



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

Genômica comparativa de isolados de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV com ênfase no seu provável *locus v-cath/chiA* e caracterização de clones purificados e mutantes FP gerados

Marina Tagliari

Brasília - DF
2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - IB
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Genômica comparativa de isolados de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV com ênfase no seu provável *locus v-cath/chiA* e caracterização de clones purificados e mutantes FP gerados

Marina Tagliari

Brasília - DF
Março/2013

Marina Tagliari

Genômica comparativa de isolados de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV com ênfase no seu provável *locus v-cath/chiA* e caracterização de clones purificados e mutantes FP gerados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília - UnB, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientadora: Dr^a. Maria Elita Batista de Castro

Brasília - DF
Março/2013

Tagliari, Marina
Genômica comparativa de isolados de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV com
ênfase no seu provável *locus v-cath/chiA* e caracterização de clones
purificados e mutantes FP gerados
156 p.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília. Instituto de Ciências
Biológicas. Departamento de Biologia Celular. Pós-Graduação em Biologia
Molecular. Brasília,
2013.
Orientadora: Dr^a. Maria Elita Batista de Castro
1.Variantes genotípicos 2.Mutantes *few polyhedra* 3.Baculovírus
4.CoveMNPV

Projeto de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), sob a orientação da pesquisadora Dr^a. Maria Elita B. Castro, com suporte financeiro da EMBRAPA e CNPq-UnB.

Brasília, 28 de março de 2013.

Banca Examinadora:

Dr^a. Maria Elita Batista de Castro (Orientadora e Presidente da Banca) - CENARGEN

Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Examinador Interno) - UnB

Dr. Felipe Rodrigues da Silva (Examinador Externo) - Embrapa Informática Agropecuária

Dr. Peter Ward Inglis (Suplente) - CENARGEN

Aos meus pais, Antonio e Juçara.
Aos meus irmãos, Jucelane e Henrique.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço àqueles que independentemente de minhas escolhas sempre estarão comigo torcendo para que eu seja feliz e tenha sucesso, àqueles que me deram condições para que eu pudesse realizar meu mestrado e que com muita dedicação, carinho e amor incondicional me ajudaram a ser quem sou. Mãe e Pai, amo muito vocês e obrigada por tudo!

Aos meus amados irmãos por me apoiar e incentivar. Amo vocês!

A todos os meus familiares que apesar da distância que nos separa, terem torcido e torcerem muito para o meu sucesso profissional.

Agradeço ao meu namorado Pedro pela paciência e compreensão muitas vezes requerida e pelas ajudas técnicas, principalmente em inglês e informática. Obrigada e obrigada!

À minha orientadora Dr^a. Maria Elita Batista de Castro por ter aceitado me orientar e por me permitir conduzir o projeto de dissertação com muita liberdade. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos desde o PIBIC os quais contribuíram para minha formação acadêmica e profissional. Agradeço aos incentivos e momentos de descontração em meio ao desespero do mestrado em que muitas vezes me encontrava.

Ao Dr. Fernando Lucas de Melo (UnB) por ter aceitado ser um colaborador no desenvolvimento do capítulo 2. Agradeço principalmente por, com muita paciência e tempo dedicado, ter me ensinado tudo o que sei a respeito de bioinformática. E ao mesmo tempo, ao Prof^o Dr. Bergmann Morais Ribeiro - Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia (UnB) - por ter facilitado essa valiosa colaboração.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof^o Dr. Bergmann Morais Ribeiro (UnB), Dr^a. Marlinda Lobo de Souza (CENARGEN), Dr^a. Ângela Mehta dos Reis (CENARGEN) e Dr^a. Débora Pires Paula (CENARGEN) por terem aceitado compor a minha banca de qualificação e pelas oportunas sugestões.

À querida parceira de trabalho Zildinha por sempre que necessário ceder células SF21 e meio de cultura, por me ensinar a fazer gel de poliacrilamida, por me ajudar sempre que precisei e claro pelo carinho e respeito que sempre me tratou.

Ao querido colega de trabalho William que por inúmeras vezes me auxiliou e me tirou dúvidas, por ter cedido células SF21 e meio de cultura sempre que necessário e pelas várias conversas descontraídas que tivemos.

À sempre muito irreverente Raimundinha pelas risadas e suporte laboratorial.

À amiga Milene Ribeiro por compartilhar angústias de pós-graduandas e pelos momentos de descontração.

Às colegas de laboratório Briana e Saluana que desde a graduação, sempre muito solícitas, me ajudaram sempre quando precisei.

Aos colegas de laboratório Jorge, Larissa, Moema e Camila que de alguma forma me ajudaram na realização do meu trabalho, principalmente por meio de conversas e momentos divertidos e descontraídos.

Aos professores do curso de pós-graduação em Biologia Molecular (UnB).

Às Dr^a. Débora Pires Paula e Dr^a. Rose Monnerat pela receptividade em seus Laboratórios (CENARGEN).

Pelo envio das lagartas *C. vestigialis* infectadas e sadias agradeço ao Dr. Bráulio Santos (Bosquioli & Santos Ltda) e Edilene Machado (Swedish Match do Brasil S.A).

À Ingrid, técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia - UnB, pela observação das telinhas.

À doce Ana Cristina do Laboratório de Microscopia Óptica e Eletrônica (CENARGEN) pela preparação das amostras para MET e pelas nossas conversas sempre muito confortantes.

Ao Prof^o Dr. Tatsuya Nagata (UnB) pelo envio das amostras para o sequenciamento na Coréia.

Ao Dr. Peter Inglis (CENARGEN) pelo desenho dos oligonucleotídeos para amplificação do *v-cath* e *chiA*.

Por fim, agradeço as instituições que deram suporte ao desenvolvimento do presente trabalho. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da UnB e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida. À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) pelo financiamento da pesquisa. E ao Decanato de Pós-Graduação da UnB pelo suporte financeiro na participação em eventos científicos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ANEXOS.....	iv
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Baculovírus.....	4
2.1.1 História e características gerais.....	4
2.1.2 Baculovírus como bioinseticida.....	6
2.1.3 Classificação taxonômica.....	9
2.1.4 Ciclo de vida e fases da expressão gênica.....	11
2.2 Transmissão Horizontal do Vírus.....	14
2.2.1 Catepsina (<i>v-cath</i>).....	16
2.2.2 Quitinase (<i>chiA</i>).....	16
2.2.3 Outros genes.....	17
2.3 Baculovírus mutantes gerados in vitro.....	18
2.4 Álamo.....	23
2.5 Condylorrhiza vestigialis – Praga do Álamo.....	25
2.6 Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivos Gerais.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
CAPÍTULO 1.....	31
4 BUSCA POR ALTERAÇÕES NO LOCUS <i>v-cath/chiA</i> EM ISOLADOS DE CoveMNPV.....	32
4.1 Introdução.....	32
4.2 Materiais e Métodos.....	33
4.2.1 Vírus e Insetos.....	33
4.2.2 Purificação parcial de OBs.....	33

4.2.3	Bioensaios	33
4.2.4	Extração de DNA a partir de OBs	34
4.2.5	Clivagem de DNA viral de populações de campo	34
4.2.6	Eletroforese em gel de agarose	35
4.2.7	Amplificação por PCR dos genes <i>v-cath</i> e <i>chiA</i>	35
4.2.8	Preparação de células competentes com cloreto de cálcio	36
4.2.9	Construção do plasmídeo recombinante.....	36
4.2.10	Transformação bacteriana por choque térmico.....	37
4.2.11	Extração plasmidial por lise alcalina	38
4.2.12	Confirmação da clonagem e seleção dos clones	38
4.2.13	Sequenciamento dos genes clonados	38
4.3	Resultados e Discussão.....	40
4.4	Conclusão	48
CAPÍTULO 2		49
5 MONTAGEM, ANOTAÇÃO, FILOGENIA E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GENÔMICA DE CoveMNPV.....		50
5.1	Introdução	50
5.2	Materiais e Métodos.....	51
5.2.1	Inseto, vírus e DNA viral.....	51
5.2.2	Sequenciamento e montagem da sequência de DNA	51
5.2.3	Anotação do genoma	51
5.2.4	Filogenia	52
5.2.5	Variações entre os isolados	53
5.2.6	Identificação do provável <i>locus v-cath/chiA</i>	54
5.2.7	Evolução do <i>locus v-cath/chiA</i>	55
5.3	Resultados e Discussão.....	56
5.4	Conclusão	71
CAPÍTULO 3		73
6 OBTENÇÃO DE CLONES DE CoveMNPV E RELEVÂNCIA BIOLÓGICA DAS SUAS DIFERENÇAS GENOTÍPICAS.....		74
6.1	Introdução	74
6.2	Materiais e Métodos.....	75
6.2.1	Vírus, Células e Insetos	75

6.2.2	Transfecção de células SF21	75
6.2.3	Plaque assay e amplificação de clones virais	76
6.2.4	Extração de DNA a partir de BVs	77
6.2.5	Clivagem de DNA dos clones virais.....	77
6.2.6	Quantificação da produção de BVs - TCID ₅₀	78
6.2.7	Ensaio de Infectividade viral <i>in vitro</i>	78
6.2.8	Produção de OBs.....	78
6.2.9	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	79
6.2.10	Multiplicação de OBs por injeção de BVs intrahemocele.....	79
6.2.11	Bioensaios pelo método <i>droplet feeding</i>	80
6.2.12	Amplificação por PCR dos genes <i>polh</i> e <i>fp25K</i>	81
6.2.13	Sequenciamento e análise dos genes <i>polh</i> e <i>fp25K</i>	82
6.3	Resultados e Discussão.....	83
6.4	Conclusão	106
7	CONCLUSÃO GERAL.....	108
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
9	ANEXOS.....	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fenótipos dos Baculovírus. Desenho ilustrativo de um corte longitudinal das partículas OB, ODV e BV	5
Figura 2. Esquema representativo do ciclo de infecção dos Baculovírus.....	13
Figura 3. Representação da organização do <i>locus v-cath/chiA</i> em <i>Alphabaculovirus</i> Grupo I.....	15
Figura 4. Modo de ação das proteínas V-CATH e CHIA. A pre-proV-CATH e CHIA são traduzidas no RE.	17
Figura 5. Área nativa de Salicaceae no mundo.....	24
Figura 6. <i>Condylorrhiza vestigialis</i>	25
Figura 7. Plantação de Álamo em São Mateus do Sul - PR, Brasil.....	26
Figura 8. Micrografia eletrônica de transmissão de um OB do vírus CoveMNPV.....	28
Figura 9. Esquema representativo do vetor pGEM-T Easy utilizado para a clonagem dos prováveis genes catépsina (<i>v-cath</i>) e quitinase (<i>chiA</i>)	37
Figura 10. Padrão de restrição do DNA de CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R.....	41
Figura 11. Lagartas <i>Condylorrhiza vestigialis</i> com sintomas típicos de infecção causada por baculovírus.	43
Figura 12. Produtos de PCR dos prováveis genes <i>v-cath</i> e <i>chiA</i> dos isolados de CoveMNPV antes (A) e após (B) a purificação das bandas com tamanho esperado	44
Figura 13. Análise das clonagens dos supostos genes <i>v-cath</i> e <i>chiA</i> em plasmídeos pGEM-T Easy por digestão com <i>Pst</i> I	45
Figura 14. Resultado do sequenciamento de produtos de PCR do suposto gene <i>chiA</i> de CoveMNPV-NR e -R clonado em pGEM-T Easy.....	46
Figura 15. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do suposto gene <i>v-cath</i> de CoveMNPV-R clonado em pGEM-T Easy	47
Figura 16. Mapa circular representativo do genoma de CoveMNPV.....	58
Figura 17. Relações filogenéticas de CoveMNPV com os demais baculovírus da família <i>Baculoviridae</i>	63
Figura 18. Árvore filogenética de CoveMNPV e 14 <i>Alphabaculovirus</i> do grupo I construída com base na concatenação das sequências nucleotídicas de 11 <i>core genes</i> : <i>alk-exo</i> , <i>lef-8</i> , <i>lef-9</i> , <i>pif-0</i> , <i>pif-1</i> , <i>pif-2</i> , <i>pif-3</i> , <i>pif-5</i> , <i>odv-e18</i> , <i>odv-e27</i> e <i>odv-ec43</i>	64
Figura 19. Alinhamento do provável locus <i>v-cath/chiA</i> de CoveMNPV	65
Figura 20. Produtos de PCR resultantes da amplificação da região intergênica <i>lef-7/gp64</i> para os 2 isolados de campo e 9 clones de CoveMNPV	66
Figura 21. Árvores filogenéticas dos genes <i>v-cath</i> , <i>chiA</i> , <i>gp64</i> e <i>lef-7</i>	69
Figura 22. Padrão de restrição do DNA extraído de OBs de CoveMNPV-IC.....	83
Figura 23. Micrografia de contraste de fase de células SF21 infectadas com CoveMNPV-II, 120h p.i.	84

Figura 24. DNA de clones virais purificados por <i>plaque assay</i> clivado com a endonuclease de restrição <i>Pst</i> I.....	86
Figura 25. Padrão de restrição do DNA extraído de BVs dos clones de CoveMNPV selecionados....	87
Figura 26. Micrografias ópticas dos ensaios de infectividade <i>in vitro</i>	92
Figura 27. Micrografias eletrônicas de transmissão das partículas OBs produzidas em ensaios de infectividade <i>in vitro</i>	93
Figura 28. Padrão de clivagem por endonucleases de restrição de DNA extraído de OBs de clones de CoveMNPV.....	94
Figura 29. Análise eletroforética dos produtos de PCR dos genes <i>fp25k</i> e <i>polh</i>	96
Figura 30. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>polh</i> dos clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 e isolados CoveMNPV-II e -IC antes a após amplificação <i>in vivo</i>	97
Figura 31. Cromatograma e alinhamento das sequências nucleotídicas do gene <i>fp25k</i> dos clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 e isolados CoveMNPV-II e -IC antes e após amplificação <i>in vivo</i>	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais baculovírus utilizados como bioinseticidas no mundo.	7
Tabela 2. Distribuição de genes responsáveis pela liquefação larval nos genomas sequenciados de espécies e isolados de baculovírus.	10
Tabela 3. Oligonucleotídeos degenerados para amplificação dos genes <i>v-cath</i> e <i>chiA</i>	36
Tabela 4. Modelos evolutivos dos <i>core genes</i> utilizados para a construção das árvores.....	53
Tabela 5. Oligonucleotídeos para amplificação do locus <i>v-cath/chiA</i>	54
Tabela 6. Modelos evolutivos dos genes do locus <i>lef-7/gp64</i> utilizados para a construção das árvores filogenéticas.....	55
Tabela 7. Regiões repetitivas identificadas no genoma do CoveMNPV.	59
Tabela 8. Análise quantitativa dos polimorfismos observados nos.....	60
Tabela 9. <i>Indels</i> identificados nos genomas dos isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R e suas relativas posições no genoma viral.....	61
Tabela 10. Oligonucleotídeos para amplificação dos genes <i>polh</i> e <i>fp25k</i> de CoveMNPV.....	81
Tabela 11. Produção de partículas OBs e BVs em ensaios de infectividade <i>in vitro</i>	89
Tabela 12. Tempo médio de morte (TM) e taxa de mortalidade de larvas.....	95
Tabela 13. Alterações detectadas no gene <i>fp25k</i> dos clones e isolados de CoveMNPV e suas consequências refletidas no seu produto.....	100

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Alinhamento do gene quitinase (<i>chiA</i>) dos representantes dos <i>Alphabaculovirus</i> do Grupo I Clado B.....	126
Anexo 2. Alinhamento do gene catepsina (<i>v-cath</i>) dos representantes dos <i>Alphabaculovirus</i> do Grupo I Clado B.....	128
Anexo 3. Genes identificados no genoma de CoveMNPV e sua identidade com outros baculovirus.	129
Anexo 4. Árvores filogenéticas do CoveMNPV e 14 <i>Alphabaculovirus</i> do Grupo I baseada em 11 <i>core genes</i>	134
Anexo 5. Número de SNPs intergênicos sinônimos e não sinônimos compartilhados e únicos para os isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R.	135

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Adenina
ABRAF	Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
EtBr	Brometo de etídeo
bros	<i>Baculovirus repeated ORF</i> – ORF repetitiva de baculovírus
BV	<i>Budded virus</i> - vírus brotado
C	Citosina
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i> - Sequência de DNA codificadora
chiA	Quitinase
CL₅₀	Concentração letal média
core genes	Genes comuns a todos os baculovírus
d p.i	Dias pós-infecção
DIP	Defective Interfering Particle - partícula interferente defectiva
DNA	Deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Double strand DNA - DNA dupla fita
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FP	Few polyhedra - mutante de poucos poliedros
fp25k	Few polyhedra protein - proteína de poucos poliedros
G	Guanina
GlcNAc	<i>N-Acetylglucosamine</i> - N-acetilglicosamina
gp64	<i>Envelope glycoprotein</i> - glicoproteína do envelope
GV	Granulovirus
h p.i.	Hora pós-infecção
ha	Hectares
hr	<i>Homologous regions</i> – regiões homólogas
IAA	Álcool isoamílico
ICTV	<i>Comite Internacional de Taxonomia de Vírus</i> - International Committee on the Taxonomy of Viruses
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IEC	<i>International equipment Company</i>
IMC	<i>Internacional Minerals and Chemical Corporation</i>
IPC	<i>International Poplar Commission</i> - Comissão Internacional do <i>Populus</i>
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kbp	<i>kilo base pairs</i> - quilo pares de bases
kDa	<i>kiloDaltons</i> - quilo Daltons
KDEL	Motivo proteico formado pelos aminoácidos Lys-Asp-Glu-Leu
lef-7	<i>Late expression factor</i> - fator de expressão tardia 7
M	Molar
mer	Tamanho do oligonucleotídeo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MNPV	<i>Multiple nucleopolyhedrovirus</i>
MOI	Multiplicidade de infecção
NC	Nucleocapsídeos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> - Centro Nacional de Informações biotecnológicas
NPV	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OB	<i>Occlusion body</i> - Corpo de oclusão
ODV	<i>Occlusion derived virus</i> - vírus derivado do corpo de oclusão

ORF	<i>Open reading frame</i> - fase aberta de leitura
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
pfu	<i>Plaque forming units</i> - unidades formadoras de placa
pH	Potencial de hidrogênio iônico
polh	Poliedrina
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> - Dodecil sulfato de sódio
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleotídeo único
SNPV	<i>Single nucleopolyhedrovirus</i>
T	Timina
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-borate-EDTA
TCID₅₀	<i>50% Tissue Culture Infectious Dose</i> - dose infecciosa 50% para cultura de tecidos
TL₅₀	Tempo letal médio
TM	Tempo médio de morte
T_m	<i>Melt Temperature</i> - Temperatura de fusão
TTAA	Sítio alvo de recombinação
U	Unidade
UV	Ultravioleta
V	Volume
v-cath	Catepsina
X-GAL	5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside
λ	Lambda
μM	Micromolar
μg	Micrograma
μL	Microlitro

RESUMO

O lepidóptero *Condylorrhiza vestigialis* é uma das principais pragas desfolhadoras da cultura de álamo no Brasil. Como uma alternativa de controle desta praga, o baculovírus *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CoveMNPV) vem sendo aplicado em plantações de Álamo na região de Cascavel-PR. Devido à ocorrência no campo de lagartas mortas por infecção viral apresentando tegumento liquefeito e intacto, os genes virais catepsina (*v-cath*) e quitinase (*chiA*), essenciais para a liquefação do tegumento da lagarta morta por vírus, foram investigados quanto a sua presença ou ausência nos genomas de dois isolados de campo de CoveMNPV. A amplificação destes genes por PCR usando oligonucleotídeos degenerados foi altamente inespecífica em ambas as amostras. Embora os produtos detectados em gel de agarose fossem dos tamanhos esperados, as suas sequências não corresponderam aos genes *v-cath* e *chiA*, indicando uma possível ausência desses genes no genoma de CoveMNPV. Bioensaios demonstraram um comportamento semelhante para ambas às amostras de campo, onde à maioria das lagartas mortas apresentou o tegumento íntegro. Os perfis de restrição do DNA viral, gerados pela clivagem com cinco endonucleases de restrição (*Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I), foram idênticos para ambos os isolados, tanto para bandas principais como submolares. Para melhor entender as diferenças nos dois isolados de campo de CoveMNPV, seus genomas foram sequenciados utilizando o sequenciador automático FLX 454 (*Roche*). Após a montagem, anotação e análise, os dois isolados foram comparados por meio da avaliação de polimorfismos, onde o percentual de similaridade entre eles foi de 99.97%. O genoma do CoveMNPV é de 125.767 pares de base (pb) e tem um conteúdo G+C de 42.9%, e contém 138 fases abertas de leitura (ORFs), 9 *bro*s e 4 *hrs*. Análise filogenética baseada nas sequências deduzidas de aminoácidos do genoma completo e nas sequências nucleotídicas de 11 genes comuns a todos os baculovírus (*core genes*) classificou o CoveMNPV como espécie irmã do clado AgMNPV/CfDEFMNPV. A ausência dos genes *v-cath* e *chiA* foi confirmada no genoma de ambos os isolados, e análise filogenética do *locus lef-7/gp64* sugere que este evento tenha ocorrido no ancestral do AgMNPV, CfDEFMNPV e CoveMNPV. Com base na presença de bandas submolares no perfil de restrição do DNA dos isolados de CoveMNPV, clones virais foram purificados por *plaque assay* a partir de uma das misturas de genótipos de campo. Três destes clones, nomeados CoveMNPV-C2, -C6 e -C8, foram selecionados e amplificados *in vivo* e *in vitro*. Análise comparativa dos DNAs não mostrou qualquer alteração entre os perfis de restrição gerados por *Bst*EII, *Hind*III e *Pst*I, sugerindo a não recuperação do genótipo de campo após a primeira passagem dos clones *in vivo*. Os clones foram submetidos a ensaios de infectividade *in vivo* e *in vitro*, evidenciando diferenças nos seus graus de virulência. Além disto, os OBs dos clones demonstraram diferenças na morfologia do poliedro como revelado

por microscopia eletrônica de transmissão. Com base nestes dados, os genes *polh* e *fp25k* responsáveis pela formação do poliedro, antes e após a passagem dos clones *in vivo*, foram amplificados e sequenciados. Nenhuma alteração no gene *polh* foi detectada, mas o gene *fp25k* do C8 e C6 apresentou uma mutação *frameshift* pela inserção de um único nucleotídeo resultando em uma proteína truncada. Após a passagem destes clones *in vivo* houve uma diminuição na frequência do mutante com relação ao selvagem. Os OBs do C8 apresentaram poucos ou nenhum ODV no seu interior, fenótipo este esperado para um *fp25k* mutado, e o que também justifica sua menor virulência observada em ensaios *in vivo*. O clone que se mostrou mais virulento em ensaios *in vivo*, CoveMNPV-C2, foi similar ao isolado de campo após passagem *in vitro*, não mostrando qualquer mutação no gene *fp25k* e produzindo ODVs oclusos. Estas evidências sugerem que este clone é geneticamente mais estável, uma vez que não houve alteração em consequência da passagem em cultura de células, enquanto que os outros clones foram identificados como mutantes de poucos poliedros (FP: *few polyhedra*).

ABSTRACT

The lepidopteran, *Condylorrhiza vestigialis* is a major defoliating pest of poplar in Brazil. The baculovirus *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CoveMNPV) has been applied in poplar plantations in the region of Cascavel-PR as an alternative to chemical control of this pest. Due to the occurrence of dead caterpillars in the field with either intact or liquefied integument, the presence or absence of virus-encoded cathepsin (*v-cath*) and chitinase (*chiA*) genes, essential for the liquefaction of the integument of caterpillars killed by virus, were investigated in the genomes of two CoveMNPV field isolates. Amplification of these genes by PCR using degenerate primers was highly nonspecific in both samples. Although some products detected by agarose gel electrophoresis were of the expected sizes, their sequences did not correspond to the *v-cath* and *chiA* genes, indicating a possible lack of these genes in the CoveMNPV genome. Bioassays showed a similar behavior for both field samples, where most killed caterpillars possessed an intact integument. The restriction profiles of the viral DNA, generated by cleavage with five restriction endonucleases (*Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III and *Pst*I), was identical in the two isolates, for both major and submolar bands. To better understand the differences in the two CoveMNPV field isolates, their genomes were sequenced using the 454 FLX automated sequencer (Roche). Following assembly, annotation and analysis, the two genomes were compared to evaluate polymorphisms, where the percentage similarity between them was 99.97%. The CoveMNPV genome is 125,767 base pairs (bp) and has a G+C content of 42.9%, and contains 138 open reading frames (ORFs), 9 *bro*s and 4 *hrs*. Phylogenetic analysis based on deduced amino acid sequences of the complete genome and nucleotide sequence of 11 core genes placed CoveMNPV as sister to AgMNPV and CfDEFMNPV. The absence of *v-cath* and *chiA* genes was confirmed in the genome of both isolates, and phylogenetic analysis of the *lef-7/gp64* locus suggests that this event occurred in the ancestor of AgMNPV, CfDEFMNPV and CoveMNPV. Based on the presence of submolar bands in DNA restriction profiles of CoveMNPV isolates, viral clones were purified by plaque assay from a mixture of field genotypes. Three of these clones, named CoveMNPV-C2, -C6-and -C8, were selected and amplified *in vivo* and *in vitro*. Comparative DNA analyses showed no change in the restriction profiles generated by *Bst*EII, *Hind*III and *Pst*I suggesting the no recovery of field genotype after the first passage of the clones *in vivo*. The clones were also subjected to *in vivo* and *in vitro* infectivity assays, showing differences in their degree of virulence. Furthermore, the OBs of the clones also demonstrated differences in polyhedron morphology as revealed by transmission electron microscopy. Based on these data, the *polh* and *fp25k* genes responsible for polyhedron formation, before and after passage of the clones *in vivo*, were amplified and sequenced. No change in the *polh* gene was detected, but the *fp25k* gene of C8 and C6 showed a frameshift mutation by insertion of a single nucleotide resulting in a

truncated protein. After the passage of these clones *in vivo* there was a decrease in the frequency of the mutant relative to the wild-type. The OBs of C8 had few or no ODVs inside, which is the expected phenotype for an *fp25k*-defective mutant, and also explains its lower observed virulence in *in vivo* assays. The clone showing greater virulence in *in vivo* assays, CoveMNPV-C2, was similar to the field isolate after passage *in vitro*, did not show any mutation in the *fp25k* gene and produced occluded ODVs. This evidence suggests that this clone is genetically more stable, since it did not change as a result of passage in cell culture, whereas other clones were identified as few polyhedra (FP) mutants.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os baculovírus pertencem à família *Baculoviridae*, uma das mais bem caracterizadas até o momento das 25 famílias existentes de vírus que infectam invertebrados. Estes vírus são altamente específicos e infectam exclusivamente artrópodes das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera causando morte em seus hospedeiros (Herniou *et al.*, 2012). São considerados inofensivos aos seres humanos e plantas, e a outros organismos não alvos tornando-os assim uma excelente alternativa de uso em programas de controle integrado de pragas agrícolas e florestais (Payne, 1986; Groner, 1989).

Condylorrhiza vestigialis (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), em seu estágio larval, é uma praga desfolhadora de uma espécie florestal, o Álamo (*Populus* spp., família Salicaceae), de grande valor econômico para a indústria madeireira (Diodato e Pedrosa-Macedo 1996). Atualmente, o Brasil conta com uma área de plantio para *Populus* spp. de 4.220 ha nos estados do Paraná e Santa Catarina (ABRAF 2012). No Brasil, esta praga, que era combatida totalmente com inseticidas químicos, atualmente vem sendo controlada em cultivos de Álamo em Cascavel-PR pelo uso do bioinseticida a base do baculovírus *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CoveMNPV).

Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus (CoveMNPV) é um novo vírus de ocorrência natural pertencente à família *Baculoviridae* (Castro *et al.*, 2009) que vem sendo considerado uma alternativa importante como agente de controle da praga do álamo, *C. vestigialis*, por causar alta mortalidade em seus estágios larvais. Portanto, a vantagem de se ter uma caracterização mais detalhada de CoveMNPV para sua utilização como bioinseticida faz deste vírus um interessante objeto de estudo.

O presente trabalho foi subdividido em três capítulos. No capítulo 1 propõe-se investigar a ocorrência no campo de lagartas *C. vestigialis* infectadas com o baculovírus CoveMNPV apresentando dois distintos fenótipos pós-morte, cadáveres apresentando o tegumento liquefeito e cadáveres com tegumento intacto (Bráulio Santos, comunicação pessoal). Pressupondo a existência de uma possível variação genética entre os isolados virais de cada fenótipo, as lagartas liquefeitas e intactas

foram coletadas separadamente para a realização de estudos comparativos relacionados aos eventos observados. O isolado responsável pelo aparecimento do fenótipo de tegumento rompido foi nomeado de vírus CoveMNPV-R (R: rompe) e o isolado responsável pelo tegumento intacto de CoveMNPV-NR (NR: não rompe). Dois genes virais, *v-cath* (catepsina) e *chiA* (quitinase), por estarem envolvidos na liquefação e melanização pós-morte do tegumento da lagarta infectada com baculovírus, foram eleitos para o estudo inicial das possíveis variações genéticas existentes entre os isolados de campo. As enzimas catepsina e quitinase degradam proteína e quitina, respectivamente, causando ao final da infecção viral após a lise celular, a liquefação do tegumento da lagarta pós-morte facilitando assim a dispersão das partículas virais para o meio ambiente (Slack *et al.*, 1995; Hawtin *et al.*, 1997). Considerando a existência de ambos os fenótipos virais, a hipótese do presente capítulo é de que o isolado CoveMNPV-NR terá em seu genoma, um ou ambos os genes *v-cath* e *chiA* ausentes ou não funcionais por motivo de truncamento gênico, repressão na sua transcrição ou não ativação de seus produtos. Por outro lado, espera-se que o isolado CoveMNPV-R apresente ambos os genes ativos.

Brevemente, o capítulo 2 visa uma maior caracterização molecular dos isolados de campo por meio da obtenção da sequência nucleotídica, montagem, anotação e análise básica do genoma completo do CoveMNPV. Devido à importância dos baculovírus como ferramentas na expressão de proteínas heterólogas, na terapia gênica e no controle integrado de pragas, a compreensão genética desse vírus torna-se um importante passo para sua caracterização e manipulação genética. Hoje, incluindo espécies distintas e seus isolados, apenas 70 baculovírus apresentam o genoma completo sequenciado e o aumento no número de sequências gerará um maior conhecimento a respeito desta família de vírus. Este capítulo nos permitiu fazer conclusões destacadas dentro dos demais capítulos, ajudando assim na elucidação de questões aqui fundamentadas.

Por fim, o capítulo 3 apresenta a caracterização biológica de clones purificados de CoveMNPV. A existência de bandas submolares nos perfis de restrição do DNA dos isolados de campo, CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R, que conhecidamente são sinais da existência de variantes genotípicos na população estudada, nos conduziu

para a purificação de clones virais. Os clones virais selecionados apresentaram diferenças no perfil de restrição o que sugere a seleção de um variante genotípico proveniente do campo ou a geração de mutantes em decorrência da passagem do baculovírus em cultura de células. Visando elucidar esta questão foram conduzidos, para análise comparativa entre os clones, ensaios de infectividade *in vivo* e *in vitro*.

A expectativa é que os resultados gerados neste trabalho, incluindo a sequência completa do genoma do baculovírus CoveMNPV, possam contribuir para avanços na pesquisa genômica e proteômica do vírus e no entendimento de suas interações com os hospedeiros trazendo grandes impactos no desenvolvimento biotecnológico desse vírus e de outros baculovírus.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Baculovirus*

2.1.1 História e características gerais

O primeiro relato que se tem notícia de lagartas apresentando sintomas característicos de doença provocada por vírus do tipo baculovírus se deu na época em que houve o desenvolvimento da indústria da seda, século XVII. Neste período, devido à ausência de equipamentos que possibilitassem a confirmação da doença por vírus, não se conhecia o agente causador da doença ocorrida na criação massal do bicho-da-seda, *Bombyx mori*. Somente em meados de 1800 é que por meio do advento do microscópio de luz puderam ser observados OBs (*occlusion bodies* – corpos de oclusão) virais responsáveis pela doença e somente na década de 1940, com o microscópio eletrônico maiores detalhes virais puderam ser identificados (Bergold, 1947). Basil M. Arif em 2011 publicou um artigo biográfico em homenagem ao Dr. Mauro E. Martignoni onde relatou a origem do nome baculovírus. No início da década de 60 este nome foi sugerido por Mauro a um membro do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on the Taxonomy of Viruses* - ICTV). “*Baculo*” tem origem do latim e faz referência à forma de bastão dos vírions.

Os baculovírus são vírus que infectam exclusivamente artrópodes das ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera, sendo o modo de transmissão dado por via oral. Eles produzem dois fenótipos virais durante o seu ciclo de replicação no hospedeiro; o primeiro, responsável pela infecção primária ou infecção oral nomeado de vírus derivado do corpo de oclusão (*occlusion derived virus* ou ODV) pode conter um (*granulovirus* - GV ou *single nucleopolyhedrovirus* - SNPV) ou mais (*multiple nucleopolyhedrovirus* - MNPV) nucleocapsídeos (NC) no seu interior e é envolvido por uma camada bilipídica oriunda da membrana nuclear interna do hospedeiro (Figura 1); o segundo fenótipo, responsável pela infecção secundária, célula-a-célula, nomeado de vírus brotado (*budded virus* ou BV) possui um NC no seu interior e é envolvido por uma camada bilipídica oriunda da membrana citoplasmática do hospedeiro (Figura 1) (Blissard e Rohrmann, 1990). Ambos os fenótipos apresentam a mesma composição gênica, sendo o genoma de dsDNA circular, superenovelado na faixa de 80-180 kbp com fases abertas de leitura (*open reading frames* - ORFs)

em ambas as fitas e em ambos os sentidos variando de 90-180 ORFs. No meio ambiente, os baculovírus encontram-se na forma de uma partícula viral oclusa em uma matriz proteica cristalina (OB) que possibilita ao vírus resistir às condições ambientais adversas, como radiação ultravioleta-UV e calor extremo (Figura 1) (Jackes *et al.* 1985; Wang *et al.* 1991; Rohrmann, 2011). A proteína mais abundante que forma os OBs dos NPVs (*nucleopolyhedrovirus*) e GVs (*granulovirus*) é a poliedrina (POLH), codificada pelo gene *polh*, e a granulina (GRAN), codificada pelo *gran*, respectivamente (Summers *et al.*, 1980).

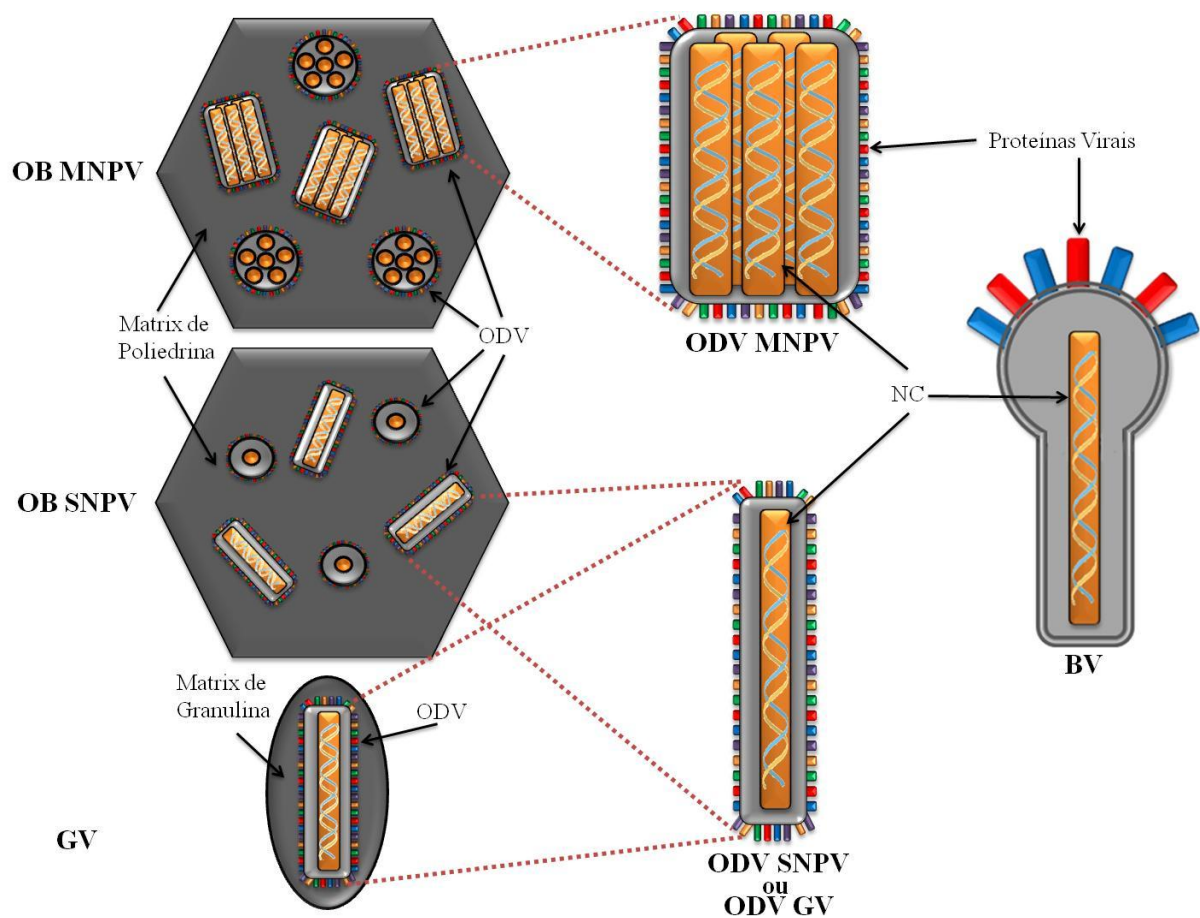


Figura 1. Fenótipos dos Baculovírus. Desenho ilustrativo de um corte longitudinal das partículas OB, ODV e BV. Os OBs podem ser do tipo MNPV, SNPV ou GV apresentando no seu interior vários ODVs MNPV, vários ODVs SNPV ou um ODV GV, respectivamente. Os OBs MNPV e SNPV são encontrados em *Alphabaculovirus* enquanto que os OBs GV são encontrados em *Betabaculovirus*. Os gêneros *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* possuem apenas representantes de OBs SNPV. As partículas BVs e ODVs são envolvidas por uma bicamada lipídica oriunda do hospedeiro contendo proteínas virais transmembrânicas. Os ODVs podem ter vários ou um NC no seu interior enquanto que os BVs apresentam apenas um NC.

Os baculovírus são considerados importantes agentes no controle biológico de pragas agrícolas e florestais, pois são considerados inofensivos aos seres humanos e plantas, assim como outros organismos não alvo (Payne, 1986; Groner, 1989). Diferentemente de inseticidas químicos eles apresentam uma gama estreita de hospedeiros, além de poucos relatos, até o momento, da ocorrência de resistência dos insetos a estes agentes. Tendo ocorrido até então relatos de resistência de baculovírus apenas em populações da traça da maçã (*Cydia pomonella*) infectada com CpGV (Fritsch *et al.*, 2005; Sauphanor *et al.*, 2006; Asser-Kaiser *et al.*, 2007). Os baculovírus também são utilizados como ferramentas biotecnológicas na expressão de proteínas heterólogas em larga escala (Kost *et al.*, 2005) e mais recentemente na terapia gênica (Kim *et al.*, 2007). Como já relatado os baculovírus são infectivos somente a insetos, porém entram nas células de mamíferos, mas não são capazes de se replicarem, deste modo não causam infecção (Beljelarskaya, 2011). Devido a esta capacidade os baculovírus podem ser utilizados como carreadores de genes exógenos para células de mamíferos. Este sistema de expressão pode transferir de maneira direcionada sequências grandes de DNA (100kb) a serem expressos em altos níveis tanto *in vivo* como *in vitro* (Kost e Condreay, 1999). Com o intuito da utilização do baculovírus na produção de proteínas heterólogas em larga escala, baculovírus recombinantes podem ser construídos com o gene de interesse sob a ativação de um promotor forte (promotor que possui alta afinidade pela RNA polimerase e assim, atinge altos níveis de transcrição), sendo assim utilizados como vetores de expressão de proteínas exógenas *in vivo* ou *in vitro* tanto em inseto como em mamífero.

2.1.2 Baculovírus como bioinseticida

Um dos primeiros relatos da utilização de baculovírus no controle de pragas se deu na Alemanha em 1892, onde um NPV foi inoculado em larvas de *Lymantria monacha* em floresta de pinheiros (Huber, 1986). O primeiro formulado de baculovírus, registrado em 1975, teve como alvo o controle biológico de pragas do gênero *Helicoverpa* e *Heliiothis* sendo assim, destinada a proteção de plantações como a de tomate, milho, pimenta e algodão (Ignoffo and Couch, 1981). O produto à base de *Heliiothis zea* NPV (HzSNPV), desenvolvido pela empresa norte americana *Internacional Minerals and Chemical Corporation* (IMC) e comercializado pela

empresa Sandoz Agro Inc. com o nome de Elcar™, foi descontinuado em 1982 devido a disponibilização de um novo inseticida químico mais lucrativo. Devido a resistência adquirida pela praga a inseticidas químicos que o substituíram, o mesmo vírus, agora com o nome de GemStar™ comercializado pela Biosys, voltou a ser comercializado em 1996 (Ravensberg, 2011).

Outra praga que ataca culturas de interesse comercial, maçã e pêra, e por isto torna-se alvo de controle biológico é a *Cydia pomonella*. Existem vários produtos a base de *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) e ao somar todas as áreas de aplicação de todos estes produtos, este vírus se torna o mais importante inseticida viral atualmente aplicado no que se refere a área tratada (Szewczyk *et al.*, 2011). Outros baculovírus já empregados no controle biológico estão listados na Tabela 1.

Na China, o primeiro baculovírus a ser comercialmente vendido foi o *Helicoverpa armigera* SNPV (HaSNPV) no ano de 1993 (Zhang *et al.*, 1995; Sun e Peng, 2007). Hoje a China é o país onde há o maior número de produtos virais registrados voltados para o controle biológico, 14 dos mais de 50 existentes (Szewczyk *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012). Hoje, ao menos 24 produtos são utilizados em campo na China sendo que alguns não possuem registro (Yang *et al.*, 2012).

Tabela 1. Principais baculovírus utilizados como bioinseticidas no mundo.

Gênero	Espécie	Praga	Cultura alvo
Alphabaculovirus	AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Soja
	BusuNPV	<i>Buzura suppressaria</i>	Chá, <i>Vernicia fordii</i>
	HzSNPV	<i>Helicoverpa zea</i>	Algodão, Legumes
	LdMNPV	<i>Lymantria dispar</i>	Silvicultura
	OpMNPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
	SeMNPV	<i>Spodoptera exigua</i>	Horticultura
Betabaculovirus	AdhoGV	<i>Adoxophyes honmai</i>	Chá
	AdorGV	<i>Adoxophyes orana</i>	Maçã
	CpGV	<i>Cydia pomonella</i>	Maçã, pêra
	HomaGV	<i>Hormona magnanima</i>	Chá
	PhopGV	<i>Phthorimea operculella</i>	Batata
Gammabaculovirus	NeabNPV	<i>Neodiprion abietis</i>	<i>Abies balsamea</i>
	NeleNPV	<i>Neodiprion lecontei</i>	Pinheiro
	NeseNPV	<i>Neodiprion sertifer</i>	Silvicultura

No Brasil, a praga que destrói plantações de mandioca, *Erinnyis ello*, na década de 80 foi controlada pelo uso do baculovírus *Erinnyis ello granulovirus* (EeGV) (Schmitt, 1985). No início da mesma década (1982/1983), o Brasil instituiu o que viria a ser o maior programa de controle biológico utilizando baculovírus como bioinseticida. Neste programa, o baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) foi pulverizado em plantações de soja localizadas no Sul do País visando o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) (Moscardi, 1999). O programa atingiu uma área de 2 milhões de ha/ano tratados com o baculovírus (2003/2004), o que representa aproximadamente 10% da área de plantação de soja no país, um alcance até hoje não superado por nenhum outro programa de controle por biopesticidas virais (Moscardi, 2007). Benefícios econômicos, ecológicos e sociais foram proporcionados por este programa de manejo de praga, como a interrupção do uso de mais de 17 milhões de litros de inseticidas químicos e economia de U\$ 11.000.000 que seriam destinados a compra de inseticidas químicos e sua aplicação (Szewczyk *et al.*, 2011). Uma característica do vírus AgMNPV, que contribuiu para o sucesso do programa, foi a ausência de dois de seus genes, o catepsina e o quitinase, detectada na análise do genoma completo desse vírus (Oliveira *et al.*, 2006). Sem esses genes virais, a coleta das lagartas era facilitada pela ausência de liquefação dos insetos e permanência de um tegumento larval intacto (Moscardi, 1999).

