome.jp>) que fez o pareamento dos aminoácidos das proteínas putativas de SfMNPV-19 com seqüências de outros baculovírus disponíveis no Genbank.

### 3.7 Sequenciamento completo da região das seis primeiras ORFs

Para fechar as *gaps* da região das seis primeiras ORFs clones que abrangem essa região foram selecionados e *primers* internos foram desenhados. O sequenciamento e análise da região foram feitos como descrito na seção 3.5 e 3.6

**Tabela 03: Primers desenhados para sequenciar as regiões internas dos clones PstI 4 e PstI 43**

Clones	primer	posição	dir
<i>PstI</i> 4	CCTCCACCTCCTCCTCT	1389	←
<i>PstI</i> 4	CGCAACTCAAAAACATGGTG	2213	←
<i>PstI</i> 4	CTATGCAACCTCCTCCTTCG	3123	←
<i>PstI</i> 4	GTCGAAACTAACGCGGACAC	3646	←
<i>PstI</i> 4	CGCCAGACATGAAAACAATAG	4119	←
<i>PstI</i> 43	TCGTTCTTTGTTCTGTCCATC	4668	←
<i>PstI</i> 43	CCTCTTATCGCGGATGTATG	4863	→
<i>PstI</i> 43	GCAAACGAGCACATCAACTC	5400	→
<i>PstI</i> 43	AACTTACAGATGCCGTCGAG	6145	→
<i>PstI</i> 43	CTGTACCTGCGGGAAATAATC	6892	→

Nota: Descrição da sequência, posição e direção dos *primers* desenhados para sequenciar a região interna dos clones *PstI* 4 e *PstI* 43.

### 3.8 Fechamento de Gaps

Para regiões que não estiverem presentes no conjunto de clones selecionados para a construção do arcabouço do genoma viral, vários clones das bibliotecas genômicas construídas serão utilizados como fita molde para o desenho de *primers*. Essas regiões serão sintetizadas através de PCR. O sequenciamento e análise das amostras de PCR serão realizados de acordo com o procedimento descrito acima.

### **3.9 Análise da ORF 5**

A região que corresponde a ORF 5 possui alta variabilidade genética entre os baculovírus do Grupo II, Subgrupo A. Para verificar se esta variabilidade genética ocorre dentro da espécie *primers* específicos foram desenhados (Primer 1: 5' CCTCTTATCGCGGATGTATG 3'; Primer 2: 5' TTGTTGGTGGGTGTGTTACC 3') para sintetizar um fragmento que abrange a região da ORF 5 através de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). Até o momento o isolado geográfico proveniente da Guatemala e o variante SfMNPV-2 foram utilizados nesta análise. Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0.8%) para confirmar a síntese do fragmento. Os dois amplicons obtidos foram purificados com o kit Omega e seqüenciados como descrito na seção 3.5.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Construção do arcabouço do genoma de SfMNPV-19

Um dos objetivos deste trabalho foi a construção de uma biblioteca genômica para o sequenciamento do SfMNPV-19. Esta biblioteca formou um arcabouço contendo clones com fragmentos de todo o genoma viral a partir dos quais o sequenciamento está realizado. Para este fim, um total de oito bibliotecas genômicas foram construídas utilizando-se DNA viral digerido com as enzimas de restrição *Bgl*III, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I e dupla digestão com *Bam*HI e *Bgl*III. Como vários dos clones obtidos possuíam o mesmo segmento de DNA, foi utilizado um procedimento para selecionar clones únicos para cada uma destas bibliotecas. Para realizar esta seleção, os clones de cada biblioteca foram digeridos por enzimas de restrição e analisados em géis de eletroforese (dados não apresentados). A análise eletroforética dos clones digeridos possibilitou a seleção de alguns clones únicos (aqueles que apresentaram tamanho diferente de todos os demais). Por outro lado, vários clones de uma mesma biblioteca contêm fragmentos que não puderam ser diferenciados pelo tamanho do inserto. A seleção destes últimos clones foi realizada pelo sequenciamento de suas extremidades. As seqüências das extremidades dos fragmentos foram obtidas e comparadas com as seqüências disponíveis no Genbank utilizando o programa BlastX (ALTSCHUL *et al.*, 1990), disponível no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). O programa BlastX (ALTSCHUL *et al.*, 1990) traduz a seqüência de DNA submetida e realiza uma triagem no banco de dados visando identificar proteínas, ou segmentos de proteínas, que apresentem similaridade a proteína putativa que esta sendo analisada.

Esta análise possibilitou a identificação dos genes localizados nas extremidades dos clones das bibliotecas e a seleção de novos clones únicos. Desta forma 60 clones contendo diferentes segmentos do genoma viral foram selecionados (Tabela 4) (Figuras 7 a 13).

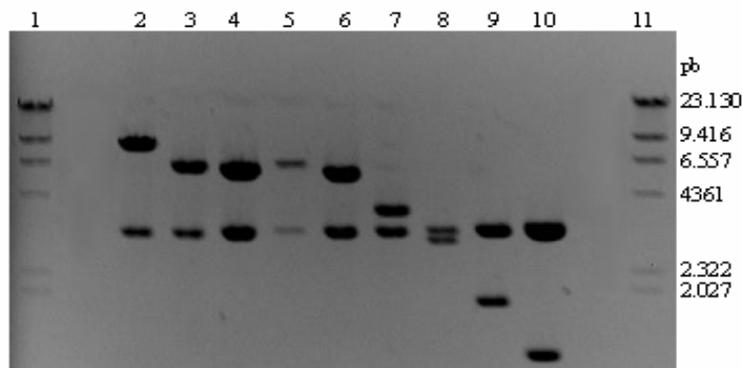
As ORFs localizadas nas extremidades dos clones do SfmNPV-19 apresentaram alto grau de similaridade com ORFs de três baculovírus cujo genoma completo já foi determinado, o *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) (IJKEL *et al.*, 1999), o *Mamestra configurata* MNPV-A (MacoMNPV-A) (Li, Q. *et al.*, 2002) e o *Mamestra configurata* MNPV-B (MacoMNPV-B) (Li, L. *et al.*, 2002). Com as análises dos clones logo foi possível confirmar que os genes dos baculovírus SfmNPV-19, SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B estão distribuídos de forma colinear, ou seja, a localização da maioria dos genes é equivalente (Tabela 5). A alta similaridade entre os genomas destes vírus já havia sido sugerida após o sequenciamento e a análise de uma região de 5.1 kb de SfmNPV isolado de Sete Lagoas-MG (TUMILASCI *et al.*, 2002). Mais recentemente, Simón *et al.*, (2005) mostraram similaridade e colinearidade de um isolado de SfmNPV da Nicarágua com baculovírus do Subgrupo II-A.

Como o genoma do SfmNPV-19 é colinear com genomas de outros baculovírus do grupo II, subgrupo A, foi possível fazer uma seleção de clones contendo segmentos que, quando sobrepostos, representam quase todo o genoma viral. Esta seleção possibilitou a montagem de um arcabouço do genoma contendo 28 clones selecionados das várias bibliotecas genômicas construídas (Tabela 4). Os clones que formam o arcabouço construído para o sequenciamento do genoma viral apresentam, nas suas extremidades, segmentos de 45 genes putativos (Tabela 5) que codificam proteínas com funções estruturais e não estruturais (Tabela 6). A distribuição destes genes no genoma

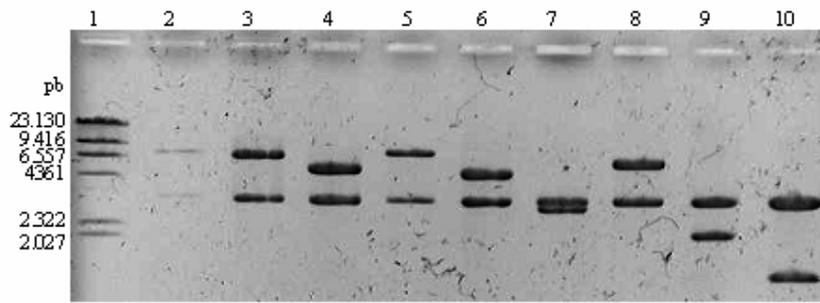
(Tabela 5) mostra que genes que codificam proteínas estruturais e não estruturais estão espalhados pelo genoma e são codificados nas duas fitas do DNA viral. Esta ausência de organização gênica por função é típica dos baculovírus.

**Tabela 4: Número de clones únicos das bibliotecas *Bgl*II, *Eco*RV, *Hinc*II, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sal*I e *Bam*HI/*Bgl*II e número de clones selecionados para construção do arcabouço de SfMNPV-19.**

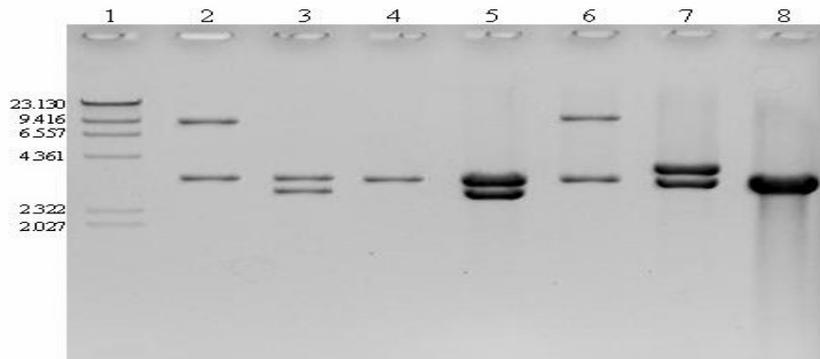
Bibliotecas	Clones únicos	Clones selecionados
<i>Bgl</i> II	3	1
<i>Eco</i> RV	11	5
<i>Hinc</i> II	12	1
<i>Hind</i> III	9	8
<i>Kpn</i> I	7	
<i>Pst</i> I	8	7
<i>Sal</i> I	2	2
<i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II	8	1
Total	60	28



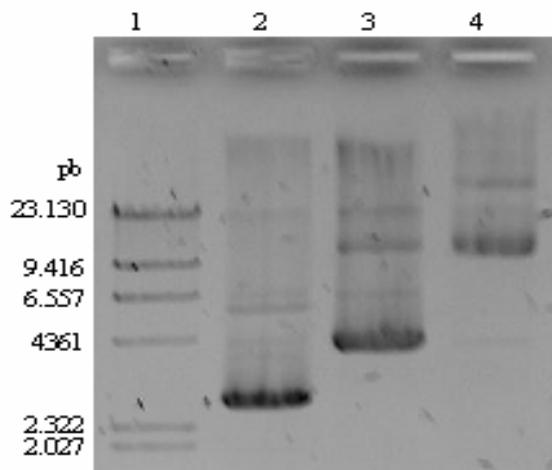
**Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca *Hind*III digeridos com a enzima de restrição *Hind*III. Canaleta 1e 11: Padrão; Canaletas 2 a 10: clones 29, 10, 16, 19, 33, 7, 22, 26, 8.**



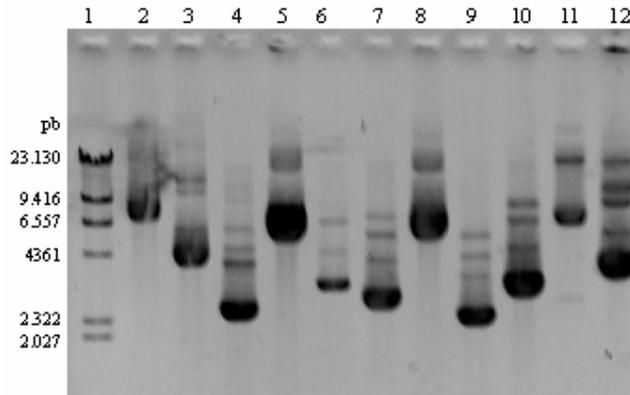
**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca *PstI* digeridos com a enzima de restrição *PstI*. Canaleta 1: Padrão; Canaletas 2 a 10: clones 7, 43, 4, 18, 44, 2, 5, 3, 52.



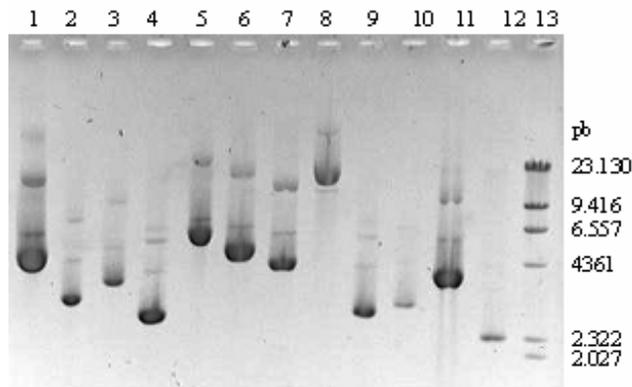
**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca *KpnI* digeridos com a enzima de restrição *KpnI*. Canaleta 1: Padrão; Canaletas 2 a 8: clones 27, 41, 38, 3, 12, 2, 5.



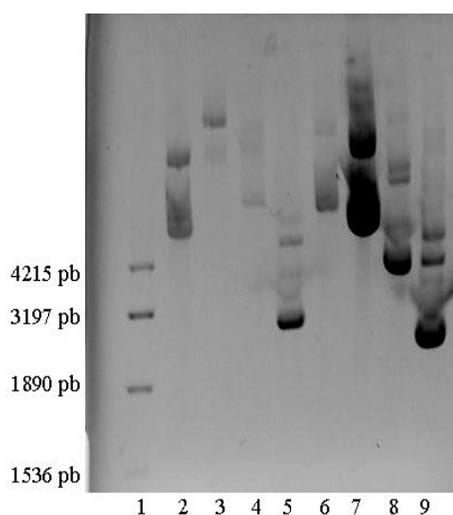
**Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca *Bgl*II.** Canaleta 1: Padrão; Canaletas 2 a 4: clones 2, 4, 6.



**Figura 11: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca *Eco*RV.** Canaleta 1: Padrão; Canaletas 2 a 12: clones 1, 8, 6, 11, 14, 15, 16, 18, 27, 37, 57.



**Figura 12: Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca *Hinc*II.** Canaletas 13 e 14: Padrão; Canaletas 1 a 12 e 15 a 18: clones 1, 3, 6, 9, 11, 15, 16, 22, 27, 26, 40, 46.



**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos clones únicos da biblioteca construída com dupla digestão *Bam*HI/ *Bgl*II. Canaleta 1: Padrão; Canaletas 2 a 9: clones 1, 2, 5, 8, 10, 11, 14, 15, 16.

**Tabela 05 – Sequenciamento das extremidades dos clones selecionados para construção do arcabouço genômico de SfMNPV-19 e ORFs similares dos baculovírus SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B.**

Clones	Primers	proteína	Similaridade (%)		
			SeMNPV	MacoMNPV-A	MacoMNPV-B
4 <i>Pst</i> I	SP6	<i>poliedrina</i>	1	1	1
4 <i>Pst</i> I	T7	<i>HOAR</i>	4	4	4
43 <i>Pst</i> I	T7	<i>hypothetical protein</i>	-	-	-
43 <i>Pst</i> I	SP6	<i>Envelope fusion protein</i>	8	9	8
7 <i>Pst</i> I	SP6	<i>Envelope protein</i>	8	9	8
7 <i>Pst</i> I	T7	<i>cathepsin</i>	16	33	28
18 <i>Pst</i> I	T7	<i>Cathepsin</i>	16	33	28
		<i>ecdysteroid UDP-</i>			
18 <i>Pst</i> I	SP6	<i>glucosyltransferase</i>	27	39	33
2 <i>Pst</i> I	T7	<i>hypothetical protein</i>	28	40	35
2 <i>Pst</i> I	SP6	<i>hypothetical protein</i>	30	42	37
16 <i>Sal</i> I	T7	-	31		

16 <i>SalI</i>	SP6	<i>Alkaline exonuclease</i>	41	54	47
<i>GAP 41 a 43</i>					
39 <i>SalI</i>	T7	<i>hypothetical protein</i>	43	56	50
39 <i>SalI</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	44	57	51
<i>GAP 44 A 47</i>					
46 <i>HincII</i>	T7	<i>Lef-6</i>	47	62	61
46 <i>HincII</i>	SP6	<i>Lef-6</i>	47	62	61
<i>GAP 47 A 52</i>					
4 <i>BglIII</i>	T7	<i>hypothetical protein</i>	52		
4 <i>BglIII</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	54	72	71
15 <i>BamHI/BglIII</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	54	72	71
15 <i>BamHI/BglIII</i>	T7	<i>p13-like protein</i>	56		28
38 <i>EcoRV</i>	SP6	<i>ODV-E66</i>	57	78	77
38 <i>EcoRV</i>	T7	<i>p87capsid</i>	61	81	82
33 <i>HindIII</i>	SP6	<i>p87capsid</i>	61	82	81
33 <i>HindIII</i>	T7	<i>hypothetical protein</i>	68	88	87
6 <i>EcoRV</i>	T7	<i>hypothetical protein</i>	69	92	91
6 <i>EcoRV</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	69	92	91
10 <i>HindIII</i>	T7	<i>helicase</i>	70	93	91
10 <i>HindIII</i>	SP6	<i>lef-4</i>	74	98	97
25 <i>HindIII</i>	T7	<i>Lef-4</i>	74	98	97
25 <i>HindIII</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	79	103	102
5 <i>PstI</i>	SP6	<i>VP39</i>	75	99	98
5 <i>PstI</i>	T7	<i>glycoprotein 41kD</i>	80	104	103
16 <i>HindIII</i>	T7	<i>glycoprotein 41kD</i>	80	104	103
16 <i>HindIII</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	90	112	111
8 <i>EcoRV</i>	T7	<i>p26</i>	87	109	108
8 <i>EcoRV</i>	SP6	<i>desmoplakin</i>	92	114	113
26 <i>Hinc II</i>	SP6	<i>desmoplakin</i>	92	114	113
26 <i>Hinc II</i>	T7	<i>DNA polymerase</i>	93	115	114
<i>GAP 93 A 99</i>					
18 <i>EcoRV</i>	T7	<i>P94-like protein</i>	99	126	125
18 <i>EcoRV</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	100	128	127
<i>GAP 100 A 103</i>					
11 <i>EcoRV</i>	T7	<i>hypothetical protein</i>	103	131	130
11 <i>EcoRV</i>	SP6	<i>vp1054 virion protein</i>	105	133	132
<i>GAP 105 A 109</i>					
19 <i>HindIII</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	109	138	137

19 <i>HindIII</i>	T7	<i>lef-8</i>	112	141	140
22 <i>HindIII</i>	T7	<i>ODV-E66</i>	113	143	142
22 <i>HindIII</i>	SP6	<i>putative P47-like protein</i>	115	145	144
<i>GAP 115 A 118</i>					
3 <i>PstI</i>	T7	<i>hypothetical protein</i>	118	148	147
3 <i>PstI</i>	SP6	<i>39K/pp31</i>	120	150	149
<i>GAP 120 A 125</i>					
40 <i>HincII</i>	T7	<i>hypothetical protein</i>	125	154	153
40 <i>HincII</i>	SP6	<i>hypothetical protein</i>	125	154	153
<i>GAP 125 A 127</i>					
3 <i>HincII</i>	T7	<i>Lef-6</i>	127	156	155
3 <i>HincII</i>	SP6	<i>Lef-6</i>	127	156	155
<i>GAP 127 A 131</i>					
29 <i>HindIII</i>	T7	<i>p74</i>	131	160	159
29 <i>HindIII</i>	SP6	<i>ie0</i>	138	168	167
<i>ribonucleotide reductase</i>					
7 <i>HindIII</i>	T7	<i>large subunit (rr1)</i>	139		
7 <i>HindIII</i>	SP6	<i>orf1629</i>	2	2	2

Nota: Os *primers* utilizados para sequenciamento das extremidades dos clones foram os *primers* universais T7 e SP6. As seqüências obtidas foram analisadas no programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1990) que identificou ORFs similares nos baculovirus *Spodoptera exigua* múltiplo Nucleopoliedrovirus (SeMNPV), *Mamestra configurata* múltiplo Nucleopoliedrovirus-A (MacoMNPV-A) e *Mamestra configurata* múltiplo Nucleopoliedrovirus-B (MacoMNPV-B).

**Tabela 6: Função das proteínas codificadas por ORFs localizadas nas extremidades dos clones de SEMNPV-19**

	Função	Proteína
Proteínas estruturais	ligação do vírion na superfície celular, penetração, aquisição do envelope viral	<i>Polh, envelope protein, ODV-E66, p87, glycoprotein 41kD, vp1054, vp39, p74, orf1629</i>
Proteínas não estruturais	Metabolismo de nucleotídeos	<i>Ribonucleotide reductase large subunit-1</i>
	Replicação	<i>dnapol, alkaline exonuclease, helicase</i>
	Expressão viral	<i>lef-4, lef-8, p47, lef-6, 39k e ie-0</i>
	Auxiliares	<i>Catepsina e EGT</i>

Dos nove genes que codificam proteínas estruturais identificados no genoma do SfMNPV-19 (Tabela 6), os genes da *poliedrina*, *glycoprotein 41kD*, *ODV-E66* e *P74*, codificam proteínas encontradas exclusivamente nos vírus oclusos (Ma *et al.*, 1993). Dentre este grupo de genes, chama a atenção o fato de duas cópias do *ODV-E66* ter sido encontradas (Tabela 5). A presença de duas cópias deste gene parece ser uma característica dos baculovírus que formam o subgrupo A do grupo II NPV, já que o mesmo foi verificado nos outros membros do subgrupo (IJKEL *et al.*, 1999; LI, L *et al.*, 2002; LI, Q *et al.*, 2002)). O gene *ODV-E66* codifica uma proteína envolvida na formação do envelope do vírus oclusos (OBs) (HONG, *et al.*, 1997). Ainda não foi investigado qual a importância de duas cópias deste gene e nem se ambos são ativos.

A poliedrina é o principal componente do corpo de oclusão. Esta proteína foi totalmente seqüenciada neste trabalho. Vários aspectos da poliedrina do SfMNPV-19 serão discutidos na seção 4.3. A fusão do envelope viral com a membrana plasmática foi demonstrado como sendo mediado pela proteína *P74* que se liga a um receptor específico da célula hospedeira (HAAS-STAPLETON *et al.*, 2004). Pan *et al.*, (2005) caracterizaram em *Spodoptera litura* MNPV a proteína *glycoprotein 41kD* a que está associada com o envelope dos OBs (PAN *et al.*, 2005).

Outros três genes de proteínas estruturais identificados em SfMNPV-19 codificam *P87capsid*, *VP39* e *VP1054*. Estas proteínas são requeridas para a formação do nucleocapsídeo e estão presentes tanto nos vírus oclusos quanto nos “budded virus” (LU *et al.*, 2002; LU E CARTENS, 1992; OLSZEWSKI E MILLER, 1997).

Um total de doze genes que codificam proteínas não estruturais foi identificado (Tabela 6). Conforme indicado na tabela 6, estes genes codificam proteínas cuja função esta ligada ao metabolismo de nucleotídeos, à replicação do genoma viral e à expressão de genes virais. Além de genes envolvidos diretamente nas funções ligada aos processos de multiplicação viral, genes que codificam proteínas cuja função é classificada como auxiliar também foram identificados (Tabela 6).

O gene *ribonucleotide reductase large subunit-1 (RR-I)* codifica uma proteína não estrutural envolvida no metabolismo de nucleotídeos. Estudos mostram que a enzima *RR-I* catalisa a redução dos ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos (REICHARD, 1993). Os genes que codificam a enzima *ribonucleotide reductase* não são conservados em baculovírus e não estão bem caracterizados. Este gene não ocorre no genoma de AcMNPV, a espécie tipo dos baculovírus (AYRES *et al.*, 1994). Strien *et al.* (1997) analisaram a seqüência da proteína *RRI* dos baculovírus SpliMNPV e SeMNPV e observaram alta homologia com proteínas de *Plasmodium falciparum* e *Homo sapiens*. A análise filogenética da enzima *RRI* destes baculovírus sugere que eles tenham adquirido o gene *RRI* de um organismo eucarioto, já que o grau de similaridade foi alto (STRIEN *et al.*, 1997).

Os três genes cujo produto estão envolvidos na replicação viral, os genes da *helicase*, da *DNA polimerase* e da *alkaline exonuclease*, são, na verdade, essenciais para este processo e encontrados em todos os genomas de baculovírus. O gene da *helicase* codifica uma enzima que promove a quebra das ligações de ponte de hidrogênio da molécula de DNA (LU e CARSTENS, 1991). O gene da *DNA polimerase* foi inicialmente identificado em AcMNPV como um gene que codifica um polipeptídeo de 114,3 kDa, expresso na fase precoce da infecção (TOMALSKI *et al.*, 1988). Estudos

indicam que a exonuclease alcalina de origem viral faz parte de um sistema de reparo que, durante a replicação, remove seqüências que contenham erros (OKANO *et al.*, 2004).

Estudos de expressão protéica em células infectadas com baculovírus mostram que durante a fase tardia da infecção aparece uma *RNA polimerase* que difere por cromatografia da *RNA polimerase II*, composta por 4 polipeptídeos: *LEF-4*, *LEF-8*, *LEF-9* e *P47*. (GUARINO *et al.*, 1998; JIN *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1991). Neste estudo foram localizados genes de 3 componentes da *RNA polimerase* viral (os genes *Lef-4*, *Lef-8*, *p4*). Nossa expectativa é que o gene do quarto componente da RNA polimerase, o *Lef-9*, também esteja presente no genoma de SfMNPV-19.

Dezoito genes, denominados *lef* ("late expression factors"), foram descritos como importantes para a regulação da expressão dos genes tardios (TODD *et al.*, 1995). O gene *lef-6* localizado em SfMNPV-19 codifica uma proteína envolvida na transcrição de genes tardios. Em AcMNPV *lef-6* não é um gene essencial a replicação, entretanto a ausência deste genes provocou um atraso na transcrição de genes tardios (LIN e BLISSARD 2002).

Alguns genes de baculovírus codificam proteínas que não são essenciais para replicação dos vírus e que não são encontradas em todas as espécies virais. Estas proteínas desempenham funções variadas no processo infectivo e são classificadas como proteínas auxiliares. Neste trabalho, dois genes que codificam proteínas auxiliares foram identificados, os genes da *catapsina* e *EGT*. A *catapsina* é secretada na fase tardia da infecção celular. (HAWTIN *et al.*, 1995). Estudos indicam que ela age na dissolução dos tecidos do inseto promovendo o rompimento da cutícula larval e a liberação dos poliedros (HAWTIN *et al.*, 1997). O gene Ecdisteróide UDP-Glicosil Transferase

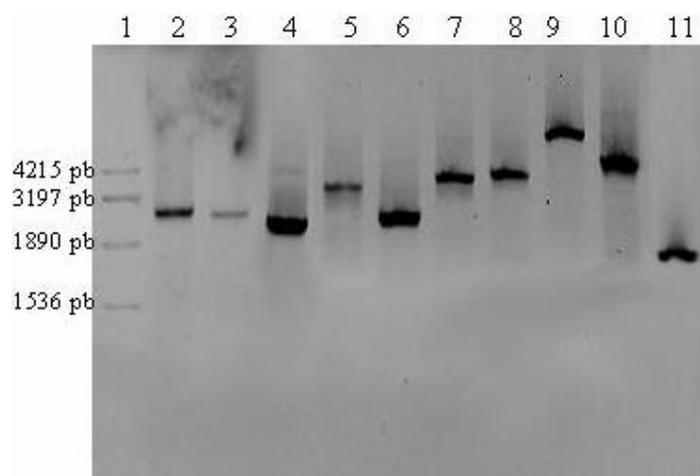
(*EGT*) codifica uma proteína que inativa o hormônio da muda do inseto fazendo com que os insetos infectados se mantenham por mais tempo na fase de larva (FLIPSEN *et al.*, 1995; TUMILASCI *et al.*, 2003). Estudos indicam que esta interferência com o processo de desenvolvimento da larva propicia a formação de maior quantidade de poliedros virais favorecendo a disseminação do vírus na natureza (FLIPSEN *et al.*, 1995).