Uma desvantagem dos baculovírus como agentes de controle é a maior atenção requerida para sua utilização principalmente com relação ao momento de aplicação do produto, dosagem viral recomendada, instar e densidade de larvas no campo (Moscardi, 1999), requisitos estes, muitas das vezes, não observados pelos agricultores. No caso do programa de controle biológico com o vírus AgMNPV, devido à demora que os agricultores observavam na ação do agente de controle e receosos quanto a sua eficácia, muitos deles aplicaram também outros agentes de controle, fato que contribuiu para o extermínio da praga. Isso provocou um desequilíbrio ecológico que culminou no declínio da população de *A. gemmatalis* e aumento de pragas antes classificadas como secundárias no complexo da soja (Szewczyk *et al.*, 2009; Bueno *et al.*, 2007). Este fato aliado à falta de conhecimento

por parte dos agricultores, com relação à utilização adequada do produto formulado, contribuíram para a regressão do Programa.

Como vantagem, ao contrário dos inseticidas químicos que são formulações de amplo espectro de ação, os bioinseticidas a base de baculovírus são específicos aos invertebrados das ordens de insetos Hymenoptera, Lepidoptera e Diptera, sendo assim, seguros aos que o manipulam e a outros organismos não alvo (Payne, 1986; Gröner, 1989). Uma vantagem econômica deste bioinseticida com relação ao inseticida químico é que a multiplicação massal do vírus em campo, em substituição a multiplicação viral em laboratório, reduz os custos para obtenção do bioinseticida (Moscardi, 1999).

2.1.3 Classificação taxonômica

Os baculovírus são classificados taxonomicamente na família *Baculoviridae* a qual se subdivide em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* (Herniou *et al.*, 2012).

Alphabaculovirus - O gênero *Alphabaculovirus*, subdividido em Grupo I e Grupo II, apresenta o maior número de espécies já identificadas, 456 das 661 (Rohrmann, 2011) sendo 19 para o grupo I e 32 para o grupo II com o genoma completo sequenciado (NCBI). Caracteriza-se por ter como hospedeiros insetos da ordem Lepidoptera, possuir OBs na forma poliédrica com um (SNPV) ou vários (MNPV) NCs por vírion, sendo vários vírions por OB.

Betabaculovirus - O gênero *Betabaculovirus*, assim como os *Alphabaculovirus*, caracteriza-se por ter como hospedeiros insetos da ordem Lepidoptera, porém, apresentam os mais morfológicamente distintos representantes da família, OBs em formato granular e apenas um ou dois NCs por vírion, sendo um único vírion por OB (GV). Até o momento, são 148 espécies já identificadas (Rohrmann, 2011) e 15 destas apresentam o genoma completo sequenciado (NCBI).

Gammabaculovirus - O gênero *Gammabaculovirus* caracteriza-se por ter como hospedeiros insetos da ordem Hymenoptera, ter a infecção limitada ao intestino, possuir OBs na forma poliédrica e apenas um NC por vírion (SNPV), sendo vários vírions por OB. Até o momento, o gênero comporta espécies com o genoma de menor tamanho (81 – 86 kpb), 30 espécies foram identificadas (Rohrmann, 2011)

sendo 3 espécies com o genoma completo sequenciado (Duffy *et al.*, 2006; Lauzon *et al.*, 2004; Garcia-Maruniak *et al.*, 2004).

Deltabaculovirus - O gênero *Deltabaculovirus* caracteriza-se por ter como hospedeiros insetos da ordem Diptera e possuir OBs na forma poliédrica e apenas um NC por vírion (SNPV), sendo vários vírions por OB. Estes são pouco conhecidos apresentando, até o momento, 27 espécies identificadas (Rohrmann, 2011) e apenas 1 representante com o genoma completo sequenciado (Afonso *et al.*, 2001).

As espécies e isolados de baculovírus com genoma completo sequenciado, tamanho dos genomas (80-180 Kbp) e a presença ou ausência dos genes virais cathepsina (*v-cath*), chitinase (*chiA*) e metalloproteinase (*metallo*) estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição de genes responsáveis pela liquefação larval nos genomas sequenciados de espécies e isolados de baculovírus.

ID	Gênero	Espécie	Acrônimo	Acesso GenBank	Tamanho (pb)	<i>v-cath</i>	<i>chiA</i>	<i>metallo</i>
1		<i>Autographa californica nucleopolyhedrovirus clone C6</i>	AcMNPV-C6	L22858	133894	✓	✓	✗
2		<i>Bombyx mandarina nucleopolyhedrovirus S1</i>	BomaNPV-S1	FJ882854	126770	✓	✓	✗
3		<i>Bombyx mandarina nucleopolyhedrovirus S2</i>	BomaNPV-S2	JQ071499	129646	✓	✓	✗
4		<i>Bombyx mori NPV strain cubic</i>	BmNPV-cubic	JQ991009	127465	✓	✓	✗
5	Alphabaculovirus	<i>Bombyx mori NPV strain India</i>	BmNPV-india	JQ991010	126879	✓	✓	✗
6	Grupo I Clado A	<i>Bombyx mori NPV isolate T3</i>	BmNPV-T3	NPHT3COMP	128413	✓	✓	✗
7		<i>Maruca vitrata MNPV</i>	MaviMNPV	EF125867	111953	✓	✓	✗
8		<i>Plutella xylostella multiple nucleopolyhedrovirus</i>	PkxyMNPV	DQ457003	134417	✓	✓	✗
9		<i>Rachiplusia ou MNPV</i>	RoMNPV	AY145471	131526	✓	✓	✗
10		<i>Thysanoplusia orichalcea NPV isolate p2</i>	ToNPV-p2	JX467702	132978	✓	✓	✗
11		<i>Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus Z</i>	AnpeNPV-Z	NC_008035	126629	✓	✓	✗
12		<i>Antheraea pernyi nucleopolyhedrovirus L2</i>	AnpeNPV-L2	EF207986	126246	✓	✓	✗
13		<i>Anticarsia gemmatalis nucleopolyhedrovirus clone 2D</i>	AgMNPV-2D	DQ813662	132239	✗	✗	✗
14	Alphabaculovirus	<i>Choristoneura fumiferana DEF MNPV</i>	CfDEFMNPV	AY327402	131160	✓	✓	✗
15	Grupo I Clado B	<i>Choristoneura fumiferana MNPV</i>	CfMNPV	AF512031	129593	✓	✓	✗
16		<i>Epiphyas postvittana NPV</i>	EppoNPV	AY043265	118584	✓	✓	✗
17		<i>Hyphantria cunea nucleopolyhedrovirus</i>	HycuNPV	AP009046	132959	✓	✓	✗
18		<i>Orgyia pseudotsugata MNPV</i>	OpMNPV	OPU75930	131995	✓	✓	✗
19		<i>Philosamia cynthia ricini nucleopolyhedrovirus virus GX-1</i>	PerNPV-GX1	JX404026	125376	✗	✗	✗
20		<i>Adoxophyes honmai NPV</i>	AdhoNPV-ADN001	AP006270	113220	✓	✗	✗
21		<i>Adoxophyes orana nucleopolyhedrovirus E1</i>	AdorNPV-E1	EU591746	111724	✓	✗	✗
22		<i>Agrotis ipsilon multiple nucleopolyhedrovirus</i>	AgipMNPV	EU839994	155122	✓	✓	✗
23		<i>Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus</i>	AgseNPV	DQ123841	147544	✓	✓	✗
24		<i>Apocheima cinerarium nucleopolyhedrovirus</i>	ApciNPV	FJ914221	123876	✓	✗	✗
25		<i>Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus</i>	ChchNPV	AY864330	149622	✓	✓	✗
26	Alphabaculovirus	<i>Clanis bilineata nucleopolyhedrovirus virus</i>	ClibiNPV	DQ504428	135454	✓	✓	✗
27	Grupo II	<i>Ectropis obliqua NPV</i>	EcobNPV	DQ837165	131204	✓	✓	✗
28		<i>Euproctis pseudoconspersa nucleopolyhedrovirus</i>	EupsMNPV	FJ227128	141291	✓	✓	✗
29		<i>Helicoverpa armigera multiple nucleopolyhedrovirus</i>	HearMNPV	EU730893	154196	✓	✓	✗
30		<i>Helicoverpa armigera NPV isolate C1</i>	HearMNPV-C1	AF303045	130759	✓	✓	✗
31		<i>Helicoverpa armigera NPV NNg1</i>	HearMNPV-NNg1	AP010907	132425	✓	✓	✗
32		<i>Helicoverpa armigera NPV strain Australia</i>	HearMNPV-aus	JN584482	130992	✓	✓	✗
33		<i>Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus isolate G4</i>	HearMNPV-G4	AF271059	131405	✓	✓	✗

Cont. Tabela 2

ID	Gênero	Espécie	Acrônimo	Acesso GenBank	Tamanho (pb)	v-cath	ef1a	metallo
34		<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	HezeSNPV	AF334030	130869	✓	✓	✗
35		<i>Leucania separata</i> nuclear polyhedrosis virus	LeseNPV	AY394490	168041	✓	✓	✗
36		<i>Lymantria dispar</i> MNPV	LdMNPV	AF081810	161046	✓	✓	✗
37		<i>Lymantria xyliana</i> MNPV	LyxyMNPV	GQ202541	156344	✓	✓	✗
38		<i>Mamestra brassicae</i> MNPV strain K1	MabaMNPV-K1	JQ798165	152710	✓	✓	✗
39		<i>Mamestra brassicae</i> MNPV strain CHb1	MabaMNPV-CHb1	JX138237	154432	✓	✓	✗
40		<i>Mamestra configurata</i> NPV-A strain 90/4	MacoNPV-90/4	AF539999	153656	✓	✓	✗
41		<i>Mamestra configurata</i> NPV-A strain 90/2	MacoNPV-90/2	MBU59461	155060	✓	✓	✗
42	<i>Alphabaculovirus</i>	<i>Mamestra configurata</i> NPV-B	MacoNPV-B	AY126275	158482	✓	✓	✗
43	Grupo II	<i>Orgyia leucostigma</i> NPV	OrleNPV	EU309041	156179	✓	✓	✗
44		<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	SeMNPV	AF169823	135611	✓	✓	✗
45		<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV isolate 3AP2	SfMNPV-3AP2	EF035042	131331	✓	✓	✗
46		<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV isolate 19	SfMNPV-19	EU258200	132565	✓	✓	✗
47		<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV isolate Nicaraguan	SfMNPV-Nic	HM595733	132954	✓	✓	✗
48		<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV genotype SfMNPV-G defective	SfMNPV-G	JF899325	128034	✓	✓	✗
49		<i>Spodoptera litura</i> NPV strain G2	SpliNPV-G2	AF325155	139342	✓	✓	✗
50		<i>Spodoptera litura</i> nucleopolyhedrovirus II	SpliNPV-II	EU780426	148634	✓	✓	✗
51		<i>Trichoplusia ni</i> SNPV	TnSNPV	DQ017380	134394	✓	✓	✗
52		<i>Adoxophyes orana</i> granulovirus	AdorGV	AF547984	99657	✗	✗	✗
53		<i>Agrotis segetum</i> granulovirus	AgseGV	AY522332	131680	✓	✓	✗
54		<i>Choristoneura occidentalis</i> granulovirus	ChocGV	DQ333351	104710	✗	✗	✓
55		<i>Closteria anachoreta</i> granulovirus	ClanGV	HQ116624	101487	✓	✓	✓
56		<i>Cryptophlebia leucotreta</i> granulovirus	CrleGV	AY229987	110907	✓	!	✓
57		<i>Cydia pomonella</i> granulovirus	CpGV	U53466	123500	✓	✓	✓
58		<i>Epinotia aporema</i> granulovirus	EpapGV	JN408834	119082	✓	✓	✓
59	<i>Betabaculovirus</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> granulovirus	HearGV	EU255577	169794	✗	✓	✓
60		<i>Phthorimaea operculella</i> granulovirus	PhopGV	AF499596	119217	✗	✗	✓
61		<i>Pieris rapae</i> granulovirus isolate wuhan	PiraGV-wuhan	GQ884143	108592	✓	✓	✓
62		<i>Pieris rapae</i> granulovirus strain E3	PiraGV-E3	GU111736	108476	✓	✓	✗
63		<i>Plutella xylostella</i> granulovirus	PkxyGV	AF270937	100999	✗	✗	✗
64		<i>Pseudaletia unipuncta</i> granulovirus	PsunGV	EU678671	176677	✓	✓	✓
65		<i>Spodoptera litura</i> granulovirus	SpliGV	DQ288858	124121	✗	✗	✗
66		<i>Xestia c-nigrum</i> granulovirus	XnGV	AF162221	178733	✓	✓	✓
67		<i>Neodiprion abietis</i> NPV	NeabNPV	DQ317692	84264	✗	✗	✗
68	<i>Gammabaculovirus</i>	<i>Neodiprion lecontei</i> NPV	NeleNPV	AY349019	81755	✗	✗	✗
69		<i>Neodiprion sertifer</i> NPV	NeseNPV	AY430810	86462	✗	✗	✗
70	<i>Deltabaculovirus</i>	<i>Culex nigripalpus</i> NPV	CumiNPV	AF403738	108252	✗	✗	✗

✓ Gene presente ! Gene truncado ✗ Gene ausente

2.1.4 Ciclo de vida e fases da expressão gênica

O ciclo de infecção dos baculovírus é subdividido em três fases temporais: fase inicial (*early*), fase tardia (*late*) e fase muito tardia (*very late*). Em cada uma destas fases há a expressão de genes característicos devido à existência de promotores específicos para cada fase, sendo assim, os genes virais são transcritos em cascata iniciando pela expressão dos genes iniciais (*early*), seguindo pela expressão dos genes tardios (*late*) e culminando na expressão dos genes muito tardios (*very late*) no final do ciclo infeccioso.

- Fase Inicial (*early*): O ciclo de infecção dos baculovírus (Figura 2) tem início quando a lagarta suscetível ingere alimentos contaminados com as partículas OBs. Para o início do processo infeccioso, é necessário que haja a liberação dos ODVs pela solubilização da proteína (granulina ou poliedina) que envolve os vírions. Isso ocorre no lúmen do intestino médio da lagarta devido ao pH alcalino e a ação de proteases presentes no meio. As partículas liberadas atravessam a membrana peritrófica do inseto e, por fusão de membranas, penetram nas células epiteliais colunares do intestino médio para então usufruir da maquinaria celular dando início à infecção (Granados e Lawler, 1981; Haas-Stapleton *et al.*, 2004; Ohkawa *et al.*, 2005; Volkman, 2007). Os ODVs promovem a infecção primária ou infecção oral devido à existência de proteínas de membrana chamadas fatores de infectividade oral (*per os infectivity factors* – PIF), estes são responsáveis pelo reconhecimento espécie-específica do vírus ao seu hospedeiro (Ohkawa *et al.*, 2005). Até o momento são conhecidas sete proteínas PIFs, são elas: PIF-0, PIF-1, PIF-2, PIF-3, PIF-4, PIF-5 e PIF-6 (Kuzio *et al.*, 1989; Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2009; Ohkawa *et al.*, 2005; Sparks *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2012). Após fusão, os ODVs liberam no interior celular os NCs (Haas-Stapleton *et al.*, 2004). Estes por sua vez, são transportados para o núcleo por meio de filamentos de actina (Ohkawa *et al.*, 2010) onde iniciam a transcrição dos genes virais iniciais (*early*), tais como a RNA polimerase viral e fatores transcricionais necessários para a ativação da transcrição de genes tardios.

- Fase tardia (*late*): Tem início com a expressão de genes tardios que são responsáveis pela replicação do genoma viral e montagem da partícula viral BV, tais como as proteínas GP64 e/ou proteína F. Os NCs brotam da membrana levando com eles proteínas virais de fusão (GP64 e/ou F) formando o vírus no seu fenótipo BV. Os BVs liberados de células infectadas entram por endocitose nas células vizinhas e, após fusão destes endossomos com lisossomos celulares ácidos, a membrana do BV funde-se à membrana do endossomo, via proteínas de fusão virais, liberando os NCs no citosol celular (Blissard, 1996; Washburn *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2007). O material genético viral de dsDNA segue para o núcleo celular onde irá dominar a maquinaria de replicação, transcrição e tradução da célula hospedeira desligando as funções celulares normais. Os BVs liberados pelas

inúmeras células intestinais infectadas ganham acesso à hemolinfa do inseto e infectam os demais órgãos como túbulos de malpighi e tecido adiposo se disseminando por toda a lagarta.

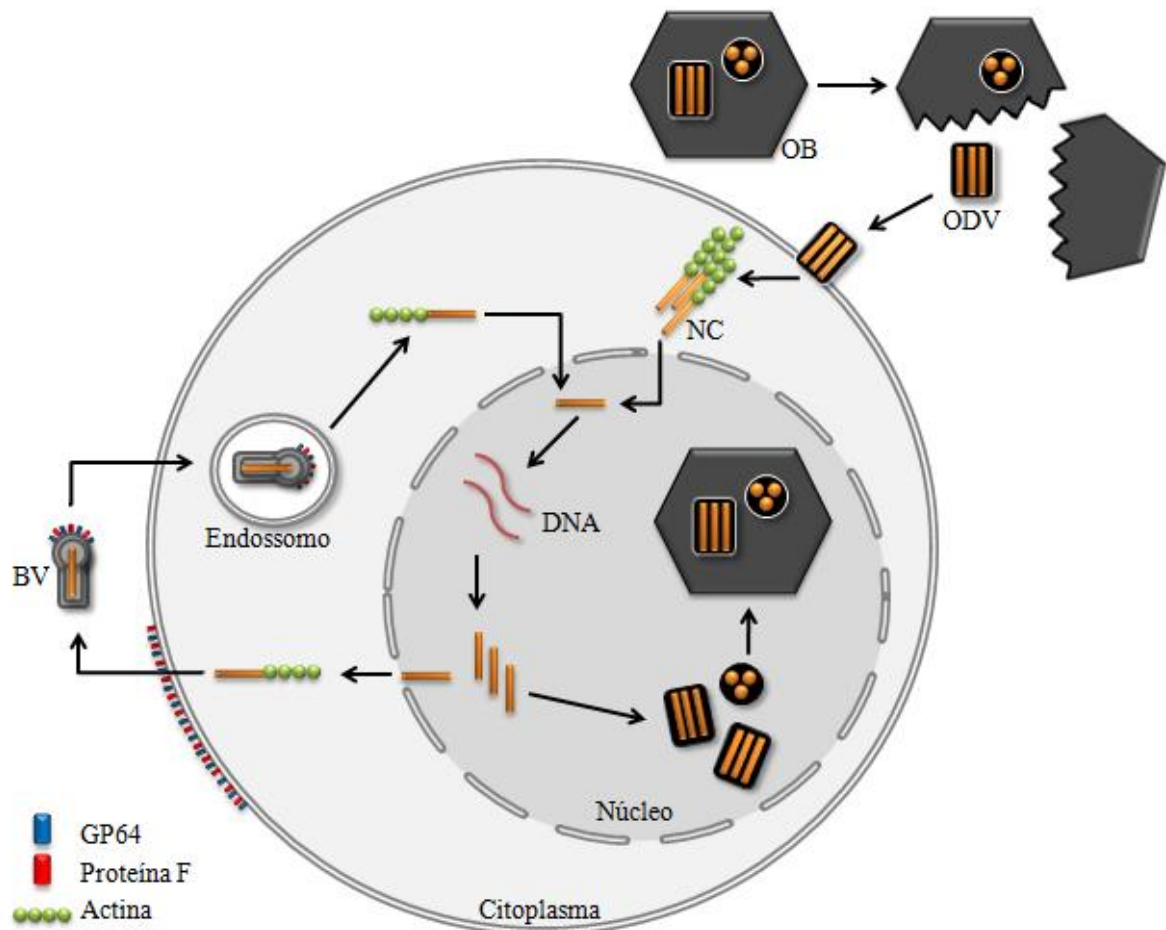


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de infecção dos Baculovírus. Os OBs ingeridos juntamente com os alimentos liberam seus ODVs no lúmen do intestino médio da lagarta que se fundem à membrana das células epiteliais liberando intracelularmente os NC. Estes são transportados para o núcleo onde iniciam a formação de novos NC que são transportados para o meio extracelular formando assim os BVs. Por endocitose os BVs entram nas células vizinhas liberando os NC e promovendo a infecção sistêmica. No estágio avançado da infecção, os NC são envelopados formando os ODVs que são envolvidos por uma matriz proteica formando os OBs. As células infectadas hipertrofiam, apresentando um núcleo inchado repleto de OBs.

- Fase muito tardia (*very late*): Os genes com promotores muito tardios, responsáveis pela montagem do fenótipo OB, começam a ser expressos. Em destaque a proteína poliedrina ou granulina, proteína estrutural responsável pela formação da matriz proteica da partícula ocluída, e a proteína P10, possivelmente responsável pela montagem do OB e envolvida na lise nuclear (Russell *et al.*, 1991;

Van Oers e Vlak, 1997; Carpentier, *et al.*, 2008; Carpentier e King, 2009). As células infectadas hipertrofiam, apresentando um núcleo inchado repleto de OBs que são liberados no ambiente após a morte e liquefação da lagarta. As partículas liberadas das larvas mortas servirão de inóculo para a infecção de novas lagartas e assim reinício do ciclo de infecção.

2.2 Transmissão Horizontal do Vírus

No período final da infecção viral, fase esta de máxima produção dos OBs, ocorre à morte da larva e liberação das partículas virais para o meio ambiente (Slack *et al.*, 1995). A liberação dos OBs do cadáver larval ocorre devido à lise celular e à liquefação do tegumento da lagarta. Esta liquefação, devido à ação de duas proteínas codificadas pelo genoma viral, catepsina e quitinase, favorece a transmissão horizontal do vírus.

A maioria das espécies do gênero *Alphabaculovirus*, que possuem o genoma completo sequenciado, apresenta em seu genoma o *v-cath* (49 de 51 espécies), gene codificador da proteína catepsina, e o *chiA* (47 de 51 espécies e 1 truncada), gene codificador da proteína quitinase. No gênero *Betabaculovirus*, 60% (9 de 15 espécies) das espécies com genoma completo sequenciado possuem ambos os genes, porém em uma das espécies somente o gene *v-cath* é funcional. Uma espécie possui somente o gene *chiA*, sendo o *v-cath* ausente. Os *Betabaculovirus* possuem, além destes dois genes, o gene *metalloproteínase* que desempenha função semelhante, participando assim da liquefação da lagarta. Deste gênero, 66.66% (10 de 15 espécies) das espécies possuem o gene *metalloproteínase* em seu genoma. A infecção promovida pelos vírus dos gêneros *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus* é restrita ao trato gastrointestinal e não ocasiona liquefação da lagarta, pois estes genes não estão presentes em seus genomas (Afonso *et al.*, 2001; Duffy *et al.*, 2006; Lauzon *et al.*, 2004; Garcia-Maruniak *et al.*, 2004). Uma relação das espécies que possuem os genes *v-cath*, *chiA* e *metalloproteínase* é apresentada na Tabela 2.

As enzimas virais V-CATH e CHIA, responsáveis pela liquefação e melanização do tegumento da lagarta após sua morte em decorrência de infecção por baculovírus, participam do processo de degradação proteica e da quitina, respectivamente. Esta

ação permite a dispersão das partículas virais oclusas facilitando a transmissão horizontal do vírus. As espécies de baculovírus onde ambos os genes, catepsina e quitinase, estão ausentes não provocam a melanização nem a liquefação da lagarta (Hawtin *et al.*, 1997). Quando apenas o gene *chiA* não é funcional ocorre uma falha na atividade da glicoproteína V-CATH, devido a formação de agregados insolúveis de catepsina no retículo endoplasmático (RE), sugerindo assim uma possível função de chaperona para a quitinase (Hom e Volkman, 2000). Quando apenas o gene *v-cath* está ausente, a melanização e liquefação não ocorrem (Slack *et al.*, 1995). Deste modo, ambas as proteínas são interdependentes, ou seja, precisam uma da outra para desempenhar suas atividades (Ohkawa *et al.*, 1994; Slack *et al.*, 1995; Hawtin *et al.*, 1997; Hom e Volkman, 2000; Daimon *et al.*, 2007).

Devido à alta identidade entre os genes *v-cath* e *chiA* nas diferentes espécies de baculovírus do gênero *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus* e sua presença na maioria deles, pode-se afirmar que estes formam entre si um grupo monofilético, onde ambos os genes foram adquiridos antes da especiação dos baculovírus (Kang *et al.*, 1998). Estes genes foram transmitidos aos baculovírus por via horizontal, ou seja, os obtiveram dos seus hospedeiros ou bactérias (Herniou *et al.*, 2003).

A organização genômica de ambos os genes, *v-cath* e *chiA*, é altamente conservada nos baculovírus do gênero *Alphabaculovirus* Grupo I. Estes genes estão localizados *in tandem* no genoma, porém em sentidos opostos. À jusante do gene quitinase localiza-se o gene *lef-7*, enquanto que à jusante do gene catepsina encontra-se o gene *gp64* (Figura 3). Alguns *Alphabaculovirus* do Grupo I possuem entre os genes *lef-7* e *chiA* um sequência diferente destas, como um gene codificador de uma proteína hipotética ou uma região repetitiva. Os *Alphabaculovirus* do Grupo II não apresentam uma organização conservada destes genes.

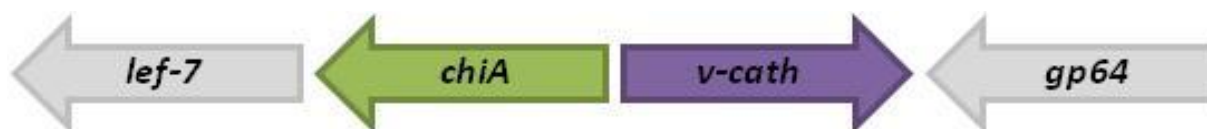


Figura 3. Representação da organização do locus *v-cath/chiA* em *Alphabaculovirus* Grupo I. As setas indicam a direção da transcrição de cada CDS (Sequência codificadora) tomando como base o gene da poliedrina sendo transcrito no sentido anti-horário.

2.2.1 Catepsina (*v-cath*)

O gene *v-cath*, identidade de sequência similar a catepsina celular L e/ou H e especificidade de substrato similar a catepsina celular B, é expresso tardiamente no período da infecção (gene *late*) e codifica para uma cisteína protease (Ohkawa *et al.*, 1994; Bromme e Okamoto, 1995; Slack *et al.*, 1995) que é expressa na sua forma inativa como uma pre-proenzima (pre-proV-CATH) (Hodgson *et al.*, 2009). Devido a um motivo de 22 aminoácidos localizados terminalmente na cadeia da pre-proV-CATH esta é direcionada para o RE (Hodgson *et al.*, 2011). No RE esta sofre processamento proteolítico na região N-terminal, tornando-se uma proenzima inativa (proV-CATH), e posterior modificações pós-traducionais (Hodgson *et al.*, 2009). Sua permanência no RE até a morte celular se deve ao fato desta proteína interagir com a proteína CHIA impossibilitando sua saída (Hodgson *et al.*, 2011). Em consequência da morte celular, aproximadamente 80h p.i (horas pós-infecção), os lisossomos celulares são rompidos e as proteases liberadas, estas proteases possivelmente seriam responsáveis por promover a clivagem da proV-CATH em V-CATH e sua consequente ativação (Hom *et al.*, 2002). Em um estudo mais recente foi demonstrado que um bacmídeo recombinante, construído com o gene *chiA* deletado, foi capaz de produzir uma proV-CATH solúvel, prematuramente secretada das células e processada para a sua forma ativa madura V-CATH (Hodgson *et al.*, 2013).

2.2.2 Quitinase (*chiA*)

O gene *chiA* é expresso tardiamente no período da infecção (gene *late*) e codifica para uma glicohidrolase que degrada quitina (Hawtin *et al.*, 1997) que é um polissacarídeo composto de subunidades de N-acetilglicosamina (GlcNAc) encontrado no exoesqueleto de artrópodes. O produto gênico é armazenado no RE das células infectadas devido à existência de um motivo KDEL C-terminal de retenção ao RE (Thomas *et al.*, 1998; Saville *et al.*, 2002). A quitinase, ancorada ao RE, pode auxiliar o tráfego da pro-V-CATH para o RE e por meio de glicosilação evitar sua atividade prematura, antes da máxima produção de OBs (Thomas *et al.*, 1998; Saville *et al.*, 2002). Após a morte celular ocorre a liberação da proteína ativa do RE (Hom *et al.*, 2002). Uma representação esquemática do modo de ação das proteínas V-CATH e CHIA é mostrada na Figura 4.

Esta enzima pode apresentar três distintos modos de ação:

1. Endoquitinase – cliva aleatoriamente seu substrato no interior da cadeia de quitina (McCreath e Gooday, 1992).
2. Exoquitinase – cliva seu substrato progressivamente em duas subunidades da extremidade da cadeia de quitina, podendo ser a extremidade redutora ou a não-redutora (Brurberg *et al.*, 2001).
3. N-acetilglicosaminidase – cliva seu substrato progressivamente em uma subunidade da extremidade da cadeia de quitina, podendo ser a extremidade redutora ou a não-redutora (Williams *et al.*, 2002).

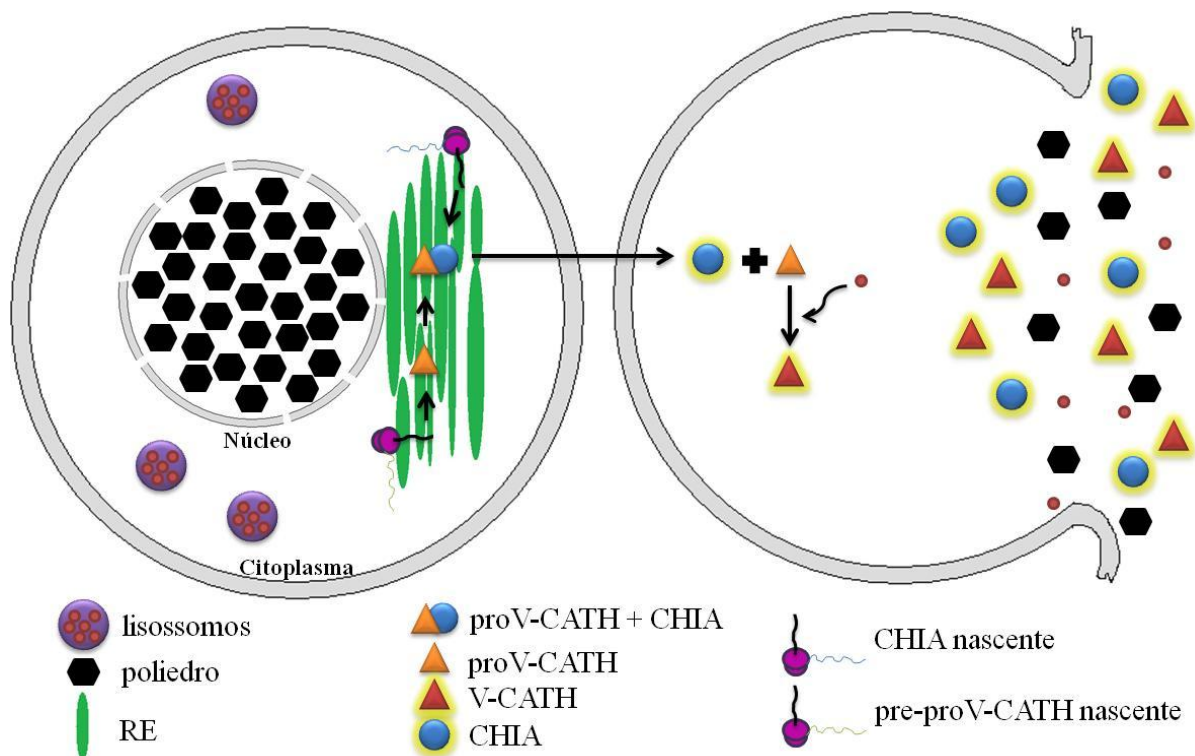


Figura 4. Modo de ação das proteínas V-CATH e CHIA. A pre-proV-CATH e CHIA são traduzidas no RE. No interior do RE a catepsina é processada em proV-CATH e conjugada a CHIA que a mantém retida até a morte celular. Após a morte celular ocorre à liberação das partículas OBs e os lisossomos celulares liberam proteases que ativam a CATH.

2.2.3 Outros genes

Outros genes virais foram testados quanto a sua participação na degradação tegumentar pós-morte. Mutantes do gene *fp25k* de *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) foram analisados *in vivo* e observou-se a ausência

da liquefação da lagarta (Katsuma *et al.*, 1999). Estudos posteriores *in vivo* e *in vitro* mostraram que a mutação no gene *fp25k* levou a uma redução da liberação da proteína catepsina para o meio extracelular levando assim a ausência de liquefação do tegumento larval (Katsuma *et al.*, 2004). Outro gene, o *p10*, quando deletado do genoma de AcMNPV atrasou em 24h o aparecimento da atividade da proteína quitinase no meio extracelular em testes realizados *in vitro*. Quando este foi testado *in vivo* em lagartas *T. ni* o mesmo atraso foi observado (Thomas *et al.*, 1998). Testes *in vivo* realizados em lagartas *T. ni* e *S. frugiperda* com o vírus AcMNPV apresentando o gene *p35* deletado também não resultaram na liquefação da lagarta (Clem, 2001). Ao contrário, o evento de liquefação foi observado quando larvas *T. ni* foram inoculadas com o AgMNPV-2D, vírus que apresenta ambos os genes ausentes em seu genoma (Slack *et al.*, 2004). Ainda não se conhece o real motivo que permitiu a liquefação da lagarta infectada com AgMNPV-2D, porém fatores ambientais ou específicos do hospedeiro podem contribuir para a liquefação do inseto (Slack *et al.*, 2004).

Na natureza há relatos de baculovírus apresentando alterações genéticas que resultam em um fenótipo de liquefação ausente. Como exemplo o isolado de Cascavel-PR, 6NR de *Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus* (SfNPV 6NR), apresentou o gene da quitinase truncado e conseqüente ausência de liquefação (Acesso GQ330502.1) (Vieira *et al.*, 2012, Valicente *et al.*, 2008). O sequenciamento do genoma completo do baculovírus AgMNPV-2D, isolado também do Sul do Brasil (Oliveira *et al.*, 2006), evidenciou a ausência de ambos os genes, *v-cath* e *chiA*, em seu genoma o que provocou o fenótipo de lagartas *A. gemmatalis* infectadas intactas pós-morte. O baculovírus ApciNPV apresentou uma mutação no gene quitinase que o tornou não funcional e os baculovírus AdhoNPV e AdorNPV não possuem este mesmo gene em seu genoma (Zhang *et al.*, não publicado, Nakai *et al.*, 2003, Hilton e Winstanley, 2008).

2.3 Baculovirus mutantes gerados *in vitro*

Mutações na sequência de DNA podem ocorrer por diversas maneiras, tais como, substituição, inserção, deleção de único ou poucos nucleotídeos ou por recombinação ou duplicação de uma sequência nucleotídica. Mutações pontuais são definidas como alterações de um único nucleotídeo na sequência de DNA e quando

o mutante é comparado com o selvagem este tipo de mutação é denominada de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfismo de nucleotídeo único). Os polimorfismos podem ser classificados em dois tipos, são eles SNP por transição e por transversão. O SNP por transição é caracterizado pela substituição de uma purina por outra purina ($A \leftrightarrow G$) ou de uma pirimidina por outra pirimidina ($C \leftrightarrow T$), sendo este tipo de polimorfismo mais comum do que os do tipo transversão, aonde ocorre à troca de uma purina por uma pirimidina ou vice e versa ($C/T \leftrightarrow A/G$). Estas substituições podem ou não alterar o aminoácido codificado, quando há mudança no aminoácido esta é chamada de mutação não silenciosa ou não sinônima e quando o aminoácido não é alterado é denominada silenciosa ou sinônima. Mutações por inserção ou deleção são denominadas *indels* e, assim como as mutações de um único nucleotídeo, surgem devido a erros cometidos pela DNA polimerase ou pela enzima de reparo.

A maior dificuldade hoje para a utilização do baculovírus como bioinseticida é a sua produção em larga escala, feita atualmente por meio da multiplicação viral *in vivo* em laboratório. Para isto, há demanda de mão de obra qualificada, necessidade da criação massal da lagarta hospedeira e desenvolvimento de dieta específica, sendo esta uma alternativa barata, porém laboriosa segundo Gard (1997). Uma alternativa é a realização da multiplicação viral *in vitro* em biorreatores que se torna mais barata do que a multiplicação *in vivo*, quando em larga escala (Rhodes, 1996; Tramper e Vlak, 1986; Claus *et al.*, 2012). Porém, devido à geração de baculovírus mutantes em decorrência da sua passagem seriada em cultura de células, a multiplicação em biorreatores ainda não é uma solução viável (Kool *et al.*, 1991; Claus *et al.*, 2012). Geralmente estes mutantes estão relacionados a um aumento do *fitness* viral *in vitro* à custa de uma redução ou perda da infectividade *in vivo*, isto devido a uma mutação que afeta a formação das partículas OBs (Bull *et al.*, 2003; Lua *et al.*, 2002).

Os vírions são ocluídos em uma matriz proteica cristalina o que permite sua viabilidade extrahospedeiro mesmo após longos períodos expostos a condições ambientais adversas, como radiação UV, calor e seca (Jackes *et al.* 1985; Wang *et al.* 1991; Rohrmann, 2011). Muitos vírus de insetos são ocluídos, porém apenas as famílias de vírus de invertebrados *Baculoviridae* e *Reoviridae* apresentam forma

poliédrica regular. A poliedrina destas famílias não apresenta similaridade de sequência, mas sim similaridade de forma (Anduleit *et al.*, 2005). A oclusão cristalina de origem proteica protege os poliedros e grânulos (OBs) da degradação e inativação no meio ambiente preservando sua virulência, mesmo quando em momentos de diapausa dos insetos, não sendo este um fenótipo necessário em infecções *in vitro*.

Dentre os vários tipos de mutantes que podem vir a ocorrer, dois são frequentemente associados à passagem seriada do baculovírus em cultura de células, o mutante de poucos poliedros (*few polyhedra* - FP) e a partícula interferente defectiva (*defective interfering particle* - DIP). O FP apresenta como característica a diminuição no número de OBs formados, a formação de oclusões sem vírions ou com morfologia alterada, o aumento do número de BVs, a má formação no envelopamento dos ODVs e a presença do gene *fp25k* mutado (Harrison e Summers, 1995). A proteína FP25K é responsável, entre outras funções, pela ativação da síntese e localização nuclear da proteína poliedrina e pela produção de ODVs e BVs. Quando o gene *fp25k* encontra-se deletado ou mutado, as funções da proteína FP25K ficam alteradas (Beames e Summers, 1989). O momento do aparecimento do FP em ensaio *in vitro* varia conforme o vírus e hospedeiro estudado, em LdMNPV e AgMNPV-2D, por exemplo, o aparecimento se deu na segunda e sexta passagens, respectivamente (Rezende *et al.*, 2009; Slavicek *et al.*, 1995). Estes eventos são associados a inserções no DNA viral de parte do genoma do hospedeiro, perda de parte do genoma viral ou pequenas mutações pontuais. Foram relatados mutantes FP em AcMNPV, GmMNPV, AgMNPV, HearSNPV, LdMNPV, BmNPV, TnMNPV, SfMNPV (Fraser *et al.*, 1983; Rezende *et al.*, 2009; Lua *et al.*, 2002; Slavicek *et al.*, 1995; Katsuma *et al.*, 1999; Potter, *et al.* 1976; Pedrini *et al.*, 2004). Em AcMNPV e GmMNPV o evento responsável pela formação do FP ocorreu na terceira passagem do vírus em células *T. ni* e foi uma inserção de uma sequência de DNA repetitiva oriunda do hospedeiro detectada na faixa de 0.8–2.8 kpb na região específica do genoma, gene *fp25k*, promovendo a ausência da proteína FP25K (Fraser *et al.*, 1983). Mutagênese mediada por transposição foi detectada em mutantes FP de AcMNPV e GmMNPV onde um transposon do hospedeiro, linhagem celular de *T. ni*, se integra no gene

fp25k promovendo a duplicação do sítio alvo TTAA (Cary *et al.*1989; Fraser *et al.* 1985). Segundo Bischoff e Slavicek (1997) o maior número destes sítios alvos no *fp25k* de AcMNPV e GmMNPV, 18, em comparação a mutantes FP de LdMNPV, 7, pode justificar a alta incidência de inserções do hospedeiro em AcMNPV e GmMNPV e não em LdMNPV. Alternativamente, estes mesmos autores sugerem que talvez o maior índice de transposição observado em mutantes AcMNPV e GmMNPV pode ser uma característica intrínseca ao vírus ou inerente a linhagem celular, sendo necessário mais estudos para maiores elucidações. Ensaio realizado com AcMNPV, onde o sítio alvo de transposição no gene *fp25k* foi removido, mostrou que esta mutação não previne a acumulação de mutantes FP, mas que há um atraso no seu surgimento (Giri *et al.*, 2010). Em LdMNPV o aparecimento de mutantes FP se deu na segunda passagem do vírus em células de *L. dispar* e não está relacionado com inserções ou deleções facilmente detectáveis no DNA viral (Slavicek *et al.*, 1995). Dos 5 isolados mutantes FP de LdMNPV, 4 apresentaram pequenas inserções (1pb) ou deleções (8 e 24 pb) o que provavelmente gera uma proteína FP25K truncada no C-terminal e 1 mutante apresentou uma grande deleção (1.3kpb) (Bischoff e Slavicek 1997). Erros inseridos pela DNA polimerase na replicação do DNA viral provavelmente são os responsáveis por mutações como inserções ou deleções de sequências pequenas. Estas mutações frequentemente ocorrem em regiões palindrômicas por serem regiões de formação de *hairpin loops* ou estruturas em forma de cruz (Rosche *et al.*1995) e em regiões repetitivas (Streisinger *et al.*1966). Em AgMNPV o mutante FP não apresentou alterações no perfil de restrição do DNA viral indicando que não houve grandes inserções ou deleções no DNA do vírus mutante (Rezende *et al.*, 2009). Assim, como em LdMNPV e AgMNPV, os mutantes FP do HaSNPV, detectados na sexta passagem em células *H. zea*, não apresentaram sequências grandes inseridas ou deletadas do genoma (Lua *et al.*, 2002). Dois dos mutantes apresentaram uma inserção de uma adenina (A) em uma sequência repetitiva de A, enquanto que cinco mutantes apresentaram mutações pontuais. Estas mutações de inserções ou deleções pontuais são denominadas mutações *frameshift* e levam a formação de uma proteína truncada devido à alteração na fase aberta de leitura (ORF).

O DIP caracteriza-se pela deleção de grande parte do genoma viral com perda de genes essenciais tornando-o não infectivo, para que a infecção ocorra este necessita ser coinfestado com o vírus selvagem denominado *helper* (Kool *et al.*, 1991; Pijlman *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 1991). Em AcMNPV os DIPs foram confirmados por microscopia eletrônica que evidenciou o menor tamanho dos BVs em relação ao vírus selvagem, o tamanho foi alterado de 330nm para 190nm, em decorrência da perda de 43% do genoma viral (Kool, *et al.* 1991). Geralmente o DIP surge em passagens muito altas ou quando uma alta multiplicidade de infecção (MOI) é utilizada. O mesmo mutante utilizado por Giri *et al* (2010), AcMNPV com remoção do sítio alvo de transposição localizado no *fp25k*, foi avaliado quanto à formação de DIPs, como resultado o AcMNPV mutado apresentou um atraso também na formação destes mutantes comprovando a maior estabilidade do genoma de AcMNPV quando este sítio é alterado (Giri *et al.*, 2012). Os DIPs além de causarem a diminuição da virulência também causam a diminuição na expressão de proteínas heterólogas, caso estes estejam sendo utilizados na produção em larga escala de proteínas de interesse (Wickham *et al.*, 1991). A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado do DNA dos BVs foi descrita por Giri *et al.* (2012) para melhor caracterização quantitativa, percentual de genomas defectivos na população, e qualitativa, detecção de genomas defectivos e tamanho destes genomas, de DIPs no estoque viral.

Os nucleopoliedrovírus apresentam corpos de oclusão poliédricos, entretanto, há relatos de baculovírus mutantes apresentando poliedros com formas anormais, além do FP citado acima, sendo estes não relacionados a mutações no *fp25k*. Estes mutantes também são gerados em cultura de células e geralmente estão associados a uma mutação no gene da poliedrina (*polh*). Apresentam como característica fenotípica OBs cubóides com pouco ou nenhum ODV no interior ou apenas uma massa de POLH dispersa no núcleo e citoplasma. Sendo, deste modo, evidente que a conservação da estrutura primária da POLH é essencial para a correta montagem do OB e oclusão dos ODVs. Uma única mutação no *polh* de AcMNPV foi responsável pelo surgimento em cultura de células Sf9 de um poliedro grande e cubóide apresentando ODVs em apenas alguns dos poliedros anormais, o que causou uma redução da infectividade oral em larvas suscetíveis (Carstens *et al.*,

1986; Lin *et al.*, 2000; López *et al.*, 2011). Mutantes de AcMNPV e BmNPV, também apresentando uma mutação pontual no *polh*, apresentaram a formação de poucos ou nenhum poliedro e a acumulação no núcleo e citoplasma de uma massa proteica de POLH (Carstens *et al.*, 1987; Katsuma *et al.* 1999; Ribeiro *et al.* 2009).

Além de alterações nos genes *fp25k* e *polh*, outras mutações podem promover o aparecimento de um mutante com poliedros anormais. Em BmNPV, o sequenciamento completo do genoma de um mutante apresentando OBs cubóides não evidenciou qualquer alteração no *polh* com relação ao vírus selvagem, apenas foram encontradas alterações em *bros* e *hrs* (Cheng *et al.* 2012).

2.4 Álamo

O gênero *Populus*, conhecido popularmente como Álamo ou Choupo, classificado taxonomicamente na família Salicaceae, compreende espécies florestais do tipo angiospermas dicotiledóneas dióicas que habitam regiões de várzeas, sendo nativas de regiões temperadas e subtropicais (Figura 5). Estas espécies apresentam crescimento rápido, vida curta, se reproduzem de maneira vegetativa com facilidade, são caducifólias e adaptadas a diferentes climas e solos. O álamo detém um grande valor econômico, pois pode ser utilizados para a confecção de partes de móveis, portas, palitos de fósforos, marcenaria interior, caixas, utensílios de cozinha, forragem para a pecuária, reflorestamento, brinquedos, e mais recentemente como fonte de bioenergia e descontaminação de solos e águas (FAO, 2012; Mio e Amorim, 2000; ABRAF, 2012).

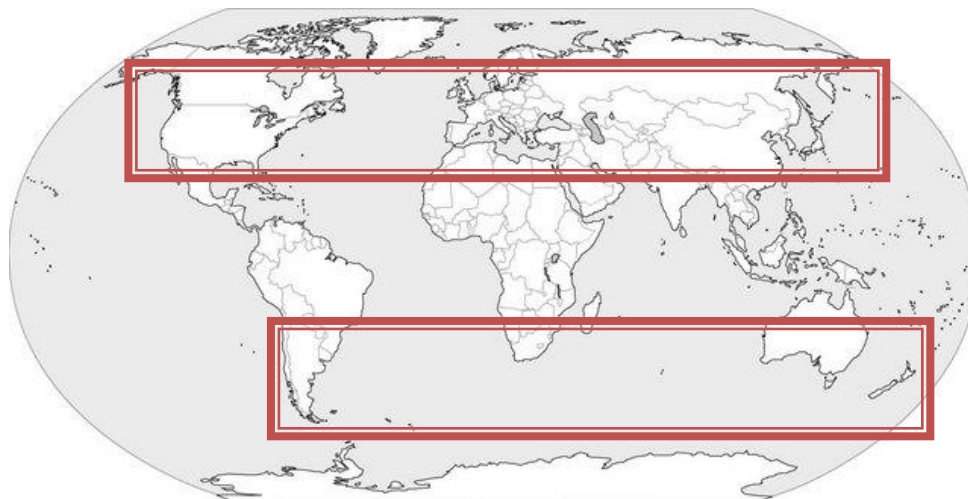


Figura 5. Área nativa de Salicaceae no mundo. Retângulos destacam a região temperada e subtropical, regiões onde a família Salicaceae é nativa. Fonte: Mapa mundi.

Devido a sua grande importância econômica, no ano de 2006 foi publicado por Tuskan *et al.* o sequenciamento completo de uma das espécies do gênero *Populus*, *Populus trichocarpa*. Esta foi a terceira planta a ter o genoma completo sequenciado, as primeiras foram *Oryza sativa* (arroz) e *Arabidopsis thaliana* (planta modelo da fisiologia vegetal).

No Brasil, foi na região sul, na cidade de Curitiba, Paraná, que entre 1905 e 1910 teve início o plantio da espécie *Populus* spp. com mudas provenientes dos Estados Unidos. Apenas no ano de 1991 foram implantados os viveiros de Álamo com finalidade comercial (Mio e Amorim, 2000). Segundo o Anuário ABRAF 2012, ano base 2011 (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas), o Brasil contou com uma área de plantio para *Populus* spp. de 4.220 ha em 2010 mantidos em 2011 sendo estes nos estados do Paraná e Santa Catarina, o que representa um acréscimo de 4.7% com relação ao ano de 2009.

A Comissão Internacional do Álamo (*International Poplar Commission - IPC*) foi criada em 1947 e atualmente é formada por 37 países, incluindo Estados Unidos, Argentina e Chile. A reunião ocorre a cada quatro anos para discutir questões como cultivo, conservação e utilização do álamo. O relatório mais recente, publicado em 2012 pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO*), informou que a área mundial reportada de álamo nativo é superior a 75 milhões de hectares (ha) e a de

álamo plantado é de 8.6 milhões de ha (FAO, 2012). O Canadá possui a maior área de álamo nativo (30 milhões de ha) respondendo com a Rússia e os Estados Unidos por 96% do total. Já o maior detentor, 87.5%, da área plantada de álamo é a China com 7.57 milhões de ha. Quase 5.9 milhões de ha, 68%, de álamo plantado tem destino à produção de madeira enquanto que 2 milhões, 23%, são voltados para a proteção ao meio ambiente, o restante não foi enquadrado em uma função particular.

2.5 *Condylorrhiza vestigialis* – Praga do Álamo

O lepidóptero *Condylorrhiza vestigialis* (Figura 6), conhecido popularmente como Mariposa-do-Álamo, é uma das principais pragas desfolhadoras de culturas do Álamo no Brasil (Diodato e Pedrosa-Macedo 1996). Segundo estes mesmos autores o primeiro relato dessa praga em cultura de *Populus* spp. no Brasil se deu no estado do Paraná em 1992. A sua ocorrência já havia sido descrita no Brasil em outros hospedeiros que não o álamo (D'Araujo e Silva *et al.* 1968) e nos Estados Unidos sem relato de hospedeiros (Harrison, 1902).

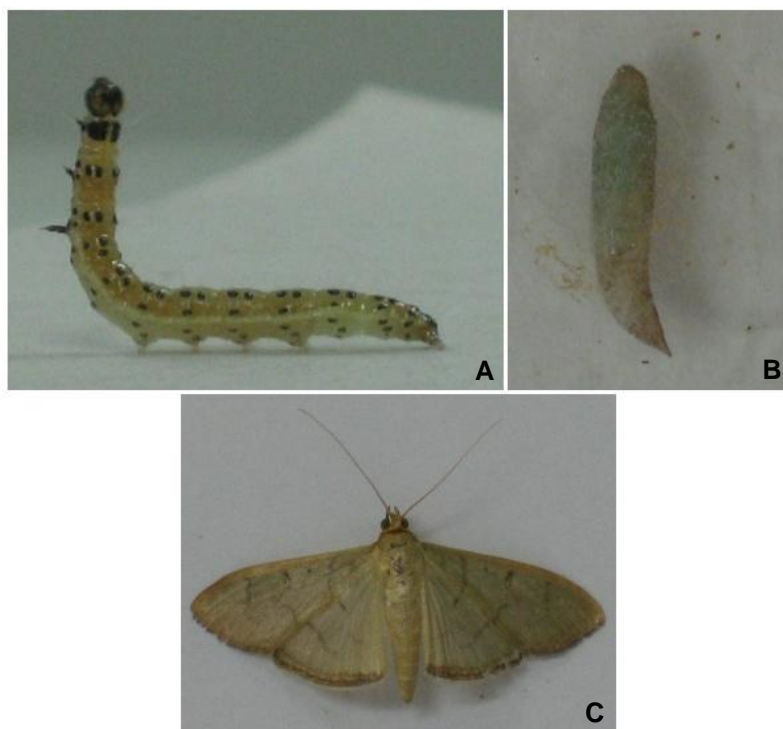


Figura 6. *Condylorrhiza vestigialis*. Fases: larva (A), pupa (B) e adulto (C).

O maior dano econômico causado em decorrência de sua atividade se dá no período da primavera ao verão, pois este período é caracterizado pelo crescimento vegetativo da planta e proporcionando maior disponibilidade de alimento para a praga (Diodato, 1999). Nos demais períodos, outono ao inverno, a praga se alimenta de outras plantas próximas ao Álamo. Lagartas de primeiro ínstar se alimentam da epiderme enquanto que lagartas em ínstares mais avançados poupam apenas as nervuras (Diodato, 1999). Esta praga causa irreparáveis danos econômicos levando a perda de mais de 50% das folhas em viveiros de Álamo com 1 ano de existência e 100% em viveiros com 2 anos (Marques *et al.*, 1995). O desfolhamento do Álamo causado pela alta infestação da praga pode ser visto na Figura 7.



Figura 7. Plantação de Álamo em São Mateus do Sul - PR, Brasil. Imagem do álamo saudável (A) e após desfolha causada pela praga *Condylorrhiza vestigialis*. Fonte: Castro *et al.*, 2009.

Devido à localização onde a planta é encontrada, às margens de rios, o uso de inseticidas químicos para o controle da praga é inviabilizado podendo provocar contaminações e dano à biota aquática. Como alternativa, o uso de bioinseticidas (bactérias, vírus, fungos e nematóides) vem sendo cada vez mais aceito, pois apresentam baixo espectro de ação e não são prejudiciais aos aplicadores e organismos não alvo.

O período de vida desta praga, desde a postura dos ovos até a emergência dos adultos, leva $32,3 \pm 4,2$ d, sendo $2,9 \pm 0,65$ d de incubação dos ovos, $19,4 \pm 2,41$ d de fase larval, $1,01 \pm 0,12$ d de fase pré-pupal e $9,05 \pm 1,01$ d de fase pupal. Esta praga apresenta cinco ínstares larvais identificados a partir da medição da sua cápsula

encefálica. Lagartas que possuem cápsula encefálica medindo 0,3 – 0,31mm; 0,6 – 0,61mm, 1 – 1,01mm; 1,4 – 1,41mm e 2,2 – 2,21mm, são respectivamente identificadas como lagartas de primeiro à quinto ínstar (Corrêa, 2006).

2.6 *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus*

O baculovírus *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CoveMNPV), patogênico à mariposa-do-álamo *Condylorrhiza vestigialis*, teve sua primeira ocorrência descrita no estado do Paraná, Brasil (Castro *et al.*, 2003). Segundo estudos morfológicos em microscopia eletrônica de transmissão (Figura 8), *leaf-dip* e microscopia de contraste de fase este vírus apresenta OB na forma poliédrica com múltiplos NCs por envelope (MNPV) sendo classificado taxonomicamente como um vírus da família *Baculoviridae*, gênero *Alphabaculovirus* (Castro *et al.*, 2009). Estudos filogenéticos com base no gene *p74 (pif-0)* mostram que este vírus pertence ao Clado B do gênero *Alphabaculovirus* Grupo I sendo o CfDEFMNPV o baculovírus filogeneticamente mais próximo (Castro *et al.*, 2011). A poliedrina, proteína estrutural mais abundante no OB, foi identificada por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante sendo sua massa molecular estimada em 33 kDa (Castro *et al.*, 2004). Estudos de infectividade do vírus em diferentes linhagens celulares demonstraram que a linhagem SF21 é susceptível, permitindo assim o desenvolvimento de estudos *in vitro*, principalmente no avanço da caracterização molecular desse vírus (Castro *et al.*, 2004).

Bioensaios visando análise da infectividade do CoveMNPV em lagartas *C. vestigialis* foram realizados por Machado (2006). A concentração letal média (CL₅₀) viral (concentração pela qual o vírus é capaz de matar 50% da população de insetos testados) foi de 10⁷ OBs/mL, porém nas concentrações virais de 10⁸ e 10⁹, os percentuais de mortalidade foram de 93,33% e 96,76%, respectivamente, sendo assim, consideradas concentrações eficientes para o controle da praga. Após 6 a 8 d p.i (dias pós-infecção) observa-se a morte de larvas infectadas, sendo que o tempo letal (TL₅₀) (tempo pós-infecção necessário para o vírus matar 50% da população de insetos testados) foi de 7,48 d p.i em larvas infectadas na concentração de 10⁹ OBs/mL. Apesar do elevado TL₅₀, as larvas em 4 d p.i. apresentaram sintomas de infecção ocasionados por baculovírus, como mudança na coloração corpórea para amarelada, diminuição da mobilidade e do consumo foliar, levando a uma diminuição

em 3 dias na desfolha em relação a lagartas saudáveis, o que representa uma redução no nível de dano econômico. Os bioensaios também demonstraram que larvas de primeiros ínstar de *C. vestigialis*, 1° ao 3° ínstar, são mais suscetíveis ao vírus e que larvas de 3° ínstar são ideais para produção viral em larga escala e podem ser controladas com eficiência pelo baculovírus.

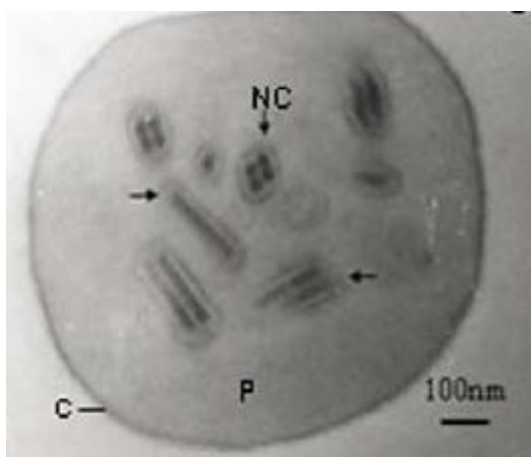


Figura 8. Micrografia eletrônica de transmissão de um OB do vírus CoveMNPV. OB constituído principalmente da proteína poliedrina (P) com ODVs contendo múltiplos NCs no seu interior. c: membrana que envolve o poliedro. Fonte: Castro *et al.*, 2009.

O baculovírus CoveMNPV vem sendo utilizado no sul do Brasil para o controle da praga desfolhadora do Álamo, *C. vestigialis*. Em fevereiro de 2012, foi emitido um registro especial temporário para a empresa Bosquioli & Santos Ltda visando a avaliação, a eficácia e a praticabilidade agrônômica do uso deste baculovírus, além de testes de resíduos na cultura de Álamo. Mais recentemente, em julho de 2012, esta empresa solicitou para o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) o registro deste produto para sua formulação e comercialização.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivos Gerais*

Em uma plantação de Álamo na região de Cascavel-PR, foram observados cadáveres de lagartas *Condylorrhiza vestigialis* infectadas com o baculovírus *Condylorrhiza vestigialis* MNPV apresentando tegumento liquefeito e intacto (Bráulio Santos, comunicação pessoal). Sabendo que os *Alphabaculovirus* apresentam dois genes diretamente responsáveis por esta característica, catepsina e quitinase, o presente trabalho tem como objetivo geral investigar, nestes dois isolados (CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R), possíveis alterações genéticas relacionadas aos divergentes efeitos causados pelo vírus em seu hospedeiro. Para isto, os genes catepsina e quitinase foram investigados quanto à sua presença ou ausência no genoma dos dois isolados virais e em clones selecionados *in vitro*.

Objetivando complementar a caracterização do baculovírus CoveMNPV, até então muito limitada, foi proposto elucidar a sequência completa do genoma dos isolados de CoveMNPV e realizar análises genômica e filogenética comparativas entre os baculovírus com o genoma completo sequenciado e entre os isolados.

Nos perfis de restrição destes isolados de campo foram observadas bandas submolares que conhecidamente são sinais da existência de variantes genotípicos na população estudada. Deste modo, o objetivo foi purificar clones de CoveMNPV e avaliar comparativamente os clones selecionados quanto ao grau de virulência.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Identificar possíveis diferenças genômicas entre dois isolados de campo de CoveMNPV por meio de análise comparativa de seus perfis de restrição de DNA;
- Verificar se há reprodução dos fenótipos observados no campo, larvas *C. vestigialis* infectadas com CoveMNPV apresentando liquefação do tegumento larval pós-morte e tegumento larval intacto, em ensaios de infecção realizados em laboratório;
- Identificar a presença ou ausência dos genes catepsina e quitinase e se presentes se são funcionais no genoma dos dois isolados de CoveMNPV e

em clones de CoveMNPV purificados e assim justificar as alterações no padrão de liquefação do tegumento larval;

- Sequenciar, montar e anotar o genoma completo dos isolados de campo CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R;
- Reclassificar filogeneticamente o baculovírus CoveMNPV utilizando para isto as sequências deduzidas de aminoácidos do genoma completo e a sequência de nucleotídeos de 11 *core genes*;
- Analisar comparativamente os genomas de CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R quanto à ocorrência de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfismos de nucleotídeo único);
- Selecionar variantes genotípicos detectados na população viral de campo por meio da purificação de clones virais *in vitro*;
- Comparar os clones selecionados quanto a possíveis alterações genômicas por meio da comparação do perfil de restrição do DNA viral;
- Comparar os clones selecionados quanto ao grau de virulência baseado em ensaios de infectividade *in vivo* e *in vitro*;
- Identificar se houve restauração do fenótipo de campo após a primeira passagem dos clones *in vivo* por meio da análise comparativa do perfil de restrição do DNA viral e microscopia eletrônica dos OBs antes e após a passagem *in vivo*;
- Investigar a possível formação de mutantes em decorrência da passagem dos clones selecionados em cultura de células pelo sequenciamento do gene *fp25k* e *polh*, pela identificação de possíveis alterações morfológicas na partícula OB e pelas análises geradas nos ensaios de infectividade *in vivo* e *in vitro*;

CAPÍTULO 1
Busca por Alterações no *locus v-cath/chiA*
em isolados de CoveMNPV

4 BUSCA POR ALTERAÇÕES NO *LOCUS v-cath/chiA* EM ISOLADOS DE CoveMNPV

4.1 Introdução

Em geral, a infecção causada por baculovírus resulta em morte do hospedeiro e liberação das partículas virais oclusas no meio ambiente (Slack *et al.*, 1995). A liberação destas partículas ocorre devido à lise celular e à liquefação do tegumento da lagarta. Esta liquefação ocorre devido à ação de duas proteínas codificadas pelo genoma viral, catepsina e quitinase, o que favorece a transmissão horizontal do vírus.

Visando explicar a ocorrência, em área de plantio de Álamo em Cascavel-PR, de lagartas *C. vestigialis* infectadas pelo baculovírus CoveMNPV, apresentando o tegumento liquefeito e intacto pós-morte, o presente trabalho tem como objetivo investigar que variações genéticas virais poderiam ser responsáveis pelos diferentes fenótipos observados. Para isto, os genes catepsina (*v-cath*) e quitinase (*chiA*) foram analisados quanto a sua presença ou ausência no genoma viral de ambas as amostras de campo. As amostras virais de campo foram nomeadas de CoveMNPV-R (R: rompe, tegumento rompido por liquefação) e CoveMNPV-NR (NR: não rompe, tegumento íntegro por ausência de liquefação).

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Vírus e Insetos

Larvas *Condylorrhiza vestigialis* infectadas e mortas pelo baculovírus CoveMNPV apresentando o tegumento liquefeito e intacto foram coletadas separadamente em área de cultivo de Álamo (*Populus* spp., Salicaceae). Macerados destas larvas foram preparados separadamente e utilizados para multiplicação viral, no laboratório da empresa Bosquiroli & Santos LTDA (Cascavel/PR), em lagartas *C. vestigialis* alimentadas em dieta artificial. Lagartas infectadas e sadias, estas para que os testes de infectividade *in vivo* pudessem ser realizados, foram cedidas pelas empresas Swedish Match do Brasil S.A (Edilene B. Machado) e Bosquiroli & Santos LTDA (Bráulio Santos) ao Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

4.2.2 Purificação parcial de OBs

A semipurificação de OBs dos isolados virais CoveMNPV-R e CoveMNPV-NR foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Hashimoto *et al.* (2000). Lagartas infectadas foram maceradas em água destilada autoclavada e o homogeneizado foi filtrado em 6 camadas de gaze, e então deixado sob agitação magnética por 30min em SDS 1%, seguida de uma série de lavagens com SDS 1% e centrifugação a 13.000rpm/10min (Microcentrifuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*), até a obtenção de um precipitado limpo (cor branca). O precipitado foi ressuspenso em água destilada autoclavada e armazenado a -20°C.

4.2.3 Bioensaios

Visando testar as diferenças apresentadas no campo com relação à liquefação do tegumento de lagartas *C. vestigialis* infectadas com o isolado CoveMNPV-R e CoveMNPV-NR, bioensaios foram realizados utilizando larvas de 3° ínstar de *C. vestigialis* submetidas à infecção com 10⁸ OBs/mL. Copos de plástico de 50mL foram adicionados de 10mL de dieta artificial (Corrêa, 2006) contaminada com 200µL da diluição viral ou 200µL de água destilada para o tratamento controle. Após 1h, para secagem do inóculo na dieta, foram adicionadas 5 larvas/copo. Para cada tratamento foram utilizadas 20 larvas e os experimentos foram realizados em quadruplicata em situação controlada de temperatura (27°C±2°C) e fotoperíodo

(12h). Diariamente foi realizado o acompanhamento do bioensaio para anotação da mortalidade, pupação e alterações morfológicas.

4.2.4 Extração de DNA a partir de OBs

O procedimento de extração do DNA viral a partir de OBs foi baseado no protocolo descrito por Miller e Dawes (1978) com algumas modificações. Para dissolução da matriz proteica dos OBs e liberação dos NCs, Na₂CO₂ 1M (concentração final 0,1M) foi adicionado em 1x10⁹OBs/mL de suspensão viral. Após incubação a 37°C/1h, foi acrescentado Tris-HCl 1M pH 7.6 (concentração final 0,1M). Uma rápida centrifugação foi realizada e o sobrenadante transferido para um novo microtubo onde foram adicionados tampão de disrupção (10µM EDTA, 0,25% SDS) e proteinase K 20mg/mL (concentração final 0,5mg/mL), o sistema foi incubado a 37°C por 16h. A extração do DNA foi realizada por ciclos de fenol, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico-IAA (25:24:1) e clorofórmio:IAA (24:1) adicionados em um igual volume do sobrenadante e intercalados com centrifugações a 13.000rpm/5min, 3min e 1min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*), respectivamente após homogeneização por 5min. Para cada etapa, a banda aquosa foi coletada e a fenólica descartada. Para precipitação do DNA, foram adicionados 2V de etanol 100% gelado e 0,1V do volume inicial de acetato de sódio 3M (pH 5,2), o material foi armazenado a -20°C por 16h. O DNA foi então sedimentado por centrifugação a 13.000rpm/30min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*), o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com etanol 70% gelado, centrifugado a 13.000rpm/10min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*), o sobrenadante descartado e o DNA secado à temperatura ambiente e posteriormente ressuspenso em TE (0,01M Tris pH 7.8, 0,001M EDTA, completar com H₂O destilada e autoclavar) e armazenado a 4°C. Para melhor dissolução do DNA extraído e degradação do RNA pela RNase adicionada o material foi incubado a 37°C por 1h. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%.

4.2.5 Clivagem de DNA viral de populações de campo

O DNA viral de ambos os isolados foi clivado com cinco endonucleases de restrição: *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I. Para cada sistema de digestão, montado conforme instrução do fabricante das enzimas, foi utilizada cerca de 1µg de DNA e incubação a 37°C ou 60°C (para o caso da *Bst*EII) por 16h.

4.2.6 Eletroforese em gel de agarose

O gel foi preparado pela dissolução de agarose em tampão TAE 1x (1000mL de TAE 50x: 242g de Tris-HCl; 57,1mL de ácido acético glacial; 100mL de EDTA 0,5M, pH 8,0, completar com água destilada) e coloração com brometo de etídio (EtBr) em uma concentração final de 0,2 µg/mL. Após a polimerização do gel, tampão de corrida 1x (TAE) foi adicionado em quantidade suficiente para cobrir o gel na cuba de eletroforese. As amostras de DNA, preparadas em tampão amostra 1x (*gel loading buffer* 5x: azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; ficoll 15%), foram aplicadas no gel e submetidas a uma voltagem de 30V por 16h. Para a visualização das bandas de DNA, o gel foi submetido à luz ultravioleta e então fotografado.

4.2.7 Amplificação por PCR dos genes *v-cath* e *chiA*

Os oligonucleotídeos degenerados específicos para *v-cath* e *chiA* (Tabela 3) foram desenhados com base em regiões gênicas conservadas entre os vírus pertencentes ao Clado B do gênero *Alphabaculovirus* Grupo I (AnpeNPV-Z, AnpeNPV-L2, CfDEFMNPV, CfMNPV, EppoNPV, HycuNPV e OpMNPV) identificadas após alinhamento gênico realizado no BioEdit/ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) (Anexo 1 e 2). Os prováveis genes foram amplificados por PCR usando DNA de CoveMNPV-R, CoveMNPV-NR como molde. O termociclador (Esco Healthcare Swift MaxPro) foi programado com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C/5min, seguido de 30 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação a 95°C/30s, anelamento dos oligonucleotídeos a 57°C/30s, polimerização a 72°C/1min e uma etapa final de polimerização a 72°C/7min. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,5% e as bandas de tamanho correspondentes ao esperado foram eluídas e purificadas em gel de agarose 1%, conforme protocolo para purificação de DNA de gel de agarose TAE e TBE do Kit de purificação de banda de gel e DNA de PCR GFX™ *illustra*™ (GE Healthcare). Após a purificação, os insertos foram quantificados em gel de agarose 1% e armazenados a 4°C até serem utilizados. Os produtos amplificados pelo molde de CoveMNPV-NR e R foram clonados e sequenciados.

Tabela 3. Oligonucleotídeos degenerados para amplificação dos genes *v-cath* e *chiA*.

Gene	Direção	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho (mer)
<i>v-cath</i>	Forward	RYAGYRARTMKGARAARYTRCRCCG	25
	Reverse	SYARTTCRTTTYKWATRCCRCAMGC	25
<i>chiA</i>	Forward	TNARYARRTCRCRTRTCRGCGTC	25
	Reverse	GGCRYRCCVGTVATYGAYTGGGCCG	25

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base no alinhamento para os genes *v-cath* e *chiA* de regiões gênicas conservadas entre os vírus pertencentes ao Clado B do gênero *Alphabaculovirus* Grupo I.

4.2.8 Preparação de células competentes com cloreto de cálcio

Células da linhagem de *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) foram submetidas a tratamento com CaCl₂ visando a obtenção de células competentes conforme protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001) com adaptações. Para isto, 500µL de um pré-inóculo de 5mL crescido 16h/37°C/200rpm foram adicionados a 200mL de meio LB (Luria-Bertani) (bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, completar com H₂O bidestilada, ajustar o pH para 7,2 e autoclavar) e incubado a 37°C/200rpm até atingir uma A₆₆₀ de aproximadamente 1 (meio para o final da fase exponencial). Em seguida, o material foi deixado 5min no gelo para esfriar e centrifugado a 4.400rpm/4°C/6min (IEC – *International Equipment Company* - Centra MP4R). O precipitado contendo as células foi ressuspensão em 50mL da solução de CaCl₂ 0,1M estéril e gelada e recentrifugado e ressuspensão nas mesmas condições e incubado no gelo por 1h. Transcorrido o tempo de incubação, o material foi centrifugado 4.400rpm/4°C/15min (IEC - Centra MP4R rotor 224) e o precipitado ressuspensão em 10mL da solução de CaCl₂ 0,1M estéril e gelada e glicerol 20%, após este ter sido filtrado em filtro *millipore* 0,2µM. As células competentes foram aliqüotadas em 300µL e estocadas a -80°C.

4.2.9 Construção do plasmídeo recombinante

O plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) foi utilizado para a clonagem dos produtos de PCR (Figura 9). O vetor, por ser comercialmente linearizado, foi diretamente submetido ao sistema de ligação com o inserto. O ensaio de ligação, realizado conforme instruções do fabricante, composto de 3U da enzima T4 DNA ligase, tampão da enzima na concentração final de 1x e uma razão de 1:3 do vetor

(aproximadamente 50ng) e inserto (aproximadamente 150ng), respectivamente em um volume final de 10µL foi incubado à temperatura ambiente por 1h.

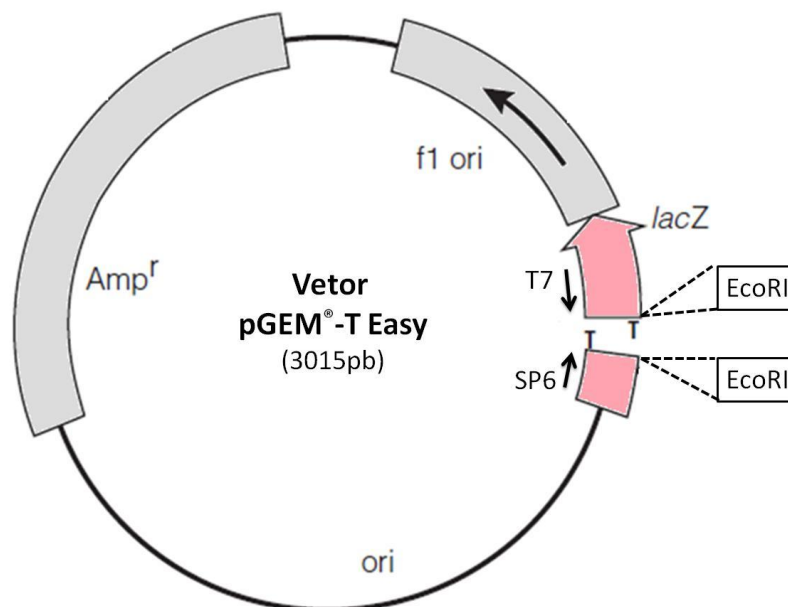


Figura 9. Esquema representativo do vetor pGEM-T Easy utilizado para a clonagem dos prováveis genes catepsina (*v-cath*) e quitinase (*chiA*). Genes *v-cath* e *chiA* amplificados por PCR foram clonados, interrompendo o gene *lacZ* (rosa), no vetor pGEM-T Easy. A confirmação da clonagem foi realizada pela clivagem do vetor com a enzima *EcoRI*, e consequente liberação do inserto. Os oligonucleotídeos universais T7 e SP6, flanqueando a região de clonagem, foram utilizados para a identificação do inserto via sequenciamento.

4.2.10 Transformação bacteriana por choque térmico

Visando a obtenção do plasmídeo recombinante, a transformação bacteriana foi realizada conforme Sambrook e Russel (2001) com adaptações. Em 5µL do sistema de ligação foram adicionados 100µL de células competentes *E. coli XL1-Blue* e o sistema foi incubado no gelo por 30min, em seguida incubado a 42°C por 90s e incubação por 5min no gelo para abertura de poros na superfície celular por choque térmico. Em cada reação de transformação foi adicionado 1mL de meio LB e incubado por 1h e 30min/37°C/150rpm. Após centrifugação a 3.000rpm/2min (IEC – Centra MP4R rotor 224) o precipitado foi ressuspensão em 300µL de meio LB, espalhado em placa de *Petri* com 20mL de meio LB sólido 2% (meio LB acrescido de ágar bacteriológico 2%), ampicilina 100µg/mL, X-GAL 25µg/mL e IPTG 20µg/mL e incubado a 37°C por 16h. As colônias brancas, que representam bactérias onde a transformação teve sucesso, foram selecionadas e coletadas para a extração do

DNA plasmidial e posterior confirmação da clonagem. A presença de colônias brancas demonstra que o inserto se ligou ao plasmídeo ocorrendo à interrupção do gene *β-galactosidase*, não havendo, portanto a hidrólise do substrato X-GAL que resulta em coloração azul.

4.2.11 Extração plasmidial por lise alcalina

A metodologia para extração do DNA plasmidial das células transformadas foi realizada conforme Sambrook e Russel (2001) com adaptações. As colônias brancas foram selecionadas, coletadas com ponteira estéril e crescidas em 1mL de meio LB com ampicilina a 37°C/160rpm por 16h. Após centrifugação a 13.000rpm por 4min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*), o precipitado foi ressuspenso em 100μL da solução I (Tris-HCl 25mM pH 8, EDTA 10mM pH 8, Glicose 50mM) e incubado à temperatura ambiente por 10min. O sistema foi acrescido de 200μL da solução II (SDS 1%, NaOH 0,2M) e incubado no gelo por 10min, seguido de adição da solução III (acetato de potássio 3M; 11,5% de ácido acético glacial) e incubação no gelo por 5min. O sistema foi centrifugado a 13.000rpm/5min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*) e do sobrenadante foi realizada a extração de DNA com fenol, fenol:clorofórmio:AAI e clorofórmio:AAI e precipitação do DNA plasmidial conforme já descrito. Em cada DNA extraído foi adicionado 1μL de RNase e o sistema incubado a 37°C/1h. O DNA foi quantificado visualmente em gel de agarose 0.8% corado com EtBr.

4.2.12 Confirmação da clonagem e seleção dos clones

Para a confirmação da clonagem, o DNA plasmidial foi clivado com a endonuclease de restrição *EcoRI* conforme instruções do fabricante e analisado em gel de agarose 1% para detecção do inserto, caso a clonagem tenha sido realizada com sucesso. O sistema de digestão foi montado utilizando cerca de 500ng de DNA e incubação a 37°C por 16h.

4.2.13 Sequenciamento dos genes clonados

Para obter material suficiente para o sequenciamento, as colônias brancas foram selecionadas, coletadas com ponteira estéril e crescidas em 10mL de meio LB com ampicilina a 37°C/200rpm por 16h. A partir deste material foi realizado o procedimento para extração plasmidial. Em cada DNA extraído foi adicionado 1μL de

RNAse e o sistema incubado a 37°C/1h. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0.8%, corado com EtBr e sequenciado.

O sequenciamento dos insertos clonados nos plasmídeos foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Cenargen) utilizando o sequenciador automático 3700, os oligonucleotídeos universais SP6 e T7 e o Kit *BigDye Terminator* (*Applied Biosystems*). As sequências obtidas foram identificadas após análise utilizando-se BLASTx e alinhamento com a respectiva sequência do CfDEFMNPV pelo programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1997).

4.3 Resultados e Discussão

Visando explicar o evento de lagartas *C. vestigialis* mortas pelo CoveMNPV apresentando tegumento liquefeito e intacto, inicialmente foi investigada a possível existência de alterações genômicas, detectáveis por eletroforese em gel, entre os isolados CoveMNPV-R (isolado de lagartas com tegumento liquefeito) e CoveMNPV-NR (isolado de lagartas com tegumento íntegro). Estes isolados foram submetidos a ensaios *in vivo* para que o evento observado no campo pudesse ser reproduzido e compreendido em condições controladas. Por fim, oligonucleotídeos específicos para os genes virais catepsina e quitinase foram desenhados para que estes fossem submetidos à identificação no genoma dos isolados.

Catepsina e quitinase não estão presentes ou ausentes em apenas uma das amostras

Para a detecção de possíveis variações nos genomas dos isolados CoveMNPV-R e CoveMNPV-NR foi realizada inicialmente uma análise comparativa dos perfis de restrição dos DNAs obtidos da clivagem com cinco endonucleases de restrição. Os fragmentos resultantes foram idênticos para uma mesma enzima, exibindo 8, 15, 10, 22 e 17 fragmentos para *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I, respectivamente (Figura 10). No entanto, foram detectados nos perfis de DNA gerados pelas enzimas *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I um total de 1, 2, 1 e 2 fragmentos submolares, respectivamente. Estes resultados, perfis de restrição idênticos e presença de bandas submolares, demonstram tratar-se de uma mistura de genótipos de uma mesma espécie.

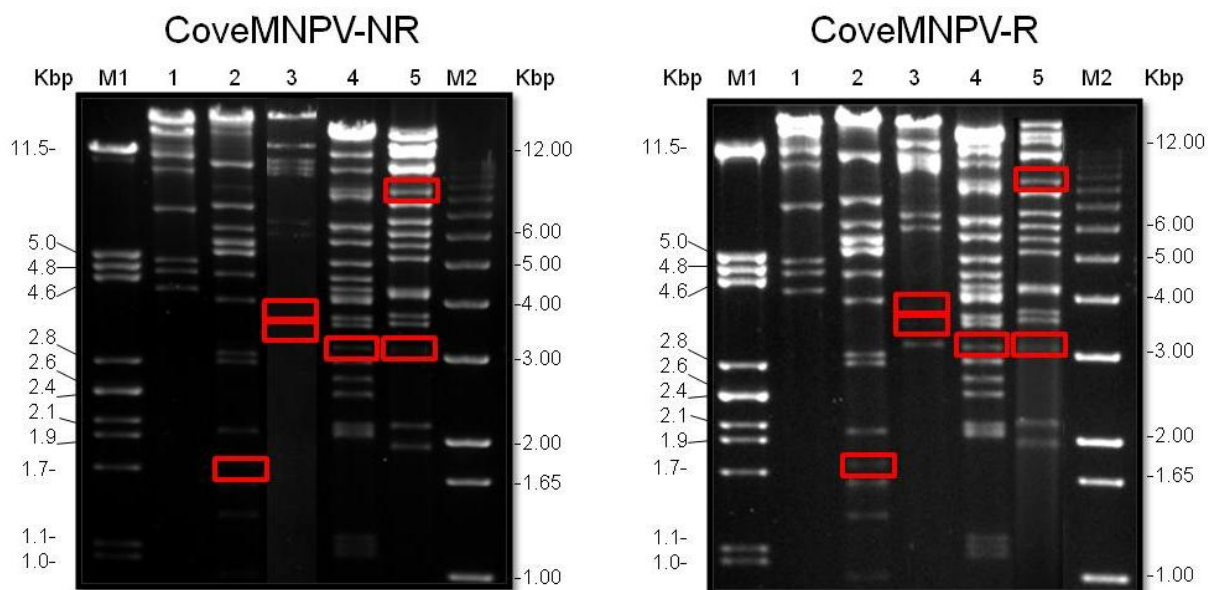


Figura 10. Padrão de restrição do DNA de CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com EtBr. Colunas M1 e M2 são marcadores de massa molecular em mil pares de bases (kbp): DNA de fago λ clivado com *Pst*I e 1kb *Plus DNA ladder*, respectivamente. Colunas 1 a 5: clivagem com *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*, respectivamente. Os retângulos vermelhos indicam as bandas submolares.

Diante da ausência de diferenças entre os perfis de restrição do DNA dos isolados, pode-se afirmar que não houve grandes inserções ou deleções no genoma de um isolado com relação ao outro. Tendo em vista que o *locus v-cath/chiA* possui aproximadamente 2.7 kpb e que a deleção de um fragmento deste tamanho seria perceptível em gel de agarose, não se espera encontrar estes genes ausentes em apenas uma das amostras. Contudo, apenas com este resultado não é possível concluir que os genes estejam presentes ou ausentes. Vieira *et al.* (2012) relatam a ocorrência de uma mutação pontual como responsável pelo truncamento da quitinase de SfMNPV-6NR, alteração esta que não seria perceptível em uma eletroforese em gel de agarose ao menos que esta variação esteja localizada no sítio de clivagem da enzima de restrição.

Poucas lagartas apresentam tegumento rompido pós-morte

Os testes de infectividade foram realizados em quadruplicata, com 20 lagartas por replicata e em condição controlada de temperatura e fotoperíodo com inóculo na concentração de 2×10^7 OBs/5 larvas. Ambos os fenótipos observados em campo foram identificados nos bioensaios (Figura 11), porém a maioria das larvas mortas

com sintomas típicos de infecção por baculovírus, 89,04% para o inóculo CoveMNPV-NR e 71,23% para o -R, apresentaram o tegumento intacto.

Ao contrário do esperado, bioensaios realizados com esses fenótipos do campo demonstraram um comportamento semelhante para ambas às amostras, onde a maioria das lagartas mortas apresentou o tegumento íntegro e poucas apresentaram o tegumento com características de liquefação. Slack *et al.* (2004) relataram uma situação semelhante quando em ensaios de infecção de larvas *T. ni* com o AgMNPV-2D, baculovírus que apresenta os genes *v-cath* e *chiA* ausentes do seu genoma, foram observadas larvas com tegumento liquefeito. Segundo os autores, ainda não se conhece o motivo que permitiu a liquefação do tegumento das lagartas infectadas com AgMNPV-2D, porém fatores ambientais ou específicos do hospedeiro podem contribuir para a liquefação do inseto.

A semelhança dos resultados dos bioensaios para as amostras pode ser atribuída à inexistência de diversidade genética entre as populações virais de campo, CoveMNPV-R e -NR, no que se refere ao evento de liquefação do tegumento larval pós-morte. E sugere que os genes responsáveis por este fenótipo estejam ausentes ou inativos em ambas as populações virais. Os experimentos de infecção *in vivo* foram realizados em condições ambientais controladas, ao menos no que se refere à temperatura e fotoperíodo, o que sugere fatores intrínsecos ao hospedeiro ou condições ambientais diferentes da testada como os responsáveis pela rara ocorrência de larvas mortas por baculovírus apresentando tegumento liquefeito. Observações realizadas no campo de lagartas *C. vestigialis* infectadas com CoveMNPV evidenciaram que em temperaturas mais elevadas ocorre um aumento do número de cadáveres de larvas infectadas com tegumento liquefeito (Bráulio Santos, comunicação pessoal).



Figura 11. Lagartas *Condylorrhiza vestigialis* com sintomas típicos de infecção causada por baculovírus. A: Larva de *C. vestigialis* infectada com CoveMNPV-NR apresentando o tegumento intacto pós-morte. B: Larvas de *C. vestigialis* infectadas com CoveMNPV-R apresentando o tegumento liquefeito pós-morte.

***v-cath* e *chiA* não foram amplificados por oligos específicos**

Para investigar a existência ou não de alterações genéticas entre os isolados para a característica em estudo, os genes virais catepsina e quitinase foram analisados por PCR quanto a sua ausência ou presença no genoma dos isolados virais.

As amostras virais das populações de campo foram submetidas à amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes *v-cath* e *chiA*. Houve muita amplificação inespecífica mesmo quando alterados os parâmetros da reação como concentração de $MgCl_2$, sal e oligonucleotídeos, temperatura de anelamento e adição de formamida. Dentre os fragmentos amplificados inespecificamente foram gerados amplicons do tamanho próximo ao esperado tanto para o *v-cath* quanto para o *chiA* (Figura 12A). As bandas com tamanho próximo ao esperado foram eluídas do gel e purificadas obtendo assim apenas um fragmento a ser clonado (Figura 12B).