Finalmente 24 ORFs que codificam proteínas com funções desconhecidas foram localizadas (Tabela 5). Dentre estas foi identificada o *p26*, um gene cuja expressão foi investigada em AcMNPV no qual constatou-se que ele é expresso tanto na fase precoce como na tardia (HUH e WEAVER, 1990a). Chama a atenção o fato de duas cópias do gene *p26* ser encontrada nos genomas dos outros membros do grupo II, subgrupo A (LI, L. *et al.*, 2002; IJKEL *et al.*, 1999). Por esta razão, é provável que com o sequenciamento completo do genoma do SfMNPV-19 uma segunda cópia do gene *p26* seja localizada.

## **4.2 Fechamento das Gaps**

A biblioteca de fragmentos clonados não foi suficiente para a construção de um arcabouço contendo todo o genoma do SfMNPV-19. A análise das seqüências das extremidades dos fragmentos clonados (Tabela 5), indicou que 10 segmentos do genoma não foram incluídos nas bibliotecas). Para a obtenção destas regiões que não foram clonadas, as quais foram chamadas de “gaps”, foi utilizado a técnica PCR. Para cada um destes “gaps”, um par de oligonucleotídeos foram desenhados tendo por base as seqüências flanqueadoras. A utilização destes oligonucleotídeos como *primers* na reação PCR possibilitou a síntese destes segmentos (Figura 14).

Após a purificação destes amplicons, as extremidades dos mesmos foram sequenciadas utilizando o mesmo *primer* da reação de PCR. As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências disponíveis no Genbank utilizando o programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1990), o que confirmou a sua localização no genoma viral (Tabela 7). Com a síntese deste conjunto de amplicons todo o genoma viral ficou representado no conjunto formado pelos fragmentos clonados em plasmídeos e fragmentos obtidos por PCR.



**Figura 14:** Regiões obtidas por PCR que não estão presentes no conjunto de clones selecionados para construção do arcabouço do genoma viral de SfMNPV-19. Canaleta 1 - Padrão; Canaletas 2 a 11- amplicons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

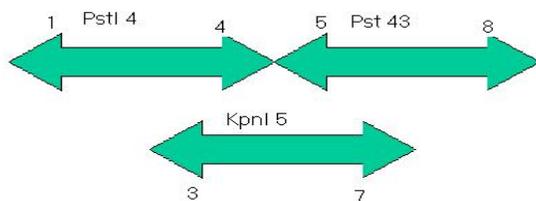
**Tabela 7:** Sequenciamento das extremidades das regiões obtidas por PCR e ORFs similares dos baculovírus SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B.

Amplicon	Primers	proteína	Similaridade (%)		
			SeMNPV	MacoMNPV-A	MacoMNPV-B
<i>GAP 41 a 43</i>					
1	10A	<i>Alkaline exonuclease</i>	41	54	47
1	10B	<i>hypothetical protein</i>	43	56	50
<i>GAP 44 A 47</i>					
2	2A	<i>hypothetical protein</i>	44	57	51
2	2B	<i>Calyx/pep</i>	47	62	
<i>GAP 47 A 52</i>					
3	3A	<i>hypothetical protein</i>	47	62	
3	3B	<i>hypothetical protein</i>	52		
<i>GAP 93 A 99</i>					

4	15A	<i>DNA polimerase</i>	93	115	114
4	15B	<i>P94-like protein</i>	99	126	125
<i>GAP 100 A 103</i>					
5	11A	<i>hypothetical protein</i>	100	128	127
5	11B	<i>hypothetical protein</i>	103	131	130
<i>GAP 105 A 109</i>					
6	16A	<i>Vp1054 virion protein</i>	105	133	132
6	16B	<i>hypothetical protein</i>	109	138	137
<i>GAP 115 A 118</i>					
7	19A	<i>P47</i>	115	145	144
7	19B	<i>hypothetical protein</i>	118	148	147
<i>GAP 120 A 125</i>					
8	12A	<i>39K/pp31</i>	120	150	149
8	12B	<i>hypothetical protein</i>	125	154	153
<i>GAP 125 A 127</i>					
9	13A	<i>hypothetical protein</i>	125	154	153
9	13B	<i>lef-6</i>	127	156	155
<i>GAP 127 A 131</i>					
10	14A	<i>lef-6</i>	127	156	155
10	14B	<i>P74</i>	131	160	159

### 4.3 Análise da região das seis primeiras ORFs de SfMNPV-19

Além de determinar a seqüência das extremidades de 28 clones e dos 10 amplicons que compõem o arcabouço do genoma de SfMNPV-19, um segmento de 8.5 kbp teve sua seqüência totalmente determinada. Para o sequenciamento desta região, que abrange da ORF 1 a ORF 6 do SfMNPV-19, os clones *PstI* 4, *PstI* 43 e *KpnI* 5 foram selecionados (Figura 15) para servir como DNA molde de oligos desenhados para o procedimento de “primer-walking”. As seqüências obtidas foram inicialmente analisadas no programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1990). Esta análise mostrou a posição, o tamanho, a orientação dos genes no genoma de SfMNPV-19 e a posição destes genes em outros baculovírus (Tabela 8).



**Figura 15: Clones selecionados para o sequenciamento da região das seis primeiras ORFs de SfMNPV-19.** Foram selecionados os clones *PstI* 4 e *PstI* 43 que abrangem a região da ORF 1 a ORF 8. Também foi selecionado o clone *KpnI* 5 que abrange a região da ORF 3 a 7 e sobrepõe a região dos vetores de *PstI* 4 e *PstI* 43.

**Tabela 8: Descrição da Região de 8.5 kbp de SfMNPV-19 seqüenciada e ORFs correspondentes nos baculovírus *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) *Neodiprion sertifer* NPV (NeseNPV), *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) e *Culex nigripalpus* NPV (CuniNPV).**

Proteína	posição	dir	Posição	aa	ORF				
					SeMNPV	AcMNPV	NeseNPV	CuniNPV	CpGv
<i>Poliedrina</i>	1	→	740	246	1	8	8		1
<i>Orf1629</i>	805	←	2193	462	2	9			
<i>protein kinase 1</i>	2192	→	3028	278	3	10			3
<i>HOAR</i>	3086	←	4492	468	4				
ORF 5	5127	→	6581	484	5				
<i>ODV-E56</i>	6765	→	7877	371	6	148	38	102	18

Nota: Nos baculovírus o gene da poliedrina é considerado como ponto de início do genoma viral. Foi descrito o tamanho em aminoácidos das proteínas putativas, posição e orientação dos genes.

A região seqüenciada de SfMNPV-19 abrange as ORFs de 1 a 6 e contém os genes da *poliedrina*, *ORF 1629*, *protein kinase-1*, *HOAR*, *ORF 5* e *ODV-E56*. Nos baculovírus, é convenção considerar o gene da *poliedrina* como o início do genoma viral, por isto a ORF deste gene é chamada de ORF número 1. O começo da

representação do genoma do mapa físico de SfmNPV-19 foi o fragmento 4 *Pst*I (Tabela 8) o qual contém o do gene da *poliedrina*.

Foi analisada a similaridade das ORFs sequenciadas com ORFs de outros baculovírus que possuem seu genoma completo disponível no GenBank (Tabela 9). Nesta análise nota-se que os níveis de similaridade são maiores entre os genes dos baculovírus do Subgrupo II-A (SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B), seguida pelos genes AcMNPV (Grupo I NPV), pelo CpGV, e finalmente pelos NPVs que infectam espécies que não são lepidópteros (Tabela 9). Estes resultados são esperados pois estão de acordo com a proximidade filogenética deduzida pela comparação de genes e genomas virais (HERNIOU *et al.*, 2003). O grau de proximidade filogenética se reflete não só nos níveis de conservação observado entre os genes mas também no conteúdo gênico. Neste aspecto chama a atenção o fato de que NeseNPV e CuniNPV apresentarem apenas dois e um genes, respectivamente, dos seis genes de SfmNPV analisados (Tabela 9).

**Tabela 9: Similaridade da ORF 1 A ORF 6 de SfMNPV-19 com ORFs de oito baculovírus.**

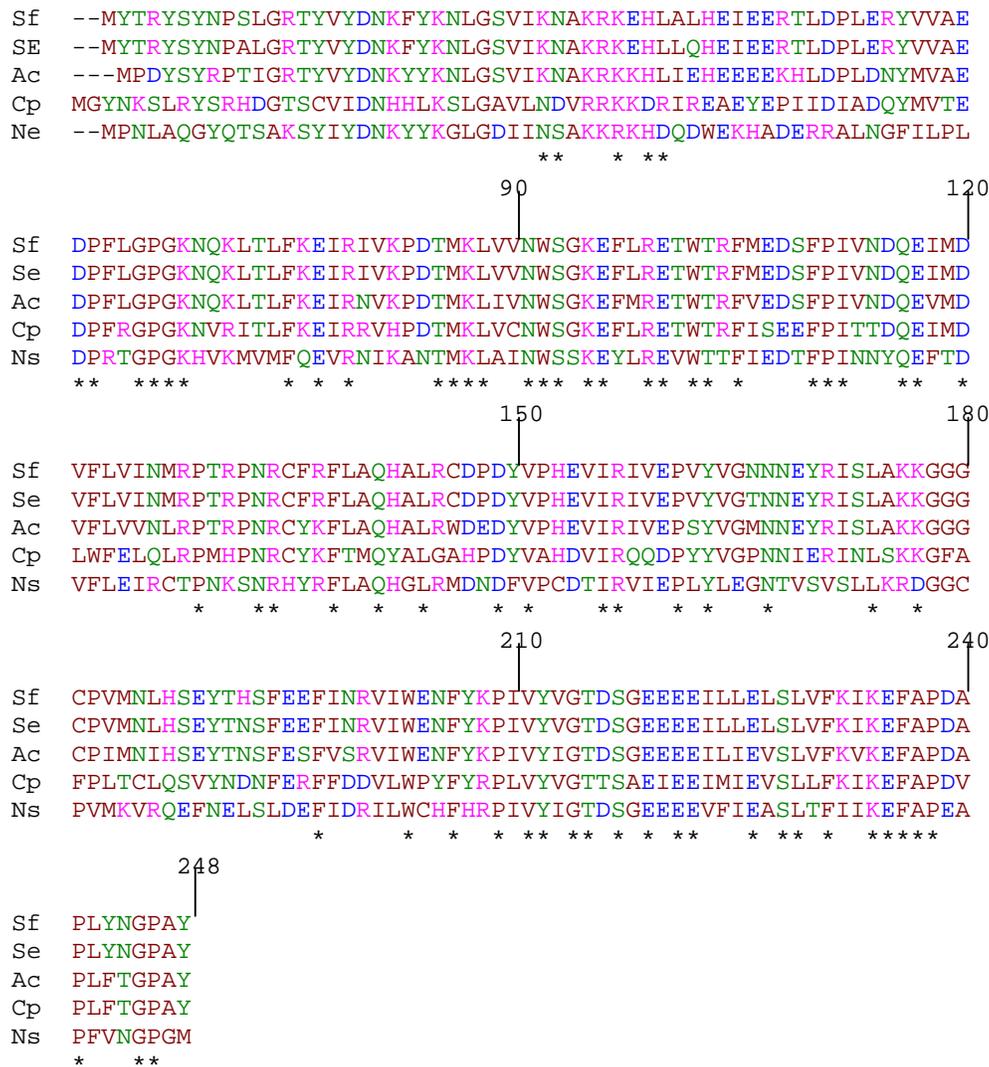
ORF	Proteína	Similaridade %						
		SeMNPV	Maco-A	Maco-B	AcMNPV	CpGV	NeseNPV	CuniNPV
1	<i>polh</i>	241/246 (97%)	222/246 (90%)	226/246 (91%)	208/242 (85%)	92/153 (60%)	120/233 (51%)	-----
2	<i>Orf1629</i>	266/476 (61)	174/481 (39%)	168/508 (37%)	114/424 (26%)	-----	-----	-----
3	<i>protein kinase 1</i>	195/275 (70%)	141/265 (53%)	148/265 (55%)	114/268 (42%)	91/248 (36%)	-----	-----
4	<i>HOAR</i>	181/510 (35%)	109/402 (27%)	113/424 (26%)	----	-----	-----	-----
5	----	---	----	----	----	-----	-----	-----
6	ODV-E56	176/266 (66%)	139/266 (52%)	145/266 (54%)	129/264 (48%)	113/274 (41%)	97/267 (36%)	60/212 (28%)

Nota: Os baculovírus que tiveram suas ORFs comparadas com ORFs de SfMNPV-19 estão divididos em baculovírus que infectam lepidópteros AcMNPV, SeMNPV, MacoMNPV-A (Maco-A), MacoMNPV-B (Maco-B) e *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV); baculovírus que infecta himenóptero *Neodiprion sertifer* NPV (NeseNPV) e baculovírus que infecta díptero *Culex nigripalpus* NPV (CuniNPV).

O gene da *poliedrina* de SfMNPV-19 codifica uma proteína putativa de 246 aminoácidos. Esta proteína está presente nos corpos de oclusão, correspondendo a aproximadamente 95% do conteúdo protéico dos poliedros (MARUNIAK, 1986). Realizamos a análise da sequência da *poliedrina* putativa de SfMNPV-19 com sequências de outras *poliedrinas* disponíveis no banco de dados GenBank. A maior similaridade foi de 97% entre as *poliedrinas* de SfMNPV-19 e SeMNPV. Apesar de ser uma proteína altamente conservada entre os baculovírus a similaridade da região comparada cai para 85% entre SfMNPV-19 e AcMNPV. A comparação da *poliedrina* de SfMNPV-19 e da *granulina* de CpGV mostrou uma similaridade de 60%.