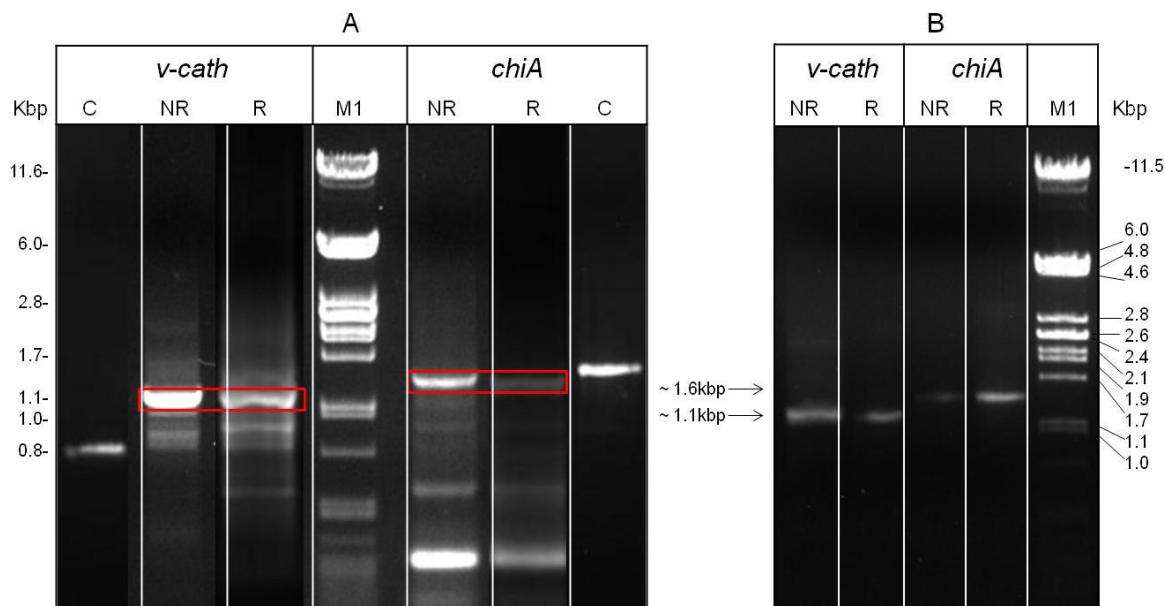


Figura 12. Produtos de PCR dos prováveis genes *v-cath* e *chiA* dos isolados de CoveMNPV antes (A) e após (B) a purificação das bandas com tamanho esperado. Colunas C, NR e R: produtos de PCR utilizando DNA de vAg2100Cf (controle), CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R como molde, respectivamente. Coluna M1: Marcador de massa molecular DNA de fago λ clivado com *Pst*I em mil pares de bases (kbp). Retângulos vermelhos: bandas com tamanho esperado. Gel de agarose 1% corado com EtBr.

Estes fragmentos foram clonados no plasmídeo pGEM-T Easy para posterior sequenciamento. Visando a confirmação da clonagem os DNAs plasmidiais de 10 clones para o *chiA* de CoveMNPV-NR, 4 clones para o *chiA* de CoveMNPV-R e 10 clones para o *v-cath* de CoveMNPV-R foram extraídos e clivados com a endonuclease de restrição *Eco*RI (Figura 13). Dos clones obtidos 8 clones para o *chiA* de CoveMNPV-NR, 1 clone para o *chiA* de CoveMNPV-R e 6 clones para o *v-cath* de CoveMNPV-R apresentaram o tamanho do inserto correspondente ao produto de PCR clonado, aproximadamente 1,6 kbp para o *chiA* e 1,1 kbp para o *v-cath*.

Visando o sequenciamento dos insertos foram selecionados 2 plasmídeos contendo o possível gene *chiA* de CoveMNPV-NR, 1 contendo o possível *chiA* de CoveMNPV-R e 2 contendo o possível *v-cath* de CoveMNPV-R. As colônias contendo os plasmídeos selecionados foram amplificadas, os plasmídeos extraídos e enviados para o sequenciamento.

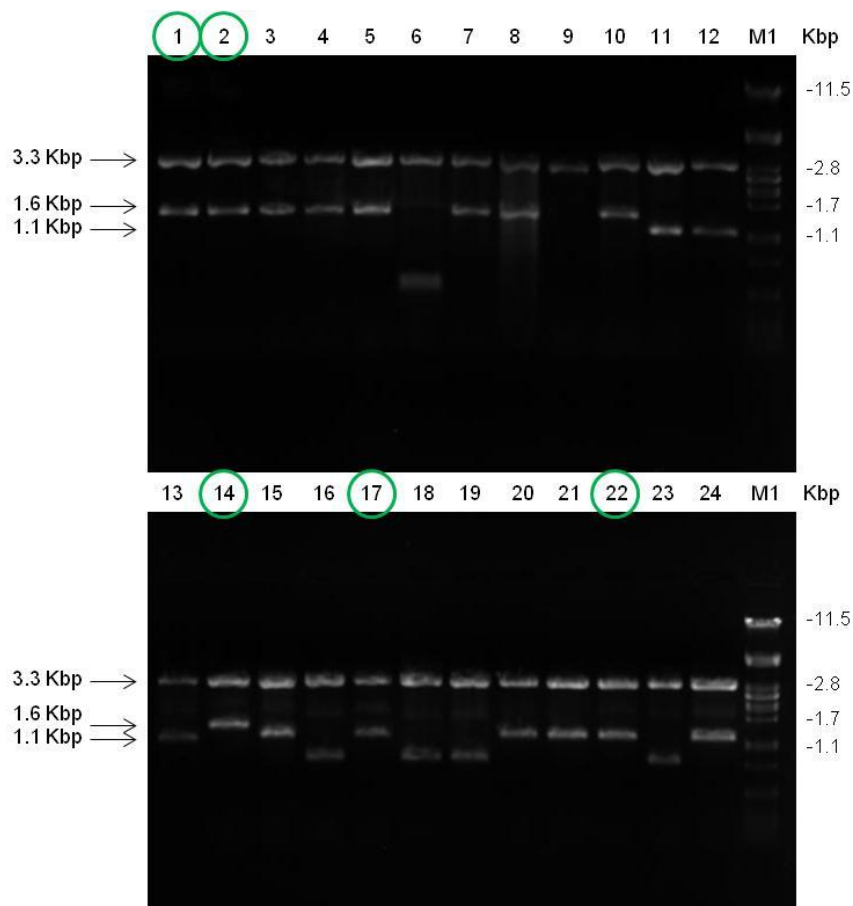


Figura 13. Análise das clonagens dos supostos genes *v-cath* e *chiA* em plasmídeos pGEM-T Easy por digestão com *Pst*I. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com EtBr. Colunas 1-10: clones 1-10 de pGEM-T Easy + *chiA* do CoveMNPV-NR; Colunas 11-14: clones 1-4 pGEM-T Easy + *chiA* do CoveMNPV-R; Colunas 15-24: clones 1-10 de pGEM-T Easy + *v-cath* do CoveMNPV-R; Coluna M1 : marcador de massa molecular - DNA de fago λ clivado com *Pst*I em mil pares de bases (kbp). Círculos: clones selecionados para realização do sequenciamento.

As sequências gênicas obtidas pelo sequenciamento foram alinhadas com o genoma completo de *Choristoneura fumiferana defectivo multiple nucleopolyhedrovirus* (CfDEFMNPV), o baculovírus filogeneticamente mais próximo ao CoveMNPV, segundo análise filogenética baseada no gene *p74* (Castro *et al.*, 2011). Diferentemente do esperado, as sequências foram altamente similares a parte dos genes *fp25k* e *lef-9* para o suposto produto de PCR do *chiA* (Figura 14) e ao *bro* (*orf* repetitiva de baculovírus) para o suposto produto de PCR do gene *v-cath* (Figura 15).

A

```

44810 44820 44830 44840 44850 44860 44870 44880 44890 44900
CoveMNPV-NR_chiA_T7      .....T-----TGCTCCCGGCCGCGCATGGCGGCCGCGGGAATTGATTTTAAACAAGTCA-CCG--TTGTGAGCGTCAAAACGAA
CoveMNPV-R_chiA_T7      .....T-----CCAAGCTCCGGCGCATGGCGGCCGCGGGA-TTCGATTTTAAATAAGTCA-CCA--TTATCGGCGTCAAAACGAA
CfDEFMNPV genoma completo AGATTCAACTTGATCAGTTAATTTAGCTTAAATTTAAATAATATTTTG-CAACATG--CTAGATTTCAAAACACGTCCGCCCTTTGTCCGCGTCAAAACGAA

44910 44920 44930 44940 44950 44960 44970 44980 44990 45000
CoveMNPV-NR_chiA_T7      .....T-----AAAAGGTTGTTGGCTTTTAAATAATCAATGTGTTGTTTATTCTTGACAATAAACACTCGGCTTTTTCGTCCGCGCGTACCATGACGCCATGCTTGCACA
CoveMNPV-R_chiA_T7      .....T-----AAAAGGTTGTTGGCTTTTAAATAATCAATGTGTTGTTTATTCTTGACAATAAACACTCGGCTTTTTCGTCCGCGCGTACCATGACGCCATGCTTGCACA
CfDEFMNPV genoma completo AAAAGGTTGTTGGCTTTTAAATAATCAATGTGTTGTTTATTCTTGACAATAAACACTCGGCTTTTTCGTCCGCGCGTACCATGACGCCATGCTTGCACA

45010 45020 45030 45040 45050 45060 45070 45080 45090 45100
CoveMNPV-NR_chiA_T7      .....T-----ACGATATGTACTTGTAAATCGGCAAGAGTGCCTCACGGCCCTTTTTCAGCAACAACCTTATGCTCCGCGCGCGCCACAATATCTTTACGGGACCGTC
CoveMNPV-R_chiA_T7      .....T-----ACGATATGTACTTGTAAATCGGCAAGAGTGCCTCACGGCCCTTTTTCAGCAACAACCTTATGCTCCGCGCGCGCCACAATATCTTTACGGGACCGTC
CfDEFMNPV genoma completo GCGATATATACTTGTAGACCGGCAAGAGTGCCTCACGGCCCTTTTTCAGCAACAACCTTATGCTCCGCGCGCGCCACAATATCTTTACGGGACCGTC

45110 45120 45130 45140 45150 45160 45170 45180 45190 45200
CoveMNPV-NR_chiA_T7      .....T-----GTAATCAATGTCTAGGTTGTAA-----
CoveMNPV-R_chiA_T7      .....T-----GTAATCAATGTCTAGGTTGTAA-----
CfDEFMNPV genoma completo GTAATCAATGTCTAGGTTGTAAATTTTAAAGCGTTGTTTCGCGGACTTGTCTGCCACTCGGCGCGCGGACGCGTCCGCAACAATTAACCCATGATGG

```

B

```

46210 46220 46230 46240 46250 46260 46270 46280 46290 46300
CoveMNPV-NR_chiA_SP6      .....T-----GACGTGCGCATCTTGAGTGT-ACACAGATTGGAACGTAAGTGGTCTTGGCAT-TTCCAGGCGCAACCCGATTTGATGG
CoveMNPV-R_chiA_SP6      .....T-----GCACGCAAGTGTCCGACGTGCGCATCAACGAGTGTGACACCGATTGGAACGTAAGTGGTCTTGGCATATTTCCAGGCGCAACCCGATTTGATGG
CfDEFMNPV genoma completo GCACGCAAGTGTCCGACGTGCGCATCAACGAGTGTGACACCGATTGGAATGTAAGTGGTCTTGGCATATTTCCGCGCGCAACCCGATTTGATGG

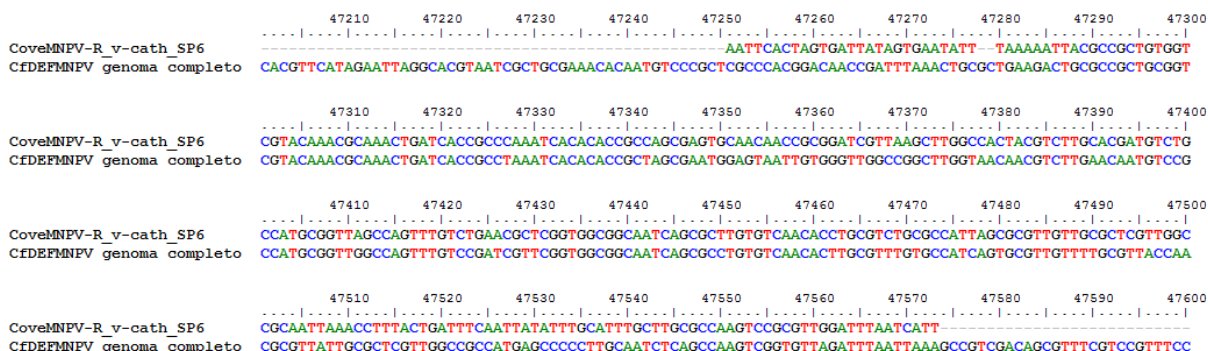
46310 46320 46330 46340 46350 46360 46370 46380 46390 46400
CoveMNPV-NR_chiA_SP6      .....T-----CGACAAAATAATTATTA-ATGTTTTCGCGCAACCCAACTCGCTCATCGACGCCGACATGGCAATT-TGCTAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCTGC
CoveMNPV-R_chiA_SP6      .....T-----CGACAAAATAATTATACGTTTTTTCGCGCAACCCAACTCGCTCATCGACGCCGACACGATTTACTGAAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCTGC
CfDEFMNPV genoma completo CGACAAAATAATTATACGTTTTTTCGCGCAACCCAACTCGCTCATCGACGCCG--AGTGCTGTTGTATGGCATCCGCGTACAGCTTTATTTGCTTTG

46410 46420 46430 46440 46450 46460 46470 46480 46490 46500
CoveMNPV-NR_chiA_SP6      .....T-----AGGTCGACC-----
CoveMNPV-R_chiA_SP6      .....T-----AGGTCGACCAT-----
CfDEFMNPV genoma completo ACAAAAACCGTCTCACGTTTGTGCTCAGCAAAATTTTCTACTTGTACCAAAAACGTAACCGCGGTAGAAAAACTTTTAAAAACCATGCCGTTGGCGCACAT

```

Figura 14. Resultado do sequenciamento de produtos de PCR do suposto gene *chiA* de CoveMNPV-NR e -R clonado em pGEM-T Easy. Os resultados dos sequenciamentos utilizando os oligonucleotídeos universais T7 e SP6 foram alinhados com o genoma completo do CfDEFMNPV e foram identificados como sendo os genes *fp25K* (A) e *lef-9* (B), respectivamente.

A



B

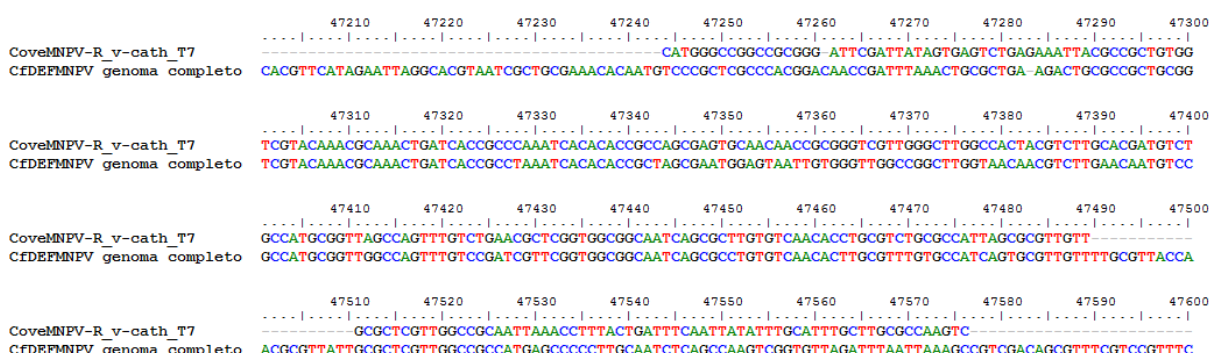


Figura 15. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do suposto gene *v-cath* de CoveMNPV-R clonado em pGEM-T Easy. Os resultados dos sequenciamentos utilizando os oligonucleotídeos universais SP6 e T7 foram alinhados com o genoma completo do CfDEFMNPV e foram identificados como sendo o gene *bro* ORF 59.

Não foi obtido sucesso na clonagem do *v-cath* para o CoveMNPV-NR, porém não foi realizada uma nova tentativa de clonagem devido a não correspondência dos genes intencionalmente clonados com os obtidos pelo sequenciamento.

Diante dos resultados aqui mostrados pode-se sugerir que os isolados são parte de uma mesma população e que os genes catepsina e quitinase estejam ausentes do genoma de CoveMNPV. A ocorrência de baculovírus com ausência dos genes *v-cath* e *chiA* em seu genoma é de grande interesse para o controle integrado de pragas (Valicente *et al.*, 2008). Sabendo que o custo é reduzido quando a produção de baculovírus ocorre no campo, à presença de lagartas infectadas com este vírus mutante facilita a coleta pelo agricultor além de reduzir a perda para o ambiente do baculovírus produzido (Moscardi, 1999). Estes genes têm a função de facilitarem a dispersão das partículas OBs para o meio ambiente ao final da infecção, mas parece não serem essenciais na eficiência de sua transmissão horizontal.

4.4 Conclusão

A suposição de ausência dos genes *v-cath* e *chiA* no genoma dos isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R foi levantada neste capítulo diante de evidências como a similaridade observada entre os perfis de restrição de DNA dos isolados, o reduzido número de larvas mortas apresentando tegumento liquefeito, e a não amplificação desses genes (*v-cath* e *chiA*) por PCR. A similaridade do perfil de restrição dos isolados virais sugere pouca ou nenhuma diversidade genética entre as populações, sendo descartada a possibilidade de perdas ou ganhos de sequências perceptíveis em gel para apenas uma das amostras. A prevalência de lagartas *C. vestigialis* mortas apresentando tegumento intacto em condições controladas, sugere que a maior incidência de lagartas mortas com tegumento rompido observadas no campo seja devido a alterações nas condições ambientais ou fatores intrínsecos ao hospedeiro e não devido a alterações no genoma viral. A não amplificação dos genes *v-cath* e *chiA* por oligonucleotídeos degenerados não é esperado, tendo em vista que estes oligos foram desenhados com base em regiões gênicas conservadas nos baculovírus com genoma completo sequenciado próximos ao CoveMNPV.

CAPÍTULO 2
**Montagem, Anotação, Filogenia e Análise da sequência
genômica completa do CoveMNPV**

5 MONTAGEM, ANOTAÇÃO, FILOGENIA E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GENÔMICA DE CoveMNPV

5.1 Introdução

Os baculovírus são vírus que apresentam o genoma de DNA dupla fita, circular, superenovelado, na faixa de 80-180 kpb, com ORFs (fases abertas de leitura) variando de 90-180 em ambas as fitas e sentidos. Dos mais de 661 baculovírus já identificados (Rohrmann, 2011), apenas 70 apresentam o genoma completo sequenciado, sendo 54 vírus de espécies distintas e 16 isolados variantes destas espécies (NCBI). Análises dos genomas dos baculovírus já sequenciados revelam um total, de 37 genes comuns a todos os baculovírus (*core genes*), 9 genes comuns aos gêneros *alpha-*, *beta-* e *gammabaculovirus*, 1 comum aos *alpha-*, *beta-* e *deltabaculovirus* e 16 comuns aos *alpha-* e *betabaculovirus* (Garavaglia *et al.*, 2012).

Devido à importância dos baculovírus como ferramentas na expressão de proteínas heterólogas, na terapia gênica e como bioinseticidas no controle integrado de pragas, a abordagem genômica aqui apresentada torna-se um importante passo na caracterização e manipulação desses vírus.

Neste capítulo serão apresentadas a sequência completa, organização do genoma e análise comparativa do CoveMNPV com outros baculovírus já seqüenciados. A ocorrência de polimorfismos será investigada entre os isolados CoveMNPV-NR e – R. O provável *locus* dos genes *v-cath* e *chiA*, *lef-7/gp64*, será analisado filogeneticamente visando a reconstrução da história evolutiva dos genes *v-cath* e *chiA* no clado CoveMNPV/AgMNPV/CfDEFMNPV.

5.2 *Materiais e Métodos*

5.2.1 *Inseto, vírus e DNA viral*

Os isolados CoveMNPV- NR e CoveMNPV-R foram obtidos conforme descrito no item 4.2.1.; OBs foram isolados e semipurificados de macerados de lagartas infectadas (item 4.2.2);. DNAs dos isolados virais foram extraídos e purificados a partir de OBs semipuros, (item 4.2.4) e quantificados em gel de agarose (item 4.2.6) e no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDropTechnologies*), antes do envio para o sequenciamento.

5.2.2 *Sequenciamento e montagem da sequência de DNA*

Os sequenciamentos dos genomas dos isolados virais foram realizados no Centro de Genômica de Alto Desempenho do Distrito Federal (Genômica DF) utilizando a Plataforma 454 *Genome Sequencer* (GS) FLX Titanium (Roche) que emprega a tecnologia do pirosequenciamento. Foram eliminados *reads* menores que 20 nucleotídeos e regiões com probabilidade de erro por base superior a 1%. A montagem dos genomas foi realizada no programa *Geneious 6.0.4* por meio do *De Novo Assembly* tendo sido necessário o alongamento manual de alguns *reads* através do *Map to reference* devido a não correta montagem por causa das regiões repetitivas comuns nos baculovírus. O programa *Mira Sequence Assembler* (Chevreux *et al.*, 1999) também foi utilizado por resolver melhor a montagem em regiões repetitivas.

5.2.3 *Anotação do genoma*

O genoma montado do CoveMNPV-NR foi alinhado no programa *Geneious 6.0.4* utilizando o algoritmo *Mauve Aligner* (Darling *et al.*, 2004) com o genoma completo do CfDEFMNPV (acesso AY327402) e as anotações transferidas de um genoma para o outro. O genoma também foi alinhado com o genoma completo do AgMNPV (acesso DQ813662) para a identificação e anotação de ORFs comuns aos dois, mas ausente em CfDEFMNPV. ORFs não comuns aos CfDEFMNPV e AgMNPV foram anotadas pelo programa *Geneious 6.0.4* usando como critério que apresentassem tamanho igual ou superior a 150pb e ATG como códon de início. As ORFs transferidas entre genomas ou identificadas pelo *Geneious 6.0.4* foram anotadas no genoma de CoveMNPV-NR e conferidas utilizando o BLASTx visando a identificação de uma possível montagem incorreta e correta identificação do códon de início e

parada para cada gene. As sequências homólogas repetitivas (*hrs*) e repetições diretas (*direct repeats*) foram identificadas com ajuda do gráfico gerado pelo *SelfDotplot*, alinhamento do genoma de CoveMNPV-NR com ele mesmo, baseado na ferramenta EMBOSS (Rice *et al.*, 2000). A sequência da *hr* que apresentou a menor unidade de repetição foi submetida a um BLASTn-2seq para identificação da menor unidade de repetição. Uma busca por esta unidade repetitiva foi realizada em todo o genoma do CoveMNPV-NR. As anotações gênicas do isolado CoveMNPV-NR, realizadas conforme descrito acima, foram transferidas para o genoma do CoveMNPV-R utilizando o programa *Geneious 6.0.4* e o algoritmo *Mauve Aligner* (Darling *et al.*, 2004).

5.2.4 Filogenia

As sequências codificadoras (CDSs - *Coding DNA Sequence* - Sequência de DNA codificante) do CoveMNPV foram comparadas com as de outros baculovírus já sequenciados usando o programa BLASTn. Análise filogenética foi realizada por meio da sequência deduzida de aminoácidos do genoma completo utilizando o método evolutivo de distância no programa *Composition Vector Tree v.2* (Xu e Hao, 2009) e parâmetros como *K-tuple length* (tamanho dos fragmentos que o proteoma é subdividido para efetuar a busca) igual a 4 aminoácidos e o CuniNPV como grupo externo. Análise filogenética também foi realizada por meio da sequência de nucleotídeos de 11 *core genes* utilizando o programa PhyML. As sequências nucleotídicas dos 11 *core genes* para 14 baculovírus com genoma completo sequenciado pertencentes aos *Alphabaculovirus* grupo I (AnpeNPV-Z, PcrNPV-GX1, OpMNPV, EppoNPV, CfMNPV, HycuNPV, CfDEFMNPV, AgMNPV-2D, MaviMNPV, RoMNPV, PlixMNPV, AcMNPV-C6, BmNPV-T3, BomaNPV-S1) foram alinhadas separadamente utilizando o *translation aligner* pelo programa MAFFT (Kato *et al.*, 2002). Posteriormente, os arquivos foram concatenados. A análise filogenética baseada nos *core genes* foi realizada utilizando o método de verossimilhança implementado no programa PhyML (Guindon e Gascuel, 2003), com os modelos evolutivos (tabela 4) determinados pelo programa jModelTest (Darriba *et al.*, 2012). O suporte dos ramos foi determinado por *Bootstrap* não-paramétrico com 100 réplicas.

Tabela 4. Modelos evolutivos dos *core genes* utilizados para a construção das árvores filogenéticas.

Core Gene	Sigla	Tamanho (nt)	Modelo Evolutivo
Exonuclease alcalina	<i>alk-exo</i>	1.305	GTR + I + Γ
Fator de expressão tardia - 8	<i>lef-8</i>	2.715	GTR + I + Γ
Fator de expressão tardia - 9	<i>lef-9</i>	1.488	GTR + I + Γ
Fator de infectividade oral - 0	<i>pif-0</i> ou <i>p74</i>	1.941	GTR + I + Γ
Fator de infectividade oral - 1	<i>pif-1</i>	1.605	GTR + I + Γ
Fator de infectividade oral - 2	<i>pif-2</i>	1.152	GTR + I + Γ
Fator de infectividade oral - 3	<i>pif-3</i>	633	K80 + I + Γ
Fator de infectividade oral - 5	<i>pif-5</i> ou <i>odv-e56</i>	1.164	GTR + I + Γ
Proteína do envelope do ODV e18	<i>odv-e18</i>	306	HKY + I + Γ
Proteína do envelope do ODV e27	<i>odv-e27</i>	939	HKY + I + Γ
Proteína do envelope do ODV ec43	<i>odv-ec43</i>	1.194	GTR + I + Γ
Concatenado	-	12.954	GTR + I + Γ

GTR: *Generalised Time Reversible* (Tavaré, 1986); K80: Kimura, 1980; HKY: Hasegawa *et al.*, 1985; I (Invariante): Correção no número de sítios invariáveis; Γ (gama): Correção na taxa de substituição desigual entre sítios.

Foram construídas árvores filogenéticas baseadas nos genes separadamente e uma árvore dos 11 genes concatenados. As árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree (Rambaut, 2008).

5.2.5 Variações entre os isolados

Visando a análise comparativa entre os isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R foi realizada no *Geneious 6.0.4* uma busca por SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* - polimorfismos de nucleotídeo único) intra- e interisolados, os quais foram identificados e avaliados quanto a alterações na sequência de aminoácidos. Para isto os *reads* de ambos os isolados foram limpos por meio da eliminação de bases com erros superiores a 0.1%, permanecendo assim somente bases com alta qualidade. Estes *reads* foram alinhados com o genoma de CoveMNPV-NR utilizando sensibilidade média e permissão para a adição de *gaps*. No alinhamento foi realizada a busca por SNPs utilizando os seguintes parâmetros: cobertura mínima de 5 *reads*, frequência mínima do variante de 5%, análise do efeito do polimorfismo na tradução, busca por variações dentro e fora de CDSs desconsiderando variações localizadas em *bros*, *hrs* e *drs* fora de CDSs, busca por variações do tipo

substituição (variação de dois ou mais nucleotídeos seguidos) e SNPs do tipo transição e transversão. Devido à alta frequência de inserções/deleções em regiões homopoliméricas, inerente a técnica de sequenciamento 454, apenas *indels* maiores que 3 nucleotídeos foram considerados e sua identificação realizada manualmente. Os genomas também foram comparados por um alinhamento utilizando o programa *Mauve Aligner* (Darling *et al.*, 2004) para busca do percentual de identidade.

5.2.6 Identificação do provável *locus v-cath/chiA*

O *locus* provável dos genes *v-cath* e *chiA*, região intergênica *lef-7/gp64*, foi investigado pela identificação dos genes *lef-7* e *gp64*. O *locus* identificado para ambos os isolados foi alinhado com o respectivo *locus* do AgMNPV no programa *Geneious 6.0.4*. Para confirmar a ausência ou presença dos genes *v-cath/chiA*, os *reads* obtidos pelo sequenciamento 454 de ambos os isolados (CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R) foram submetidos a análise utilizando-se os programas BLASTn e BLASTx com os genes *v-cath* e *chiA* do CfDEFMNPV.

Visando a amplificação do possível *locus v-cath/chiA* em clones de CoveMNPV selecionados no capítulo 3, foram desenhados oligonucleotídeos para sua amplificação (Tabela 5) com base no início da sequência do gene *lef-7* e final do *gp64* do vírus CoveMNPV. Estes foram testados no programa IDT (Integrated DNA Technologies) quanto à formação de homo-dímeros, hetero-dímeros, *hairpin* e características como Tm (Melt Temperature - Temperatura de fusão) e percentual de G+C (guanina e citosina).

Tabela 5. Oligonucleotídeos para amplificação do *locus v-cath/chiA*.

Região intergênica	Direção	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho (mer)
<i>lef-7/gp64</i>	Forward	CTGGTCAAACGGCAACAGACGCAA	24
	Reverse	GCCTTACCGACATATCTTGGGGTAC	25

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base no alinhamento para o gene flanqueador do *v-cath* e *chiA*, *gp64*, de regiões gênicas conservadas entre os vírus pertencentes ao Clado B do gênero *Alphabaculovirus* Grupo I obtidas após alinhamento gênico.

O *locus* foi amplificado por PCR usando DNAs de nove clones purificados por *plaque-assay* (ver capítulo 3) e dos dois isolados de campo (CoveMNPV-NR e -R) como molde. O termociclador (Esco Healthcare Swift MaxPro) foi programado para

uma desnaturação inicial a 95°C/5min, seguida de 30 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação a 95°C/30s, anelamento a 64°C/30s e polimerização a 72°C/30s e uma etapa final de polimerização a 72°C/7min. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1.5%.

5.2.7 Evolução do locus *v-cath/chiA*

As CDSs dos genes *gp64*, *lef-7*, *v-cath* e *chiA* do CfDEFMNPV foram comparadas com as de outros baculovírus já sequenciados usando o programa BLASTx. Análise filogenética foi realizada por meio da sequência de nucleotídeos dos genes *gp64*, *lef-7*, *v-cath* e *chiA*. As sequências nucleotídicas destes 4 genes para os *Alphabaculovirus* do Grupo I com genoma completo sequenciado que as possuem foram alinhadas separadamente utilizando o *translation aligner* e alinhamento MAFFT (Kato et al., 2002). A análise filogenética foi realizada utilizando o método de verossimilhança implementado no programa PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) com os modelos evolutivos (Tabela 6) determinados pelo programa jModelTest (Darriba et al., 2012). O suporte dos ramos foi determinado por *Bootstrap* não-paramétrico com 100 réplicas.

As árvores foram visualizadas e editadas no programa FigTree (Rambaut, 2008).

Tabela 6. Modelos evolutivos dos genes do locus *lef-7/gp64* utilizados para a construção das árvores filogenéticas.

Gene	Sigla	Tamanho (nt)	Modelo Evolutivo
Catepsina	<i>v-cath</i>	975	GTR + I + Γ
Quitinase	<i>chiA</i>	1.662	GTR + I + Γ
Fator de expressão tardia - 7	<i>lef-7</i>	708	GTR + I + Γ
Maior glicoproteína do envelope do BV	<i>gp64</i>	1.605	GTR + I + Γ

GTR: *Generalised Time Reversible* (Tavaré, 1986); I (Invariante): Correção no número de sítios invariáveis; Γ (gama): Correção na taxa de substituição desigual entre sítios.

5.3 Resultados e Discussão

CoveMNPV não possui o gp37

O sequenciamento dos genomas do CoveMNPV-NR e -R gerou 57.733 (tamanho variando de 24 a 599 nucleotídeos) e 37.423 (tamanho variando de 29 a 620 nucleotídeos) *reads*, respectivamente. Após a eliminação de regiões que apresentavam baixa qualidade (erro por base superior a 1%) e de *reads* com tamanho inferior a 20 nucleotídeos, restaram 57.131 (tamanho variando de 21 a 572 nucleotídeos) e 37.204 (tamanho variando de 21 a 609 nucleotídeos) *reads* do CoveMNPV-NR e -R, respectivamente. Estes foram utilizados para a montagem do genoma viral. Do total de *reads* (94.335), 11.555 não alinharam com o genoma montado do CoveMNPV e por isso foram submetidos a análise por BLAST. Análise BLAST mostrou que 2.069 destes *reads* são de baculovírus, porém devido ao grande esforço computacional necessário para realizar o alinhamento permitindo a inserção de muitos *gaps* não foi possível o alinhamento destes no genoma de CoveMNPV. Deste modo, estes podem representar vírus CoveMNPV com grandes deleções no seu genoma. O restante dos *reads*, 9.486, foram identificados como DNA contaminante, principalmente bactérias. Isto é justificado pelo processo de semi-purificação que as amostras foram submetidas, não sendo estas purificadas em gradiente de sacarose antes do processo de obtenção do DNA viral a ser sequenciado.

O genoma do CoveMNPV é de 125.767 pb, sendo assim de tamanho menor que os genomas de AgMNPV e CfDEFMNPV, porém não é o menor dentre os *Alphabaculovirus* do Grupo I. O baculovírus de menor tamanho neste grupo é MaviNPV com um genoma de 111.953 pb. O percentual de A+T é de 57.1% e o de G+C é de 42.9%, havendo assim uma prevalência de A+T compatível com a maioria dos demais representantes da família *Baculoviridae*. Por definição, o gene da poliedrina foi anotado como sendo a ORF 1 e as demais ORFs do genoma de CoveMNPV foram anotadas sequencialmente a partir do gene da poliedrina no seu sentido senso. Um total de 138 ORFs foram anotadas e identificadas por serem comuns ao AgMNPV e/ou CfDEFMNPV, sendo 9 *bros* (*baculovirus repeated ORF* – ORF repetitiva de baculovírus) (Anexo 3). Dezesete supostas ORFs não tiveram correspondência com qualquer outra proteína depositada no *GenBank* (NCBI

databases), podendo assim serem ORFs únicas de CoveMNPV ou regiões não codificantes. Um total de 65 CDSs estão localizadas na fita positiva, sentido do gene da poliedrina, e 73 na fita negativa, antisenso da poliedrina (Figura 16).

O maior gene identificado foi a *helicase* com 3.669 pb codificando uma proteína de 1.222 aminoácidos e massa molecular de 141,167 kDa, o menor foi de uma proteína hipotética similar a ORF 144 do CfDEFMNPV com 159 pb codificando uma proteína de 52 aminoácidos e massa molecular de 6,186 kDa.

Todos os 37 *core genes* da família *Baculoviridae* (*lef-1, lef-2, lef-4, lef-5, lef-8, lef-9, alk-exo, pif-0, pif-1, pif-2, pif-3, pif-4, pif-5, odv-e18, odv-e27, odv-ec43, odv-e25, ac53, ac78, ac68, ac81, vp1054, dnapol, desmoplakin, vlf1, gp41, p95, vp39, p33, helicase, 38k, p40, p48, p47, p18, p6.9 e 49k*) foram identificados no genoma do CoveMNPV. Também foram identificados os 9 genes comuns aos *alpha-, beta-* e *gammabaculovirus* (*polh, dbp, lef-11, fp25k, ac75, ac106/107, ac108, pp34 e ac145*), 1 gene comum aos *alpha-, beta-* e *deltabaculovirus* (*ac23*) e 15 dos 16 genes comuns a todos os *alpha-* e *betabaculovirus* (*pk-1, ac13, lef-6, ubiquitin, pp31, ac38, lef-3, tlp, p12, ac110, p24, me53, exon0, ac146 e ie-1*) (Anexo 3). O gene *gp37*, conhecido como *gp50 spindlin* similar a AcMNPV ORF 64, não foi encontrado em CoveMNPV e também não está descrito em AgMNPV, contrariando a suposição de que este gene é comum a todos os *Alpha-* e *Betabaculovirus* (Garavaglia *et al.*, 2012).

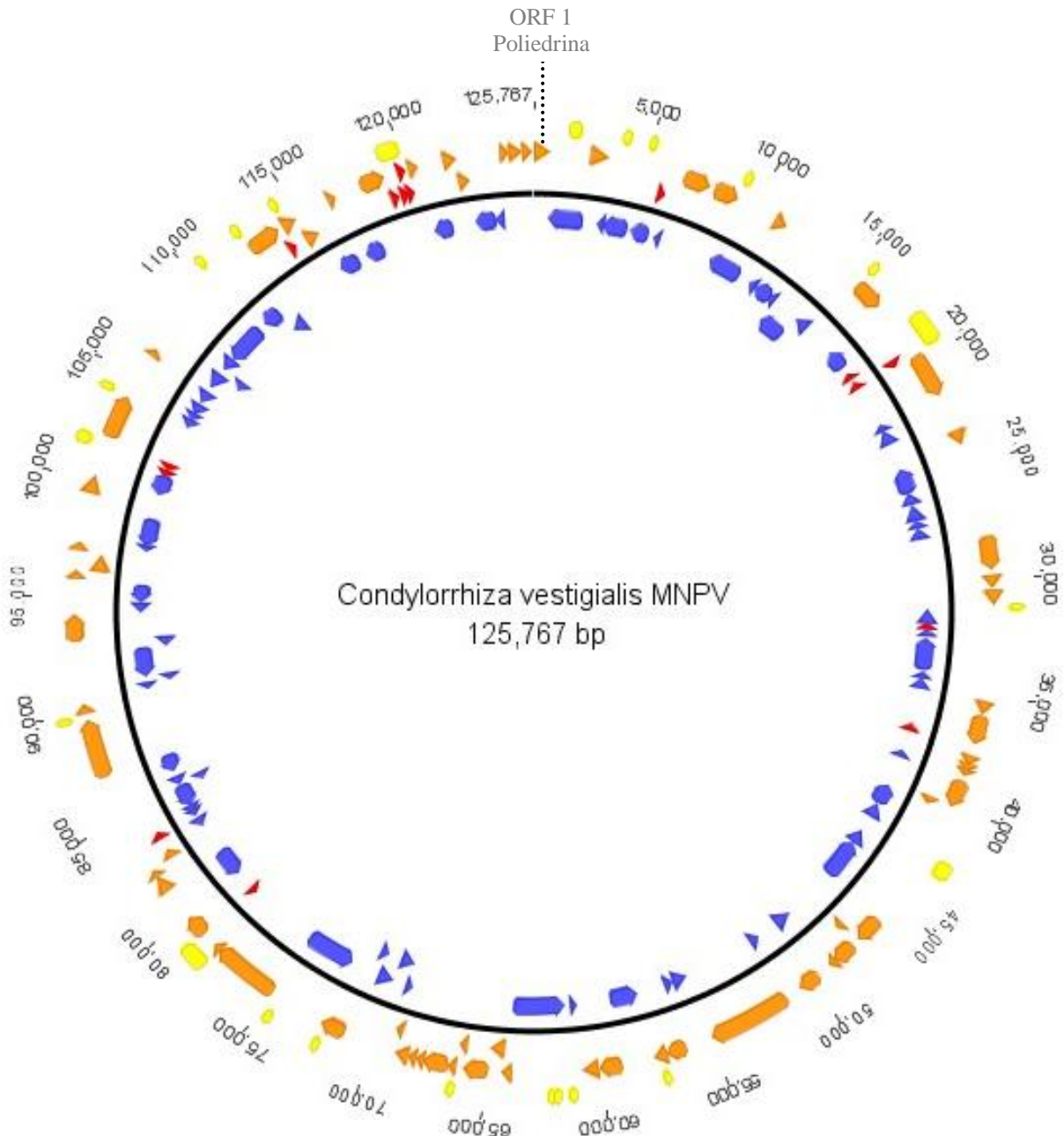


Figura 16. Mapa circular representativo do genoma de CoveMNPV. As setas representam a posição e direção das ORFs, setas laranjas e azuis são ORFs confirmadas na fita positiva e na fita negativa, respectivamente, setas vermelhas são supostas ORFs. O tamanho do genoma completo é destacado no centro do mapa. As sequências repetitivas, *drs* e *hrs*, são indicadas como retângulos amarelos. A ORF 1 é a da poliedrina e está destacada no topo da imagem, a direção desta ORF indica a ordem das demais ORFs. Figura gerada no programa *Geneious 6.0.4*.

Foram detectadas 4 *hrs* (*homologous regions* – regiões homólogas) e 19 *drs* (*direct repeats* – repetições diretas) (Tabela 7). A menor unidade de repetição observada nas 4 *hrs* identificadas, TTGAAAAGCAA ou seu reverso complemento TTGCTTTTCAA, corresponde a 11 pb e foi detectada por meio do BLASTn-2 seq da *hr4*. Nas regiões

hr1, *hr2*, *hr3* e *hr4* foram identificadas 8, 4, 6 e 13 unidades de repetição, respectivamente.

Tabela 7. Regiões repetitivas identificadas no genoma do CoveMNPV. Gerada pelo Programa *Geneious 6.0.4*.

Região Repetitiva	Posição (pb)	Tamanho (pb)
<i>dr</i>	1,496 - 2,068	573
<i>dr</i>	3,928 - 4,008	81
<i>dr</i>	5,036 - 5,094	59
<i>dr</i>	9,255 - 9,309	55
<i>dr</i>	15,659 - 15,713	55
<i>hr1</i>	18,163 - 19,612	1,450
<i>dr</i>	31,181 - 31,255	75
<i>hr2</i>	42,337 - 43,150	814
<i>dr</i>	57,162 - 57,357	196
<i>dr</i>	61,229 - 61,337	109
<i>dr</i>	61,880 - 61,949	70
<i>dr</i>	62,172 - 62,218	47
<i>dr</i>	66,415 - 66,443	29
<i>dr</i>	72,304 - 72,333	30
<i>dr</i>	74,615 - 74,674	60
<i>dr</i>	77,983 - 79,162	1,180
<i>dr</i>	89,675 - 89,744	70
<i>hr3</i>	101,509 - 102,058	550
<i>dr</i>	104,058 - 104,126	69
<i>dr</i>	110,474 - 110,641	168
<i>dr</i>	112,440 - 112,492	53
<i>dr</i>	114,354 - 114,413	60
<i>hr4</i>	119,144 - 120,103	960

CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R tem 99.97% de identidade e alta diversidade genética compartilhada

Os isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R, não apresentaram diferenças nos perfis de restrição com a clivagem do DNA viral com 5 endonucleases de restrição, deste modo, sugerindo que sejam partes da mesma população (Figura 10). A partir da análise comparativa do consenso (nucleotídeos com frequência maior que 50%) para ambos os isolados, foi constatado que eles apresentam 99.97% de identidade

de nucleotídeos, estando a maioria das variações localizadas na proteína hipotética ORF 94 (9 de 31 variações) e lef-9 (5 de 31 variações).

Os SNPs mapeados para cada isolado foram comparados, sendo detectado 598 SNPs para o CoveMNPV-NR e 668 SNPs para o CoveMNPV-R, sendo a maioria localizados em CDSs (91% para o NR e 88% para o R). Dos SNPs localizados em CDSs 221 para o NR e 228 para o R são SNPs não sinônimos, ou seja, tiveram alteração na sequência primária da proteína. Das 138 CDSs identificadas, 100 para o NR e 99 para o R apresentaram algum SNPs. Apenas 158 SNPs para o CoveMNPV-R e 103 para o CoveMNPV-NR foram SNPs exclusivos e 492 foram compartilhados entre os isolados. Destes, 445 estão localizados em regiões codantes, sendo que, 175 provocaram alterações na sequência de aminoácidos. A maioria das mutações pontuais detectadas, 84% para ambos os isolados, foram de transição, sendo as demais classificadas como transversão (10.2% para NR e 11.2% para R) ou substituição (4.8% para NR e 4.6% para R). A análise quantitativa dos polimorfismos encontrados em ambos os isolados está compilada na Tabela 8.

Tabela 8. Análise quantitativa dos polimorfismos observados nos isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R.

Números	CoveMNPV-NR	CoveMNPV-R
SNPs totais	598	668
SNPs em CDS	544	586
CDSs com SNPs	100	99
SNPs não sinônimos	221	228
SNPs tipo transição	508	562
SNPs tipo transversão	61	75
SNPs tipo substituição	29	31
Deleções	8	8
Inserções	6	6
SNPs exclusivos	103	158
SNPs compartilhados	492	492

Apesar de terem sido observados *indels*, apenas inserções e deleções de mais de 3 nt foram consideradas para a análise, ou seja, inserções e deleções pontuais foram desconsideradas. Foram detectadas 6 inserções compartilhadas entre os isolados, sendo que destas, 3 estão localizadas dentro de CDSs. Foram detectadas 9 deleções sendo 7 compartilhadas entre os isolados e uma exclusiva ao CoveMNPV-NR e uma ao -R. Do total de deleções 6, incluindo as exclusivas para NR e R, estão

localizadas dentro de CDSs. Os *indels* identificados estão descritos na Tabela 9, assim como suas relativas posições no genoma.

Tabela 9. *Indels* identificados nos genomas dos isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R e suas relativas posições no genoma viral.

Gene	ORF	Varição	Sequência
Proteína associada ao capsídeo viral	2	Inserção	AGTTTCGATACAAGAGGTTACTAACGTCGTGTTTTTCGTTTACGCCTTTAACGTTAG
Proteína associada ao capsídeo viral	2	Deleção*	GTTTGCATAGGTGGAGGTGAAGGCGCCACAAACG
-	-	Deleção	AAAATGTTTTTTT
Proteína hipotética	22	Deleção	TCG
Proteína hipotética	22	Deleção	AAC
Proteína hipotética	22	Deleção**	ACAACGACCA
Proteína hipotética	22	Deleção	CAC
-	-	Inserção	AAAATGTTGT
-	-	Deleção	TGCACAATAGAATTATTCAACAGTATCATCTAACAGACATAATTGAT
Desmoplakin	80	Deleção	TTCAAACGGTGGTTG
-	-	Inserção	AGAAACAAGTTGTT
-	-	Inserção	TAT
Proteína hipotética	111	Inserção	TGCACAAACAAT
-	-	Deleção	GTCTACTGACACT
Fator de indução do rearranjo da actina	128	Inserção	TTT

*Exclusivo em CoveMNPV R **Exclusivo em CoveMNPV NR

As CDSs de ambos os isolados que apresentaram polimorfismos detectados, sendo estes subdivididos em sinônimos e não sinônimos, estão disponíveis nos gráficos do Anexo 5. Os gráficos mostram o número de variações por nucleotídeo nas ORFs anotadas. Nos genomas do CoveMNPV-R e -NR foram detectadas 5 e 8 ORFs apresentando SNPs não sinônimos e não compartilhados, enquanto que para os SNPs sinônimos não compartilhados este número foi de 12 e 6 ORFs, respectivamente. Para ambos os isolados, o gene que apresentou o maior número de SNPs não sinônimos e sinônimos por nucleotídeo foi a ORF 22 (uma proteína hipotética) e o gene que codifica a proteína básica que se liga ao DNA - *p6.9* (ORF 51), respectivamente. O menor número de SNPs não sinônimos por nucleotídeo foi detectado no gene que codifica a maior glicoproteína do envelope do BV - *gp64* (ORF 28) e no gene que codifica a proteína similar ao transativador global - *gta* (ORF 99) do genoma do CoveMNPV-NR e -R, respectivamente. O *gta* do CoveMNPV-NR foi o segundo gene que menos variou e o *gp64* do CoveMNPV-R não apresentou a única variação presente no NR. Para ambos os isolados, o menor número de SNPs sinônimos por nucleotídeo foi detectado no gene codificador do precursor da ecdisteróide UDP-glicosiltransferase - *egt* (ORF 123).

CoveMNPV é grupo externo ao clado constituído por AgMNPV e CfDEFMNPV

O genoma do CoveMNPV se mostrou muito similar em estrutura e organização aos genomas dos baculovírus AgMNPV e CfDEFMNPV. A maioria das ORFs de CoveMNPV (67,4%) apresenta maior identidade de nucleotídeos com o genoma do CfDEFMNPV (Anexo 3). Em um estudo anterior, análise filogenética baseada apenas no gene *p74* colocou o baculovírus CoveMNPV mais proximamente relacionado ao CfDEFMNPV (Castro *et al.* 2011), porém as análises aqui realizadas utilizando sequências deduzidas de aminoácidos do genoma completo e sequências nucleotídicas de 11 *core genes* desse mesmo vírus permitem concluir que CoveMNPV é uma espécie irmã do clado AgMNPV/CfDEFMNPV (Figura 17 e 18). Os baculovírus AgMNPV e CfDEFMNPV são filogeneticamente mais próximos entre si e ligeiramente distantes de CoveMNPV.

Corroborando a classificação filogenética do CoveMNPV como grupo externo ao clado AgMNPV/CfDEFMNPV, a árvore baseada em sequências nucleotídicas concatenadas de 11 *core genes* agrupou do mesmo modo o AgMNPV/CfDEFMNPV e CoveMNPV, com *bootstrap* igual a 100% (Figura 18). CoveMNPV é mais próximo ao CfDEFMNPV do que com o AgMNPV conforme mostram resultados de busca por baculovírus com maior identidade de nucleotídeos (Anexo 3) e por análise filogenética pela observação da menor distância evolutiva (comprimento do ramo) entre CoveMNPV e CfDEFMNPV (Figura 18).

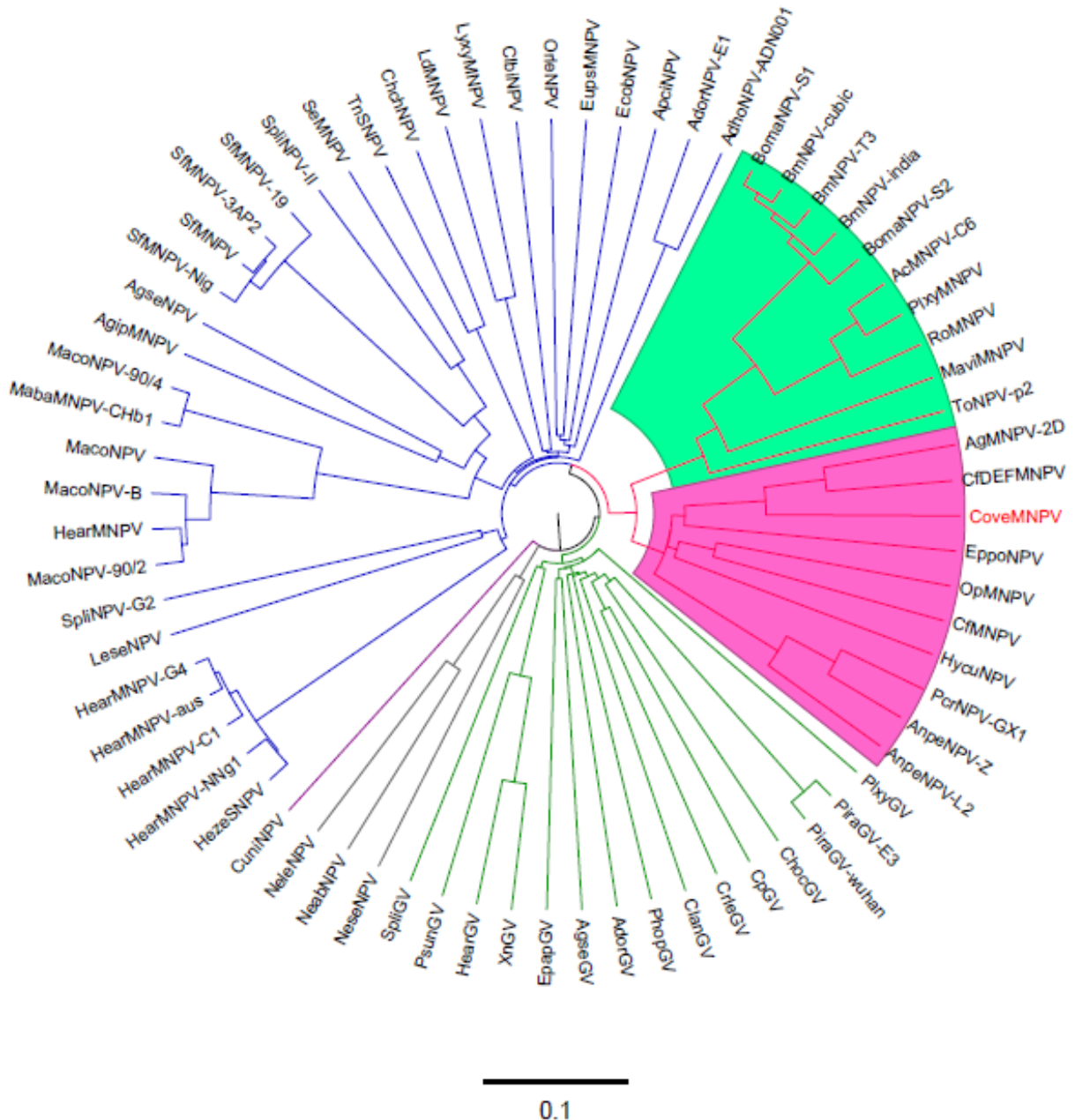


Figura 17. Relações filogenéticas de CoveMNPV com os demais baculovírus da família *Baculoviridae*. Para as análises foram utilizadas sequências deduzidas de aminoácidos de genomas completos de 70 baculovírus. Os táxons foram agrupados em: gênero *Alphabaculovirus* Grupo II (em azul); gênero *Alphabaculovirus* Grupo I clado A (rosa destacado em verde); gênero *Alphabaculovirus* Grupo I clado B (rosa destacado em rosa); gênero *Betabaculovirus* (em verde); gênero *Gammabaculovirus* (em cinza); gênero *Deltabaculovirus* (em roxo). O táxon do CoveMNPV está indicado em vermelho. Árvore gerada pelo *Composition Vector Tree* v.2 (Xu e Hao, 2009) e editada usando o programa *FigTree* (Rambaut, 2008). Barra: 0,1 substituição por sítio.

Das 11 árvores construídas, uma para cada *core genes*, 9 mantiveram o CoveMNPV como grupo externo ao AgMNPV e CfDEFMNPV e em apenas duas, *pif-0* (*p74*) e *lef-9*, mostraram AgMNPV e CfDEFMNPV como grupos externos, respectivamente (Anexo 4). As árvores dos genes *pif-0*, *lef-9*, *alk-exo*, *lef-8* e *pif-2* apresentaram um

alto valor de *bootstrap* para o clado CoveMNPV e AgMNPV/CfDEFMNPV, entretanto para os demais (*pif-1*, *pif-3*, *pif-5*, *odv-e18*, *odv-e27* e *odv-ec43*) este índice foi baixo. Os genes que apresentaram os menores *bootstraps*, *pif-3* e *odv-e18*, podem ser justificados pelo pequeno tamanho das sequências de nucleotídeos, 633 e 306, respectivamente que podem não apresentar informação suficiente para resolver este ramo (Tabela 4).

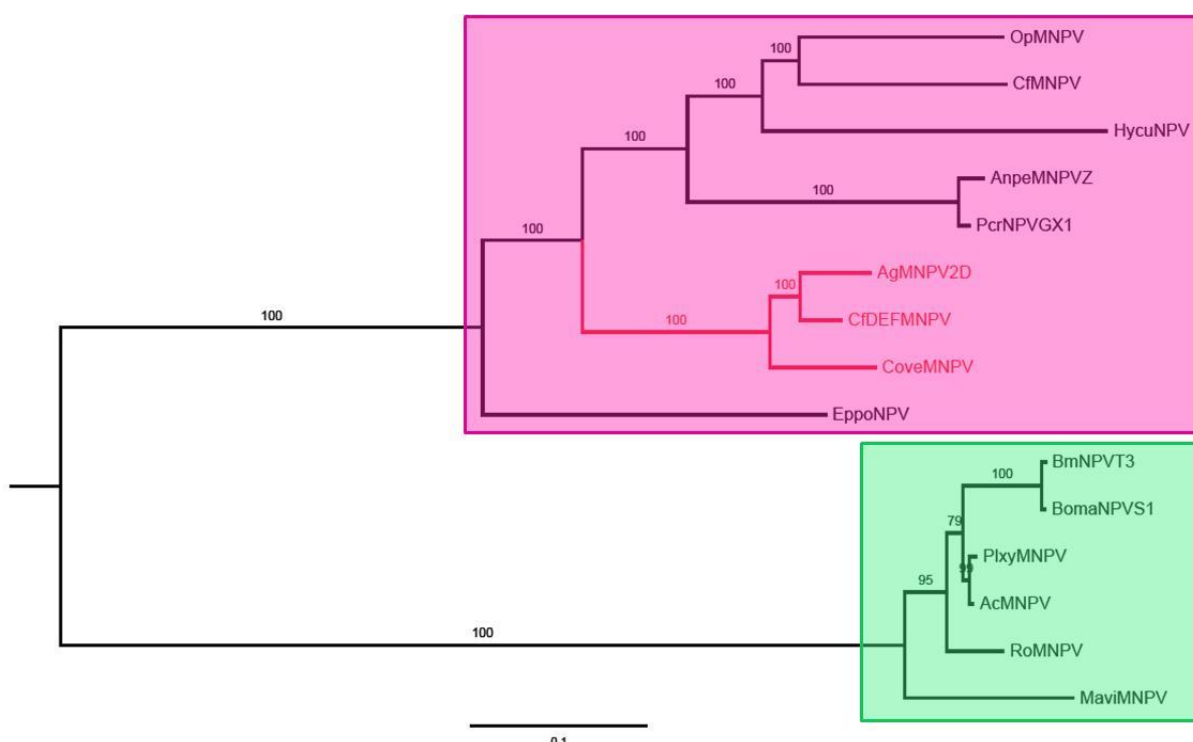


Figura 18. Árvore filogenética de CoveMNPV e 14 *Alphabaculovirus* do grupo I construída com base na concatenação das sequências nucleotídicas de 11 *core genes*: *alk-exo*, *lef-8*, *lef-9*, *pif-0*, *pif-1*, *pif-2*, *pif-3*, *pif-5*, *odv-e18*, *odv-e27* e *odv-ec43*. Os táxons foram agrupados em: *Alphabaculovirus* do Grupo I clado B (em rosa), *Alphabaculovirus* do Grupo I clado A (em verde). O táxon do CoveMNPV está destacado em vermelho. Árvore gerada pelo PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) com modelos evolutivos determinados pelo jModelTest (Darriba et al., 2012) e editada com o programa FigTree (Rambaut, 2008). Os valores de *bootstrap* (%) para 100 replicatas estão indicados nos ramos. Barra: 0,1 substituição por sítio.

O locus *lef-7/gp64* de CoveMNPV e AgMNPV tem uma alta identidade

O BLASTn-2seq e BLASTx-2seq entre os *reads* obtidos pelo sequenciamento 454 de ambos os isolados, CoveMNPV-NR e -R, e os genes *v-cath* e *chiA* do CfDEFMNPV não encontrou nenhuma correspondência (dados não mostrados). Com o sequenciamento do genoma completo dos isolados de campo foi possível comprovar que os genes *v-cath* e *chiA* estão ausentes do genoma do vírus CoveMNPV em ambas as amostras do campo. Portanto, os genes catepsina e

quitinase não são os responsáveis pelo raro evento de liquefação do tegumento larval observado no campo e em ensaios realizados em laboratório. O alinhamento realizado entre o provável *locus v-cath/chiA*, região intergênica *lef-7/gp64*, com o genoma do AgMNPV, vírus próximo ao CoveMNPV que apresenta deleção destes genes do seu genoma, evidenciou uma região similar ao do AgMNPV com identidade de nucleotídeos de 65% (Figura 19).

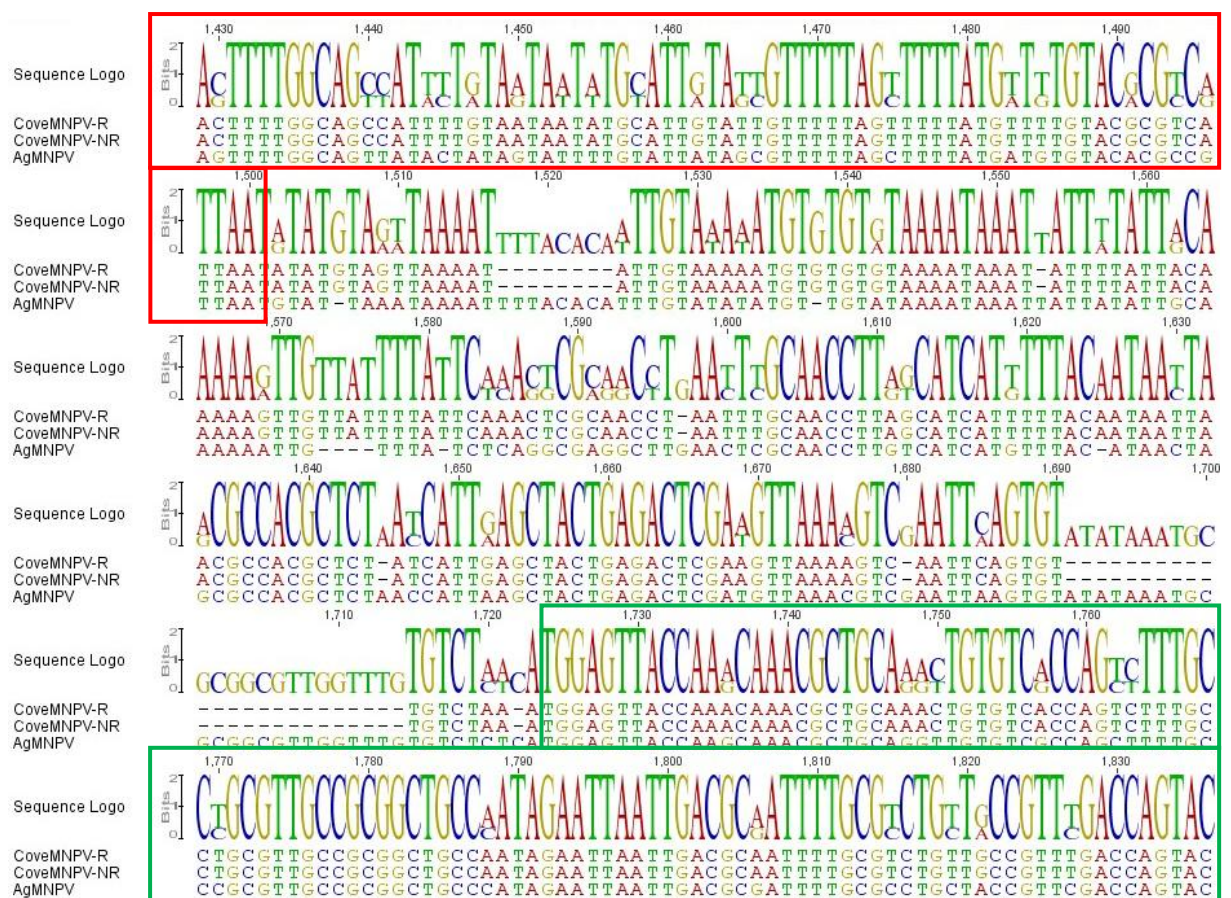


Figura 19. Alinhamento do provável *locus v-cath/chiA* de CoveMNPV. Região intergênica *lef-7/gp64* do CoveMNPV e AgMNPV. Sequência parcial do gene *gp64* (retângulos vermelhos). Sequência parcial do gene *lef-7* (retângulos verdes).

Os genes *gp64* e *lef-7* do CoveMNPV e AgMNPV apresentam uma alta identidade de sequência, aproximadamente 97% e 94%, respectivamente. As sequências nucleotídicas dos genes flanqueadores do provável *locus v-cath/chiA*, *lef-7/gp64*, e da região intergênica onde houve a deleção do *v-cath* e *chiA* são idênticas para ambos os isolados de CoveMNPV (Figura 19).

Visando a certificação da ausência destes genes (*v-cath/chiA*) até mesmo em amostras virais presentes em baixa frequência na população do isolado de campo (CoveMNPV-NR), uma reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para a amplificação da região intergênica *lef-7/gp64* foi conduzida utilizando como molde DNA de 9 clones purificados e dos 2 isolados de campo. A identificação do tamanho do amplicon por análise em gel de agarose mostrou, para todas as amostras, um único fragmento de 403pb, tamanho esperado na ausência destes genes (Figura 20). Deste modo, assim como na população que deu origem aos clones, é esperado que os genes *v-cath* e *chiA* estejam ausentes do genoma dos clones virais, ao menos no seu provável *locus* conservado entre todos os *Alphabaculovirus* do Grupo I.

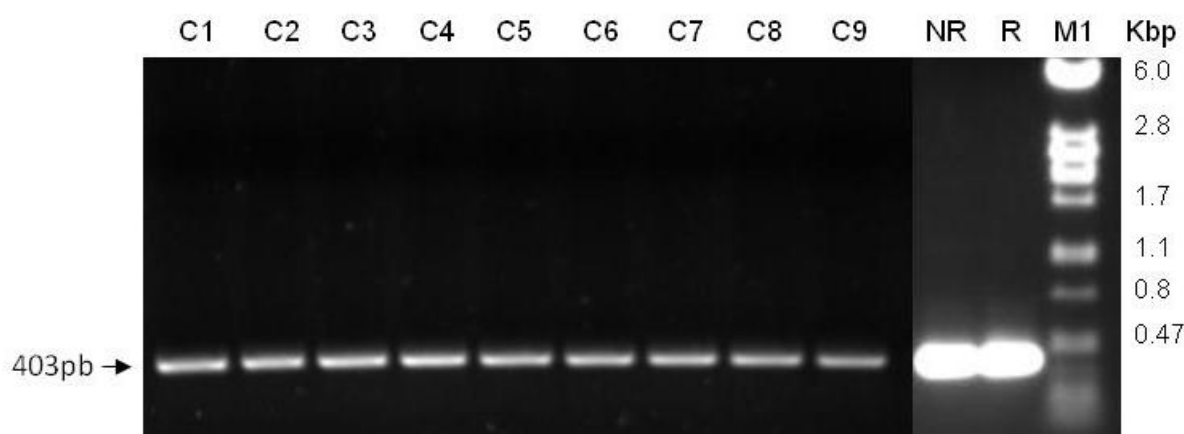


Figura 20. Produtos de PCR resultantes da amplificação da região intergênica *lef-7/gp64* para os 2 isolados de campo e 9 clones de CoveMNPV. Um único fragmento de 403pb é evidenciado no gel (seta). Linha M1: marcador de massa molecular em pares de base (bp), DNA lambda clivado com *Pst*I; Linhas C1-C9: clones CoveMNPV-C1 ao -C9; Linhas NR e R: isolados de campo CoveMNPV-NR e -R. Gel de agarose 1%.

Dentre os 66 genomas de *Alpha-* e *Betabaculovirus* completamente sequenciados, 11 não apresentam os genes catepsina e quitinase (Tabela 2). Em 63 casos, estes genes foram perdidos em conjunto, em 2 e 1 apenas a quitinase e catepsina não estão presentes, respectivamente. Até então, estes genes estavam ausentes em apenas 2 dos 19 *Alphabaculovirus* do Grupo I com genoma completo sequenciado. Devido ao não agrupamento filogenético dos baculovírus com deleção destes genes supõe-se que esta perda ocorreu em eventos evolutivos distintos, evidenciando que a eficiência da transmissão viral pode não ser estritamente dependente desses

genes. CoveMNPV é o terceiro baculovírus deste clado em que se detecta a ausência das sequências gênicas *v-cath* e *chiA* em seu genoma.

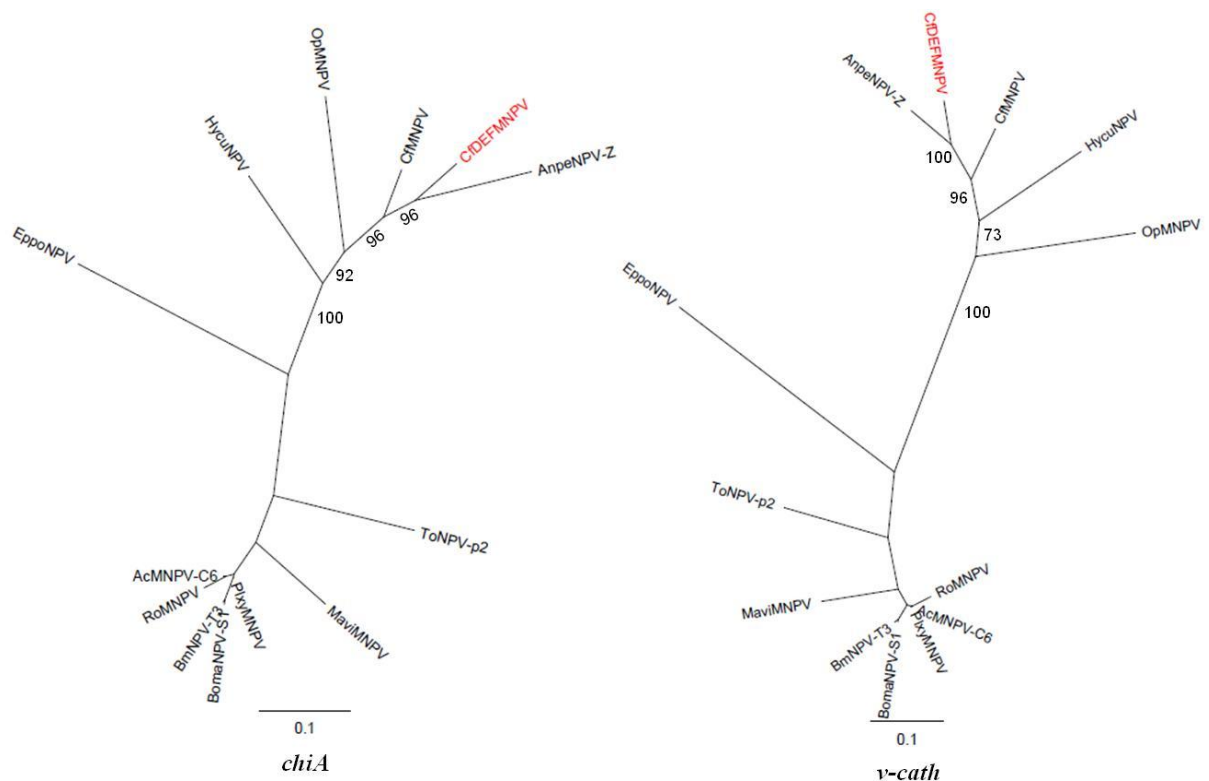
A ausência ou a não expressão dos genes *v-cath* e *chiA* pode atrasar a liberação das partículas virais oclusas para o meio ambiente, o que em geral ocorre no final do ciclo de infecção com produção máxima das partículas virais (poliedros ou grânulos). A perda do fenótipo de liquefação se torna uma vantagem quando este vírus é utilizado no controle integrado de pragas, pois devido a não liquefação da lagarta morta pelo vírus a coleta pelo agricultor destas lagartas infectadas se torna mais fácil havendo, portanto, uma seleção direcionada pelo agricultor (Moscardi, 1999).

A perda do *v-cath/chiA* ocorreu no ancestral de CoveMNPV/AgMNPV/CfDEFMNPV

Análises filogenéticas mostraram que os genes *v-cath* e *chiA* de baculovírus formam um grupo monofilético, e provavelmente foi adquirido por transmissão horizontal, de insetos ou bactérias, por um baculovírus ancestral dos gêneros *Alpha-* e *Betabaculovirus* (Kang *et al.*, 1998). Entretanto, estes genes não estão presentes em todos os baculovírus sequenciados (AgMNPV-2D: Oliveira *et al.*, 2006; PcrNPV: Qian *et al.*, 2013; AdhoNPV: Nakai *et al.*, 2003; AdorNPV: Hilton e Winstanley, 2008; AdorGV: Wormleaton *et al.*, 2003; ChocGV: Escasa *et al.*, 2006; PhopGV: Taha *et al.*, 2000; PlxyGV: Hashimoto *et al.*, 2000; SpliGV: Wang *et al.*, 2008; HearGV: Harrison e Popham, 2008), sugerindo portanto a ocorrência de múltiplos eventos de perda destes genes.

Diante dos resultados apresentados da análise filogenética do CoveMNPV, foi levantada a questão de como se deu o evento evolutivo para a perda destes genes em CoveMNPV e AgMNPV, mas não em CfDEFMNPV. Tendo em vista que o CfDEFMNPV, mais próximo filogeneticamente de AgMNPV, possui ambos os genes no seu genoma, duas hipóteses foram levantadas para explicar este evento. A primeira é de que a perda destes genes tenha ocorrido em eventos independentes em AgMNPV e CoveMNPV, assim como em muitos outros baculovírus sequenciados. Alternativamente, poderia ter ocorrido antes da especiação do CoveMNPV, ou seja no ancestral de CoveMNPV/AgMNPV/CfDEFMNPV com posterior reaquisição destes genes pelo CfDEFMNPV.

Ambas as hipóteses descritas acima dependem da ocorrência de pelo menos dois eventos evolutivos (perda/perda ou perda/ganho). Portanto, para compreender a evolução desse *locus*, os genes *v-cath*, *chiA* e seus flaqueadores *lef-7* e *gp64* foram submetidos à análise filogenética. O resultado do BLASTx (dados não mostrados) para os genes *v-cath* e *chiA* de CfDEFMNPV mostrou maior identidade com os dos *Alphabaculovirus* do Grupo I e por isto a análise filogenética foi baseada apenas nos baculovírus deste grupo. Para que a primeira hipótese aqui levantada seja verdadeira, ou seja, para que a perda dos genes em AgMNPV e CoveMNPV tenha ocorrido independentemente, a catepsina e a quitinase do CfDEFMNPV deveriam estar agrupadas filogeneticamente no clado B próximo ao EppoNPV, pois o CfDEFMNPV é mais próximo filogeneticamente ao EppoNPV. No entanto, as árvores geradas tanto para o *v-cath* quanto para o *chiA* mostram estes mais filogeneticamente próximos ao CfMNPV e AnpeNPV-Z (Figura 21).



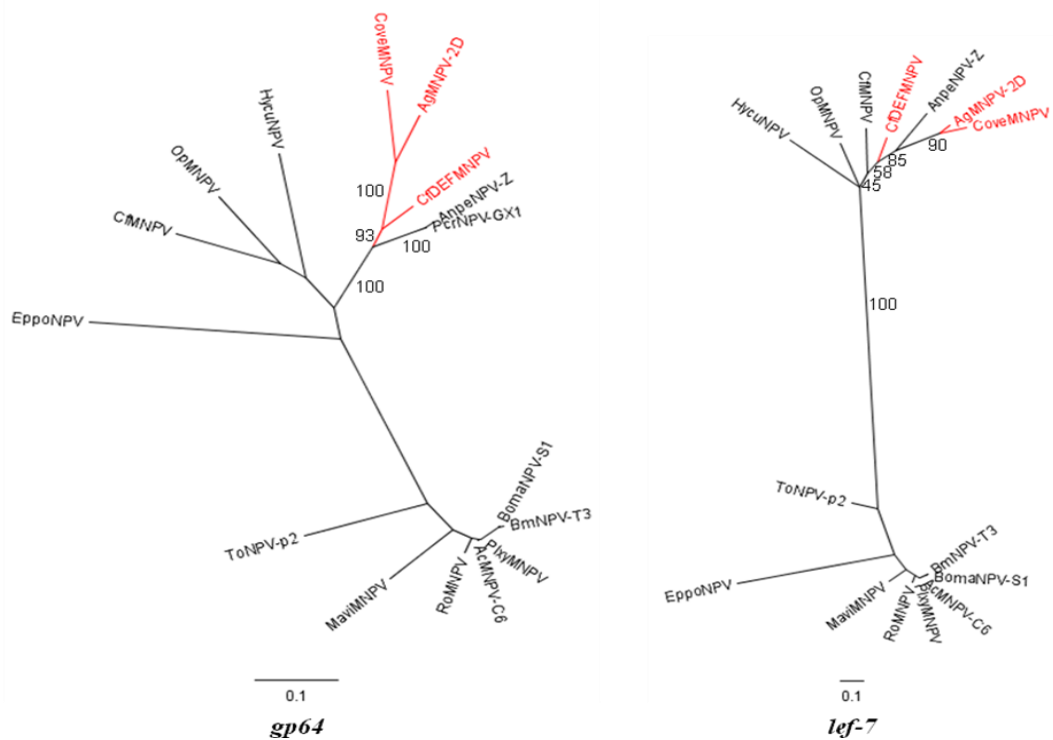


Figura 21. Árvores filogenéticas dos genes *v-cath*, *chiA*, *gp64* e *lef-7*. Táxon AgMNPV, CfDEFMNPV e CoveMNPV estão destacados em vermelho. Árvores geradas pelo PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) com modelos evolutivos determinados pelo jModelTest (Darriba et al., 2012) e editadas com o programa FigTree (Rambaut, 2008). Os números nos ramos indicam o valor de *bootstrap* (%). Barra: 0,1 substituição por sítio.

Ao analisar as árvores geradas pelas análises filogenéticas dos genes flancadores, o gene *gp64* do CfDEFMNPV se mostrou externo ao clado do CoveMNPV e AgMNPV, sendo o *gp64* de AgMNPV e CoveMNPV mais próximos filogeneticamente. O *lef-7* do CfDEFMNPV se mostrou externo ao AgMNPV e CoveMNPV apresentando apenas parte do gene similar a estes taxons e mais próximo filogeneticamente ao CfMNPV podendo a recombinação ter acontecido de maneira a envolver este gene.

O baculovírus CfDEFMNPV foi isolado de uma população de CfMNPV do campo (Arif *et al.*, 1984). Este vírus é um defeutivo e por isto não é capaz de infectar oralmente lagartas *C. fumiferana* sem a presença de um vírus *helper*. Neste caso, o vírus *helper* é o CfMNPV que complementa o defeutivo por coinfeção. Entre o *lef-7* e *chiA* do CfDEFMNPV e CfMNPV (Lauzon *et al.*, 2005; de Jong *et al.*, 2005) há uma sequência repetitiva (*hr*), região sujeita a alta frequência de recombinação. Deste modo, há um ambiente favorável para que o evento de recombinação ocorra por

meio da coinfeção do CfDEFMNPV e CfMNPV em infecções em lagartas *C. fumiferana*. O evento de recombinação entre eles pode ter envolvido parte do *lef-7* o que pode ter promovido a aquisição pelo CfDEFMNPV do *v-cath* e *chiA* do vírus *helper*.

Portanto, a segunda hipótese levantada aonde a perda destes genes ocorreu ancestralmente a especiação do clado do AgMNPV, CoveMNPV e CfDEFMNPV pode ser verdadeira. A aquisição pelo CfDEFMNPV por recombinação com o CfMNPV pode ser suportada pela análise filogenética dos genes *v-cath*, *chiA* e *lef-7*.

5.4 Conclusão

CoveMNPV possui um genoma de dsDNA circular de 125.767 pb e um percentual de G+C de 42.9%. Foram identificadas 138 ORFs, 9 *bros*, 4 *hrs*, 19 *drs* e 17 supostas ORFs, sendo a maioria dentro de regiões repetitivas, que foram marcadas como conflito, pois não tiveram correspondência com nenhuma outra proteína depositada no *GenBank* (NCBI), podendo assim serem ORFs únicas de CoveMNPV ou regiões não codificadoras. O maior gene identificado foi a *helicase* com 3.669 pb e o menor foi uma proteína hipotética similar a ORF 144 do CfDEFMNPV com 159 pb. Dentre os genes identificados estão os 37 *core genes*, 9 genes comuns aos *Alpha-*, *Beta-* e *Gammabaculovirus*, 1 gene comum aos *Alpha-*, *Beta-* e *Deltabaculovirus* e 15 dos 16 genes comuns a todos os *Alpha-* e *Betabaculovirus*, estando o gene *gp37* ausente.

A busca por polimorfismos no genoma completo dos isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R não mostrou grandes alterações entre as populações o que mostra baixa diversidade genética entre eles. Porém, dentro de uma mesma população de CoveMNPV foi observada alta diversidade genética. A reconstrução filogenética do CoveMNPV, tanto para a sequência deduzida de aminoácidos de todas as ORFs identificadas como a sequência nucleotídica de 11 *core genes*, corroborou para a elucidação da classificação anterior do vírus (Castro *et al*, 2011) colocando CoveMNPV como pertencente ao gênero *Alphabaculovirus* Grupo I clado B, grupo externo ao AgMNPV e CfDEFMNPV. A maioria de suas ORFs identificadas apresentaram maior identidade com o genoma do CfDEFMNPV.

A partir da análise dos fatores responsáveis pelo evento de liquefação do tegumento larval, genes *v-cath/chiA* presentes no genoma da maioria dos baculovírus já identificados, não foi possível explicar a ocorrência de lagartas *C. vestigialis*, infectadas pelo baculovírus CoveMNPV, apresentando o tegumento liquefeito. Isto não foi possível devido à ausência dos genes virais responsáveis por estas características, catepsina e quitinase, no genoma do CoveMNPV. O provável *locus v-cath/chiA* de CoveMNPV é altamente similar ao de AgMNPV, *Alphabaculovirus* do Grupo I com deleção dos genes catepsina e quitinase.

Análise evolutiva do *locus lef-7/gp64* suporta a hipótese de que o evento de perda dos genes *v-cath* e *chiA* pelo CoveMNPV e AgMNPV pode ter ocorrido em um único

evento, ou seja, no ancestral de CoveMNPV/AgMNPV/CfDEFMNPV. Deste modo, a presença destes genes no CfDEFMNPV pode ser devido a um evento de recombinação com o CfMNPV.

CAPÍTULO 3**Obtenção de Clones de CoveMNPV e Relevância
Biológica das suas Diferenças Genotípicas**

6 OBTENÇÃO DE CLONES DE CoveMNPV E RELEVÂNCIA BIOLÓGICA DAS SUAS DIFERENÇAS GENOTÍPICAS

6.1 Introdução

Um dos primeiros passos para a identificação de um baculovírus é a realização de uma análise do perfil de restrição do DNA viral. Quando bandas submolares são observadas no perfil gerado, há uma evidência de que variantes genotípicos estão presentes na população estudada. Para a purificação de clones de uma população podem ser realizados ensaios de purificação em placa (*plaque assay*) ou diluição viral seriada (O'Reilly *et al.*, 1994). Porém, a amplificação em cultura de células dos clones obtidos pode gerar mutantes em decorrência da passagem deste vírus *in vitro* (Miller, 1986). Dentre os vários tipos de mutações que podem surgir em decorrência da passagem seriada do baculovírus em cultura de células, o mutante de “poucos poliedros” (*few polyhedra* - FP) e o mutante denominado “partícula interferente defectiva” (*Defective Interfering Particle* - DIP) são os mais frequentes. O FP apresenta uma diminuição no número de OBs e aumento no número de BVs formados, a formação de oclusões sem vírions ou com morfologia alterada (Harrison e Summers, 1995). O DIP apresenta deleção de grande parte do genoma viral e assim de genes essenciais tornando-o não infectivo, para que a infecção ocorra, este necessita ser coinfectado com o vírus selvagem (Kool *et al.*, 1991; Pijlman *et al.*, 2001; Wickham *et al.*, 1991).

Este capítulo tem como objetivo investigar uma possível relevância biológica, quanto ao grau de virulência, associada às diferenças genotípicas previamente detectadas por análises de restrição entre clones de CoveMNPV purificados por *plaque-assay*. Também se propõem identificar se as diferenças detectadas entre os clones selecionados são resultantes da passagem do baculovírus em cultura de células ou decorrentes da purificação de variantes genotípicos presentes na população de campo.

6.2 *Materiais e Métodos*

6.2.1 *Vírus, Células e Insetos*

O vírus CoveMNPV foi obtido de larvas *C. vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) infectadas, coletadas em área de cultivo de Álamo (*Populus* spp., Salicaceae) em Cascavel-PR. Este vírus foi multiplicado em larvas *C. vestigialis*, em laboratório, e enviado pelas empresas Swedish Match do Brasil S.A (Edilene B. Machado) e Bosquiroli & Santos LTDA (Bráulio Santos) ao Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN). Células de *Spodoptera frugiperda*, linhagem IPLB-SF21-AE (Vaughn, 1977), foram utilizadas para estudos *in vitro* do vírus, tendo em vista que estudos prévios demonstraram que essas células foram suscetíveis ao vírus CoveMNPV (Castro *et al.*, 2004). Lagartas sadias obtidas da criação massal de *C. vestigialis* foram cedidas pela empresa Bosquiroli & Santos LTDA (Bráulio Santos) para que testes de infectividade *in vivo* pudessem ser realizados.

6.2.2 *Transfecção de células SF21*

Para a purificação dos possíveis variantes genotípicos de CoveMNPV, células SF21 foram transfectadas com DNA viral conforme protocolo do reagente *Cellfectin* (Invitrogen). Para isto, 3×10^5 células/placa 35mm foram plaqueadas e incubadas a 27°C por 16h. Foram diluídos 9 µL de *cellfectina* em 100 µL de meio TNMFH sem antibiótico e 2µg de DNA de CoveMNPV-IC (CoveMNPV isolado do campo) em 100µL de meio TNMFH sem antibiótico. DNA e *cellfectina* diluídos foram combinados e incubados 45min à temperatura ambiente. O meio das células foi removido e as células lavadas um vez com meio sem antibiótico, posteriormente foram adicionados 800µL de meio no sistema de diluição combinado e o total de 1mL foi adicionado às células que foram incubadas a 27°C/5h. O sobrenadante foi descartado e 2mL de meio completo com antibiótico foram adicionados, o sistema foi incubado a 27°C. A partir de 72h p.i. a infecção foi monitorada e a 10d p.i. os BVs foram coletados e armazenados a 4°C. O estoque de BVs foi amplificado duas vezes em placa 35mm onde, como inóculo, foram acrescentados 500µL do sobrenadante da infecção anterior e após 1h de adsorção do vírus o sistema de infecção foi completado com meio TNMFH com soro para um volume final de 2mL. Os BVs de CoveMNPV-IC da 2ª passagem foram amplificados em garrafinha T-25 onde, como

inóculo, foi acrescentado 1mL do sobrenadante da infecção anterior e após 1h de adsorção do vírus o sistema de infecção foi completado com meio TNMFH com soro para um volume final de 5mL. Os BVs da 3ª passagem, nomeados de CoveMNPV-II (inóculo inicial de purificação dos clones), foram coletados 5d p.i. e armazenados a 4°C até sua utilização.

6.2.3 Plaque assay e amplificação de clones virais

A purificação em placa dos possíveis variantes genotípicos detectados em corrida em gel de agarose dos fragmentos resultantes da clivagem do DNA viral com endonucleases foi realizada conforme O'Reilly *et al.* (1994) com modificações. Para certificação da purificação de um clone viral é necessário que ao menos três *plaque assays* sucessivos sejam realizados, para isto foram conduzidos como descrito em seguida. Células SF21 em uma concentração de 1×10^6 foram semeadas em placas de 60mm com 4mL/placa de meio TNMFH e incubadas a 27°C por 16h. A infecção das células foi realizada com 1mL das diluições seriadas do estoque viral de BVs do CoveMNPV-II (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) em meio TNMFH sem soro. Após 1h de adsorção o sobrenadante foi substituído por 4mL de agarose SeaKem ME 0.5% (diluição realizada em meio de cultura TNMFH). Aguardou-se a polimerização à temperatura ambiente, por aproximadamente 15min e em seguida, as placas foram armazenadas a 27°C/4d. Para melhor visualização das unidades formadoras de placa (*plaque forming units* - pfu) e posterior coleta dos clones virais, as placas foram coradas com *neutral red*, corante para células vivas, e incubadas a 27°C por 16h. Após marcação dos pontos de coleta, local de infecção, sob o microscópio óptico, o plote coletado foi diluído em 400µL de meio TNMFH sem soro e após forte homogenização no vortex para a liberação dos BVs da agarose, o vírus foi amplificado três vezes antes do próximo *plaque assay*. Para a primeira amplificação, placas de 96 poços foram semeadas com 1×10^4 células SF21/poço e como inóculo foram utilizados 100µL de vírus/poço. A segunda amplificação foi realizada em placas de 12 poços, semeadas com 2×10^5 células SF21/poço e, após incubação por 16h, foram adicionados 400µL do sobrenadante da primeira amplificação. A última amplificação foi realizada em garrafas T-25, semeadas com 1×10^6 células SF21/garrafa e, após incubação por 16h, foram adicionados 1mL do sobrenadante da segunda amplificação. Dando continuidade a purificação, mais dois *plaque*

assays foram realizados, intercalados de três ampliações. Para a produção de estoques dos clones, o terceiro *plaque assay* foi amplificado em sete garrafas T-75 contendo 8×10^6 células SF21/garrafa, usando 500µL de vírus do sobrenadante de sua terceira amplificação. O DNA dos clones foi purificado a partir de 30mL do estoque, clivados com enzima de restrição e analisados por eletroforese em gel de agarose. Os clones foram identificados e selecionados com base nas possíveis diferenças detectadas entre os perfis de restrição.

6.2.4 Extração de DNA a partir de BVs

Os procedimentos de concentração viral e de extração de DNA a partir de BVs foram realizados conforme descrito por O'Reilly *et al.*(1994). Inicialmente 30mL do estoque de BVs (quarta passagem) foi concentrado por ultra-centrifugação em colchão de sacarose. Para isto, ao estoque viral foram adicionados 4mL da solução de sacarose 25% (sacarose 25% diluída em NaCl 5mM e EDTA 10mM) e então submetido à ultra-centrifugação a 24.000rpm/75min/4°C (Sorvall Ultra Pro 80 rotor AH-629). O precipitado, correspondente aos BVs, foi gentilmente ressuspenso em 2mL de tampão de ruptura (10mM de Tris-HCl, pH 7.6; 10 mM EDTA e 0,25% SDS) e 50µl de proteinase K 20mg/mL (concentração final 0,5mg/mL). O sistema foi incubado a 37°C por 16h. A partir desta etapa, a extração do DNA foi realizada conforme item 4.2.4 do capítulo 1.