Como esperado, não foi encontrado o gene da *poliedrina* no baculovírus CuniNPV. Os baculovírus que infectam dípteros tem seu corpo de oclusão formado por uma proteína distinta de aproximadamente 90 kDa (PERERA *et al.*, 2006). Já os NPVs que infectam himenópteros conservaram o gene da *poliedrina* (Tabela 9).





**Figura 17: Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene da poliedrina de SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se), AcMNPV (Ac), CpGV (Cp) e NeSeMNPV (Ns).** Os aminoácidos foram separados de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais (ALBERTS *et al.*, 1999) (Anexo B). Aminoácidos em rosa possuem cadeias laterais básicas; aminoácidos em azul possuem cadeias laterais ácidas; aminoácidos em verde possuem cadeias laterais polares não-carregadas; aminoácidos em vermelho possuem cadeias laterais não-polares.

O pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene da poliedrina de SfMNPV-19 e de outros quatro baculovírus também foi realizado com o programa CLUSTAL 1.83 (Figuras 17). A análise do alinhamento das seqüências de

aminoácidos da *polyedrina* confirma que esta proteína é altamente conservada entre os baculovírus. Observa-se que mesmo comparando-se a poliedrina dos NPVs de lepidópteros com a de um NPV que infecta himenóptero (NeseNPV), muitos dos resíduos são idênticos. Observa-se também que, em geral, as diferenças são constituídas por substituições nas quais um aminoácido é substituído por outro do mesmo grupo químico (Figura 17). O que indica que estas substituições não confirmam mudanças importantes na conformação da proteína (FAN *et al.*, 1996).

A ORF 2 de SfMNPV-19 corresponde ao gene *ORF1629* e codifica uma proteína putativa de 462 aminoácidos. Estudos sugerem que o produto da *ORF 1629* é uma proteína estrutural do envelope do vírion ou uma proteína que ocorre na camada intermediária entre o envelope e o nucleocapsídeo (PHAM *et al.*, 1993). A *ORF 1629* foi identificada pela primeira vez por Possee *et al.*, (1991) analisando uma região de 9.4 kbp de AcMNPV. Estes pesquisadores tentaram construir um baculovírus na qual a transcrição da *ORF 1629* seria bloqueada. A impossibilidade de se construir este recombinante foi a primeira indicação de que este gene é essencial para a replicação viral (POSSEE *et al.*, 1991).

A análise da seqüência de aminoácidos da *ORF 1629* de SfMNPV-19 mostrou similaridade apenas com os genes dos NPVs que infectam lepidópteros. Os baixos níveis de similaridade desta proteína mostram que se trata de uma proteína pouco conservada, mesmo entre vírus muito próximos filogeneticamente. Por exemplo, a similaridade da *ORF 1629* de SfMNPV-19 com a mesma ORF de SeMNPV foi de 61% (Tabela 9). Este valor cai para 26% quando comparação é feita com a *ORF 1629* de AcMNPV. O motif GTAAG esta presente na posição 13 da região promotora da *ORF 1629* de SfMNPV-19.

A ORF 3 de SfMNPV-19 corresponde ao gene da *protein kinase-1 (pk-1)* e codifica uma proteína putativa de 278 aminoácidos. Várias vias de sinalização celular são reguladas por fosforilação e desfosforilação de proteínas. O balanço da fosforilação/desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos como regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, entre outros (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

As proteínas quinases são divididas naquelas que fosforilam proteínas com resíduos de tirosina (tirosina-quinases) e aquelas que fosforilam proteínas com resíduos de serina e treonina (serina/treonina-quinases) (SHAAN, 2003). Em SfMNPV-19 a seqüência de aminoácidos da proteína putativa *pk-1* foi semelhante a quinases que fosforilam proteínas com resíduos de serina e treonina (serina/treonina-quinases). Foi encontrada similaridade da proteína putativa *pk-1* de SfMNPV-19 apenas com ORFs dos baculovírus que infectam lepidópteros (Tabela 9).

Em estudos com o baculovírus AcMNPV observou-se a presença de “motifs” similares as encontradas em genes precoces e tardios sugerindo que *pk-1* é expresso durante toda a infecção (GIANNOPOULOS *et al.*, 2005). O pareamento das seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene *pk-1* de SfMNPV-19, SeMNPV e de AcMNPV foi realizado através do programa CLUSTAL 1.83 (Figura 18). Nota-se em SfMNPV-19 a presença de uma região promotora de genes precoces tetranucleotídica (CAGT) localizada 96 nucleotídeos antes do ponto de início da tradução. Nota-se em SeMNPV uma variação região promotora de genes precoces (CAAT). A mesma variação foi observada por Lima *et al.*, (2004) quando analisaram a expressão do gene da *helicase*. Em AcMNPV foi observada presença de promotores de genes precoces e tardios.

Sf TAACACACCGCATCGAA **CAGT**TCCGTAGACACGGGTTTGGTTAATTTTTGAAAAAGATCC -60  
 Se TAACACACCGCATCGTA **CAAT**TCCATCGATACGGGAGTGGTCAATTTTTGAAAAAGATCC  
 Ac ---TTTTTGATAAATTTGCGCTTCCG **CAGT**ATCGACACGTTCAAAAAATTTGATGCGCATCA  
 \* \* \*\*\*\* \* \*\* \*\* \* \*\* \*

Sf ACGACATTATTCTGAGGATTTGTAGA--AATTCATACACGGTGGTCTGCATAGT-AGCC -1  
 Se ACCACATTATTGTTTGGATTTGTAAA--AAGTTTAATACGCTCTCCGTGTCTGT-CATC  
 Ac ATTTTGTGTTCCTATTATTGAATAAA **ATAAG**ATTGTACAGATT CATATCTACGATTCGTC  
 \* \*\* \*\* \*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Sf ATG  
 Se ATG  
 Ac ATG

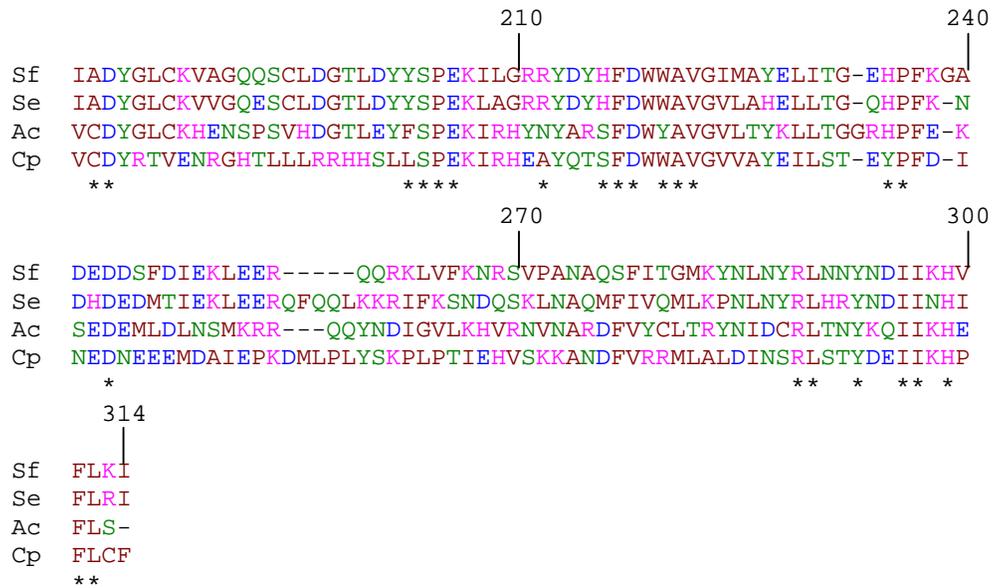
**Figura 18: Pareamento das seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene *pk-1* dos baculovírus SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se) e AcMNPV (Ac).** Os nucleotídeos sublinhados formam o aminoácido metionina, o ponto de início da tradução. A numeração começa com o primeiro nucleotídeo antes do ponto de início da tradução (ATG). As áreas sombreadas são os promotores.

O pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *pk-1* de SfMNPV-19 e de outros três baculovírus também foi realizado através do programa CLUSTAL 1.83 (Figuras 19).

30 60  
 Sf -----MAKNGLTNNNNMDTTLQ**EITDFYSDLELDR-EHKT**LNGRY**GKLSVW**  
 Se MMTTTTTSTANQLINIDS**VVKNN**DHLDSVLQ**ELCDFYAEVKLSR-DHKL**VLDGKYGHVSVL  
 Ac -----MATTNATLQTLIQ**FYENCKNVKTRYKI**INGR**FGKISIL**  
 Cp -----MNPSK**SISRVAQELSKYEIL**KKLDES**DTESYSSVYLC**

120 180  
 Sf **KHKPTQKVFVKKQIKLKH**YNE**VEPMIHTLMKKN**PPYINLY-YSITTL**KSHVLIMDYIKGG**  
 Se **KHEPTQKLF**LKK**QIKLKH**YNE**IEPMVHSLMKDNR**YFINLY-YSITTL**KTHVLIMDFIKGG**  
 Ac **SHKPTSKLYLQKT**ISAHNF**NADEIKVHQ**LMSDHP**FKIY-FNHGS**INNQVIMDYIDCP  
 Cp **KKKG**EHKR**FVCKIVK**SP**TFNSLEF**DVHILMRNNPN**FIKLN**FVFN**DNGESLLIMDYVSDG**  
 \* \* \* \* \* \* \*

150 180  
 Sf DLF**ELLKM**----**EEYLSVDETRL**IIGQL**CEGLHALHKHHYV**HNDIKLENVLYNR-**YKQIY**  
 Se DLF**DLLKS**----**EECLTVDETKL**IVGQV**CEGLHALHKHHFI**HNDVKLENILYNR-**YKQIY**  
 Ac DLF**ETLQI**----**KGELSYQLVSN**IIRQL**CEALNDLHKHNF**IHNDIKLENVLY**FEALDRVY**  
 Cp DLF**DFV**KMND**TRELRLNEAACK**IIITLV**TALNDLHKNN**IVHNDVKLENLLY**DRKKRLF**  
 \*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \*



**Figura 19: Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *pk-1* de SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se), AcMNPV (Ac) e CpGV (Cp).** Os aminoácidos foram separados de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais (ALBERTS *et al.*, 1999) (Anexo B). Aminoácidos em rosa possuem cadeias laterais básicas; aminoácidos em azul possuem cadeias laterais ácidas; aminoácidos em verde possuem cadeias laterais polares não-carregadas; aminoácidos em vermelho possuem cadeias laterais não-polares.

Como esperado, a similaridade das seqüências de aminoácidos da proteína *pk-1* foi maior entre os NPVs que infectam lepidópteros. A região mais conservada se localizou na posição 162 a 172 onde as seqüências são quase idênticas (Figura 20). Em geral, as diferenças na estrutura primária são constituídas por substituições de aminoácidos que possuem as mesmas cadeias laterais. Por exemplo, na posição 165 de SfMNPV-19 e AcMNPV existe um resíduo de Valina (V), na mesma posição em SeMNPV e CpGV um resíduo de Isoleucina (I). Outras mudanças ocorreram na posição 170 onde em SfMNPV-19 e AcMNPV existe um resíduo de Valina (V), em SeMNPV existe um resíduo de Isoleucina (I) e em CpGv um resíduo de Leucina (L).

Fan *et al.*, (1996) analisaram a expressão de três vírus de AcMNPV, com mutações no gene *pk-1*, sensíveis à temperatura. O comportamento de vírus mutante sensível a temperatura é semelhante ao vírus selvagem quando a temperatura ambiente está entre 25° e 28°C. Contudo, quando a temperatura foi elevada para 33°C a expressão de genes tardios foi alterada. As mutações resultaram na troca de um único aminoácido no gene *pk-1*. Em dois mutantes, XF4 e XF5, no aminoácido 92 o resíduo de Ácido aspártico (D) foi substituído pelo resíduo de Asparagina (N); em outro mutante, KT800, na posição 204 o resíduo de Treonina (T) foi substituído por um resíduo de Isoleucina (I). Os experimentos realizados mostram que as substituições afetam a atividade da proteína *pk-1*. Essas modificações indicaram diferenças na expressão do gene muito tardio *p10* quando em condições de temperatura não permissiva ao vírus, sugerindo que o gene *pk-1* esteja envolvido na regulação da expressão desse gene (FAN *et al.*, 1996). Nessas posições em SfmNPV-19 existem os mesmos resíduos de Ácido aspártico (D) e de Treonina (T), respectivamente.

As proteínas quinases estão amplamente distribuídas na natureza e têm sido encontradas em animais, vegetais e microorganismos (AOYAMA *et al.*, 2003). Os resultados da análises Blast, revelou que, entre as quinases de eucariotos, a *pk-1* de *Aedes aegypti* foi a que apresentou maior similaridade com a *pk-1* do SfmNPV-19. O pareamento destas duas seqüências de aminoácidos destas duas proteínas foi realizado com o programa CLUSTAL 1.83 (Figuras 20). O grau de similaridade não foi alto entre o baculovírus SfmNPV-19 e *Aedes aegypti*.

```

Sf ----- 60
Aa MSSSDTTQPPAVPVTQPARVIQPSAaLIVKEGWLYKRGEHIKNWRSRYFILRDDGTLVGY

Sf ----- 120
Aa KNRPDASfQAEPSNNTVRGCQIMSVDRPPPTFIIRGLQWTTVIERMFHVEEERERQEW

Sf -----MAKNGLTNNNNMDTTLQEITDFYSDLELDREHKTLN----- 180
Aa VEAIRSVANRLTEAEAYQGSQSNNGDGVEMASIAEDELLTEKFSVQGTSTGKISGRKKVT
      * * * . : * * *
      * * * * *

Sf -----GRYGKLSVWKHKPTQKVFVKQIKLKHYNVEPMIHTLMK-----K 240
Aa LENFEFLKVLGKGTFGKVIKREKTTAKLYAIKILKKEVIVQKDEVAHTMAENRVLKKTN
      * ** * * * * * **

Sf NPYINLYYSITTLKSHVLIMDYIKGGDLFELLKMEEYLSVDETRLIIGQLCEGLHALHK 300
Aa HPFLISLKYsfQTVDRLCFVMQYVNGGELFFHLSRERVFSEDRTRFYGAEIIISALGYLHS
      * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sf HHYVHNDIKLENVLYNRYKQIYIADYGLCKVAGQQ----SCLDGTLDYYSPEKILGRRYD 360
Aa HEIVYRDLKLENNLLDKDGHKIDFGLCKEQITYGRITKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYD
      * * * * * * * * * * * * * * * * *

Sf YHFDWWAVGIMAYELITGEHPFKGADEDDSFIEKLEERQQKLVFKNRSVPANAQSFIT 420
Aa LAVDWWGTGVVMYEMMCGRLPFYNRDHDILFTLILMEEVKFPRSISAN-ARDLLAGLLMK
      *** * ** * ** * * * * * * *

Sf GMKYNLNYRLNNDI IKHVFLKI----- 480
Aa QPRDLGGGPNDVKEIMVHPFFSSINWTDLVQKRIAPPFKPQVTSDDTRYFDSEFTGES
      * * * * *

Sf ----- 529
Aa VELTPPDNNGPLGAVQEEPHFSQFSYQDMASLTNTPSFINNPNYSYVSMQ

```

**Figura 20: Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *pk-1* de SfMNPV-19 (Sf) e *Aedes aegypti* (Aa).** Os aminoácidos foram separados de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais (ALBERTS *et al.*, 1999) (Anexo B). Aminoácidos em rosa possuem cadeias laterais básicas; aminoácidos em azul possuem cadeias laterais ácidas; aminoácidos em verde possuem cadeias laterais polares não-carregadas; aminoácidos em vermelho possuem cadeias laterais não-polares.

A ORF4 de SfMNPV-19 corresponde ao gene *HOAR* que codifica uma proteína putativa de 468 aminoácidos. Le *et al.*, (1997) localizaram o gene *HOAR* em *Helicoverpa zea* SNPV (HzSNPV). Este gene ainda não está bem caracterizado. Foi observada similaridade da região seqüenciada da proteína *HOAR* com ORFs dos baculovírus do Grupo II.

A ORF 6 de SfMNPV- 19 corresponde ao gene *ODV-E56* codifica uma proteína putativa de 265 aminoácidos. O produto do gene *ODV-E56* é uma proteína de aproximadamente 56 kDa, que faz parte do envelope dos vírus oclusos (BRAUNAGEL *et al.*, 1996; MA *et al.*, 1993).

O gene *ODV-E56* pertence ao grupo de genes “cerne” pois está presente em todos os baculovírus (Tabela 9). O grau de conservação deste genes entre os baculovírus é relativamente baixo já que mesmo entre membros do subgrupo II/A, a similaridade ficou abaixo de 70%. No outro extremo, observou-se apenas 28% de similaridade entre o *ODV-E56* de SfMNPV e de CuniNPV (Tabela 9).

Braunagel *et al.*, (1996) detectaram a proteína ODV-E56 de AcMNPV sendo expressa 36 horas p.i., mostrando ser esse um gene tardio. Neste mesmo estudo foi localizada uma região promotora pentanucleotídica “ATAAG” (BRAUNAGEL *et al.*, 1996). O pareamento das seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene *ODV-E56* de SfMNPV-19 e SeMNPV foi realizado através do programa CLUSTAL 1.83 (Figura 21). A seqüência de nucleotídeos da região promotora do gene *ODV-E56* se mostrou altamente conservada entre os baculovírus SfMNPV-19 e SeMNPV com destaque para as regiões sombreadas onde se encontra o motif G TAAG (Figura 21).

```

Sf  TATATATTATTGTAAGTTTGTATTAAAATTTAATAAATACTTTTAACTCAACAAACATG -1
Se  TGTACATATTTGTAAGTTTAT-ATTAAA-CTCAACACACACACACTATACAATG-----
    * * * * *

```

**Figura 21: Pareamento das seqüências de nucleotídeos da região promotora do gene *ODV-E56* dos baculovírus SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se) e AcMNPV (Ac).** Os nucleotídeos sublinhados formam o aminoácido metionina, o ponto de início da tradução. A numeração começa com o primeiro nucleotídeo antes do ponto de início da tradução (ATG). As áreas sombreadas são os promotores.

O pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *ODV-E56* de SfMNPV-19 e de outros cinco baculovírus também foi realizado através

do programa CLUSTAL 1.83 para melhor análise (Figuras 22). Apesar da proteína *ODV-E56* estar presente em todos os baculovírus, a conservação da sequência de aminoácidos desta proteína entre os baculovírus não é alta. Comparando-se as sequências nota-se que a maior similaridade, como esperado, ocorreu entre os baculovírus do Grupo II.

```

                                     30                               60
Sf  ---MVFRLPNVNVKTYSN--ITSFVADNNSVVN-ASPSGFRNVLNKPT---SVPAGNNQI
Se  ---MFRPLRSVNRTPFTNNIASFTNQNLNVIN-NSPQGFRNVLSNPR---TVDIGNGQV
Ac  --MSFFSNLRAVNKLYPN--QASFITDNTRLLT-STPAGFTNVLNAPS---VRNIGNNRF
Cp  --MSFFRGLRRTNKVYND--PSGFITDHAQLIRNQTPAGFN--LNNPT---TMGLANGTY
Ns  ---MFSGLRKTAKIYDN--TADLLVDNTSLVV-GKFSNFDAVFSLPS---AKSISKGYV
Cn  MASKLFGLRVMGHVVDRSALAMDRFRTAFRAVKNDNAPLQRIFDLPIREVPVTSFRNGDQ
      *  **

                                     90                               120
Sf  VPGYNLPNNNFISTSELNSIMRNDTNGMRRVFGNTPTNNDYNSLTQIRRADNIPDANMH
Se  RPYALPNNQMISTAEMNSIMRNDNSAGMRRVFGNNLSNNDYNGLSQLRRADNIPDANMH
Ac  QPGYQLSNNQFVSTSDINRITRNDVVPNIRGVFQG-ISDPQINSLGQLRRVDNVPDFNYH
Cp  VPGYNING-AFISNTNVNTVLRNNDVVGMRQLFPD-ASNQMNGLTNLRRADNIPDATH
Ns  IDYATFIG--NVDTFSSINKILRQADDVNIETLFNA--TDTDIAGLNVLRKAANVPDNTIY
Cn  LYEPHLVMPDEPTMPMREFDTGLRRGDQQLNRLRMTSSERAGLNNIR-GNSLPDNYLQ
                                     *  *  **

                                     150                            180
Sf  SKQLKRDAVKNNNPSTR-TNTPBGIQNSLNQNPSSLNDYLG-MKTAGKVALLGVGVYLTFE
Se  SRQLRRDAVKNNNPSTR-TRTEAGIENSLNRNPNLNRLQGLKNAGVAALLGTGAYLVFQ
Ac  TKQTRSNAVKQNFPETN-VRTPBEGVQNALQQNPRLHITYMQSLKVGGTGILLATGGYFLFS
Cp  GLQTRKNGVKTSHPETA-VRDRVGVENALAQNPRLADYLR---GAGYVTLFGVSVYLVIN
Ns  VAEVKRINLKSLYPSLD-VKTYDGIASGLNPNPKLYSYLK---GLGVATLAGGAVVLVLL
Cn  AVRADAAAIRVRDPNLANARTEQEITDALRHPRLRDLT----AGGVIKAGVSVLVIVG
      *  *  *  *

                                     210                            240
Sf  GISLIQDIREALARTGGSYHTTGIDGGN---EVSVCLLRYRTCRLPDV-IDNEKVTICRN
Se  YASLVQDIREALRRTGGSYHTTGINGGD---ELRTCLLMNRTCVPDL-VDSN-VTVCQN
Ac  AATLVQDIINAINNTGGSYVQKNGGE---NADACLLLQRTCQDPN-LNQSDVAICPF
Cp  VADLVSSIVEALNRTGGSWYRGNNGGDNFSNIDACVLRYSRSGMS---LADIDFVCEL
Ns  GIDLQDIIDALNRTGGSYFTYG-EADN---VESCYLRYRSCGVDQSSVDTTTYCQNFL
Cn  GALLAAELYQYLNRMGGAFIEQREADGS----VVRHYLLWRSCGMPSVVSLEEVFPGES
      *  **  *  *  *

                                     270                            300
Sf  DPLIADIN-----QLQNICANFNYYYYEESVCRASDPNANPDSQPQYLDISNLGVDQMIN
Se  DPLIADQS-----ELSRICDGFDYEVERTVCRASDPNAYEFSPQYVDISELSTDQMIH
Ac  DPLLPNPP-----ELTNMCQGFNYEVEKTVCRGSDPSADPDSQPQYVDISDLPAQOTLM
Cp  DPHDPNNVDPLLSFDEARNFCNGYSLAAEGSVCRGSDTNADPSTLQYLDISELEPNQTVQ
Ns  DPILLEDDVT-----ALTAICDGYDIDTEISVCRQSDPYADPDSEQWVDVSELAENQTLS
Cn  GDPIYDSVG-----EAQAICSGYKNSVERSVCRQADVLAEPSSQQFLDARTLENAHIY
      *  *  ***  *  *  *  *  *

```

```

                                     330                                     360
Sf  CIEPYDFGDLIADLGLDGLLGENGLFTKSSNSSKSI SDSL LPAILMIGIIIFIVFIGYFI
Se  CIEPYDFGDLIADLGLDGLLGENGSITQSSNKSKSI SDSL LPAILMIGAIILIVLVGYFI
Ac  CIEPYSFGDLVGDLDGLDWLLGDEGLVKGSSNVSDSVSGKLMPIILLIGAVLFLGLIFYFI
Cp  CVEPYDFGDLIGDLGLDWLLGENGFVTASSNSLTSVSNF TTILLVIGGILLLTFIGFVI
Ns  CVEPYTFSDLISDLGLDWLLGDD SILGNSFTSGSDS ISSLSSYIGYIAIFAI IIIIVGIVF
Cn  CVEPGTLGRLVADLGLADLVD AVGGSVSGSSGNSSGKSSGNPLILISAFVVLII IIFVVV
    *  *  *      *  *  *  *  *
                                     390
Sf  FKRLG-NTQTQTIQLEPIR TSVPM TSVPIQVVR-----
Se  FKNLNSNRQTVQFPMPVPTAVPV TPLPIQVR-----
Ac  YRYIMKGGSGGGTSTATSP TPIVISMQNPTSTTAPR
Cp  FKVVNRSSNNNTS-----
Ns  IKLSKAVS-----
Cn  FGYSRTRRNSDADRTI-----

```

**Figura 22: Pareamento das seqüências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *ODV-E56* de SfMNPV-19 (Sf), SeMNPV (Se), AcMNPV (Ac), CpGV (Cp) (Ns), NeSeMNPV e CuniNPV (Cn).** Os aminoácidos foram separados de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais (ALBERTS *et al.*, 1999) (Anexo B). Aminoácidos em rosa possuem cadeias laterais básicas; aminoácidos em azul possuem cadeias laterais ácidas; aminoácidos em verde possuem cadeias laterais polares não-carregadas; aminoácidos em vermelho possuem cadeias laterais não-polares.

#### 4.4 Análise da ORF 5 de SfMNPV-19

Ao contrário do que foi observado com as outras 5 ORFs sequenciadas neste trabalho, a ORF 5 de SfMNPV-19 não revelou homologia com ORFs de outros baculovírus, nem mesmo genes dos outros membros do Subgrupo II-A. Na análise Blast, esta proteína putativa apresentou maior similaridade com a proteína hipotética PF11\_0371 de *Plasmodium falciparum* 3D7. Embora a porcentagem da similaridade tenha sido de 21%, o Valor *e* foi de 2e-04, relativamente alto (Anexo C). Este resultado, portanto, indica uma probabilidade razoável de não haver de fato vínculos evolutivos entre essas duas proteínas. Para se verificar a relevância do Valor *e* da comparação da ORF 5 de SfMNPV-19 com uma ORF de *Plasmodium falciparum* 3D7, foi comparado o Valor *e* para genes que mostraram baixa similaridade entre os baculovírus. Por exemplo, para a proteína codificada pelo gene *Hoar*, a semelhança com ORFs dos baculovírus de Subgrupo II-A foi em média 30%, entretanto o Valor *e* foi de

2e-72. Esses resultados mostram que a similaridade entre ORF 5 de SfMNPV-19 com uma ORF de *Plasmodium falciparum* 3D7 pode ter ocorrido ao acaso pois seu Valor e é alto.

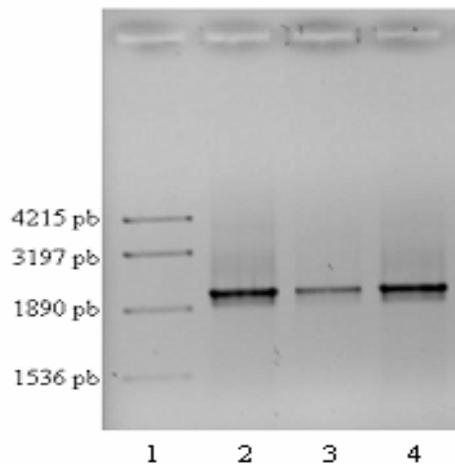
Análises de genomas completos dos baculovírus SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B também não mostraram homologia da região correspondente a ORF 5 com outros baculovírus (Tabela 10 ). Estas observações indicam que a região da ORF 5 é altamente variável entre os baculovírus do Grupo II.

**Tabela 10: Comparação da região corresponde a ORF 5 de três baculovírus**

Baculovírus	Left	Dir.	Right	aa	Similaridade
SfMNPV-19	5127	→	6581	484	proteína hipotética PF11_0371 de <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7(21%)
SeMNPV	6190	→	7713	507	proteína hipotética de <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 (25%)
MacoMNPV-A	5704	→	6312	202	Proteína hipotética de MacoMNPV-B (66%)
MacoMNPV-B	5913	→	6504	197	Proteína hipotética de MacoMNPV-A (65%)

Nota: A tabela mostra a comparação do tamanho da ORF 5 entre os baculovírus SfMNPV-19, SeMNPV (IJKEL *et al.*, 1999), MacoMNPV-A (LI, Q. *et al.*, 2002) e MacoMNPV-B (Li, L. *et al.*, 2002). A análise pelo programa Blast (ALTSCHUL *et al.*, 1990) nos mostrou ORFs similares a região correspondente a ORF 5 de diferentes baculovírus.