6.2.5 Clivagem de DNA dos clones virais

Visando a seleção dos clones, 1µg do DNA extraído de cada clone foi clivado com a endonuclease *Pst*I e o sistema montado conforme instruções do fabricante da enzima. A incubação foi realizada a 37°C, *overnight*. Para seleção dos clones virais, seus DNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, conforme descrito no item 4.2.6.

O DNA dos clones selecionados foi clivado com três endonucleases de restrição: *Bst*EII, *Hind*III e *Pst*I. Para cada sistema de digestão, montado conforme instrução do fabricante das enzimas, foi utilizada cerca de 1µg de DNA e incubação a 37°C ou 60°C (conforme a temperatura ótima da enzima) por 16h.

6.2.6 Quantificação da produção de BVs - TCID₅₀

O estoque de BVs dos clones selecionados e inóculo inicial utilizado para a purificação dos clones *in vitro* foram quantificados por meio de um ensaio de titulação viral (50% Tissue Culture Infectious Dose - TCID₅₀) para que pudessem ser realizados os ensaios comparativos de infectividade *in vitro*. O TCID₅₀, baseado em O'Reilly, 1994, foi realizado em triplicata sendo cada replicata realizada em placa de 96 poços. As diluições seriadas de base 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) foram aplicadas em cada replicata em 10 poços e para cada diluição 2 poços foram adicionados como controle negativo. O título viral foi calculado com dados coletados 7d p.i conforme descrito por Reed e Muench (1938). A titulação também foi realizada após o ensaio de infectividade *in vitro* visando assim à comparação da produtividade de BVs entre as amostras.

6.2.7 Ensaio de Infectividade viral *in vitro*

Visando análise comparativa da replicação viral *in vitro* entre os clones selecionados e inóculo inicial, foram realizados ensaios de infectividade onde foi avaliado o percentual de células infectadas, possíveis variações na produção de OBs e BVs e características morfológicas das partículas infectivas (OBs). Para isto, placas de 6 poços foram semeadas com 6×10^5 células SF21/poço e infectadas em triplicata a um MOI 10, após 1h de infecção o inóculo foi removido e as células lavadas 1x com meio. As infecções foram incubadas a 27°C e acompanhadas diariamente por microscopia óptica, as análises foram realizadas 3d p.i.

6.2.8 Produção de OBs

As células foram ressuspensas 3d p.i e uma fração de cada replicata foi retirada para contagem das células ao microscópio usando um hemacitômetro (câmara de Neubauer). A fórmula abaixo foi utilizada para obtenção do número de células infectadas e sadias por mL (Moraes e Alves, 1986).

$$\text{Média } (\Sigma 4 \text{ campos}) \times 10^4 = n^\circ \text{ células/mL}$$

Parte das células ressuspensas foram sedimentadas a uma centrifugação de 10.000rpm/10min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, Eppendorf) e o precipitado ressuspenso em SDS 1%, após 1h à temperatura ambiente os OBs liberados pela lise das células foram sedimentados a 10.000rpm/10min

(Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*) e ressuspensos em H₂O. O sobrenadante da infecção foi armazenado para realização do TCID₅₀. Uma fração para cada replicata foi adicionada ao hemacitômetro onde o número de OBs foi estimado em 10 campos distintos. A fórmula abaixo foi utilizada para obtenção do número de partículas OBs por mL (Moraes e Alves, 1986).

$$(\Sigma 10 \text{ campos})/2 \times 50.000 \times \text{fator de diluição} = n^{\circ} \text{ OBs/mL}$$

6.2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os OBs foram sedimentados a 10.000rpm/5min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*) e o precipitado fixado em glutaraldeído 2% e tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7.2) e agitado por 16h. O material fixado foi centrifugado a 8.000rpm/5min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*) e o sobrenadante descartado. Foram realizadas 3 sucessivas lavagens com tampão cacodilato 0,1M intercaladas por centrifugação a 8.000rpm/5min (Microcentrífuga 5415R rotor F-45-24-11, *Eppendorf*). O pellet foi pós-fixado em tetróxido de ósmio 2% e deixado agir por 2h, e então centrifugado e lavado com água Milli-Q por 5 vezes. Para a contrastação o pellet foi ressuspense em acetato de uranila 0,5%, armazenado a 4°C por 16h (tubo envolto em papel laminado). A desidratação foi feita em séries crescentes de etanol (10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%) com intervalos de 10min entre uma troca e outra, seguida de centrifugação e ressuspensão do pellet na concentração maior de etanol. A infiltração foi realizada removendo-se parte do etanol 100% e acrescentando-se resina, seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram colocadas em moldes próprios e postas a polimerizar por 48h em estufa a 70°C. As amostras foram cortadas em secções semifinas com 500nm, e ultrafinas 50nm, preparadas em um ultramicrotomo (LKB Ultratome III). Secções ultrafinas foram colhidas em grades de cobre (malha 200), coradas com acetato de uranila 2% por 1h no escuro e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011 (Laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia - UnB).

6.2.10 Multiplicação de OBs por injeção de BVs intrahemocele

Lagartas de *C. vestigialis* foram infectadas por injeção intrahemocélica de BVs visando à produção de OBs, partículas requeridas para a realização dos bioensaios

droplet feeding. Os inóculos foram diluídos em meio TNMFH completo para uma concentração final de $5,39 \times 10^5$ pfu/mL. Lagartas de quarto ínstar foram anestesiadas em gelo por cerca de 5min e usando uma seringa de insulina foram injetados aproximadamente 10 μ L da diluição viral. A perfuração foi realizada superficialmente ao tegumento, entre os primeiros pares de patas, em direção à cabeça. Para cada inóculo foram infectadas 50 lagartas e para controle negativo 20 lagartas foram injetadas com meio sem vírus. Após inoculação, as lagartas foram distribuídas em copos de 50mL (5 lagartas/copo) contendo dieta artificial sem formol. Os bioensaios foram incubados a $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12h e monitorados diariamente. As lagartas mortas foram coletadas e armazenadas a -20°C . Parte deste material foi macerado e os OBs semipurificados conforme item 4.2.2 do capítulo 1.

6.2.11 Bioensaios pelo método *droplet feeding*

Visando uma análise comparativa da virulência entre os clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8, isolado inicial CoveMNPV-II, e isolado de campo CoveMNPV-IC em infecções *in vivo*, OBs semipurificados após terem sido quantificados em hemacitômetro foram utilizados como inóculo para a realização de bioensaios *droplet feeding*, conforme protocolo descrito por Hughes e Wood (1981). Lagartas neonatas de *C. vestigialis* foram alimentadas com uma suspensão viral na concentração de 1×10^6 OBs/mL contendo corante para fins alimentícios de cor azul (Mix Coralim) e sacarose 5%, sendo o controle negativo uma suspensão de água autoclavada contendo corante (Mix Coralim) e sacarose. As lagartas que ingeriram a suspensão foram transferidas para copos de plástico de 50mL contendo dieta artificial (Corrêa, 2006). Foram adicionadas 3 larvas/copo. Para cada tratamento foram utilizadas 30 larvas e os experimentos foram realizados em triplicata em situação controlada de temperatura ($27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12h). Diariamente foi realizado o acompanhamento do bioensaio para anotação da mortalidade e pupação. Os dados foram analisados através do cálculo do tempo médio de morte (TM) conforme fórmula descrita abaixo (Morales, 2001) e do percentual de larvas mortas pelo vírus.

$$\text{TM} = \frac{\sum (D1 \times N1 + D2 \times N2 + D3 \times N3 + \dots Dn \times Nn)}{\text{Total de larvas mortas pelo vírus}}$$

Dn: dia de avaliação (dia pós-infecção)

Nn: número de larvas mortas pelo vírus no respectivo d.p.i

6.2.12 Amplificação por PCR dos genes *polh* e *fp25k*

Os oligonucleotídeos específicos para amplificação do gene da poliedrina (Tabela 10) foram desenhados com base na sequência da região flanqueadora do gene *polh* de CoveMNPV e testados no programa IDT (*Integrated DNA Technologies*) quanto à formação de homo-dímeros, hetero-dímeros, *hairpin* e características como T_m (*Melt Temperature* - Temperatura de fusão) e percentual de G+C (guanina e citosina). Para amplificação do gene *fp25k* foram utilizados oligonucleotídeos específicos, desenhados com base na região flanqueadora do *fp25k* do AgMNPV. Estes foram usados devido sua disponibilidade no Laboratório e proximidade com o genoma de CoveMNPV (Tabela. 10).

Tabela 10. Oligonucleotídeos para amplificação dos genes *polh* e *fp25k* de CoveMNPV.

Gene	Direção	Sequência do Oligonucleotídeo (5'-3')	Tamanho (mer)
<i>polh</i>	Forward	GTGGACCGCATTACAAACTG	21
	Reverse	GCAAACCAGCTTAGTACGCT	20
<i>fp25k</i>	Forward	AATCATGACAACGCGTGCGCGTG	23
	Reverse	GACTTTTATTTATTCCAAGGACGG	24

Os oligonucleotídeos para *polh* foram desenhados com base na região flanqueadora da poliedrina do CoveMNPV e para o *fp25k* foram desenhados com base na região flanqueadora do *fp25k* do AgMNPV.

Os genes foram amplificados por PCR e como DNA molde foram utilizados DNAs extraídos a partir de: OBs do isolado do campo (CoveMNPV-IC); BVs (obtidos após infecção *in vitro*) e OBs (obtidos após infecção *in vivo* por injeção intrahemocélica) de clones purificados e do inóculo inicial de purificação dos clones (CoveMNPV-II). A reação foi montada conforme instruções da enzima utilizada, *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen). O termociclador (Esco Healthcare Swift MaxPro) foi programado com uma etapa de desnaturação inicial a 94°C/30s, seguido de 30 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação a 94°C/30s, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C/30s, polimerização a 68°C/1min e uma etapa final de polimerização a 68°C/1min. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 0.8%, quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies*) e sequenciados (MACROGEN Korea).

6.2.13 Sequenciamento e análise dos genes *polh* e *fp25K*

Os produtos obtidos da amplificação dos genes *polh* e *fp25k* foram sequenciados pelo método de sequenciamento por capilarização (*capillary sequencing*) pela Macrogen Korea utilizando o sequenciador *Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer*. A montagem, alinhamento e análise dos resultados do sequenciamento foram realizados no programa *Geneious 6.0.4*. Os *reads* obtidos do sequenciamento *forward* e *reverse* foram montados formando um *contig* e os *contigs* de um mesmo gene para todas as amostras foram alinhados visando identificação de possíveis polimorfismos.

6.3 Resultados e Discussão

A população do CoveMNPV-IC é heterogênea

Neste capítulo, o CoveMNPV-NR foi nomeado de CoveMNPV-IC (CoveMNPV inóculo de campo), pois a característica de romper ou não o tegumento larval pós-morte não foi aqui atribuída a alterações intrínsecas às populações dos isolados virais, como demonstrado nos capítulos anteriores pela ausência de catepsina e quitinase em ambas as populações. As evidências de idênticos perfis de restrição entre ambos os DNAs de isolados de campo deram suporte para que aleatoriamente o CoveMNPV-IC fosse selecionado para a purificação de clones. O propósito de purificar clones de amostras de CoveMNPV-IC visando estudos de caracterização do vírus foi baseado na presença de bandas submolares detectadas e confirmadas pela análise de restrição de DNA deste isolado (Figura 22), uma característica típica da existência de variantes genotípicos na população viral.

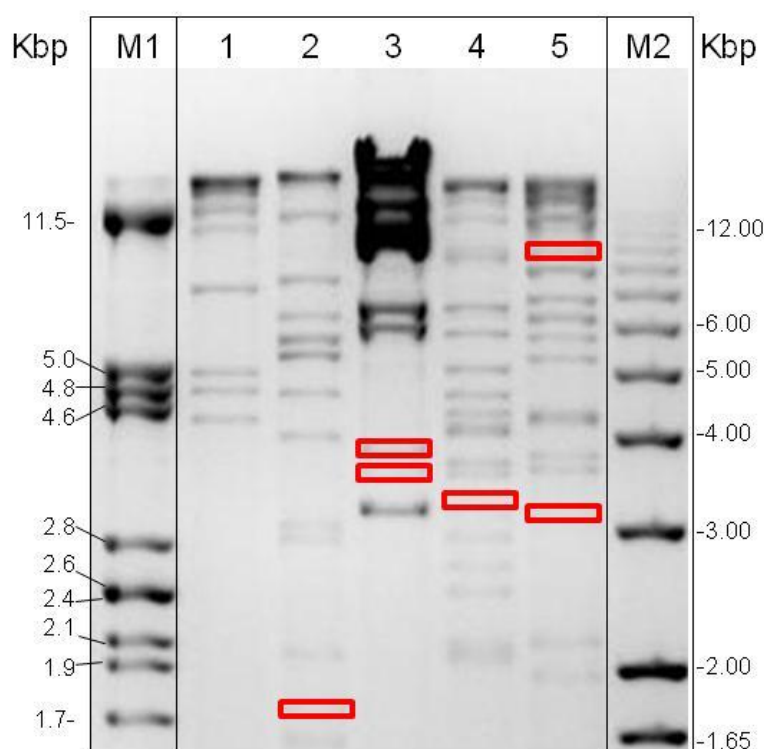


Figura 22. Padrão de restrição do DNA extraído de OBs de CoveMNPV-IC. Linhas 1, 2, 3, 4 e 5: DNA clivado com *Bam*HI, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hind*III e *Pst*I, respectivamente. Retângulos: bandas submolares. Linhas M1 e M2: marcador de massa molecular em pares de base (bp), DNA lambda clivado com *Pst*I e 1kb *Plus DNA ladder*, respectivamente.

Essa heterogeneidade genética na população do CoveMNPV-IC, demonstrada pela presença de bandas submolares no perfil de restrição do DNA viral, parece ser comum entre os representantes do gênero *Alphabaculovirus* (Shapiro *et al.*, 1991; Merryweather-Clarke *et al.*, 1994; Munõz *et al.*, 1999; Simón *et al.*, 2004; Erlandson *et al.*, 2006; Ogembo *et al.*, 2007; Redman *et al.*, 2010). A alta diversidade genética encontrada entre os parasitas é necessária para a sua sobrevivência no hospedeiro que se encontra em constante adaptação de sua capacidade de defesa (Read e Taylor, 2001).

CoveMNPV-II infecta a maioria das células SF-21-AE em cultivo

O DNA extraído do CoveMNPV-IC foi transfectado em células SF21 e o inóculo resultante da sua terceira amplificação, nomeado de CoveMNPV-II (inóculo inicial de purificação dos clones), foi utilizado como inóculo para o primeiro experimento de *plaque assay*. Este inóculo resultou em uma infecção onde a maioria das células exibiu corpos de oclusão em seus núcleos e as células identificadas como infectadas, apresentaram muitos poliedros (Figura 23).

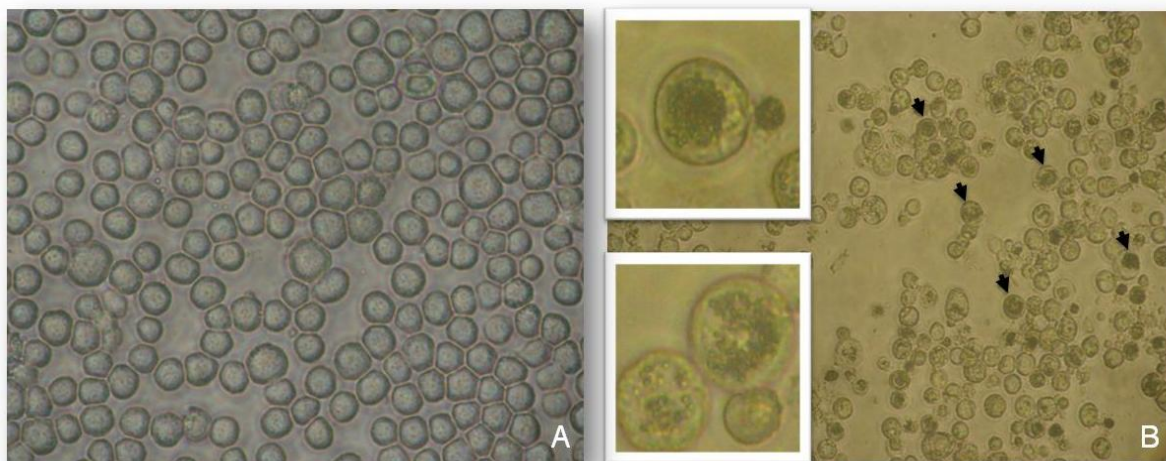


Figura 23. Micrografia de contraste de fase de células SF21 infectadas com CoveMNPV-II, 120h p.i. Células SF21 não infectadas (A). Células SF21 infectadas com inúmeros OBs presentes em seus núcleos (setas pretas) (B). Em destaque células infectadas repletas de OBs.

Normalmente, ao final da infecção promovida por baculovírus, há muitos poliedros no interior da célula hospedeira os quais promovem o rompimento da célula infectada (Slack e Arif, 2007). Esta etapa é importante, pois culmina na liberação dos OBs para o meio ambiente, permitindo assim o recomeço do ciclo de vida viral em

novas populações do inseto hospedeiro. Contudo, estas partículas não são necessárias em sistema *in vitro*, pois seu papel é proteger o vírus das condições extremas do meio ambiente (Jackes *et al.* 1985; Wang *et al.* 1991; Rohrmann, 2011). Em cultura de células é comum o aparecimento de baculovírus mutantes apresentando uma diminuição no número de partículas OBs formadas (Fraser e Hink, 1982; Harrison e Summers, 1995). Um dos fatores que contribuem para o seu surgimento é a redução do gasto energético para a produção de OBs tornando-os assim, mais viáveis e por isto, prevalentes em poucas passagens *in vitro* (Rezende *et al.*, 2009; Slavicek *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1983).

Clones virais purificados apresentam diferenças genotípicas

A seleção dos clones de CoveMNPV, realizada em células SF21 em ensaios de *plaque assay*, resultou na coleta inicial de 19 clones virais, os quais foram amplificados e 10 selecionados para a realização do segundo experimento de *plaque assay* o qual gerou 48 clones onde destes, 15 foram selecionados para a realização do terceiro e último *plaque assay*. O último *plaque assay* resultou na coleta de 39 clones, dos quais 9 foram amplificados *in vitro* (CoveMNPV-C1, -C2, -C3, -C4, -C5, -C6, -C7, -C8 e -C9). O DNA extraído dos BVs amplificados dos 9 clones foi clivado com a endonuclease de restrição *Pst*I (Figura 24). A digestão dos clones evidenciou a seleção de, ao menos, 6 clones com alguma diferença no seu genoma. A partir do perfil de restrição gerado, os clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 foram selecionados visando a realização de um estudo comparativo de infectividade *in vitro* e *in vivo* correlacionando assim as alterações genotípicas com uma possível relevância biológica.

O clone CoveMNPV-C2 foi selecionado devido a ausência de bandas submolares e inexistência de bandas distintas em comparação ao perfil de restrição do CoveMNPV-IC, supondo assim ser um clone puro. Os clones CoveMNPV-C6 e -C8 foram selecionados devido a presença do maior número de bandas distintas em comparação ao perfil do CoveMNPV-IC.

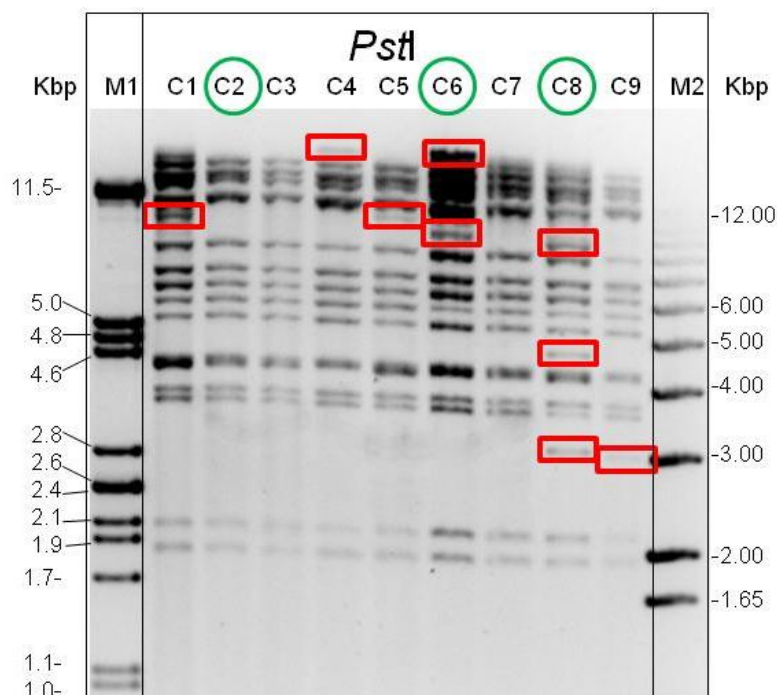


Figura 24. DNA de clones virais purificados por *plaque assay* clivado com a endonuclease de restrição *PstI*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com EtBr. Colunas C1-C9: clones CoveMNPV C1-C9, respectivamente. Colunas M1 e M2 são marcadores de massa molecular em mil pares de bases (kbp): DNA de fago λ clivado com *PstI* e 1Kb *Plus DNA Ladder*, respectivamente. Os retângulos vermelhos destacam as diferenças entre os clones.

Por análise de perfil de restrição do DNA viral, tem sido relatada a ocorrência de variações genéticas entre isolados de uma mesma espécie e a confirmação da seleção, *in vivo* ou *in vitro*, destes variantes em diversas populações de baculovírus. Redman *et al.* (2010) relatam a ocorrência de diversidade genética em uma população natural de *Spodoptera exempta* NPV (SpexNPV). Esta diversidade foi constatada por análise comparativa do perfil de restrição do DNA viral de diferentes isolados de SpexNPV e de clones purificados *in vivo* a partir de um dos isolados de campo. Dos clones purificados, ao menos 17 apresentaram distintos genótipos. Simón *et al.* (2004), devido ao aparecimento de bandas submolares no perfil de restrição do isolado de campo de SfMNPV, conduziram experimentos para a purificação *in vitro* de clones virais. Eles relataram a identificação, por análise do perfil de restrição, de nove clones variantes genotípicos presentes na população de campo.

Clones Selecionados são diferentes genotipicamente

DNAs dos três clones selecionados (CoveMNPV-C2, -C6 e -C8) foram clivados com as enzimas *Bst*EII, *Hind*III e *Pst*I para que maiores alterações genotípicas entre eles fossem detectadas (Figura 25). Os perfis de restrição dos clones selecionados foram comparados com o obtido pelo CoveMNPV-II e os fragmentos gerados foram estimados com tamanhos aproximados. Quando estes foram clivados com a endonuclease *Bst*EII foi encontrada apenas uma banda de 12 kpb presente em C2 e ausente nos demais clones e uma de 1.6 kpb ausente no C2 e presente nos demais. A digestão do DNA dos clones com a enzima *Hind*III apresentou o maior número de alterações entre os clones, ausência de uma banda de 3 kpb no C6 e 6 kpb no C2, e presença de uma banda de 5.6 kpb no C8, 10 kpb no C2 e 11 kpb no C6. O perfil com a enzima *Pst*I apresentou uma banda de 10 kpb ausente somente no C2 e bandas de 4.6 e 3 kpb presentes somente no C8.

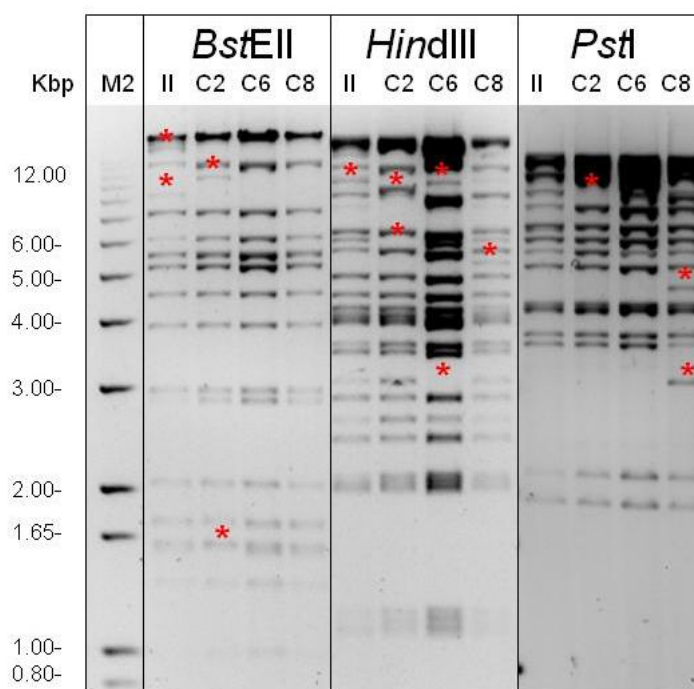


Figura 25. Padrão de restrição do DNA extraído de BVs dos clones de CoveMNPV selecionados. DNA dos clones selecionados CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 e CoveMNPV-II clivado com *Bst*EII, *Hind*III e *Pst*I. Linhas M2: marcador de massa molecular em pares de base (bp), 1kb *plus DNA ladder*. Asteriscos: bandas distintas entre eles.

Algumas das bandas submolares presentes no CoveMNPV-II foram perdidas ou deixam de ser submolares quando analisados os perfis dos clones virais. É o caso da banda gerada pela clivagem do II com *Bst*EII de 8 e 6 kpb que foi perdida e

deixou de ser submolar em todos os clones, respectivamente. Já a banda gerada pela clivagem do II com *HindIII* de 3 kpb foi perdida pelo clone C6 e deixou de ser submolar nos clones C2 e C8. Em contrapartida, algumas bandas inexistentes no II apareceram como submolaes nos clones, como é o caso da banda de 10 kpb presente no perfil do C2 clivado com *BstEII* e a de 5.5 kpb no perfil do C8 clivado com *HindIII*.

Estas diferenças entre os perfis de restrição dos clones selecionados sugere a purificação de variantes genotípicos presentes na população do campo ou a purificação de possíveis mutantes por eventuais modificações ocorridas devido à passagem do vírus em cultura de células. Estas muitas alterações detectadas entre os clones sugerem que a população do campo seja heterogênea havendo assim, uma mistura de variantes genotípicos. A análise genômica dos isolados, realizada no capítulo 2, mostra que a população de CoveMNPV é diversa justificando assim a presença de bandas distintas entre os clones purificados. Além disto, o alto surgimento de mutantes em decorrência da passagem do vírus em cultura de células pode contribuir para um aumento da diversidade antes inexistente na população de campo.

CoveMNPV-C8 é o mais infectivo *in vitro*

Foram realizados testes de infectividade *in vivo* e *in vitro* entre os clones selecionados para avaliar se as alterações genotípicas detectadas possuem uma relevância biológica quanto à infectividade. As análises de infecção *in vitro*, demonstraram que, embora a maior produção de OBs por célula tenha sido gerada pelo clone CoveMNPV-C2 (97 OBs/SF21 infectada), a maior produção de BVs (9.6×10^6 pfu/mL) foi obtida pelo clone CoveMNPV-C8 sendo, portanto, o C8 o que mais replicou em cultura de células SF21 (Tabela 11). Esta divergência não é esperada em condições normais de infecção, geralmente quanto maior a produção de BVs maior é o número de partículas OBs formadas. Quando a infecção em cultura de células é promovida por baculovírus mutante FP ocorre diminuição na produção de OBs e aumento na produção de BVs, sendo esta sua característica principal (Harrison e Summers, 1995; Fraser *et al.*, 1983; Rezende *et al.*, 2009; Lua *et al.*, 2002; Slavicek *et al.*, 1995; Katsuma *et al.*, 1999; Potter, *et al.* 1976; Pedrini *et al.*, 2004).

Tabela 11. Produção de partículas OBs e BVs em ensaios de infectividade *in vitro* em células SF21.

Inóculo Viral	BVs (pfu/mL)*	OBs (OBs/célula)	BVs (pfu/mL)**
CoveMNPV-C2	8.0x10 ⁶	97.42 ± 33.35	3.5x10 ⁵
CoveMNPV-C6	4.5x10 ¹⁰	41.6 ± 18.92	2.4x10 ³
CoveMNPV-C8	4.7x10 ⁷	23.35 ± 3.39	9.6x10 ⁶

*Valores referentes ao estoque viral.

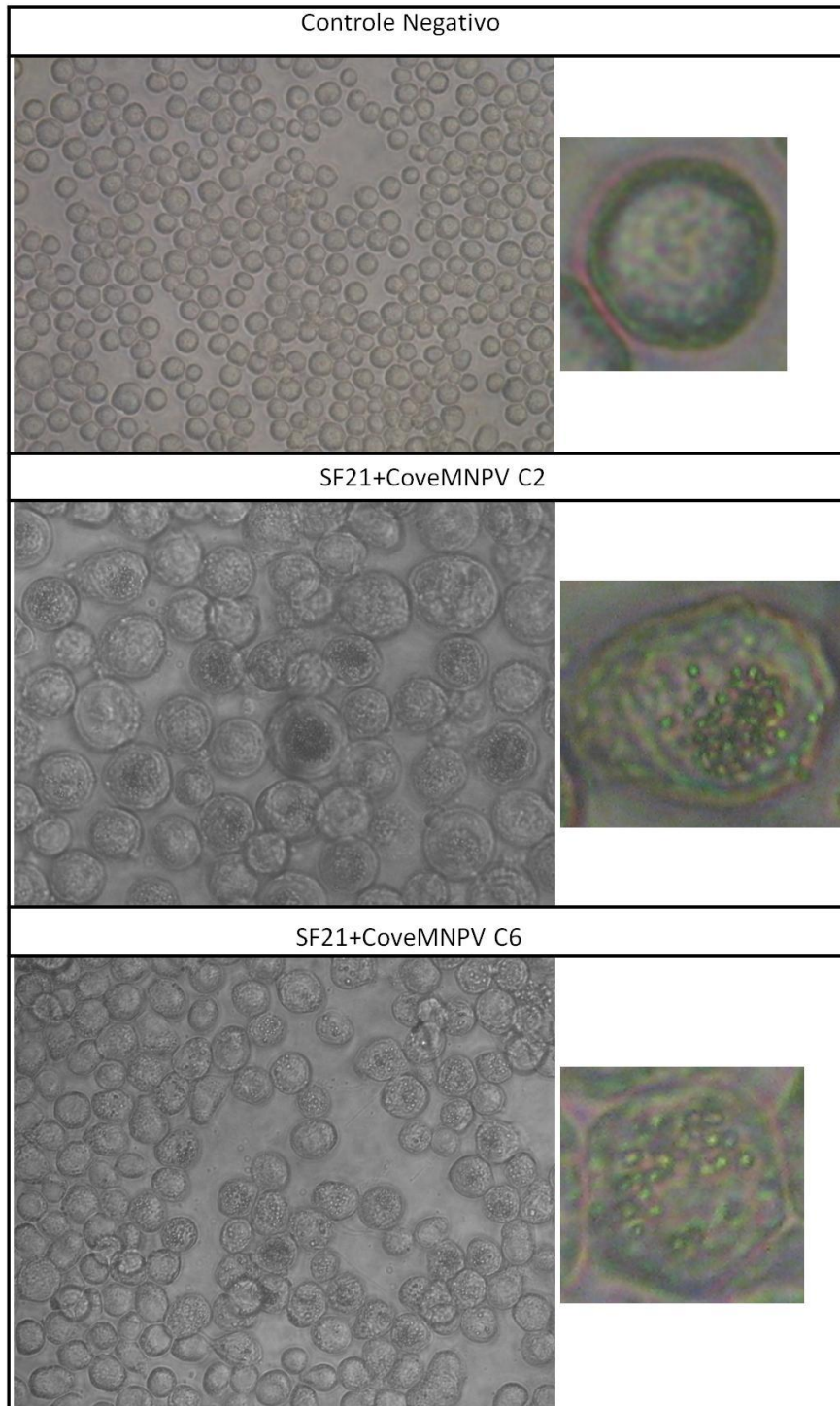
**Valores referentes ao obtido em ensaio de infecção.

As infecções geradas pelos clones CoveMNPV-C2 e -C8 apresentaram comportamentos semelhantes, onde a maioria das células apresentaram alterações citopatológicas. Porém, com relação à produção de partículas OBs e BVs, a infecção do C2 apresentou a maioria das células infectadas com muitos OBs por núcleo e um título viral menor, enquanto que a infecção gerada pelo C8 apresentou a maioria das células infectadas com poucos OBs por núcleo e um maior título viral (Figura 26). A produção de OBs por célula infectada para o clone C6 foi menos da metade da encontrada para o clone C2, mas quase o dobro da observada para o clone C8. Os poliedros gerados pela infecção com o C8 apresentaram tamanhos maiores com relação aos demais clones (Figura 26).

O título viral realizado antes do ensaio de infectividade *in vitro*, após a amplificação dos clones para obtenção de material para estoque, extração de DNA e ensaio de infectividade foi muito maior para o CoveMNPV-C6 (aprox. 10⁴ e 10³ BVs a mais do que o C2 e C8, respectivamente), confirmado pela realização de 9 replicatas do TCID₅₀ para esta amostra. Este título foi obtido após a amplificação do estoque viral e, portanto não havia condição controlada de MOI, porém condições como o tempo de incubação, o número de células infectadas, o volume de inóculo e o número de amplificações foram às mesmas para todos os clones. O C2, C6 e C8 apresentaram um título de 8x10⁶pfu/mL, 4.5x10¹⁰pfu/mL e 4.7x10⁷pfu/mL, respectivamente (Tabela 11). Porém, após ensaio de infectividade *in vitro* o clone C6 teve uma baixa infecção, apresentando alguns focos pequenos de infecção espalhados pela placa. Talvez o motivo desta divergência observada para o clone C6 seja o pouco tempo de incubação pós-infecção no ensaio de infectividade *in vitro*, 3 d p.i, em comparação ao tempo de incubação nas amplificações do estoque viral, 5 d p.i. Pode ser que

este clone atinja o seu pico replicativo em uma fase mais tardia da infecção, necessitando de mais dias de incubação para atingir um título viral superior aos demais clones.

Para investigar se um aumento no tempo de incubação resultaria em uma melhor infecção para o clone C6, em relação aos demais clones, foram realizados testes para ensaios comparativos de infectividade *in vitro* onde o tempo pós-infecção foi aumentado para 5 d p.i. Porém, como houve um grande número de células SF21 lisadas, principalmente para células infectadas com o C2 e C8, não foi possível realizar as análises de contagem de células saudas e infectadas e com isto, a contagem do número de partículas OBs por célula infectada. Contudo, é esperado que o clone C6, diferentemente dos clones C2 e C8, tenha ainda células capazes de serem infectadas e com isto de produzirem mais OBs e BVs, com isto, aumentando sua produção de partículas infectivas e atinjindo ao final um título maior que os demais clones.



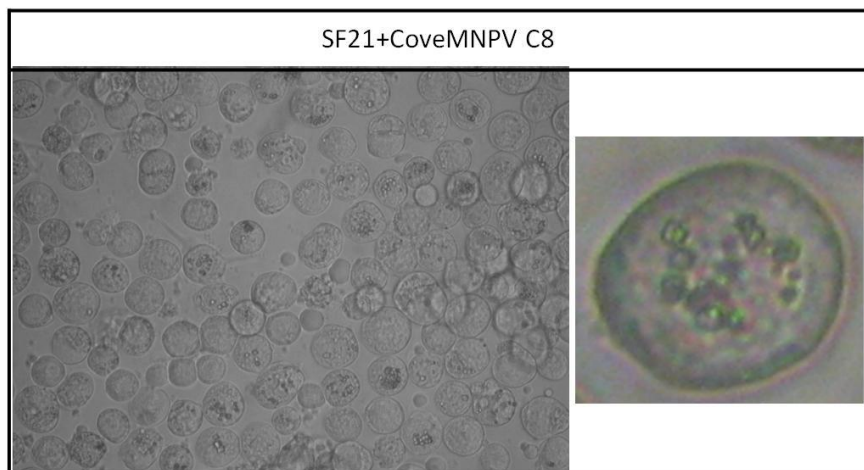


Figura 26. Micrografias ópticas dos ensaios de infectividade *in vitro*. Infecções de células SF21 3d p.i.. SF21 sadias (Controle negativo), infectadas com CoveMNPV-C2, -C6 e -C8. Variações no número e tamanho dos OBs intracelulares podem ser observadas.

OBs do CoveMNPV-C8 não apresentam ODVs

Os clones C2 e C8 apresentaram partículas OBs produzidas *in vitro* com formas e tamanhos variados, porém os OBs produzidos pelo C8 apresentaram poucos ou nenhum ODV em seu interior o que diminui ou elimina a infecção via oral em lagartas suscetíveis (Figura 27). Estas alterações são descritas na literatura como uma característica de baculovírus mutante FP (Bischoff e Slavicek 1997; Rezende *et al.*, 2009; Lua *et al.*, 2002; Giri *et al.*, 2010; Potter, *et al.* 1976).

As amostras de OBs produzidos *in vitro* para o clone CoveMNPV-C6 e *in vivo* para todas as amostras (CoveMNPV-IC, CoveMNPV-II, CoveMNPV-C2, CoveMNPV-C6 e CoveMNPV-C8) foram processadas, porém não foram fotografadas em MET devido a problemas no microscópio eletrônico que impossibilitaram a sua visualização.

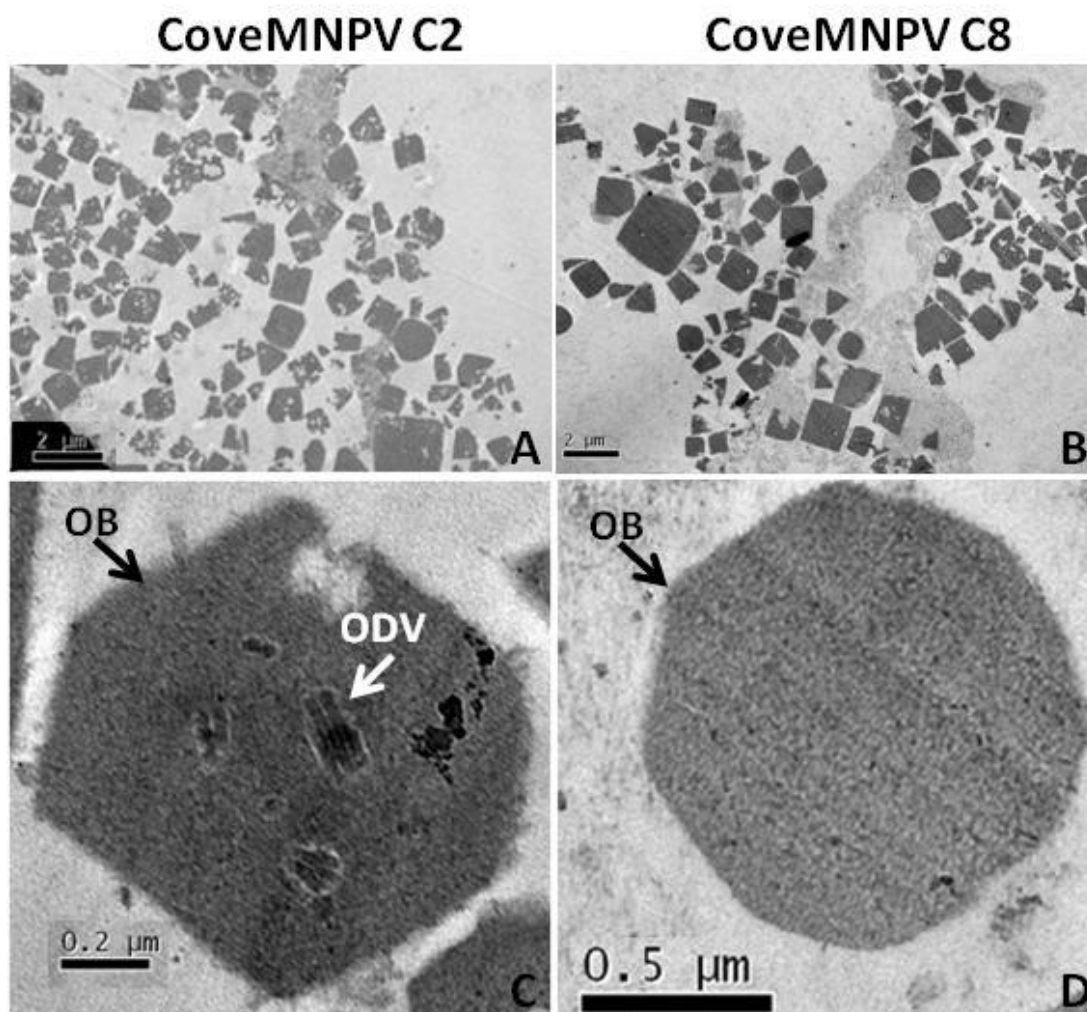


Figura 27. Micrografias eletrônicas de transmissão das partículas OBs produzidas em ensaios de infectividade *in vitro*. OBs dos clones CoveMNPV-C2 e -C8 obtidos de infecções de células SF21 3d.p.i.. Variações de forma e tamanho dos OBs de CoveMNPV-C2 (A) e -C8 (B); em destaque: OB de CoveMNPV-C2 (C) e OB de CoveMNPV-C8 (D), evidenciando presença e ausência de ODVs, respectivamente.

Os clones não restauraram o fenótipo de campo após uma passagem *in vivo*

Os BVs produzidos em cultura de células foram injetados via intrahemocele em lagartas *C. vestigialis* para a amplificação dos OBs. Este material foi utilizado para a extração e purificação de DNA e para a realização do ensaio de infectividade *in vivo*.

O DNA dos OBs amplificados uma vez *in vivo* foi extraído e clivado com as mesmas endonucleases utilizadas para a clivagem do DNA dos BVs (*BstEII*, *HindIII* e *PstI*), possibilitando assim a análise comparativa entre eles. Nenhuma alteração foi detectada em gel de agarose, o que sugere a não restauração do fenótipo de campo até a primeira passagem dos clones *in vivo* (Figura 28). Assim como na clivagem do DNA obtido de BVs, as seguintes alterações foram encontradas no padrão de

clivagem do DNA extraído dos OBs dos clones amplificados uma vez *in vivo*: clivagem com *BstEII* - uma banda de aprox. 12 kpb presente em C2 e ausente nos demais clones e uma de 1.6 kpb ausente no C2 e presente nos demais; com *HindIII* - bandas de aprox. 3 e 6 kpb ausentes somente no C6 e C2, respectivamente e uma de 5.6 kpb presente somente no C8; com *PstI* - uma banda de aprox. 10 kpb ausente somente no C2 e uma de 4.6 kpb presente somente no C8. Embora as bandas de 10 e 11 kpb (*HindIII*) presentes somente no C2 e C6, respectivamente e a de 3 kpb (*PstI*) presente somente no C6 foram detectadas nos perfis de restrição de DNA obtidos de BVs, estas não foram bem resolvidas no gel de clivagem de DNA extraído de OBs, necessitando de confirmação (Figura 28).

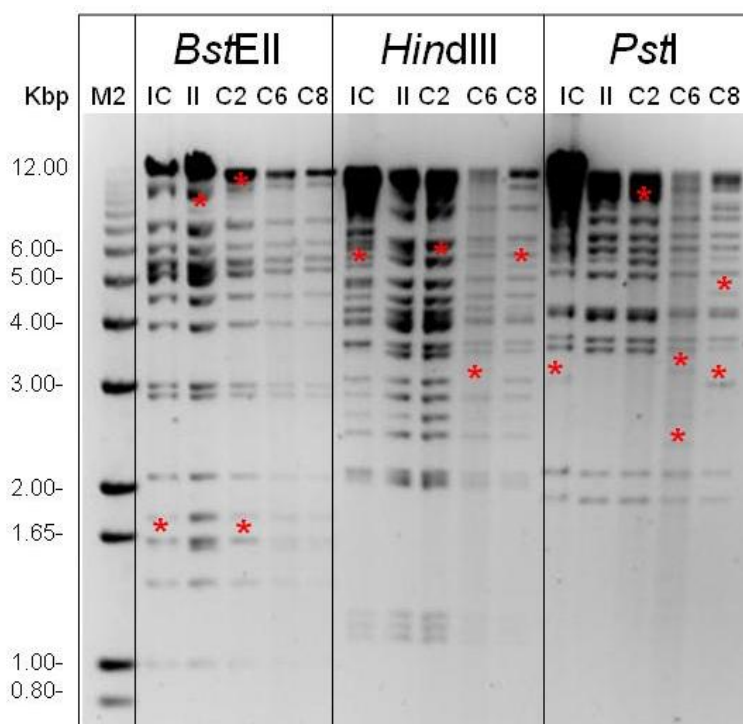


Figura 28. Padrão de clivagem por endonucleases de restrição de DNA extraído de OBs de clones de CoveMNPV. Linhas IC, II, C2, C6 e C8: CoveMNPV-IC, -II, -C2, -C6 e -C8, respectivamente, clivados com *BstEII*, *HindIII* e *PstI*. Asteriscos: bandas distintas entre eles. Linha M2: marcador de massa molecular em pares de base (bp), 1kb *Plus DNA ladder*.