Os resultados da análise da seqüência da ORF 5 de SfMNPV-19 nos levou a perguntar se esta região também seria variável dentro da mesma espécie. Para elucidar esta questão a região da ORF 5 de dois isolados de SfMNPV-19, um da Guatemala e outro da Flórida, foi sintetizada por PCR (Figura 23) e o amplicon obtido seqüenciado.



**Figura 23: Eletroforese em gel de agarose das amostras de PCR de isolados geográficos do baculovírus SfMNPV para confirmação do fragmento correspondente a ORF 5.** Canaleta 1- Padrão; Canaleta 2- SfMNPV isolado da Flórida; Canaleta 3- SfMNPV isolado da Guatemala; Canaleta 4- SfMNPV- 19 (Sertaneja – PR).

O pareamento das seqüências de nucleotídeos da ORF 5 dos isolados de SfMNPV da Flórida, Guatemala e SfMNPV-19 foi realizado através do programa CLUSTAL 1.83 para identificarmos possíveis diferenças (Figura 24). Os resultados mostram que as seqüências são idênticas, mostrando que não existe variabilidade genética intraespecífica.

```

Sf  ATGGAGAGCATATTCTACAGTGTAGACTATGCTAGTATAAATAGTCTACGATTCGAACTAT 60
Fl  ATGGAGAGCATATTCTACAGTGTAGACTATGCTAGTATAAATAGTCTACGATTCGAACTAT
Gm  ATGGAGAGCATATTCTACAGTGTAGACTATGCTAGTATAAATAGTCTACGATTCGAACTAT
    *****

Sf  TGTTCGTATATAGATATGCCATATCTAATCAACATTTTGGCACTACAAAAAGTACACT 120
Fl  TGTTCGTATATAGATATGCCATATCTAATCAACATTTTGGCACTACAAAAAGTACACT
Gm  TGTTCGTATATAGATATGCCATATCTAATCAACATTTTGGCACTACAAAAAGTACACT
    *****

Sf  ACCATCTTTATCTTGAAAAGGAGGGGATACGGGCTTATATATAAAGCGTCGGCGACGATG 180
Fl  ACCATCTTTATCTTGAAAAGGAGGGGATACGGGCTTATATATAAAGCGTCGGCGACGATG
Gm  ACCATCTTTATCTTGAAAAGGAGGGGATACGGGCTTATATATAAAGCGTCGGCGACGATG
    *****

```

Sf AGCATCAGTTCAAGTTGGTTGAACATTCTCAACGCACTAACTAACGTTTGTGAATACCTT 240  
Fl AGCATCAGTTCAAGTTGGTTGAACATTCTCAACGCACTAACTAACGTTTGTGAATACCTT  
Gm AGCATCAGTTCAAGTTGGTTGAACATTCTCAACGCACTAACTAACGTTTGTGAATACCTT  
\*\*\*\*\*

Sf CCACAGTACTACTTCACCACCAGCATCATGTACGCAAACGAGCACATCAACTCTTCGGTC 300  
Fl CCACAGTACTACTTCACCACCAGCATCATGTACGCAAACGAGCACATCAACTCTTCGGTC  
Gm CCACAGTACTACTTCACCACCAGCATCATGTACGCAAACGAGCACATCAACTCTTCGGTC  
\*\*\*\*\*

Sf GAGCAGCTTCGTGGCTTCGTGGACGACGAGCTGTTGGACGAGCTGGGCTTCAACTTCGAG 360  
Fl GAGCAGCTTCGTGGCTTCGTGGACGACGAGCTGTTGGACGAGCTGGGCTTCAACTTCGAG  
Gm GAGCAGCTTCGTGGCTTCGTGGACGACGAGCTGTTGGACGAGCTGGGCTTCAACTTCGAG  
\*\*\*\*\*

Sf CAACAGCAGCAGCAGCGCCAGGCGAAGGAGGAGCAAGACGGCGGCGACGACATGCAGACA 420  
Fl CAACAGCAGCAGCAGCGCCAGGCGAAGGAGGAGCAAGACGGCGGCGACGACATGCAGACA  
Gm CAACAGCAGCAGCAGCGCCAGGCGAAGGAGGAGCAAGACGGCGGCGACGACATGCAGACA  
\*\*\*\*\*

Sf ACTAACGATGACGCTGATTCTATTTGTGAGTTAACTAACGAGCTAGATAAATTTGCTCTGT 480  
Fl ACTAACGATGACGCTGATTCTATTTGTGAGTTAACTAACGAGCTAGATAAATTTGCTCTGT  
Gm ACTAACGATGACGCTGATTCTATTTGTGAGTTAACTAACGAGCTAGATAAATTTGCTCTGT  
\*\*\*\*\*

Sf GAAGATGAAAACGAGGAGGTTACTGTAACTCTAATAATTTTGACTCTAACCTCCGCTC 540  
Fl GAAGATGAAAACGAGGAGGTTACTGTAACTCTAATAATTTTGACTCTAACCTCCGCTC  
Gm GAAGATGAAAACGAGGAGGTTACTGTAACTCTAATAATTTTGACTCTAACCTCCGCTC  
\*\*\*\*\*

Sf ATCGATTACTCTGCCGACAGTGACATTAAGAAAACATATGCGCAGCATTTCATACTACGTTT 600  
Fl ATCGATTACTCTGCCGACAGTGACATTAAGAAAACATATGCGCAGCATTTCATACTACGTTT  
Gm ATCGATTACTCTGCCGACAGTGACATTAAGAAAACATATGCGCAGCATTTCATACTACGTTT  
\*\*\*\*\*

Sf GGCATACTGGCCGAGCTAGATAAGTTGCGCAGTATTATTAAGTTAACTTGCAAACCTTT 660  
Fl GGCATACTGGCCGAGCTAGATAAGTTGCGCAGTATTATTAAGTTAACTTGCAAACCTTT  
Gm GGCATACTGGCCGAGCTAGATAAGTTGCGCAGTATTATTAAGTTAACTTGCAAACCTTT  
\*\*\*\*\*

Sf AAAGACAACAATGTAAGCAATGATACCACCAACAACGACAACACCAACGTAAGCAATACT 720  
Fl AAAGACAACAATGTAAGCAATGATACCACCAACAACGACAACACCAACGTAAGCAATACT  
Gm AAAGACAACAATGTAAGCAATGATACCACCAACAACGACAACACCAACGTAAGCAATACT  
\*\*\*\*\*

Sf CTTGACGAAAAGATTGCAAACCTATGAGCCTAGCGAAGAACTTATGAACCATCTTCATCA 780  
Fl CTTGACGAAAAGATTGCAAACCTATGAGCCTAGCGAAGAACTTATGAACCATCTTCATCA  
Gm CTTGACGAAAAGATTGCAAACCTATGAGCCTAGCGAAGAACTTATGAACCATCTTCATCA  
\*\*\*\*\*

Sf GAATTTTTGGATTTCGGAATCCAAGTTTCGTCTGAAGAAATGAAAGATATCATCATAAAC 840  
Fl GAATTTTTGGATTTCGGAATCCAAGTTTCGTCTGAAGAAATGAAAGATATCATCATAAAC  
Gm GAATTTTTGGATTTCGGAATCCAAGTTTCGTCTGAAGAAATGAAAGATATCATCATAAAC  
\*\*\*\*\*

Sf TACATTCATCTGTACTTGGTGAACATCACAAAACCTAATCTGTCTCTGATTCCGTTACC 900

Fl TACATTCATCTGTACTTGGTGAAACATCACAAAACAACTCTGTCTCTGATTCCGTTACC  
 Gm TACATTCATCTGTACTTGGTGAAACATCACAAAACAACTCTGTCTCTGATTCCGTTACC  
 \*\*\*\*\*

Sf AAAACCCCTCAGAGAAGACTTGAGAATTTGGATGCTTCTCGGCATTTCAGCTATTGTCTAAC 960  
 Fl AAAACCCCTCAGAGAAGACTTGAGAATTTGGATGCTTCTCGGCATTTCAGCTATTGTCTAAC  
 Gm AAAACCCCTCAGAGAAGACTTGAGAATTTGGATGCTTCTCGGCATTTCAGCTATTGTCTAAC  
 \*\*\*\*\*

Sf GTCGCAGATGTTGAACTGTATAACGTTGCTACTAAACAATGGGCCGATATCTTTAAAGAA 1020  
 Fl GTCGCAGATGTTGAACTGTATAACGTTGCTACTAAACAATGGGCCGATATCTTTAAAGAA  
 Gm GTCGCAGATGTTGAACTGTATAACGTTGCTACTAAACAATGGGCCGATATCTTTAAAGAA  
 \*\*\*\*\*

Sf CTTACAGATGCCGTCGAGACACTGACCATTGACTCTAAAGAGTTTTTACACTACAAAAGAGA 1080  
 Fl CTTACAGATGCCGTCGAGACACTGACCATTGACTCTAAAGAGTTTTTACACTACAAAAGAGA  
 Gm CTTACAGATGCCGTCGAGACACTGACCATTGACTCTAAAGAGTTTTTACACTACAAAAGAGA  
 \*\*\*\*\*

Sf CTGCGCAACGTCATCGGAGACATCTTTTTCTTCGATAACCTTTACAATAACGGTGCGTGT 1120  
 Fl CTGCGCAACGTCATCGGAGACATCTTTTTCTTCGATAACCTTTACAATAACGGTGCGTGT  
 Gm CTGCGCAACGTCATCGGAGACATCTTTTTCTTCGATAACCTTTACAATAACGGTGCGTGT  
 \*\*\*\*\*

Sf AAGTTTCACGAAAATGTTTCTGAAATCTTTGAATATATTGATAAATGTTTTGCACCAGTA 1180  
 Fl AAGTTTCACGAAAATGTTTCTGAAATCTTTGAATATATTGATAAATGTTTTGCACCAGTA  
 Gm AAGTTTCACGAAAATGTTTCTGAAATCTTTGAATATATTGATAAATGTTTTGCACCAGTA  
 \*\*\*\*\*

Sf GATGACGATATTGTGTCTCGATTGGTGAATGATGATATTCTGTCTCAATTGCAAACATATG 1240  
 Fl GATGACGATATTGTGTCTCGATTGGTGAATGATGATATTCTGTCTCAATTGCAAACATATG  
 Gm GATGACGATATTGTGTCTCGATTGGTGAATGATGATATTCTGTCTCAATTGCAAACATATG  
 \*\*\*\*\*

Sf AACAAATTTGGCATCCGAATGCTGTGTATCTGTTCACGCCGTTTAAAGCTGAAGACGTCTCT 1300  
 Fl AACAAATTTGGCATCCGAATGCTGTGTATCTGTTCACGCCGTTTAAAGCTGAAGACGTCTCT  
 Gm AACAAATTTGGCATCCGAATGCTGTGTATCTGTTCACGCCGTTTAAAGCTGAAGACGTCTCT  
 \*\*\*\*\*

Sf AACGACGACAACATGCCTTCGTTGTTAGCGAGTCGCGTGTAAAGAGCACACGCAAACATC 1360  
 Fl AACGACGACAACATGCCTTCGTTGTTAGCGAGTCGCGTGTAAAGAGCACACGCAAACATC  
 Gm AACGACGACAACATGCCTTCGTTGTTAGCGAGTCGCGTGTAAAGAGCACACGCAAACATC  
 \*\*\*\*\*

Sf TCGCACAAGTTTAAAGCCGCGTCGTAACCTCTAAAAGGCCCGTCGTGCTCTCAAGTTTGAG 1420  
 Fl TCGCACAAGTTTAAAGCCGCGTCGTAACCTCTAAAAGGCCCGTCGTGCTCTCAAGTTTGAG  
 Gm TCGCACAAGTTTAAAGCCGCGTCGTAACCTCTAAAAGGCCCGTCGTGCTCTCAAGTTTGAG  
 \*\*\*\*\*

Sf CAAATGTACATATAA 1435  
 Fl CAAATGTACATATAA

Gm CAAATGTACATATAA  
\*\*\*\*\*

**Figura 24: Pareamento das seqüências de nucleotídeos da ORFs 5 dos isolados de SfMNPV da Flórida (Fl), Guatemala (Gm) e SfMNPV-19 (Sf) .**

## 5 CONCLUSÃO

A utilização de baculovírus em programas de controle biológico tem demonstrado ser uma alternativa viável para o controle de pragas agrícolas. O seu uso é seguro ao homem e ao meio ambiente, por ser restrito a invertebrados e, em geral, patogênico a uma determinada espécie.

Entre os agentes de controle biológico de *Spodoptera frugiperda*, a principal praga da cultura do milho, o baculovírus *Spodoptera frugiperda* múltiplo nucleopoliedrovirus (SfMNPV) mostra potencial para ser usado como um bioinseticida. Entretanto, este baculovírus ainda foi pouco estudado tornando necessário o maior conhecimento do genoma do baculovírus SfMNPV-19.

Este trabalho gerou clones para o sequenciamento do genoma do baculovírus SfMNPV-19. A seqüência das extremidades desses clones foi determinada e comparada com seqüências disponíveis no GeneBank. A análise das seqüências mostrou que as ORFs de SfMNPV-19 identificadas apresentam alto grau de similaridade com ORFs de três baculovírus do Subgrupo II-A cujo genoma completo já foi determinado, o *Spodoptera exigua* MNPV, *Mamestra configurata* MNPV-A e *Mamestra configurata* MNPV-B. Observou-se também que os genes dos baculovírus SfMNPV-19, SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B estão distribuídos de forma colinear, ou seja, a localização da maioria dos genes é equivalente. A distribuição dos genes o genoma mostra que genes que codificam proteínas estruturais e não estruturais estão espalhados pelo genoma e são codificados nas duas fitas de DNA viral. Esta ausência de organização gênica por função é típica dos baculovírus.

Outro foco deste trabalho foi o sequenciamento completo e análise das seis primeiras ORFs de SfMNPV-19. Uma região de aproximadamente 8.5 Kbp foi totalmente sequenciada e analisada. Essa região abrange os genes da *poliedrina*, *ORF 1629*, *pk-1*, *Hoar*, *ORF 5* e *ODV-E56*. A análise do sequenciamento desta região confirmou a alta similaridade entre SfMNPV-19 e os baculovírus do Subgrupo II-A (SeMNPV, MacoMNPV-A e MacoMNPV-B. Esta semelhança diminui entre SfMNPV-19 e os baculovírus do Grupo-I AcMNPV. Observou-se também uma grande divergência entre as ORFs de SfMNPV-19 e as ORFs dos baculovírus que infectam himenópteros e dípteros.

A região correspondente a *ORF 5* apresentou uma grande variabilidade genética interespecífica. A análise mais detalhada desta região revelou que não ocorre variabilidade genética desta região dentro da mesma espécie. Esses resultados sugerem que este gene pode estar envolvido no processo de especificidade em relação ao hospedeiro. O processo que determina a especificidade dos baculovírus em relação ao hospedeiro ainda é pouco conhecido sendo que vários genes virais podem estar envolvidos neste processo.

Os dados gerados pelo sequenciamento tem auxiliado na caracterização de muitos genes virais e na elucidação de importantes mecanismos da biologia dos baculovírus. O maior conhecimento do genoma do baculovírus SfMNPV-19 identificando todos os seus genes, suas funções e as proteínas que eles codificam abrirá novas possibilidades de se desenvolver estratégias para aumentar a utilização deste vírus como um bioinsetida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, C. L.; TULMAN, E. R.; LU, Z.; BALINSKY, C. A.; MOSER, B.A.; BECNEL, J. J.; ROCK, D. L.; KUTISH, G. F. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. **Journal of Virology**, Vol. 75, n°22, p. 11157-65, 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D. **Fundamentos da Biologia Celular**. Editora Artmed, 1999, p.323.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. **Basic local alignment search tool**. *J. Mol. Biol.*, n° 215, p. 372-382, 1990.
- AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, Vol. 26, n° 6, p.896-900, 2003.
- AYRES, M. D; HOWARD, S. C; KUZIO, J; LOPEZ-FERBER,M; POSSEE, R. D. The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, Vol. 202, n°2, p. 586-605, 1994.
- BARRETO, M. R.; GUIMARÃES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of Baculovirus spodoptera Isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae and Their Characterization By RAPD. **Neotropical entomology**, Vol.34, n°1, p. 067-075, 2005.
- BIRNBOIN, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, Vol. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BRAUNAGEL, S. C.; ELTON, D. M.; MA, H.; SUMMERS, M. D. Identification and analysis of an Autographa californica nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56. **Virology**, Vol. 17, n°1, p. 97-110, 1996.
- BULACH, D. M.; KUMAR, C. A.; ZAIA, A.; LIANG, B.; TRIBE, D. E. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups reveled by phylogenetic anlysis of polyedrin and DNA polymerase gene sequences. **Journal of Invertebrate Pathology**, Vol. 73, n°1, p. 59-73, 1999.
- CASTRO, M. A. B; MARLINDA LOBO DE SOUZA<sup>2</sup>, SIHLER, W; RODRIGUES, J. C. M. R; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, Vol.34, n° 10, 1999.
- CASTRO, V. L. **Microrganismos geneticamente modificados e algumas implicações para a saúde ambiental**. Capturado em setembro de 2005. Disponível on-line em: <http://www.ambientebrasil.com.br/>
- CAVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, Vol. 46, n° 4, 2002.

CHANG, J. H.; CHOI, J. Y.; JIN, B. R.; ROH, J. Y.; OLSZEWSKI, A.; SEO, S. J.; O'REILLEY, D. R.; JE, Y. H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, Vol. 84, p. 30-37, 2003.

CLEM, R.J.; MILLER, L.K. Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. **Journal of Virology**, Vol.67, p..3730-3738, 1993.

CORY, J. S.; GREEN, B. M.; PAUL, R. K.; HUNTER-FUJITA, F. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. **Journal of Invertebrate Pathology**, Vol. 89, n °2, p.101-11, 2005.

CORY, J. S.; MYERS, J. H. The ecology and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Vol. 34, p. 239-272, 2003.

CORY, J. S; BISHOP, D. H. Use of baculoviruses as biological insecticides. **Mol Biotechnol**, Vol. 7, n°3, p. 303-13, 1997.

CRUZ, I. Atualização em MIP. **Cultivar**, Embrapa Milho e Sorgo, Ano IV, n°43, p. 18, 2002.

CRUZ, I. **A lagarta do cartucho na cultura do milho**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Sete Lagoas, 1995. 45 p.

DANYLUK, G. M.; MARUNIAK, J. E. In vivo and in vitro Host Range of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus and *Spodoptera frugiperda* Nuclear Polyhedrosis Virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, Vol. 50, p. 207-212, 1987.

ESCRIBANO, A.; WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CAVE, R. D.; CHAPMAN, J.; CABALLERO, P. Selection of a Nucleopolyhedrovirus for Control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, Genetic, and Biological Comparison of Four Isolates from the Americas. **Journal of Economic Entomology**, Vol. 92, n° 5, p. 1079-1085, 1999.

EVANS, J.T.; ROSENBLATT, G. S.; LEISY, D. J.; ROHRMANN, G. F. Characterization of the interaction between the baculovirus ssDNA-binding protein (LEF-3) and putative helicase (P143). **Journal of General Virology**, Vol. 80, p. 493-500, 1999.

FAKTOR, O.; TOISTER-ACHITUV, M.; NAHUM, O.; KAMENSKY, B. The p10 gene of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus: nucleotide sequence, transcriptional analysis and unique gene organization in the p10 locus. **Journal of General Virology**, 78, p. 2119-28, 1997.

FAN, X.; THIRUNAVUKKARASU, K.; WEAVER, R. F. Temperature-sensitive mutations in the *protein kinase-1 (pk-1)* gene or the *Autographa californica* nuclear polyedrosis virus that block very late gene expression. **Virology**, Vol. 224, p. 1-9, 1996.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (eds) **Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses**. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses - Family *Baculoviridae*. Elsevier/Academic Press, London, 2004, 1162 p.

FLIPSEN, J. T; MANS, R. M; KLEEFSMAN, A. W; KNEBEL-MORS DORF, D; VLAK, J. M. Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene induces early degeneration of Malpighian tubules in infected insects. **Journal of Virology**, Vol. 69, n°11, p. 7380-1, 1995.

FRIESEN, P. D.; MILLER, L. K. Temporal regulation of baculovirus RNA: overlapping early and late transcripts. **Journal of Virology**, Vol. 54, n°2, p. 392–400, 1985.

FUXA, J.R. Insect control with baculoviruses. **Biotech. Adv.** Vol. 9, p.425-442, 1991.

GIANNOPOULOS, P. N.; NASSOURY, N.; LAMONTAGNE, L.; GUERTIN, C.; RASHIDAN, K. K. Choristoneura fumiferana Granulovirus pk-1: a baculoviral protein kinase. **J Biochem Mol Biol.**, Vol. 38, n°4, p. 457-67, 2005.

GOMES, S. A.; MOSCARDI, F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, Vol. 34, n° 9, p.1539-1544, 1999.

GUARINO, L. A.; XU, B.; JIN, J.; DONG, W. Virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. **Journal of Virology**, Vol. 72, n°10, p. 7985-91, 1998.

HAAS-STAPLETON, E. J; WASHBURN, J. O; VOLKMAN, L. E. *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. **Journal of General Virology**, Vol. 86, p. 1349-55, 2005.

HAAS-STAPLETON, E. J.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. **Journal of Virology**, Vol. 78, n°13, p. 6786-91, 2004.

HAWTIN, R.E.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C.J.; GOODAY, G.W.; KING, L.A.; KUZIO, J.A.; POSSEE, R.D. Liquefaction of *Autographa californica*

nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, Vol. 238, p. 243-253, 1997.

HAWTIN, R.E.; ARNOLD, K.; AYRES, M.D.; ZANOTTO, P.M.A.; HOWARD, S.C.; GOODAY, G.W.; CHAPPELL, L.H.; KITTS, P.A.; KING, L.A.; POSSEE, R.D. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **Virology**, Vol. 69, p. 975-982, 1995.

HAYAKAWA, T.; ROHRMANN, G. F.; HASHIMOTO, Y. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses. **Virology**, Vol. 278, p. 1-12, 2000.

HAYAKAWA, T.; OKANO, K.; SEONG, S. I.; GOTO, C.; MAEDA, S. Sequence analysis of de *Xestia c-nigrum* granulovirus genoma. **Virology**, Vol. 262, p. 277-297, 1999.

HELDENS, J. G. M.; VAN STRIEN, E. A.; FELDMANN, A. M.; KULCSÁR, P.; MUNOZ, D.; LEISY, D. J.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus deletion mutants generated in cell culture lack virulence *in vivo*. **Journal of General Virology**, Vol. 77, p. 3127-3134, 1996.

HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. R. The genome sequence and evolution of baculovirus. **Annu. Ver. Entomol.** Vol. 48, p. 211-234, 2003.

HINK, W.F. Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Nature**, Vol. 226, p.466-467, 1970.

HONG, T.; SUMMERS, M. D.; BRAUNAGEL, S. C. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Vol. 94, n°8, p. 050-5, 1997.

HORTON, M. H.; BURRAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, Vol. 67, n°4, p. 1860-8, 1993.

HUH, N. E.; WEAVER, R. F. Categorizing some early and late transcripts directed by the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of General Virology**, Vol. 71, p. 2195-200, 1990 a.

HUH, N.E.; WEAVER, R.F. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of General Virology**, v.71, p.195-201, 1990.

HYNK, O.; DELLOW, R. A.; OLSEN, M. J.; CARADOC-DAVIES, K. M. B.; DRAKE, K. HERNIOU, E. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. R.; WARD, V. K. Whole genoma analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, Vol. 83, p. 957-971, 2002.

IJKEL, W. F.; VAN STRIEN, E. A.; HELDENS, J. G.; BROER, R.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J.M. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, Vol. 80, n°12, p. 3289-304, 1999.

JIN, J.; DONG, W.; GUARINO, L. A. The LEF-4 Subunit of Baculovirus RNA Polymerase Has RNA 5'-Triphosphatase and ATPase Activities. **Journal of Virology**, Vol. 72, n°12, p. 10011-10019, 1998.

KUZIO, J.; PEARSON, M. N.; HARWOOD, S. H.; FUNK, C. J.; EVANS, J. T.; SLAVICEK, J. M.; ROHRMANN, G. F. Sequence and analysis of de genome of a baculovirus pathogenic for *Limantria dispar*. **Virology**, Vol. 253, n° 1, p.17-34, 1999.

LE, T. H.; WU, T.; ROBERTSON, A.; BULACH, D.; COWAN, PL; GOODGE, K.; TRIBE, D. Genetically variable triplet repeats in a RING-finger ORF of Helicoverpa species baculoviruses. **Virus Research**, Vol. 49, n° 1, p. 67-77, 1997.

LEE, S. Y.; POLOUMIENKO, A.; BELFRY, S.; QU, X.; CHEN, W.; MACAFEE, N.; MORIN, B.; LUCAROTTI, C.; KRAUSE, M. A common pathway for p10 and calyx proteins in progressive stages of polyhedron envelope assembly in AcMNPV infected *Spodoptera frugiperda* larvae. **Arch Virol**, Vol. 147, n° 7, p. 1247-58, 1996.

LI, L.; LI, Q.; WILLIS, L. G.; ERLANDSON, M.; THEIMANN, D. A. DONLY C. Complete comparative genomic analysis of two field isolates do *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus-A. **Journal of General Virology**, Vol. 86, n° 1, p. 91-105, 2005.

LI, Q.; DONLY, C.; LI, L.; WILLIS, L. G.; THEILMANN, D. A.; ERLANDSON, M. Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. **Virology**, Vol. 294, n°1, p. 106-21, 2002.

LI, L.; DONLY, C.; LI, Q.; WILLIS, L. G.; KEDDIE, B. A.; ERLANDSON, M. A.; THEILMANN, D. A. Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. **Virology**, Vol. 297, p. 226-244. 2002 .

LIMA, L.; PINEDO, F. J. R.; RIBEIRO, B. M.; ZANOTTO, P. M. A.; WOLFF, J. L. C. Identification, expression and phylogenetic analysis of the *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) *helicase* gene. **Virus Genes**, Vol. 29, n° 3, p. 345-352, 2004.

LIN, G.; BLISSARD, G. W. Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus lef-6-null virus: LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene transcription. **Journal of Virology**, Vol. 76, n° 11, p. 5503-14, 2002.

LOH, L.C.; HAMM, J.J.; KAWANISHI, C.; HUANG, E.S. Analysis of the *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome by restriction endonucleases and electron microscopy. **Journal of Virology**, Vol. 44, n°2, p.747-751, 1982.

LU, S. Y.; QI, Y. P.; GE, G. Q. Interaction of *Heliothis armigera* nuclear polyhedrosis viral capsid protein with its host actin. **J Biochem Mol Biol.**, Vol. 5, n°6, p. 562-7, 2002.

LU, A.; CARSTENS, E. B. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the p80 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a homologue of the *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus capsid-associated gene. **Virology**, Vol. 190, p. 201-9, 1992.

LU, A.; CARSTENS, E. B. Nucleotide sequence of gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, Vol. 181, p. 336-347, 1991.

LUQUE, T.; FINCH, R.; CROOK, N.; O'REILLY, D. R.; WINSTANLEY, D. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. **Journal of General Virology**, Vol. 82, n°10, p. 253-47, 2001.