CoveMNPV-C8 é o menos infectivo *in vivo*

Análise comparativa realizada por meio de teste de patogenicidade *in vivo* das amostras CoveMNPV-IC, CoveMNPV-II, CoveMNPV-C2, CoveMNPV-C6 e CoveMNPV-C8 mostra que o tempo médio de morte (TM) foi maior para CoveMNPV-C8 e menor para o CoveMNPV-C6 (Tabela 12). Deste modo, a

diminuição da virulência do clone C8 observada em infecções *in vivo* pode ser atribuída à baixa carga de vírions contidos em suas partículas ocluídas. O percentual de larvas mortas pelo vírus, que consistiu da diferença em percentual do número de larvas mortas pelo vírus e número de larvas que puparam, foi maior para o clone CoveMNPV-C2 onde apenas 1.67% das larvas submetidas a infecção puparam e menor para o clone CoveMNPV-C8 onde a maioria das larvas puparam, 55%. Apesar do TM ter sido menor para o C6, devido a um grande número de larvas mortas no início do bioensaio, 32% das larvas submetidas à infecção puparam, ou seja, foram consideradas não infectadas o que pode sugerir que este não seja o mais infectivo e sim o C2. Os bioensaios foram realizados com larvas neonatas, deste modo, larvas mortas até aproximadamente o 5º d p.i. ainda são muito pequenas o que dificulta a identificação da causa da morte, podendo as mortes iniciais detectadas para o clone C6 não estarem relacionadas à infecção viral.

A diminuição da virulência *in vivo* está diretamente associada à presença de poucos ou nenhum vírion no interior dos OBs e vem sendo relatado em bioensaios realizados com mutantes FP (Bull *et al.*, 2003; Lua *et al.*, 2002; Slavicek *et al.*, 1995).

Tabela 12. Tempo médio de morte (TM) e taxa de mortalidade de larvas *C. vestigialis*.

Inóculo Viral	TM (dias)	Larvas mortas por vírus (%)
CoveMNPV-C2	5.12 ± 0.67	98.33 ± 2.88
CoveMNPV-C6	4.11 ± 0.32	68.05 ± 12.36
CoveMNPV-C8	6.74 ± 0.56	45.33 ± 20.86
CoveMNPV-II	5.86 ± 0.53	84.96 ± 6.87
CoveMNPV-IC	6.49 ± 1.14	97.30 ± 2.44

Não há grandes inserções ou deleções nos genes *polh* e *fp25k*

Visando identificar a possível causa das diferenças apresentadas até o momento no que diz respeito às alterações encontradas na morfologia das partículas OBs e o consequente resultado das análises comparativas dos ensaios de patogenicidade *in vivo* e *in vitro*, os genes *fp25k* (proteína de 25kDa responsável pela montagem do poliedro e oclusão dos vírions, quando mutado é responsável pela característica de mutante FP) e *polh* (proteína mais abundante formadora do poliedro, poliedrina)

foram identificados em todas as amostras, antes e após a passagem dos clones em lagartas *C. vestigialis*. A escolha destes genes se deve a função atribuída a eles na formação dos poliedros e, portanto, podendo justificar as alterações na formação destas partículas. O tamanho dos amplicons gerados pela amplificação de ambos os genes não mostrou variação em gel de agarose para nenhuma amostra, sendo de aprox. 900 pb para o *polh* e 800 pb para o *fp25k* (Figura 29). Com isto, pode-se afirmar que não houve grandes inserções e deleções em ambos os genes para todas as amostras avaliadas.

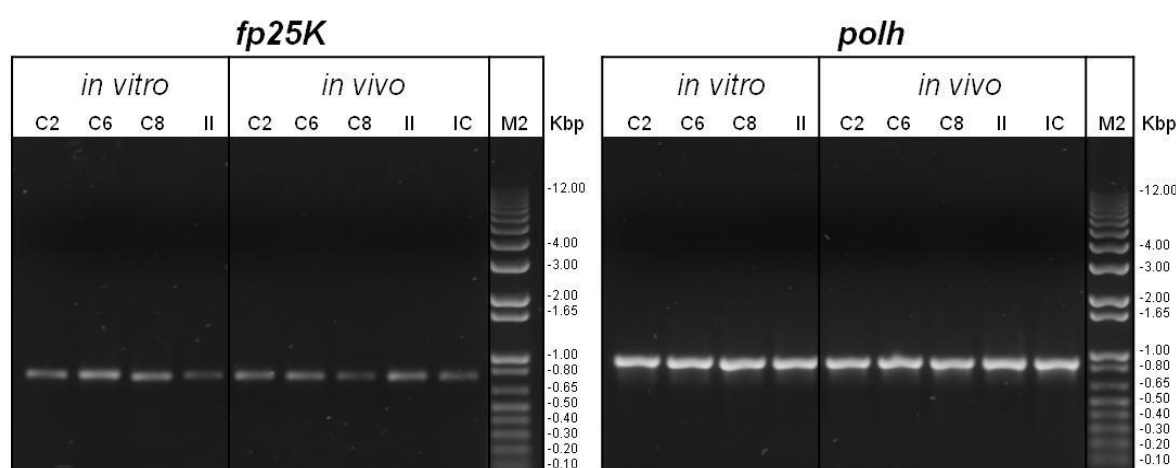


Figura 29. Análise eletroforética dos produtos de PCR dos genes *fp25k* e *polh*. Linhas C2, C6, C8, II, IC: amplicons pertencentes aos clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 e aos isolados CoveMNPV-II e -IC, respectivamente. Linha M2: marcador de massa molecular em pares de base (bp), 1kb *plus DNA ladder*. Gel de agarose 1%, corado com EtBr.

O gene da poliedrina é idêntico para todas as amostras

Os produtos de PCR foram sequenciados e os resultados alinhados. O alinhamento para o gene *polh* não mostrou qualquer alteração entre todas as amostras (Figura 30). Os últimos 41 nucleotídeos do gene da poliedrina e os 69 primeiros do *fp25k* não puderam ser identificados pelo sequenciamento, pois os oligonucleotídeos foram desenhados sobre estes pares de base e as extremidades não são bem resolvidas devido ao processo de sequenciamento das amostras. Conforme dados obtidos pelo sequenciamento completo do genoma do CoveMNPV-IC (Capítulo 2) foi constatado que o gene completo da poliedrina de CoveMNPV é de 738 pb, 245 aminoácidos e massa molecular de 28.804 kDa. Quando realizado o BLASTx e BLASTn se mostrou mais próximo ao gene da poliedrina de CfDEFMNPV com identidade de aminoácidos de 99% e de nucleotídeos de 96%.

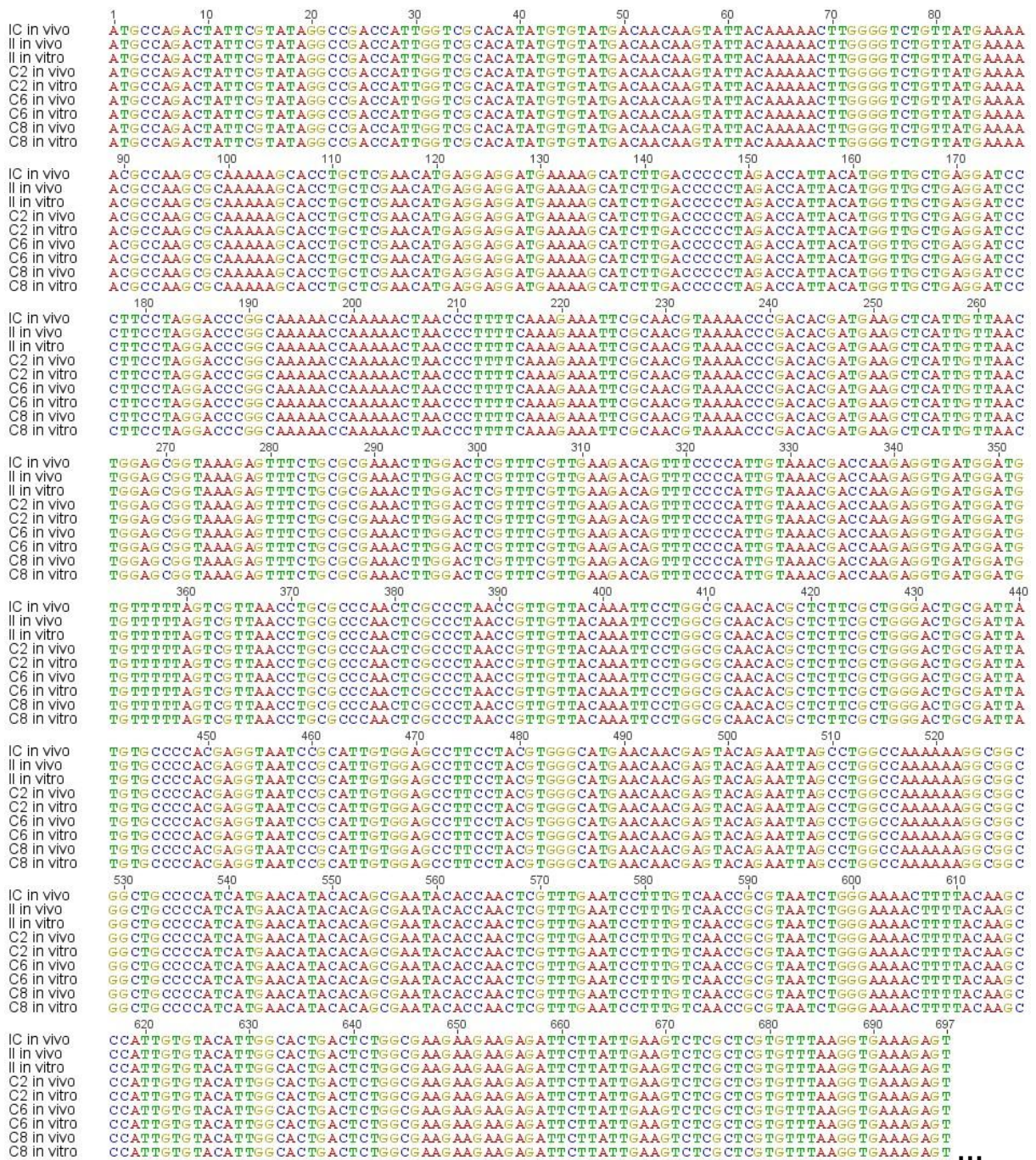


Figura 30. Alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *polh* dos clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 e isolados CoveMNPV-II e -IC antes e após amplificação *in vivo*. Nenhuma alteração foi detectada nas seqüências analisadas. Alinhamento realizado no programa *Geneius 6.0.4* criado por *Biomatters*.

Muitos dos baculovírus mutantes representando poliedros com formas alteradas são mutantes de poliedrina (López et al., 2011; Lin et al., 2000; Carstens et al., 1986; Carstens et al., 1987; Ribeiro et al. 2009; Katsuma et al. 1999). No entanto, alguns destes mutantes não possuem alterações genóticas conhecidamente relevantes

para explicar este fenômeno (Cheng *et al.* 2012). Com o sequenciamento do *polh* dos clones e isolados e a inexistência de mutantes de poliedrina, anula-se a possibilidade das alterações morfológicas nas partículas OBs terem sido provocadas por alterações diretas neste gene.

CoveMNPV-C8 e CoveMNPV-C6 são mutantes FP

A análise do cromatograma gerado pelo sequenciamento do gene *fp25k* do CoveMNPV-IC confirmou a presença de dois variantes genotípicos. Eles apresentam entre si 3 SNPs, o variante encontrado em maior proporção na população apresenta na posição 425 e 426 a adenina (A) e na posição 476 uma citosina (C), enquanto que o variante em menor frequência apresenta uma guanina (G) em substituição a A e uma timina (T) em substituição a C. A posição informada refere-se a sequência resolvida pelo sequenciamento, não estando relacionada ao início do *fp25k* devido ao não sequenciamento dos primeiros pares de base. Destes SNPs apenas a substituição da A pela G na posição 426 gerou alteração de aminoácido de uma treonina para uma alanina, sendo as demais variações do tipo silenciosa. A treonina é um aminoácido polar não carregado e a alanina um aminoácido hidrofóbico (apolar). Esta única alteração de aminoácido pode alterar a conformação (estrutura tridimensional) da proteína e conseqüentemente pode influenciar na sua função. Pelo sequenciamento do *fp25k* do CoveMNPV-II *in vivo* e *in vitro* não puderam ser observados ambos os variantes sugerindo a ocorrência de uma seleção positiva do variante prevalente no campo após passagem *in vitro*.

Quando avaliado esse mesmo gene para os três clones purificados a partir do CoveMNPV-II, cada clone apresentou alguma diferença em particular. O clone CoveMNPV-C2 se manteve igual ao II, sem qualquer mutação e igual ao variante mais prevalente na população de campo tanto *in vitro* como após passagem *in vivo*. O CoveMNPV-C6 apresentou os SNPs do isolado mais frequente no campo, além de *in vitro* ter apresentado uma inserção de um T na posição 381. Por meio do cromatograma pode ser observado que este mutante está prevalente na população sendo o selvagem presente em baixas concentrações. Esta mutação do tipo *frameshift* provocou uma mudança na fase de leitura alterando a sequência de aminoácidos da posição 382 até 405 (FVAAPAEH para ICGRAGRA) e gerando um códon de parada prematuro na posição 406 o que diminuiu a sequência de

nucleotídeos em 220 pb e a da proteína em 72 aminoácidos. Esta proteína truncada no C-terminal provavelmente não é funcional ou tem grande alteração nas funções que normalmente exerce. Após a passagem deste clone uma única vez *in vivo* por injeção intrahemocélica, apesar de permanecer os dois fenótipos (mutante e selvagem) na população, o mutante antes prevalente apresenta-se em quantidades equiparadas com o selvagem. Isto sugere que esta inserção resulte na redução do *fitness* viral *in vivo*, não sendo assim, vantajosa e ocasionando a sua baixa replicação tendendo a ser extinto em poucas passagens seguintes *in vivo*.

O clone CoveMNPV-C8 representa o variante presente em menor frequência na população de campo, apresentando tanto *in vitro* como *in vivo* os mesmos SNPs presentes no variante em menor ocorrência na população do CoveMNPV-IC. Porém, como ocorrido em infecções *in vitro* com LdMNPV (Lua *et al.*, 2002), uma inserção de uma A na posição 199 surgiu na região repetitiva de 7-nucleotídeos (AAAAAAA). Esta inserção está presente em aproximadamente 50% da população *in vitro* quando analisado o cromatograma. Ela gerou um códon de parada prematuro, o qual diminuiu a sequência de nucleotídeos em 394 pb e a da proteína em 130 aminoácidos. Após a passagem *in vivo*, assim como o mutante detectado no C6, o genótipo selvagem aumentou de frequência. Isto sugere redução de *fitness* do mutante com relação ao selvagem em ambiente *in vivo*.

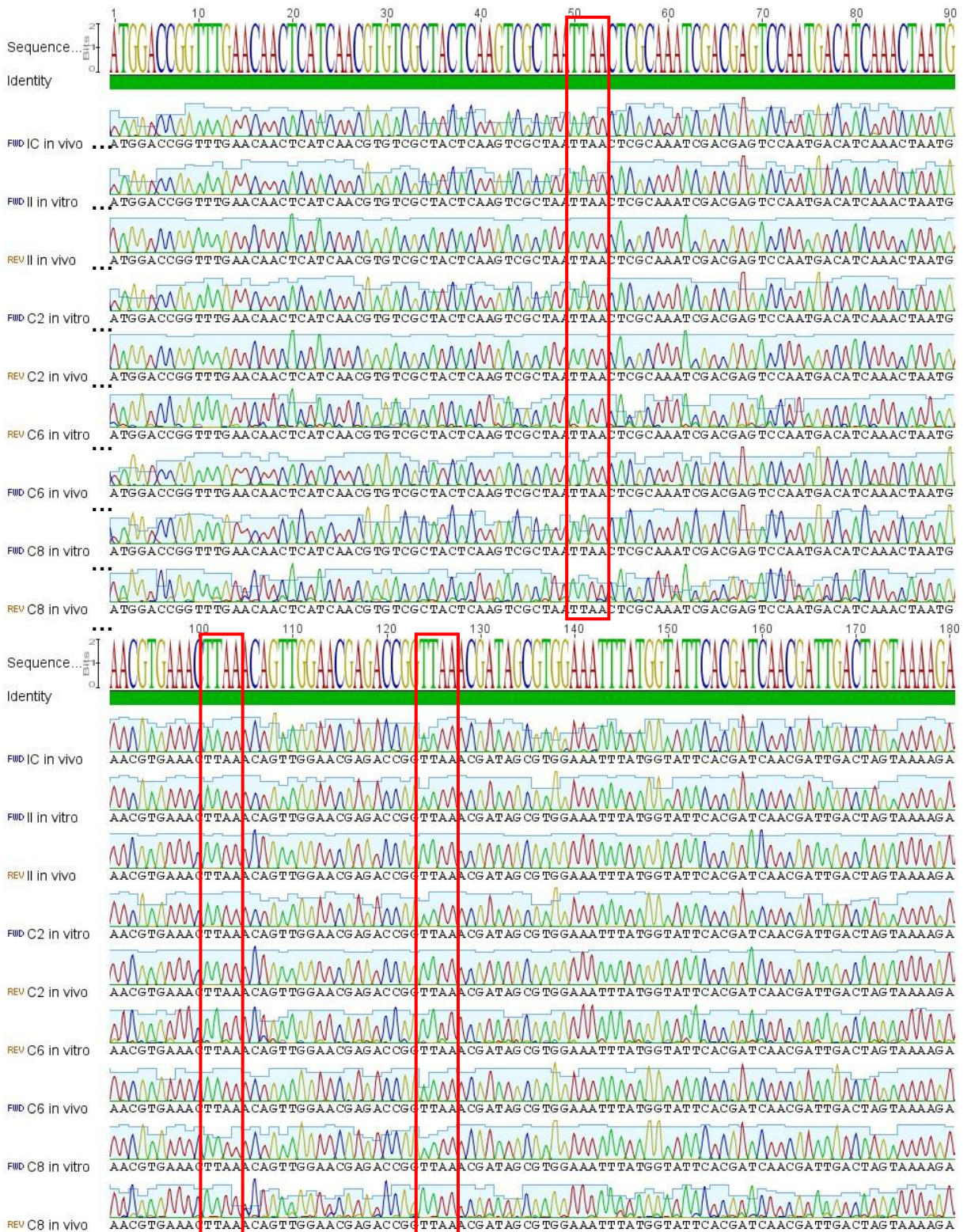
Estas inserções de 1 pb no gene *fp25k* do C6 e C8 indicam uma alta frequência de erros inseridos pela maquinaria de replicação do DNA (mutagênese baseada na replicação). Devido à seleção de um clone representando o variante em maior proporção e outro representando o variante em menor proporção no campo, apesar de não ser observado ambos no sequenciamento do *fp25k* do II, provavelmente estão presentes e do mesmo modo o variante em menor proporção *in vivo* também é o menor *in vitro*.

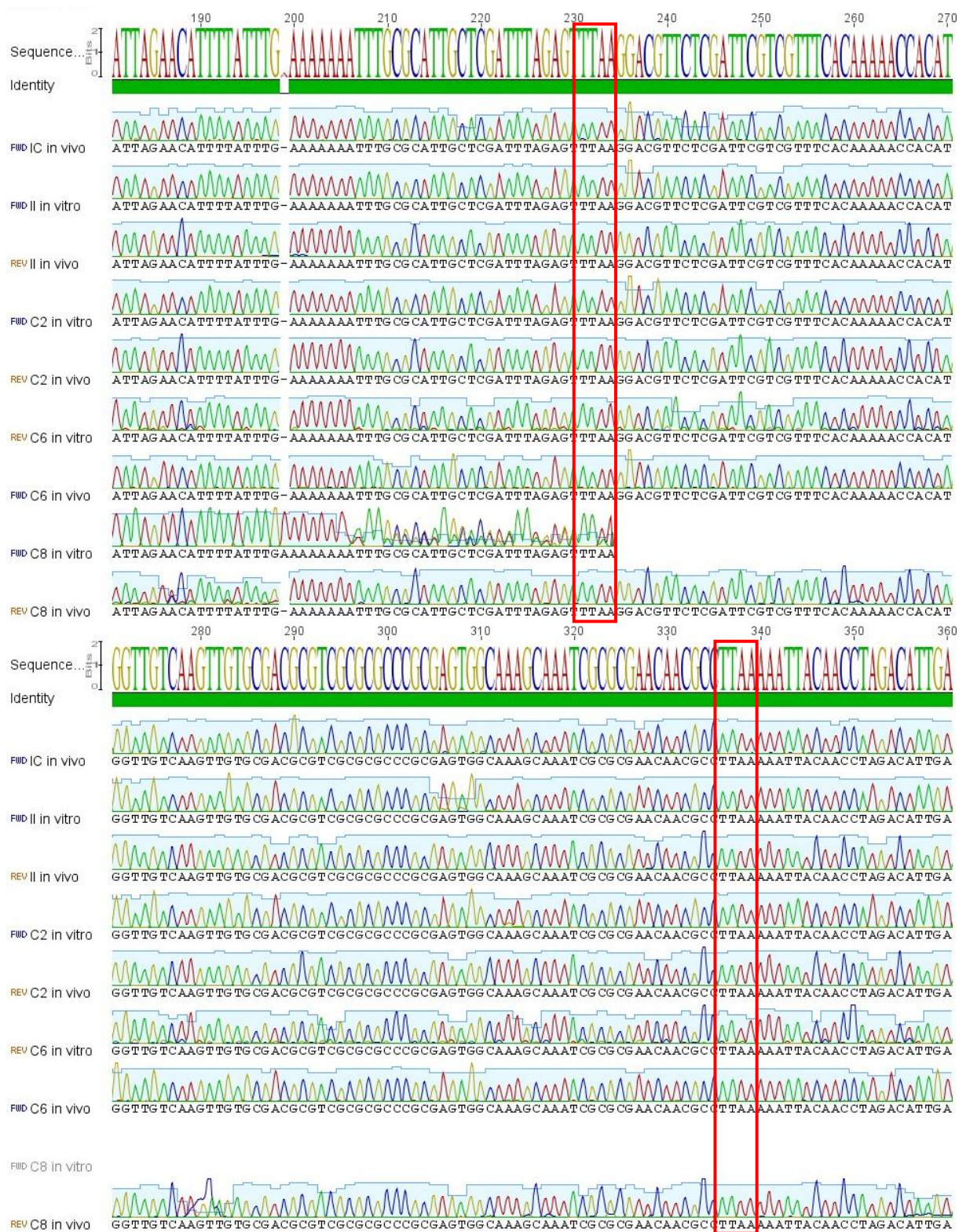
As alterações detectadas entre o *fp25k* dos clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 e isolados CoveMNPV-II e -IC podem ser observadas no alinhamento das sequências de nucleotídeos na Figura 31 e estão compiladas na Tabela 13.

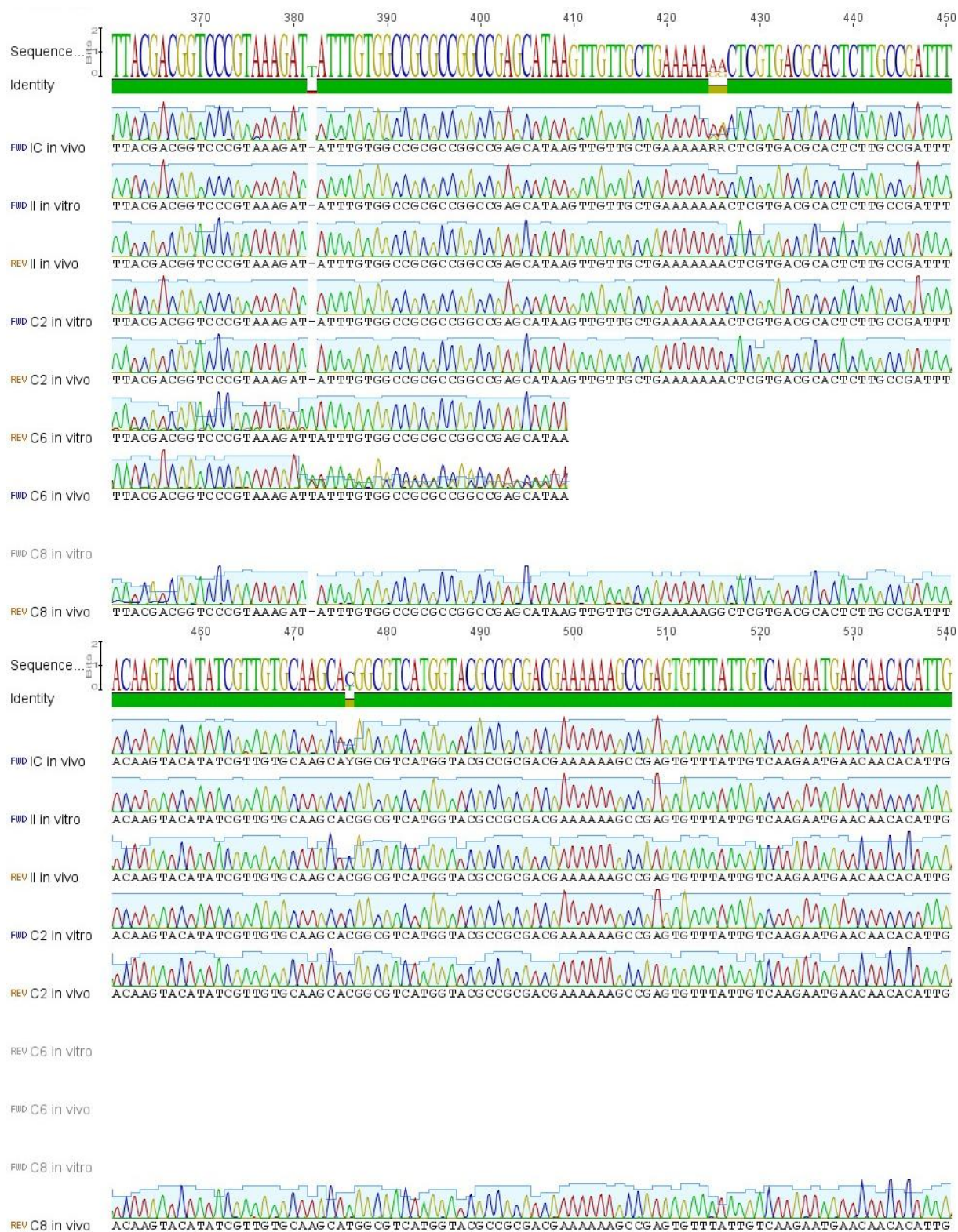
Tabela 13. Alterações detectadas no gene *fp25k* dos clones e isolados de CoveMNPV e suas consequências refletidas no seu produto.

Amostras	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Frequência do Variante	Alteração		
				Tipo	Mutação	Posição Consequência
CoveMNPV IC	627	208	Maior → Menor	Transição A → G	425	Silenciosa
				Transição A → G	426	Treonina → Alanina
				Transição C → T	476	Silenciosa
CoveMNPV II <i>in vivo e in vitro</i>	627	208	Ausente	Iguar ao CoveMNPV IC em maior frequência		
CoveMNPV C2 <i>in vivo e in vitro</i>	627	208	Ausente	Iguar ao CoveMNPV IC em maior frequência		
CoveMNPV C6 <i>in vitro</i>	408	135	Maior	Inserção T	381	Proteína truncada
	627	208	Menor	Iguar ao CoveMNPV IC em maior frequência		
CoveMNPV C6 <i>in vivo</i>	408	135	50%	Inserção T	381	Proteína truncada
	627	208	50%	Iguar ao CoveMNPV IC em maior frequência		
CoveMNPV C8 <i>in vitro</i>	234	77	50%	Inserção A	199	Proteína truncada
	627	208	50%	Iguar ao CoveMNPV IC em menor frequência		
CoveMNPV C8 <i>in vivo</i>	234	77	Menor	Inserção A	199	Proteína truncada
	627	208	Maior	Iguar ao CoveMNPV IC em menor frequência		

A característica da mutação ocorrida no C6 e C8 é similar a de outros baculovírus mutantes FP descritos, como o LdMNPV e HaSNPV, onde uma inserção pontual provocou o truncamento do *fp25k* (Bischoff e Slavicek 1997; Lua *et al.*, 2002). Mutantes FP de AcMNPV e GmMNPV são caracterizados por grandes inserções no *fp25k* oriundas do hospedeiro mediadas pelo sítio alvo de transposição TTAA (Fraser *et al.*, 1983; Cary *et al.* 1989; Fraser *et al.* 1985). Assim, como descrito por Bischoff e Slavicek (1997) em LdMNPV, foram detectados no *fp25k* do CoveMNPV apenas 7 sítios alvos para transposição, menos da metade dos identificados em vírus que eventos de transposição foram relatados (Figura 31).







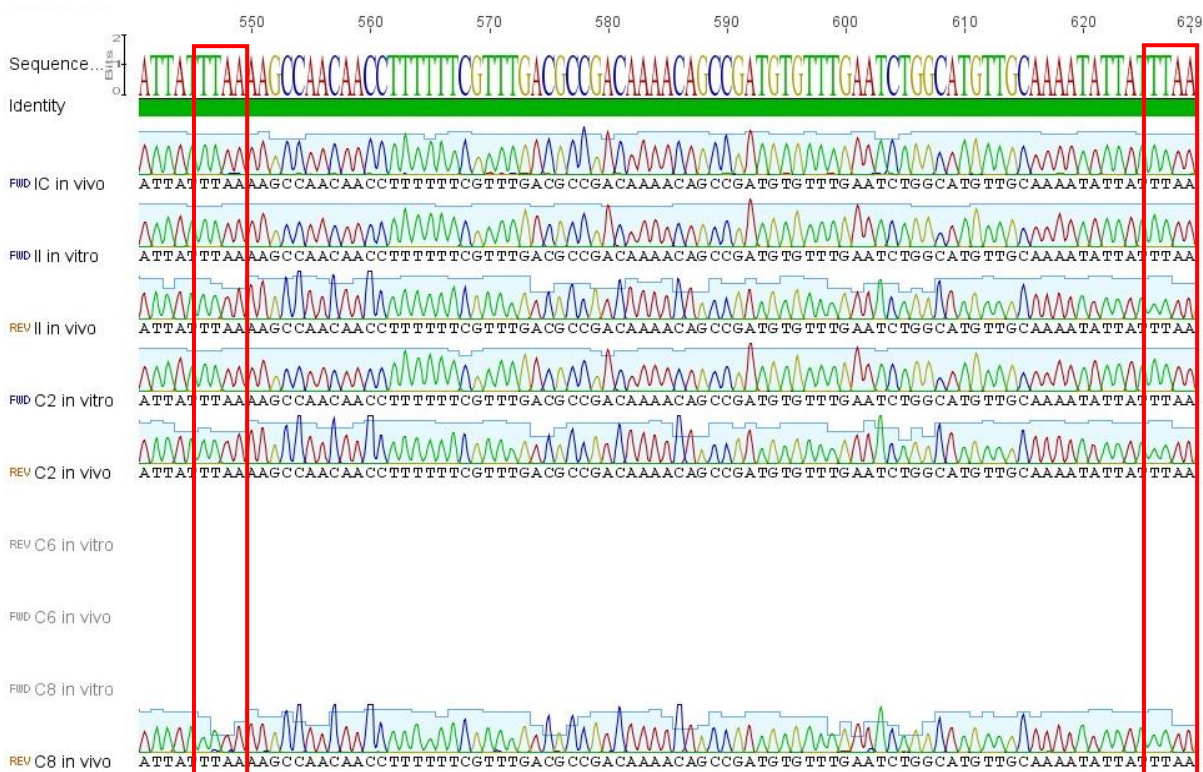


Figura 31. Cromatograma e alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *fp25k* dos clones CoveMNPV-C2, -C6 e -C8 e isolados CoveMNPV-II e -IC antes e após amplificação *in vivo*. Alinhamento realizado no programa Geneious 6.0.4 criado por Biomatters. Colunas vermelhas: sítios de transposição TTAATTA.

Prevalentemente na população de cada amostra a região codificadora sequenciada do gene *fp25k* possui os seguintes tamanhos: 627 pb para todas as amostras *in vivo* (com excessão do C6 que apresenta quantidade equilibrada do mutante com 408 pb e selvagem com 627 pb) e para II e C2 *in vitro*, 408 pb para o C6 *in vitro* e frequências equilibradas de 234 e 627 pb para o C8 *in vitro*. Conforme dados obtidos pelo sequenciamento completo do genoma do CoveMNPV-IC (Capítulo 2) foi constatado que o gene *fp25k* completo de CoveMNPV possui 696 pb e codifica para uma proteína de 231 aminoácidos e massa molecular de 27 kDa. A realização do BLASTn para o *fp25k* do CoveMNPV-IC em maior proporção mostrou este mais próximo ao do AgMNPV e CfDEFMNPV com identidade de nucleotídeos de 94% e, quando analisado o variante em menor frequência, este valor foi de 93% em ambos. O resultado do BLASTx mostrou uma identidade de aminoácidos de 95% para o CfDEFMNPV e 94% para o AgMNPV quando avaliado o variante em maior proporção e 94% com o CfDEFMNPV e 93% com o AgMNPV quando analisado o variante em menor frequência.

O mutante mais comum surgido em decorrência da passagem do baculovírus em cultura de células é o mutante de poucos poliedros ou *few polyhedra* (FP). Ele é caracterizado pela diminuição na produção de partículas OBs, má formação de partículas OBs quando produzidas, aumento da produção de partículas BVs, não oclusão de ODVs e presença do gene *fp25k* mutado (Harrison e Summers, 1995). Todas estas características listadas foram identificadas no clone CoveMNPV-C8, deste modo, este clone sofreu uma mutação pontual quando submetido à amplificação *in vitro* sendo, portanto, um mutante FP. O clone C6 apresentou algumas das evidências para sua classificação com um mutante FP, porém algumas informações não puderam até então ser determinadas. Apesar disto, o acúmulo de evidências sugere que este clone também seja um mutante FP.

6.4 Conclusão

As diferenças genóticas presentes entre os clones de CoveMNPV selecionados *in vitro* foram detectadas por meio da clivagem do DNA viral com endonucleases de restrição, estas diferenças sugerem a purificação de variantes genóticas presentes no campo ou a purificação de possíveis mutantes por eventuais modificações ocorridas devido à passagem do vírus em cultura de células. Estas alterações apresentaram uma relevância biológica detectada em ensaios comparativos de infectividade *in vivo* e *in vitro*. As análises de infectividade demonstraram que, devido à pressão seletiva diferenciada entre os dois sistemas, o clone que apresentou o melhor *fitness* no sistema *in vitro*, CoveMNPV-C8, foi o menos infectivo no sistema *in vivo*.

A via de transmissão do vírus em cultura de células dispensa a formação do fenótipo ODV, responsável pela infecção oral, e conseqüentemente da partícula OB, necessária para a manutenção da viabilidade viral no meio ambiente e carregadora das partículas responsáveis pela infectividade oral. Apesar da formação de OBs ter ocorrido em todos os clones selecionados, houve alterações na sua produtividade, morfologia e composição entre os clones C2 e C8. No caso do CoveMNPV-C8 os OBs formados continham poucos ou nenhum ODVs no seu interior e sua produtividade por célula infectada foi reduzida, enquanto que no C2 o oposto foi observado. O clone C6, apesar de ter apresentado o maior título viral após amplificação *in vitro* dos clones, apresentou uma baixa infecção *in vitro*, quando em condições controladas de MOI. Este fato pode ser atribuído ao menor tempo de incubação da infecção, em comparação as infecções de amplificação viral, o que pode ter provocado a interrupção da infecção antes do seu pico replicativo. Para este clone também foi observado uma diminuição na produção de partículas OBs por células infectadas em comparação ao clone C2.

Visando compreender as diferenças observadas entre os clones, no que se referem à virulência, os genes *polh* e *fp25k*, envolvidos na formação das partículas OBs, foram identificados em isolados e clones antes e após passagem *in vivo*. A identificação do gene da poliedrina não mostrou qualquer alteração entre as amostras. Entretanto, o sequenciamento do gene *fp25k* de CoveMNPV-C6 e -C8 mostrou que, após a passagem destes clones *in vivo*, houve redução na frequência

do mutante em relação ao selvagem. O perfil de restrição de DNA dos isolados e clones, antes e após a passagem *in vivo*, não mostrou alteração evidenciando que não houve restauração do fenótipo de campo após a primeira passagem *in vivo*.

Evidências que sugerem a formação de um mutante FP foram coletadas por meio das análises dos experimentos realizados. O clone CoveMNPV-C8 apresentou uma diminuição da produção de partículas OBs, má formação de partículas OBs, aumento da produção de partículas BVs, pouca oclusão de ODVs, diminuição da virulência *in vivo* e presença do gene *fp25k* mutado, características estas que descrevem o surgimento de um mutante FP. O clone C6 foi também classificado como um mutante FP por ter apresentado o maior título viral após a amplificação *in vitro*, uma redução na produção de partículas OBs em ensaio controlado de infectividade *in vitro*, uma baixa infectividade *in vivo* e o gene *fp25k* mutado, embora a morfologia da partícula OB e o aumento do número de BVs em condições controladas de infecção *in vitro* não tenham sido determinados.

7 CONCLUSÃO GERAL

A ocorrência no campo de lagartas *C. vestigialis* mortas por infecção viral apresentando tegumento liquefeito e intacto motivou a realização do presente trabalho. No sentido de elucidar estes eventos os genes virais da catepsina (*v-cath*) e quitinase (*chiA*) foram investigados quanto a sua presença ou ausência no genoma sequenciado de dois isolados de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV. Estes genomas foram montados, anotados e comparados entre si e com outros baculovírus. Adicionalmente, clones purificados a partir de um dos isolados foram selecionados e caracterizados.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram chegar às seguintes conclusões e considerações:

- Os fenótipos observados no campo, lagartas *C. vestigialis* apresentando tegumento liquefeito e intacto após terem sido infectadas por CoveMNPV-R e -NR, respectivamente, não se apresentaram da mesma forma em laboratório. Alta predominância de larvas não liquefeitas foi verificada em bioensaios realizados em laboratório para ambos os isolados.
- Os isolados de campo CoveMNPV-R e CoveMNPV-NR apresentam idênticos perfis de restrição de DNA. Isto possibilitou escolher um deles (CoveMNPV-NR) como representante dos isolados de campo, que foi nomeado de CoveMNPV-IC.
- A população do CoveMNPV-IC é heterogênea, demonstrando tratar-se de uma mistura de genótipos de uma mesma espécie.
- Os genes catepsina e quitinase estão ausentes na sequência genômica de CoveMNPV e na região intergênica de *lef-7/gp64* dos clones purificados.
- O genoma de CoveMNPV foi sequenciado, montado, anotado e comparado com genomas de outros baculovírus. CoveMNPV possui um tamanho de 125.767 pb com um conteúdo G+C de 42.9%. Um total de 4 *hrs* e 138 ORFs foram identificados por serem comuns ao AgMNPV/CfDEFMNPV, sendo 9 *bros*. Dezesete supostas ORFs não tiveram correspondência com qualquer outra proteína depositada no *GenBank* (NCBI databases).

-
- CoveMNPV foi reclassificado filogeneticamente, com base na sequência nucleotídica de 11 *core genes* e na sequência deduzida de aminoácidos das ORFs anotadas, pertencente ao gênero *Alphabaculovirus* Grupo I clado B, espécie irmã do clado AgMNPV/CfDEFMNPV, porém sendo este mais próximo ao CfDEFMNPV.
 - Análise evolutiva do *locus lef-7/gp64* suporta a hipótese de que o evento de perda dos genes *v-cath* e *chiA* pelo CoveMNPV e AgMNPV pode ter ocorrido em um único evento, ou seja, no ancestral de CoveMNPV/AgMNPV/CfDEFMNPV. Possivelmente tendo estes genes sido readquiridos pelo CfDEFMNPV por recombinação com o CfMNPV.
 - Os genomas de CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R apresentaram uma identidade de 99.97% e a maioria dos polimorfismos compartilhados.
 - Clones foram purificados a partir do CoveMNPV-IC e variantes genotípicos identificados. Três clones foram selecionados, CoveMNPV-C2, -C6 e -C8.
 - Análises de DNA sugerem que não houve restauração do genótipo de campo após a primeira passagem dos clones *in vivo*. Porém, diferenças na infectividade foram observadas entre os clones em infecções *in vivo* e *in vitro*.
 - Análise morfológica das partículas OBs geradas *in vitro*, realizada apenas para os clones C2 e C8, mostrou poliedros com forma e tamanho alterados. O C8 apresentou poucos ou nenhum ODV no seu interior.
 - Os testes de infectividade *in vivo* mostraram o C2 com o maior percentual de larvas mortas em decorrência de infecção viral. Embora o C6 tenha apresentado o menor tempo médio de morte, a mortalidade inicial observada provavelmente não tenha sido causada por vírus. Estes dados não são conclusivos, necessitando que os testes sejam repetidos. O C8 se apresentou como o mais infectivo *in vitro*.
 - O gene da poliedrina para todas as amostras antes e após passagem *in vivo* não apresentou mutação.

- A sequência do gene *fp25k* dos clones CoveMNPV-C6 e -C8 apresentou uma mutação *frameshift* pela inserção de um único nucleotídeo o que resultou em uma proteína truncada.
- Após única passagem *in vivo* foi observada a redução na frequência do mutante com relação ao selvagem, deste modo indicando a diminuição no *fitness* do mutante *in vivo*.
- Houve formação de mutantes em decorrência da purificação e amplificação dos clones em cultura de células. O clone C8 apresentou todas as características de um mutante FP, enquanto que para o clone C6 mais dados necessitam ser coletados. Estes dados incluem a observação das partículas OBs alteradas, o aumento do número de BVs em condições controladas de infecção *in vitro* e baixa infecção *in vivo*.
- Os ensaios de infectividade de CoveMNPV *in vitro* poderiam exibir resultados diferentes dos obtidos neste trabalho, caso a linhagem celular fosse derivada do inseto hospedeiro *Condylorrhiza vestigialis*. Até agora, não existe uma linhagem celular de *C. vestigialis* estabelecida.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAF. (2012). Anuário estatístico da ABRAF 2012 ano base 2011. ABRAF. – Brasília: 2012. 150p.: il. color; 21cm. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>
- Afonso, C.L.; Tulman, E.R.; Lu, Z.; Balinsky, C.A.; Moser, B.A.; Becnel, J.J.; Rock, D.L.; Kutish, G.F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology* 75, 11157-11165.
- Ahmad, I.; Ahmd, F.; Pichtel, J. (2011). *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer Science+Business Media LLC, 415-430.
- Anduleit, K.; Sutton, G.; Diprose, J.M.; Mertens, P.P.C.; Grimes, J.M.; Stuart, D.I. (2005). Crystal lattice as biological phenotype for insect Viruses. *Protein Science* 14, 2741–2743.
- Arif, B.M.; Kuzio, J.; Faulkner, P.; Doerfler, W. (1984). The genome of *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus: molecular cloning and mapping of the EcoRI, BamHI, SmaI, XbaI and BglII restriction sites. *Virus Research* 1, 605–614.
- Arif, B.M. (2011). Society of Invertebrate Pathology Founders' Lecture, 2010 Mauro Emilio Martignoni: A renaissance scientist in the 20th century. *Journal of Invertebrate Pathology* 107, 173–178.
- Asser-Kaiser, S.; Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Eberle, K.E.; Gund, N.A.; Reineke, A.; Zebitz, C.P.W.; Heckel, D.G.; Huber, J.; Jehle, J.A. (2007). Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science* 317, 1916–1918.
- Beames, B.; Summers, M.D. (1989). Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants. *Virology* 168, 344–353.
- Beljelarskaya, S.N. (2011). Baculovirus Expression Systems for Production of Recombinant Proteins in Insect and Mammalian Cells. *Molecular Biology* 45, 123–138.
- Bergold, G.H. (1947). Die isolierung des polyeder-virus und die natur der polyeder. *Zeitschrift für Naturforschung* 2b, 122-143.
- Bischoff, D.S.; Slavicek, J.M. (1997). Phenotypic and Genetic Analysis of *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Few Polyhedra Mutants: Mutations in the 25K FP Gene May Be Caused by DNA Replication Errors. *Journal of Virology* 71, 1097–1106.
- Blissard, G.W.; Rohrmann, G.F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* 35, 127–155.
- Bromme, D.; Okamoto, K. (1995). The baculovirus cysteine protease has a cathepsin B-like S2-subsite specificity. *Biological Chemistry* 376, 611-615.
- Brurberg, M.B.; Synstad, B.; Klemsdal, S.S.; van Aalten, D.M.F.; Sundheim, L.; Eijsink, V.G.H. (2001). Chitinases from *Serratia marcescens*. *Recent Research Developments in Microbiology* 5, 187–204.
- Bueno, R.C.O.F.; Parra, J.R.P.; Bueno, A.F.; Moscardi, F.; Oliveira, J.R.G.; Camillo, M.F. (2007). Sem barreira. *Revista Cultivar* 93, 12-15.