MA, S.W.; CORSARO, B.G.; KLEBBA, P.E.; FRASER, M.J. Cloning and sequence analysis of a p40 structural protein gene of *Helicoverpa zea* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, Vol. 192, p.224-233, 1993.

MANJI, G. A.; HOZAK, R. R.; LACOUNT, D. J.; FRIESEN, P. D. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P35 to prevent programmed cell death. **Journal of Virology**, Vol. 71, n°6, p. 4509-16, 1997.

MARUNIAK, A. G.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. A.; DOUMBOUYA, A. E.; LIU, J. C.; MERRITT, T. M. Sequence analysis of the *Neodiprion sertifer* Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Virology**, p. 7036-7051, 2004.

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (Eds.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC, Vol. 1, p.129-146, 1986.

MARUNIAK, J. E.; BROWN, S. E.; KNUDSON, D. L. Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. **Virology**, Vol. 136, p. 221-234, 1984.

MCINTOSH, A. H.; GRASELA, J. J.; LUA, L.; BRAUNAGEL, S. C. Demonstration of the protective effects of fluorescent proteins in baculoviruses exposed to ultraviolet light inactivation. **Journal of Insect Science**, 4:31, 2004.

MILLER, L. K. Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. **J Cell Physiol**, Vol. 173, n°2, p. 178-82, 1997.

MORRIS, T. D.; MILLER, L. K. Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. **Gene**, Vol. 140, p. 147-153, 1994.

MOSCARDI, F. Assessment of the Application of Baculoviruses for Control of Lepidoptera. **Annual Review Entomology**, Vol. 44, p.257-289, 1999.

MOSCARDI, F.; MORALES, L.; SANTOS, B. **The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil.** Symposium (Virus 2) Prospects for the Use of Viral Pesticides. Foz do Iguaçu-Brasil, 18 a 23 de agosto de 2002.

OKANO, K.; VANARSDALL, A. L.; ROHRMANN, G. F. Characterization of a baculovirus lacking the alkaline nuclease gene. **Journal of Virology**, Vol. 78, n°19, p.10650-6, 2004.

OLIVEIRA, J. V. C. ; WOLFF, J. L.C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M. ; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F. ; MARUNIAK, J. E. ; ZANOTTO, P. M. A. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, Vol. 87, p. 3233-3250, 2006.

OLSZEWSKI, J.; MILLER, L. K. Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation. **Journal of Virology**, Vol. 71, n°7, p. 5040-50, 1997.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors: a laboratory manual** Salt Lake City, UT: W.H. Freeman, 1992, 347 p.

PAN, L.; LI, Z.; GONG, Y.; YU, M.; YANG, K.; PANG, Y. Characterization of gp41 gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Virus Res.** Vol. 110, p.73-9, 2005.

PERERA, O. P.; VALLES, S. M.; GREEN, T. B.; WHITE, S.; STRONG, C. A.; BECNEL, J. J. Molecular analysis of an occlusion body protein from *Culex nigripalpus*

nucleopolyhedrovirus (CuniNPV).

**Journal of Invertebrate Pathology**, Vol. 91, n°1, p. 35-42, 2006.

PHAM, D. Q.; HICE, R. H.; SIVASUBRAMANIAN, N.; FEDERICI, V. A. The 1629-bp open reading frame of the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus encodes a virion structural protein. **Gene**. Vol. 137, n°2, p. 275-80, 1993.

PINEDO, F. J. R. ; MOSCARDI, F. ; LUQUE, T. ; OLSZEWSKI, J. A. ; RIBEIRO, Bergmann Morais . Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. **Biological Control**, Estados Unidos, Vol. 27, n° 3, p. 336-344, 2003.

POSSEE, R. D.; SUN, T. P.; HOWARD, S. C.; AYRES, M. D.; HILL-PERKINS, M.; GEARING, K. L. Nucleotide sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis 9.4 kbp EcoRI-I and -R (polyhedrin gene) region. **Virology**, Vol. 185, n°1, p. 229-41, 1991.

REICHARD, P. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases ? **Science**, Vol. 260, p. 1773-1777, 1993.

RIBEIRO, B.M.; SOUZA, M. L. e KITAJIMA, E. **Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus de inseto**. In. ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. FEAL, 2ª edição, Vol. 4, 1998. p. 483

ROHRMANN, G. F. Baculovirus structural proteins. **Journal of General Virology**, Vol. 73, p. 749-761, 1992.

ROHRMANN, G. F. Polyhedrin structure. **Journal of General Virology**, Vol. 67, p. 1499-513, 1986.

SALVADORI, J.R.; RUMIATTO, M. **Observações sobre a biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em trigo**. Dourados: Embrapa-UEPAE, Comunicado técnico, 8, 1982. 6p.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3ª edição, Vol. 2, p. 135 - 139, 1999.

SANGER, D.L.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 74, p.5463-5467, 1977.

SCHAAN, B. D. O papel da Proteína Quinase C no desenvolvimento da complicações vasculares do Diabetes Mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Vol. 47, n°6, 2003.

SILVIE, P.; LEROY, T.; BELOT, J.; MICHEL, B. **Manual de identificação das pragas e seus danos no algodoeiro**. Coodetec: Cascavel-PR, Boletim técnico n°34, 1ª Edição, 2001, 100 p.

SIMÓN, O.; TREVOR, W.; LÓPEZ-FERBER, M.; CABALLERO, P. Genetic Structure of a *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus Population: High Prevalence of Deletion Genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 70, n° 9, p. 5579–5588, 2004.

SIMÓN O.; CHEVENET, F.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M. Physical and partial genetic map of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) genome. **Virus Genes**, Vol. 30, n° 3, p. 403-17, 2005.

SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; COSTA, N. R.; SIHLER, W.; RIBEIRO, Z. M. A.; PEGORARO, R. A. **Monitoramento de bioinseticida aplicado para controle do mandaró da mandioca em Santa Catarina**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ano I, n° 51, 2006.

SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; SILHER, W; RIBEIRO, Z. M. A. e MOSCARDI, F. Caracterização de baculovírus utilizados no controle de pragas – Técnicas de caracterização de vírus de insetos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Edição 24, 2002.

STRIEN, E. A.; FAKTOR, O.; HU, Z. H.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Baculoviruses contain a gene for the large subunit of ribonucleotide reductase. **Journal of General Virology**, Vol. 78, p. 2365–2377, 1997.

SUMMERS, M.D.; SMITH, G.E.; KNELL, J.D.; BURAND, J.P. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ni* nuclear polyhedrosis virus recombinants. **Journal of Virology**, Vol.34, p.694-703, 1980.

TODD, J.W.; PASSARELLI, A.L.; MILLER, L.K. Eighteen baculovirus genes, including lef-11, p35, 39K, and p47, support late gene expression. **Journal of Virology**, Vol.69, p.968-974, 1995.

TOMALSKI, M. D.; WU, J. G.; MILLER, L. K. The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. **Virology**, Vol. 167, n°2, p. 591-600, 1988.

TUMILASCI, V.F; LEAL, E; ZANOTTO, P.M; LUQUE, T; WOLFF, J. L. Sequence analysis of a 5.1 kbp region of the *Spodoptera frugiperda* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome that comprises a functional ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene. **Virus Genes**, Vol. 27, n°2, p. 137-44, 2003.

VALICENTE, F.H.; CRUZ, I. **Controle Biológico da Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o Baculovírus**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa/CNPMS), Circular Técnica 15, 1991.

VOLKMAN, L.E.; **Baculoviridae in Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses**. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), p. 104-112, 1995.

VOLKMAN, L.E.; KEDDIE, B. A. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. **Virology**, Vol. 1, p. 249-256, 1990.

WHITFORD, M.; FAULKNER, P. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Vol. 66, n°8, p.4763–4768, 1992.

WHITFORD, M.; STEWART, S.; KUZIO, J.; FAULKNER, P. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Virology**, Vol. 63, n°3, p. 1393-9, 1989.

XING, K.; DENGL, R.; WANG, J.; FENG, J.; HUANG, M.; WANG, X. Analysis and prediction of baculovirus promoter sequences. **Virus Research**, Vol. 13, n°1, p. 64-71, 2005.

YANASE, T.; YASUNAGA, C.; HARA, T.; KAWARABATA, T. Coinfection of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda* cell lines with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *Spodoptera exigua*. **Intervirolgy**, Vol. 41, n°6, p. 244-52, 1998.

YANG, C. L.; D. A. STETLER, D. A.; WEAVER, R. F. Structural comparison of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*. **Virus Research**. Vol. 20, p. 251-264, 1991.

ZHANG, S. X.; HAN, Y.; BLISSARD, G. W. Palmitoylation of the *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus Envelope Glycoprotein GP64: Mapping, Functional Studies, and Lipid Rafts. **Journal of Virology**, Vol. 77, n°11, p. 6265–6273, 2003.

ZANOTTO, P.M.; KESSING, B.D.; MARUNIAK, J.E. Phylogenetic interrelationships among baculovirus: evolutionary rates and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, Vol. 62, p. 147-164, 1993.

## **ANEXOS A**

## **Anexo A: Extração de DNA viral**

### **1° Dia**

- Tubos Falcon com 4 mL de solução de poliedros
- Adicionar:
  - 400 µl de solução 10% SDS
  - 40 µl de protease (20 mg/ml)
- Incubar a 55 ° C por uma hora com agitação
- Spin na velocidade máxima em centrífuga de mesa ( ~2500 RPM)  
(pode também colocar material em tubos eppendorff e centrifugar a 10 K por 10 min.)
- Descartar sobrenadante
- Ressuspender precipitado em 2 mL de NaCO<sub>2</sub> 0,2 M
- Deixar com agitação leve em temperatura ambiente por 16 horas

### **2° Dia**

- centrifugar em tubos Falcon;  
(Velocidade máxima em centrífuga de mesa ( ~2500 RPM) por 10 min.;
- guardar sobrenadante (A)
- resuspender precipitado em 1 mL de 0,2 M NaCO<sub>2</sub>
- agitar por 30 min.
- Centrifugar  
(Vmax em centrífuga de mesa ( ~2500 RPM), por 10 min.;
- remover sobrenadante e juntar à amostra "A"
- neutralizar sobrenadante com ~ 0,8 mL de 1 M Tris HCl pH 7.0
- adicionar água até volume chegar a 4.0 mL
- guardar material na geladeira por cerca de 4 horas
- Centrifugar a 20.000 x g por 1 hora
- descartar o precipitado
- Para cada 500 µl de sobrenadante adicionar:
  - 10 µl de SDS (10%)
  - 10 µl de protease
- Incubar a 55° C por 16 horas

### **3° Dia**

- Extração fenol e clorofórmio
- precipitação com etanol ou concentração em Centricon com grande volume de água.

## **ANEXO B**

## **Anexo B: Família de aminoácidos**

Família de aminoácidos são agrupados em quatro categorias de acordo com as propriedades de suas cadeias laterais. Estes 20 aminoácidos encontrados nas proteínas são abreviados tanto por três letras como por uma letra (ALBERTS *et al.*, 1999).

<b>GRUPOS</b>	<b>AMINOÁCIDOS</b>	<b>ABREVIATURAS</b>
Cadeias Laterais Básicas	Lisina	Lys ou K
	Arginina	Arg ou R
	Histidina	His ou H
	Ácido aspártico	Asp ou D
Cadeias Laterais Ácidas	Ácido glutâmico	Glu ou E
	Asparagina	Asn ou N
Cadeias Polares Não-Carregadas	Glutamina	Gln ou Q
	Serina	Ser ou S
	Treonina	Thr ou T
	Tirosina	Tyr ou Y
	Alanina	Ala ou A
Cadeias Laterais Não-Polares	Valina	Val ou V
	Leucina	Leu ou L
	Isoleucina	Ile ou I
	Prolina	Pro ou P
	Fenilalanina	Phe ou F
	Metionina	Met ou M
	Triptofano	Trp ou W
	Glicina	Gly ou G
	Cisteína	Cys ou C

## **ANEXO C**

### Anexo C: Grau de similaridade da ORF 5 de SfMNPV-19 com ORFs similares

- Sequência da região que corresponde a ORF 5 de SfMNPV-19 comparada com seqüências do GenBank usando o programa Blast.

Sequences producing significant alignments:	(Bits)	Value
<a href="#">ref NP_701231.1</a> hypothetical protein PF11_0371 [Plasmodium f...	<a href="#">51.2</a>	2e-04
<a href="#">emb CAD51479.1</a> hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3...	<a href="#">51.2</a>	2e-04
<a href="#">gb EAR98474.1</a> hypothetical protein TTHERM_00292010 [Tetrahym...	<a href="#">50.8</a>	3e-04
<a href="#">ref XP_716736.1</a> hypothetical protein CaO19_3429 [Candida alb...	<a href="#">50.4</a>	3e-04
<a href="#">gb AAO52150.1</a> similar to Plasmodium falciparum. Hypothetical...	<a href="#">50.1</a>	4e-04
<a href="#">ref XP_644916.1</a> hypothetical protein DDB0203809 [Dictyosteli...	<a href="#">50.1</a>	4e-04
<a href="#">ref NP_704486.1</a> hypothetical protein [Plasmodium falciparum ...	<a href="#">48.9</a>	0.001
<a href="#">ref XP_724263.1</a> hypothetical protein PY00431 [Plasmodium yoe...	<a href="#">48.9</a>	0.001
<a href="#">ref XP_966228.1</a> hypothetical protein PFF1185w [Plasmodium fa...	<a href="#">47.8</a>	0.002
<a href="#">ref NP_758335.1</a> hypothetical protein MYPE9520 [Mycoplasma pe...	<a href="#">47.8</a>	0.002

- Similaridade da ORF 5 com uma proteína hipotética de Plasmodium falciparum 3D7.

>[ref|NP\\_701231.1](#) hypothetical protein PF11\_0371 [Plasmodium falciparum 3D7]  
>[gb|AAN35955.1](#) hypothetical protein PF11\_0371 [Plasmodium falciparum 3D7]  
Length=3468

Score = 51.2 bits (121), Expect = 2e-04  
Identities = 74/338 (21%), Positives = 135/338 (39%), Gaps = 71/338 (21%)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)