-
- Bull, J.C.; Godfray, H.C.J.; O'Reilly, D.R. (2003). A Few-Polyhedra Mutant and Wild-Type Nucleopolyhedrovirus Remain as a Stable Polymorphism during Serial Coinfection in *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2052–2057.
- Carpentier D.C.J.; Griffiths, C.M.; King, L.A. (2008). The baculovirus P10 protein of AcMNPV forms two distinct cytoskeletal-like structures and associates with polyhedral occlusion bodies during infection. *Virology* 371, 278-291.
- Carpentier, D.C.J.; King, L.A. (2009). The long road to understanding the baculovirus P10 protein. *Virologica Sinica* 24, 227-242.
- Carstens, E.B.; Lin-bai, Y.; Faulkner, P. (1987). A Point mutation in the polyhedron gene of a baculovirus, *Autographa californica* MNPV, prevents crystallization of occlusion bodies. *Journal of General Virology* 68, 901–905.
- Carstens, E.B.; Krebs, A.; Gallerneault, C.E. (1986). Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra. *Journal of Virology* 58, 684–688.
- Cary, L.C.; Goebel, M.; Corsaro, B.G.; Wang, H.G.; Rosen, E.; Fraser, M.J. (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172, 156-69.
- Castro, M.E.B.; Ribeiro, Z.M.A.; Souza, M.L.; Sousa, N.J.; Moscardi, F. (2003). Identificação do baculovirus da lagarta-do-álamo *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae). *Comunicado Técnico* 87 ISSN 0102-0099.
- Castro, M.E.B.; Ribeiro, Z.M.A.; Siqueira, C.B.; Santos, A.C.B.; Souza, M.L.; Sousa, N.J. (2004). Infecção por *Condylorrhiza vestigialis nucleopolyhedrovirus* em diferentes linhagens celulares e espécies de insetos. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. ISSN 1676 – 1340.
- Castro, M.E.B.; Ribeiro, Z.M.A.; Santos, A.C.B.; Souza, M.L.; Machado, E.B.; Sousa, N.J.; Moscardi, F. (2009). Identification of a new nucleopolyhedrovirus from naturally-infected *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) larvae on poplar plantations in South Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology* 102, 149–154.
- Castro, M.E.B.; Paula, D.P.; Almeida, G.F.; Ribeiro, Z.M.A.; Souza, M.L.; Inglis, P.W.; Ribeiro, B.M. (2011). Identification and sequence analysis of the *Condylorrhiza vestigialis* MNPV p74 gene. *Virus Genes* 43, 471–475.
- Cheng, Ruo-Lin; Xu, Yi-Peng; Zhang, Chuan-Xi. (2012). Genome Sequence of a *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus Strain with Cubic Occlusion Bodies. *Journal of Virology* 86, 10245.
- Chevreur, B.; Wetter, T.; Suhai, S. (1999) Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information Computer Science and Biology: Proceedings of the *German Conference on Bioinformatics* (GCB) 99, 45-56.
- Claus, J.D.; Gioria, V.V.; Micheloud, G.A.; Visnovsky, G. (2012). Production of Insecticidal Baculoviruses in Insect Cell Cultures: Potential and Limitations, *Insecticides - Basic and Other Applications*, Dr. Sonia Soloneski (Ed.), ISBN: 978-953-51-0007-2, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-basic-and-other-applications/production-of-insecticidalbaculoviruses-in-insect-cell-cultures-potential-and-limitations>
-

Clem, R.J. (2001). Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death & Differentiation* 8, 137-43.

Correa, F.A.S.F. (2006). Criação em laboratório de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) com diferentes dietas artificiais. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

D'Araujo e Silva, A.G.; Gonçalves, C.R.; Galvão, D.M.; Gonçalves, A.J.L.; Gomes, J.; Silva, M.N.; Simoni, L. (1968). Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. Ministério de Agricultura. Rio de Janeiro. Parte II, 1º Tomo.

Daimon, T.; Katsuma, S.; Shimada, T. (2007). Mutational analysis of active site residues of chitinase from *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. *Virus Research* 124, 168–175.

Darling, A.C.E.; Mau, B.; Blattner, F.R.; Perna, N.T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* 14, 1394-1403.

Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.

de Jong, J.G.; Lauzon, H.A.; Dominy, C.; Poloumienko, A.; Carstens, E.B.; Arif, B.M.; Krell, P.J. (2005). Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 86, 929-943.

Diodato, M. (1999). Bioecologia, aspectos morfológicos e consumo de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae) em *Populus deltoides* Bart. Ex Marsh. (Salicaceae). Curitiba, 1999. Tese (Doutorado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Entomologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Diodato, M.A.; Pedrosa-Macedo, J.H. (1996). Presencia de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera : Crambidae) sobre *Populus* spp. en el Brasil. *Quebracho* 4, 17-19.

Duffy, S.P.; Young, A.M.; Morin, B.; Lucarotti, C.J.; Koop, B.F.; Levin, D.B. (2006). Sequence Analysis and Organization of the *Neodiprion abietis* Nucleopolyhedrovirus Genome. *Journal of Virology* 80, 6952-6963.

Erlandson, M.A.; Baldwin, D.; Haveroen, M.; Keddie, B.A. (2006). Isolation and characterization of plaque-purified strains of *Malacosoma disstria* nucleopolyhedrovirus. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 266–271.

Escasa, S.R.; Lauzon, H.A.; Mathur, A.C.; Krell, P.J.; Arif, B.M. (2006). Sequence analysis of the *Choristoneura occidentalis granulovirus* genome. *Journal of General Virology* 87, 1917-1933.

Fang, M.; Nie, Y.; Harris, S.; Erlandson, M.A.; Theilmann, D.A. (2009). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene ac96 encodes a per Os infectivity factor (PIF-4). *Journal of Virology* 83, 12569-78.

FAO, 2012. Síntesis de los Informes Nacionales de Progreso, 24ª Reunión de la Comisión Internacional del Álamo, Dehradun, India, 30 de octubre - 2 de noviembre de 2012. Documento de trabajo IPC/12. División de Evaluación, Ordenación y Conservación Forestales, FAO, Roma, Disponível em: <http://www.fao.org/forestry/ipc2012/es>.

-
- Federici, B.A. (1997). Baculovirus pathogenesis. In: *The Baculoviruses* (Miller, L.K., Ed.). Plenum Press, New York, 33–59.
- Fraser, M.J.; Hink, W.F. (1982). Comparative Sensitivity of Several Plaque Assay Techniques Employing TN-368 and IPLB-SF 21AE Insect Cell Lines for Plaque Variants of *Galleria mellonella* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 40, 89-97
- Fraser, M.J.; Smith, G.E.; Summers, M.D. (1983). Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis viruses. *Journal of Virology* 47, 287–300.
- Fraser, M.J.; Brusca, J.S.; Smith, G.E.; Summers, M.D. (1985). Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus. *Virology* 145, 356-61.
- Fritsch, E.; Undorf-Spahn, K.; Kienzle, J.; Zebitz, C.P.W.; Huber, J. (2005). Apfelwickler Granulovirus: Erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-Populationen. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 57, 29–34.
- Garavaglia, M.J.; Miele, S.A.B.; Iserte, J.A.; Belaich, M.N.; Ghiringhelli, P.D. (2012). The *ac53*, *ac78*, *ac101*, and *ac103* Genes Are Newly Discovered Core Genes in the Family *Baculoviridae*. *Journal of Virology* 86, 12069.
- Garcia-Maruniak, A.; Maruniak, J.E.; Zanutto, P.M.A.; Doumbouya, A.E.; Liu, J.C.; Merritt, T.M.; Lanoie, J.S. (2004). Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus*. *Journal of Virology* 78, 7036-51.
- Gard, I.E. (1997). Field testing a genetically modified baculovirus. In *Brighton Crop Protection Conference Symposium Proceedings No. 68: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity?* 101–114.
- Blissard, G.W. (1996). Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* 20, 73-93.
- Geneious version 6.0.4 created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>
- Giri, L.; Li, H.; Sandgren, D.; Feiss, M.G.; Roller, R.; Bonning, B.C.; Murhammer, D.W. (2010). Removal of transposon target sites from the *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus fp25k* gene delays, but does not prevent, accumulation of the few polyhedral phenotype. *Journal of General Virology* 91, 3053–3064.
- Giri, L.; Feiss, M.G.; Bonning, B.C.; Murhammer, D.W. (2012). Production of baculovirus defective interfering particles during serial passage is delayed by removing transposon target sites in *fp25k*. *Journal of General Virology* 93, 389-99.
- Granados, R.R.; Lawler, K.A. (1981). In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108, 297-308.
- Gröner, A. (1989). Safety to nontarget invertebrates of baculoviruses. In: *Safety of microbial insecticides* (Lacey, L. e Davison, E.W., Eds.) 135-147. CRC press, Boca Raton, FL.
- Guindon, S.; Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52, 696-704.
- Haas-Stapleton, E.J.; Washburn, J.O.; Volkman, L.E. (2004). 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* 78, 6786-6791.
-

-
- Harrison, G.D. (1902). A list of north american lepidoptera and key to the literature of this order of insects. Smithsonian Institution. Bulletin 52. Washington.
- Harrison, R.L.; Summers, M.D. (1995). Mutations in the *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus 25 kDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *Journal of General Virology* 76, 1451-1459.
- Harrison, R.L.; Popham, H.J. (2008). Genomic sequence analysis of a granulovirus isolated from the Old World bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Virus Genes* 36, 565-581.
- Hasegawa, M.; Kishino H.; Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160–74.
- Hashimoto, Y.; Hayashi, K.; Hayakawa, T.; Ueno, Y.; Shimojo, E.I.; Kondo, A.; Sano, Y.; Matsumoto, T.; Granado, R.R. (2000). Physical map of a *Plutella xylostella granulovirus* genome. *Applied Entomology and Zoology* 35, 45-51.
- Hashimoto, Y.; Hayakawa, T.; Ueno, Y.; Fujita, T.; Sano, Y.; Matsumoto, T. (2000). Sequence analysis of the *Plutella xylostella granulovirus* genome. *Virology* 275, 358-372.
- Hawtin, R.E.; Zarkowska, T.; Arnold, K.; Thomas, C.J.; Gooday, G.W.; King, L.A.; Kuzio, J.A., Possee, R. D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus*-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238, 243–253.
- Herniou, E.A.; et al. (2012). In *Virus taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (eds AMQ King, MJ Adams, EB Carstens and EJ Lefkowitz) Elsevier.
- Herniou, EA.; Olszewski, J.A.; Cory, J.S.; O'Reilly, D.R. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses, *Annual Review of Entomology* 48, 211–234.
- Hilton, S.; Winstanley, D. (2008). Genomic sequence and biological characterization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the summer fruit tortrix, *Adoxophyes orana*. *Journal of General Virology* 89, 2898-2908.
- Hodgson, J.J.; Arif, B.M.; Krell, P.J. (2009). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Choristoneura fumiferana* multiple nucleopolyhedrovirus *v-cath* genes are expressed as pre-proenzymes. *Journal of General Virology* 90, 995–1000.
- Hodgson, J.J.; Arif, B.M.; Krell, P.J. (2011). Interaction of *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus Cathepsin Protease Progenitor (proV-CATH) with Insect Baculovirus Chitinase as a Mechanism for proV-CATH Cellular Retention. *Journal of Virology* 85, 3918–3929.
- Hodgson, J.J.; Arif, B.M.; Krell, P.J. (2013). Role of interactions between *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus procathepsin (proV-CATH) and chitinase chitin-binding or active site domains in V-CATH processing. *Journal of Virology* 87, 3471-3483.
- Hom, L.G.; Volkman, L.E. (2000). *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus *chiA* is required for processing of V-CATH. *Virology* 277, 178–183.
- Hom, L.G.; Ohkawa, T.; Trudeau, D.; Volkman, L.E. (2002). *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus ProV-CATH is activated during infected cell death. *Virology* 296, 212–218.
- Huber, J. (1986). Use of baculoviruses in pest management programs. In *The Biology of Baculoviruses*, vol. II (Granados, R. R. and Federici, B., eds.), CRC, Boca Raton.

-
- Hughes, P.R.; Wood, H.A. (1981). A Synchronous Peroral Technique for the Bioassay of Insect Viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 37, 154-159.
- Ignoffo, C.M.; Couch, T.L. (1981). The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial pesticide. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. (Burgess, H.D. Ed.), Academic Press. London 329-62.
- Jacks, R.; Maromorosch, E.; Sherman, K. (1985). Stability of Insect Viruses in the Environment. *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, New York, NY, USA 285-360.
- Kang, W.; Tristem, M.N.; Maeda, S.; Crook, N.E.; O'Reilly, D.R. (1998). Identification and characterization of the *Cydia pomonella granulovirus* cathepsin and chitinase genes. *Journal of General Virology* 79, 2283–2292.
- Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.; Miyata, T. (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30, 3059–3066.
- Katsuma, S.; Noguchi, Y.; Zhou, C.L.; Kobayashi, M.; Maeda, S. (1999). Characterization of the 25K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: implications for post-mortem host degradation. *Journal of General Virology* 80, 783–791.
- Katsuma, S.; Noguchi, Y.; Shimada, T.; Nagata, M.; Kobayashi, M.; Maeda, S. (1999). Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* polyhedron mutants. *Archives of Virology* 144, 1275–1285.
- Katsuma, S.; Tanaka, S.; Shimada, T.; Kobayashi, M. (2004). Reduced cysteine protease activity of the hemolymph of *Bombyx mori* larvae infected with fp25K-inactivated *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* results in the reduced postmortem host degradation. *Archives of Virology* 149, 1773–1782.
- Kelly, B.J.; King, L.A.; Possee, R.D. (2007). Introduction to baculovirus molecular biology. In *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*. Murhammer D.W.,(Ed.). Totowa, New Jersey: Humana Press. pp. 25–53.
- Kikhno, I.; Gutierrez, S.; Croizier, L.; Croizier, G.; Ferber, M.L. (2002). Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus*. *Journal of General Virology* 83, 3013–3022.
- Kimura M (1980). "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences". *Journal of Molecular Evolution* 16, 111–120.
- Kim, Y.K.; Jiang, H.L.; Je, Y.H.; Cho, M.H.; Cho, C.S. (2007). Modification of Baculovirus for Gene Therapy. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas(Ed.). 875-884.
- Kool, M.; Voncken, J.W.; van Lier, F.L.; Tramper, J.; Vlak, J.M. (1991). Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology* 183, 739-46.
- Kost, T.; Condreay, J.P. (1999). Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 428–433.
- Kost, T.A.; Condreay, J.P.; Jarvis, D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology* 23, 567-575.
-

-
- Kuzio, J.; Jaques, R.; Faulkner, P. (1989). Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* 173, 759–763.
- Lauzon, H.A.; Lucarotti, C.J.; Krell, P.J.; Feng, Q.; Retnakaran, A.; Arif, B.M. (2004). Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei nucleopolyhedrovirus* genome. *Journal of Virology* 78, 7023-7035.
- Lauzon, H.A.M.; Jamieson, P.B.; Krell, P.J., Arif, B.M. (2005). Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* genome. *Journal of General Virology* 86, 945-961.
- Lin, G.Y.; Zhong, J.; Wang, X.Z. (2000). Abnormal Formation of Polyhedra Resulting from a Single Mutation in the Polyhedrin Gene of *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology* 76, 13–19.
- López, M.G; Alfonso, V.; Carrillo, E.; Taboga, O. (2011). Description of a novel single mutation in the AcMNPV polyhedron gene that results in abnormally large cubic polyhedral. *Archives of Virology* 156, 695–699.
- Lua, L.H.L.; Pedrini, M.R.S.; Reid, S.; Robertson, A.; Tribe, D.E. (2002). Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus* serially passaged in cell culture. *Journal of General Virology* 83, 945–955.
- Machado, E.B. (2006). Controle de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera:Crambidae), a mariposa do álamo, com o uso de *C. vestigialis* multiplenucleopolyhedrovirus em condições de laboratório e campo. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.
- Marques, E.N.; Sousa, N.J.; Corrêa, R de M.; Gomes, N.B. (1995). Ocorrência de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae) em povoamentos de Álamo *Populus* spp. no Município de São Mateus do Sul – Paraná. *Revista do Setor de Ciências Agrárias*, Curitiba, 14, 229-230.
- McCreath, K.J. e Gooday, G.W. (1992). A rapid and sensitive microassay for determination of chitinolytic activity. *Journal of Microbiological Methods* 14, 229–337.
- Merryweather-Clarke, A.T.; Hirst, M.; Possee, R.D (1994). Recombination between genetically modified and unmodified *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in *Trichoplusia ni* larvae. *Acta Virologica* 38, 311-315.
- Miller, L.K.; Dawes, K.P. (1978). Restriction endonuclease analysis for the identification of baculovirus pesticides. *Applied and Environmental Microbiology* 5, 411-421.
- Miller, L.K. (1986). The genetics of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses* (Granados, R.R. e Federici, B.A. Eds) 1, 217-238. Florida, CRC Press.
- Mio, L.L.M.; Amorim, L. (2000). Doenças do Álamo. *Floresta* 30, 139-153.
- Moraes, S.A.; Alves, S.B. (1986). Quantificação de inóculo de patógenos. In: *Controle Microbiano de Insetos*. (Alves, S.B. Coord.). Editora Manole. São Paulo 278-288.

-
- Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa-Gómez, D.R.; Paro, F.E.; Soldorio, I.L. (2001). Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV susceptible and resistant strains of the insect. *Biological Control* 20, 247-253.
- Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44, 257–89.
- Moscardi, F. (2007). A Nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian Soybeans. In *Biological Control: A Global Perspective* (Goethel, C.V.M.S. e Lazarovits, G. eds.), 1, 344–352. Oxfordshire, UK, and Cambridge, USA: CAB International.
- Muñoz, D.; Murillo, R.; Krell, P.J.; Vlak, J.M.; Caballero, P. (1999). Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. *Virus Research* 59, 61-74.
- Nakai, M.; Goto, C.; Kang, W.; Shikata, M.; Luque, T.; Kunimi, Y. (2003). Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*. *Virology* 316, 171-183.
- Ogembo, J.G.; Chaeychomsri, S.; Kamiya, K.; Ishikawa, H.; Katou, Y.; Ikeda, M.; Kobayashi, M. (2007). Cloning and comparative characterization of nucleopolyhedroviruses isolated from African bollworm, *Helicoverpa armigera*, (Lepidoptera: Noctuidae) in different geographic regions. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 76, 39–49.
- Ohkawa, T.; Majima, K.; Maeda, S. (1994). A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* 68, 6619-6625.
- Ohkawa, T.; Washburn, J.O.; Sitapara, R.; Sid, E.; Volkman, L.E. (2005). Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. *Journal of Virology* 79, 15258-64.
- Ohkawa, T.; Volkman, L.E.; Welch, M.D. (2010). Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *The journal of cell biology* 190, 187–195.
- Oliveira, J.V.; Wolff, J.L.; Garcia-Maruniak, A.; Ribeiro, B.M.; Castro, M.E.B.; Souza, M.L.; Moscardi, F.; Maruniak, J.E.; Zanotto, P.M. (2006). Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 87, 3233–50.
- O'Reilly, D.R.; Miller, L.K.; Luckow, V.A. (1994). Baculovirus expression vectors. In: *A laboratory manual*. New York. Oxford University Press, Inc., 347.
- Payne, C.C. (1986). Insect pathogenic viruses as pest control agents. *Fortschritte der Zoologie* 32, 183-200.
- Pedrini, M.R.S.; Wolff, J.L.C.; Reid, S. (2004). Fast accumulation of few polyhedra mutants during passage of *Spodoptera frugiperda* multicapsid nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in Sf9 cell cultures. *Annals of Applied Biology* 145, 107-112.
- Pijlman, G.P.; Pruijssers, A.J.; Vlak, J.M., (2003). Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects. *Journal of General Virology* 84, 2041–2049.
-

-
- Pijlman, G.P.; van den Born, E.; Martens, D.E.; Vlak, J.M. (2001). *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. *Virology* 25, 132-138.
- Potter, K.N.; Faulkner, P.; Mackinnon, E.A. (1976). Strain Selection During Serial Passage of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Journal of Virology* 18, 1040-1050.
- Rambaut, A. (2008). FigTree v1.4.0: Tree figure drawing tool. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ravensberg, W.J. (2011). A Roadmap to the successful Development and Commercialization of Microbial pest control products for control of arthropods. Berlin: Springer.
- Read, A.F.; Taylor, L.H. (2001). The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292, 1099–1102.
- Redman, E.M.; Wilson, K.; Grzywacz, D.; Cory, J.S. (2010). High levels of genetic diversity in Spodoptera exempta NPV from Tanzania. *Journal of Invertebrate Pathology* 105, 190–193.
- Reed, L.J.; Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27, 493–497.
- Rezende, S.H.M.S.; Castro, M.E.B.; Souza, M.L. (2009) Accumulation of few-polyhedra mutants upon serial passage of *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* in cell culture. *Journal of Invertebrate Pathology* 3, 153-159.
- Rhodes, D.J. (1996). Economics of baculovirus–insect cell production systems. *Cytotechnology* 20, 291–297.
- Ribeiro, B.M.; Generino, A.P.M.; Acacio, C.N.L.; Kalapothakis, E.; Báoa, S.N. (2009). Characterization of a new *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) polyhedra mutant. *Virus Research* 140, 1–7.
- Rice, P.; Longden, I.; Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16, 276–277.
- Rohrmann, G.F. (2011). *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>
- Rosche, W.A.; Trinh, T.Q.; Sinden, R.R. (1995). Differential DNA secondary structure-mediated deletion mutation in the leading and lagging strands. *Journal of Bacteriology* 177, 4385–4391.
- Russell, R.L.Q.; Person, M.N.; Rohrmann, G.F. (1991). Immunoelectron microscopic examination of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins. *Journal of General Virology* 72, 275-283.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 3ed. Cold Spring Harbor, Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sauphanor, B.; Berling, M.; Toubon, J.F.; Reyes, M.; Delnatte, J.; Allezmoz, P. (2006). Carpopapse des pommes. Cas de résistance au virus de la granulose en verges biologique. *Phytoma—La Défense des Végétaux* 590, 24–27.

Saville, G.P.; Thomas, C.J.; Possee, R.D.; King, L.A. (2002). Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxyterminal KDEL ER-retention motif. *Journal of General Virology* 83, 685–694.

Schmitt, A.T. (1985). Eficiência da aplicação de Baculovirus erinnyis no controle do mandarová da mandioca. Empasc, Itajaí, *Comunicado Técnico* 88, 1-7.

Shapiro, D.I.; Fuxa, J.R.; Braymer, H.D.; Pashley, D.P. (1991). DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 58, 96-105.

Simon, O.; Williams, T.; Lopez-Ferber, M.; Caballero, P. (2004). Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5579–5588.

Simon, O.; Palma, L.; Williams, T.; Lopez-Ferber, M.; Caballero, P. (2012). Analysis of a naturally-occurring deletion mutant of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus reveals sf58 as a new per os infectivity factor of lepidopteran-infecting baculoviruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 109, 117–126.

Slack, J.M., Kuzio, J.; Faulkner, P. (1995). Characterization of vcath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology* 76, 1091–1098.

Slack, J.M.; Ribeiro, B.M.; de Souza, M.L. (2004). The gp64 locus of *Anticarsia gemmatilis* multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 39 repair exonuclease homologue and lacks v-cath and ChiA genes. *Journal of General Virology* 85, 211–219.

Slack, J.; Arif, B.M. (2007). The baculovirus occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in Virus Research* 69, 99-165.

Slavicek, J.M.; Plazolles, N.H.; Kelly, M.E. (1995). Rapid formation of few polyhedral mutants of *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus during serial passage in cell culture. *Biological Control* 5, 251-261.

Sparks, W.O.; Harrison, R.L.; Bonning, B.C. (2011). *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a per os infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut. *Virology* 409, 69–76.

Streisinger, G.; Okada, Y.; Emrich, J.; Newton, J.; Tsugata, A.; Terzaghi, E.; Inouye, M. (1966). Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 31, 77–84.

Summers, M.D.; Smith, G.E.; Knell, J.D.; Burand, J.P. (1980). Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ni* nuclear polyhedrosis virus recombinants. *Journal of Virology* 34, 694-703.

Sun, X.L. e Peng, H. (2007). Recent advances in biological pest insects by using viruses in China. *Virologica Sinica* 22, 158–162.

Szewczyk, B.; Souza, M.L.; Castro, M.E.B.; Moscardi, M.L.; Moscardi, F. (2011). Baculovirus Biopesticides. In: Margarita Stoytcheva. (Org.). Pesticides - Formulation, Effects, Fate.. New York: InTech. 25-36.

-
- Szewczyk, B.; Rabalski, L.; Krol, E.; Sihler, W.; de Souza, M.L. (2009). Baculovirus biopesticides - a safe alternative to chemical protection of plants. *Journal of Biopesticides* 2, 209-216.
- Taha, A.; Nour-El-Din, A.; Croizier, L.; Ferber, M.L.; Croizier, G. (2000). Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis granuloviruses*. *Virus Genes* 21, 147-155.
- Tavaré, S. (1986). Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* (American Mathematical Society) 17, 57–86.
- Thomas, C.J.; Brown, H.L.; Hawes, C.R.; Lee, B.Y.; Min, M.; King, L.A.; Possee, R.D. (1998). Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum. *Journal Virology* 72, 10207- 10212.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876–4882.
- Tramper, J.; Vlak, J.M. (1986). Some engineering and economic aspects of continuous cultivation of insect cells for the production of baculoviruses. *Annal of New York Academy of Sciences* 469, 279–288.
- Tuskan, G.A.; et al. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr & Gray). *Science* 313, 1596–1604.
- Valicente, F.H.; Tuelher, E.S.; Paiva, C.E.C.; Guimarães, M.R.F.; Macedo, C.V.; Wolff, J.L.C. (2008). A new baculovirus isolate that does not cause the liquefaction of the integument in *Spodoptera frugiperda* dead larvae. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 7, 77-82.
- Van Oers, M.M. e Vlak, J.M. (1997). The baculovirus 10-kDa protein. *Journal of Invertebrate Pathology* 70, 1–17.
- Vaughn, J.L.; Goodwin, R.H.; Tompkins, G.J.; McCawley, P., (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* 13, 213–217.
- Vieira, C.M.; Tuelher, E.S.; Valicente, F.H.; Wolff, J.L.C. (2012). Characterization of a *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* isolate that does not liquefy the integument of infected larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 111, 189–192.
- Volkman, L.E. (2007). Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton. *Current Drug Targets* 8, 1075-1083.
- Wang, X.; Xie, W.; Long, Q.; Pang, Y.; Pu, Z. (1991). Construction of baculovirus transfer vector system that can form polyhedra. *Chinese Journal of Virology* 7, 253–261.
- Wang, Y.; Choi, J.Y.; Roh, J.Y.; Woo, S.D.; Jin, B.R.; Je, Y.H. (2008). Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura granulovirus*. *Journal of Microbiology* 46, 704-708.
- Washburn, J.O., Chan, E.Y., Volkman, L.E., Aumiller, J.J.; Jarvis, D.L. (2003). Early synthesis of budded virus envelope fusion protein GP64 enhances *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus virulence in orally infected *Heliothis virescens*. *Journal of Virology* 77, 280–290.

-
- Qian, H.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Sun, P.; Zhu, S.; Guo, X.; Gao, K.; Xu, A.; Wang, W. (2013). Analysis of the genomic sequence of *Philosamia cynthia* nucleopolyhedrin virus and comparison with *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrin virus. *BioMed Central Genomics* 14,115.
- Wickham, T.J.; Davis, T.; Granados, R.R.; Hammer, D.A.; Shuler, M.L.; Wood, H.A. (1991). Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters* 13, 483-488.
- Williams, S.J.; Mark, B.L.; Vocadlo, D.J.; James, M.N.G.; Withers, S.G. (2002). Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* hexosaminidase plays a critical role in substrate-assisted catalysis by orienting the 2-acetamido group and stabilizing the transition state. *Journal of Biological Chemistry* 277, 40055–40065.
- Wormleaton, S.; Kuzio, J.; Winstanley, D. (2003). The complete sequence of the *Adoxophyes orana granulovirus* genome. *Virology* 311, 350-365.
- Xu, Z.; Hao, B. (2009) "CVTree update: a newly designed phylogenetic study platform using composition vectors and whole genomes", *Nucleic Acids Research* 37, 174-178.
- Zhang, G.Y.; Sun, X.L.; Zhang, Z.X.; Zhang, Z.F.; Wan, F.F. (1995). Production and effectiveness of the new formulation of *Helicoverpa* virus pesticide-emulsifiable suspension. *Virologica Sinica* 10, 242–247.
- Zhang, Y.A.; Fang, X.; Qu, L.J.; Hou, Y.X. (unpublished). Sequence and organization of the *Apocheima cinerarium nucleopolyhedrovirus* genome. Submitted (22-AUG-2012) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA
- Zonta-de-Carvalho, R.C.; Moscardi, F. (1994). Efeito de doses de Baculovirus *Anticarsia* no consumo e na utilização de alimento por larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 29, 1019-1025.
- Yang, M.M.; Li, M.L.; an Zhang, Y.; Zhu, Y. (2012). Baculoviruses and insect pests control in China. *African Journal of Microbiology Research* 6, 214-218.

9 ANEXOS

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
chiA AnpeNPV-L2	TTATAATTCGTCCTTTACT	---AATGTTTGAATATTCATGGCATTAAGCAGATCGCCATGTGACGCGTCTATTTCCCAGGCAAAACAAACCTCCTAACTTG								
chiA AnpeNPV-Z	TTATAATTCGTCCTTTACT	---AATGTTTGAATATTCATGGCATTAAGCAGATCGCCATGTGACGCGTCTATTTCCCAGGCAAAACAAACCTCCTAACTTG								
chiA CfDEFMNPV	TTAAAGTTCGTCCTTTACT	---TTAAAGTTTTTATTCATAACATTTAACAAAGTCGCCGTGTGCGCGTCGATCTCCCAGCAAAATAACCCACCCAAAGCCA								
chiA CfMNPV	CTATAGTTCGTCCTTTACT	---TTAACGTGTTTATTCATAGCATTTAACAAAGTCGCCGTGTGCGCGTCGATTTCCCAGCGAATAACCCGCCAATCCCG								
chiA EppoNPV	TTACAGTTCGTCCTTCATT	---TTGAATTGCGGTTTATTGTGTGAGCAGATCACCATTATCGGCGTCAATTTCCCATGCAAAACAATCCACCCAACTTG								
chiA HycuNPV	TCAAAGTTCGTCCTTTAAATAATTTAGTTTGTGATTCTAGCATTTAATAAATCGCCGTGTGACGCGTCTATTTCCCAGCGAACAACCCCAAAATTA									
chiA OpMNPV	TTAAAGTTCGTCCTTTACT	---CTAACCGTTCGTTCTAGCATTTCAACAAATCGCCGTGTGCGCGTCAATCTCCCAGCAAAACAGCCGCCAAAGCCG								
Consensus	YYAHARYTCGTCYYTHAHTAATHWDRHKYKHBRRTCATDRYRRTNARYARRTCRCRTRTRTCRCGCTCDATYTCCCANGCRAAYVNNCCDCCYAAANYR									
Oligo Foward										
Oligo Reverse										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
chiA AnpeNPV-L2	TTTTGTCCACATATCGACCTTTAGCTATAACAGAATCAACACATCATATGAAATTAATCGCCTTTGGTTTTATCAAAAACGTAGGCGGCTTTTGTCTA									
chiA AnpeNPV-Z	TTTTGTCCACATATCGACCTTTAGCTATAACAGAATCAACACATCATATGAAATTAATCGCCTTTGGTTTTATCAAAAACGTAGGCGGCTTTTGTCTA									
chiA CfDEFMNPV	TTTTGATCCACGTAACCTAGTTTTTGCCTAACAGAAATCAACACATCAAAACGATCAAGTCGCCATGTCTTTGTTAAAAACGTAAAGTCTTTAGCGG									
chiA CfMNPV	TTTTGATCTACATAACTATTTTTTGTAAATCAGAAATCGACACTGTCAAAAAGAGATTAATCGCCCTTGTCTTTGTTAAAAACGTAAAGCTTTAGCGG									
chiA EppoNPV	TTTTGATCAACGATCTGCTTTTAGCCAAAACGGAATCAACGCTGTCAAAAGATGATAGGTCGCCCTTATTTTTGTTAAAAACATATGATCTTCGGCAA									
chiA HycuNPV	TTTTGTCAACATACACACTTTTTTGCCTAACAGAAATCGACACTGTCAAAAGAAATCAAAATCCCTTTGGCACTGTTAAAAACGTAAAGCTTTAGCGG									
chiA OpMNPV	TTTTGTCAACGTAACACTTTTGCCTAACAGAAATCGACACTGTCAAAAGAAATCAAAATCCCTTTGGCACTGTTAAAAACGTAAAGCTTTAGCGG									
Consensus	TTTTGHTSHACRTAHMBRBYTTDGCYAWWACRGARTCRACRTRTCAWAHGWDAATHARRTCSSCHYTVKYWYTRTYAAAAACRTADGMBGCTTYDGCDR									
Oligo Foward										
Oligo Reverse										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
chiA AnpeNPV-L2	CGTTGTCAAATTTAACAAATATATTTTTTTTATTTTCGTTTTGATTTGGCGATAATCAACAACGCCATCTTCCCAGTCCCAGGAAACGGGCGGTTACTACT									
chiA AnpeNPV-Z	CGTTGTCAAATTTAACAAATATATTTTTTTTATTTTCGTTTTGATTTGGCGATAATCAACAACGCCATCTTCCCAGTCCCAGGAAACGGGCGGTTACTACT									
chiA CfDEFMNPV	CCGTGTCAAATTTGATTTGACTGTTTAAATTCGTTTTTAAATTTGGCGATAATCGACAACGCCCTTCCCAGTACCCGTCCAGGCGGCGGAGCTGT									
chiA CfMNPV	CCGAAATCAAATTTGATAATGACTGTTCAATTCGTTTTCAATTTGGCGATAATCGACAACGCCCTTCCCAGTCCCAGGCGGCGGAGCTGT									
chiA EppoNPV	CTTTGTCAAACCTGTACACGTAACCTGTTTAAATTTTCGTTTTTAAATTTGGCGATAAGTCAACAACCTCCGTTTTCCCAGTCCCAGGAAATGGGCGCTTTCCAGT									
chiA HycuNPV	CGGGTCGAACTGTAGATGATTTACTGAGTTCATTTAATTTGGCGGTAATCGACGACCCGTTTTCCCAGTCCCAGGCGGCGGCGGCGCTCGGCGGT									
chiA OpMNPV	CGGGTCGAACTGTAGATGATTTACTGAGTTCATTTAATTTGGCGGTAATCGACGACCCGTTTTCCCAGTCCCAGGCGGCGGCGGCGCTCGGCGGT									
Consensus	CBKHRTCAAAYYTRMWNHRTAYKYDYTBADWTYDYWYDATTGGCGRTARTCRACRACBCCRYTTCCEAVGTRCCSGDMAYSGVVCCKKYVSYNYY									
Oligo Foward										
Oligo Reverse										
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
chiA AnpeNPV-L2	TCCCAAAAATAGTTATCGTTTTCGTAATTTGACACTCCAGTCCAGCCGCGACCGTACATGGCCACGCCCAATAAATTTTGGCGGGTCCACGCCCTTGA									
chiA AnpeNPV-Z	TCCCAAAAATAGTTATCGTTTTCGTAATTTGACACTCCAGTCCAGCCGCGACCGTACATGGCCACGCCCAATAAATTTTGGCGGGTCCACGCCCTTGA									
chiA CfDEFMNPV	GCCTGTGAAATAGTTGTCACCGTATAGCCTGCCAGCCTGTCCAAACCGCGCCGTACATGGCAACGCCCAATAAATTTTGGCGGGTCCACGCCCTGG									
chiA CfMNPV	GCCTGTGAAATAGTTGTCACCGTATAGCCGCGCCAGCCTGTCCAAACCGCGCCGTACATGGCAACGCCCAATAAATTTTGGCGGGTCCACGCCCTGG									
chiA EppoNPV	ACCATCAAATAGTTATCACCTTTGTAATCAGACAGCCCTGTCCAGCCGCGCCGTACATGGCGACACCAATAAATTTTACTAGAAATCAACACCTTGT									
chiA HycuNPV	ACCCGAAAAAATTTATCCCGTCAATAACAGCCAGCCCTCCACCCCGGACCGTACATGGCGATGCCGACATGATTTTGTAAAGAGCTACACCTTGA									
chiA OpMNPV	GCCCGAGAAATATTTGTCCCGGCGTAGCCTGACACGCGCCGTCCACCCGCGCCGTACATGGCGACGCCCAAGTGAATTTTGGCGGGTCCACGCCCTGG									
Consensus	DCCHDHRAAAWADTTRTCRYKYRTRARYYHGMCAKCKCHGTCCAVCCCGVCCGTACATGGCVAYRCCVAYRATDAKTTRTYDVGVVKCHACRCCTTGD									
Oligo Foward										
Oligo Reverse										
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
chiA AnpeNPV-L2	TTTGTGAGCAATTTAACGGCATGGTCCGTGTTGACAGCTCGTTGGGTTCCAACTCGGCGGTACAGTGTAGTTTGGTATCCCAATCAATGTTTGACC									
chiA AnpeNPV-Z	TTTGTGAGCAATTTAACGGCATGGTCCGTGTTGACAGCTCGTTGGGTTCCAACTCGGCGGTACAGTGTAGTTTGGTATCCCAATCAATGTTTGACC									
chiA CfDEFMNPV	TTCTGTGAGCAATTTAACAGCGTAATCCGTGTTGACAGCTCGTTGGGTTCCAACTCGGCGGTAGAGTGTAGTTTGTAGCCAGATCGATGTTTGACC									
chiA CfMNPV	TTCTGTGAGCAATTTCAAGCGTATCCGTGTTGACAGCTCGTTGGGTTCCAACTCGGCGGTAGAGTGTAGTTTGTAGCCAGATCGATGTTTGACC									
chiA EppoNPV	TTTGTGAGCAATTTAACAGCGTATCCGTGTTGACAGCTCGTTGGGTTCCAACTCGGCGGTATAGTGTGTTTGTAGCCAAATCGGTATTTTGACC									
chiA HycuNPV	CTTTGTTAAACAATTTAACAGCGTATCCGTGTTGACAAATCATCGGGAATCCAACTTGGAGCGTACAAAGTGGTCTGATAGCCAAATCGGTATTTAGACC									
chiA OpMNPV	CCCGTGTGAGCAATTTCAAGCGTATCCGTGTTGACAGCTCGTTGGGTTCCAACTCGGCGGTATAGTGTGTTTGTAGCCAAATCGGTATTTTGACC									
Consensus	YYYGTKARCRWYTKMACRCRTRRTRSBGTGKGTGACARYTCRTYBGRSRTCCANYKBBGGVCGTABAHRHGTGTYTGRATKCCCAATCVRTRTTDAGCC									
Oligo Foward										
Oligo Reverse										

```

      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
chiA AnpeNPV-L2  ACGCGCCTTTAAAATCGTAGCTCATGAGAAATATTTTGTGCGAGGAACTTTTCGCGCAACGTCGTATTTTACTACAGCAATTTTGTGCGTGGCCGGCACTGAT
chiA AnpeNPV-Z   ACGCGCCTTTAAAATCGTAGCTCATGAGAAATATTTTGTGCGAGGAACTTTTCGCGCAACGTCGTATTTTACTACAGCAATTTTGTGCGTGGCCGGCACTGAT
chiA CfDEFMNPV   ACGCGCCTTTAAAATCGTAGCTCATGAGAAATATTTTGTGCGAGGAACTTTTCGCGCAACGTCGTATTTTACTACAGCAATTTTGTGCGTGGCCGGCACTAAT
chiA CfMNPV      AGGCGCCTTTAAAATCGTAGCTCATGAGAAATATTTTGTGCGAGGAACTTTTCGCGCAACGTCGTACTGTACCAGCAATTTTGTGATAGCCGGCACTGAT
chiA EppoNPV     AAGCTCCTTTAAAATCGTAGCTCATGAGAAATATTTTGTGCGAGGAACTTTTCGCGCAACGTCGTACTGTACCAGCAATTTTGTGATAGCCGGCACTGAT
chiA HycuNPV     ATGCCCTTTAAAATCGTAGCTCATGAGAAATATTTTGTGCGAGGAACTTTTCGCGCAACGTCGTACTGTACCAGCAATTTTGTGATAGCCGGCACTAAT
chiA OpMNPV      ACGCGCCTTTAAAATCGTAGCTCATGAGAAATATTTTGTGCGAGGAACTTTTCGCGCAACGTCGTACTGTACCAGCAATTTTGTGATAGCCGGCACTAAT
Consensus       ANGCBCCYTTRAAARTCGTARSTCATRASRWATATTTTTRYYVARRWRCYTTTGHGCVRSDCRTAHTBBACHASDKCRATYTTGTCTRRRCCSGMACYRAT
Oligo Foward    -----
Oligo Reverse   -----

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
chiA AnpeNPV-L2  TGCACCTTGTCAACTCGTACGTTTTGCCCCGTTTGCAGTTGCAACTCGTCTAACATCACGCGCAATTCCTTTAATAGAATGTTGACGTGTGAGCGTCGCGC
chiA AnpeNPV-Z   TGCACCTTGTCAACTCGTACGTTTTGCCCCGTTTGCAGTTGCAACTCGTCTAACATCACGCGCAATTCCTTTAATAGAATGTTGACGTGTGAGCGTCGCGC
chiA CfDEFMNPV   TGCACCTTGTCAACTCGTACGTTTTGCCCCGTTTGCAGTTGCAACTCGTCTAACATCACGCGCAATTCCTTTAATAGAATGTTGACGTGTGAGCGTCGCGC
chiA CfMNPV      TGCGCTTGTCAACTCGTACGTTTTGCCCCGTTTGCAGTTGAGTGGTCCAGCATCGCGCGCAATTCCTTTCAGTAAAATGTTGACGTGTGCGCGTCGCGC
chiA EppoNPV     TGCGCTTGTCAACTCGTACGTTTTGCCCCGTTTGCAGTTGCAACTCATCCAACATGTCACGCAACTCTTTTAGCAAAAACAAATGATGACGAGCGTCGCGC
chiA HycuNPV     TGCGCTAGTCAACTCGTACGTTTTGCCCCGTTTGCAGTTGAGAGTCCAGCATAGAACGCAATTCCTTGAACAAAATAATGACGTGTGCGCGTCGCGC
chiA OpMNPV      CGCGCTCGTCAACTCGTACGTTTTGCCCCGTTTGCAGTTGCAACTCGTCCAGCATGCGCGCAACTCTTTTAGCAAAAACAAAGTACGTGTGCGCGTCGCGC
Consensus       YGCRCTHGTARYTCTGAYRYVYTRYYGTTTGYRVYTGHRNTRSRCTCYARCATNDRMRCGAAATCYTKYARYARAAARWKGATAYTRKSVGCGTCGCGY
Oligo Foward    -----
Oligo Reverse   -----

      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
chiA AnpeNPV-L2  TCTTTGTTGCCGAGCGTGGGTTGGCGCCTTTACCGCCCGAAATTTCCAGTCGATGTCCACTCCGTCGAAAAATTTCCAAACCTGCAAAAATTCCTCTGA
chiA AnpeNPV-Z   TCTTTGTTGCCGAGCGTGGGTTGGCGCCTTTACCGCCCGAAATTTCCAGTCGATGTCCACTCCGTCGAAAAATTTCCAAACCTGCAAAAATTCCTCTGA
chiA CfDEFMNPV   TCTTTGTTGCCGAGTGTGGGTTGGCGCCTTTACCCCGGAAACTCCCAATCGATGTCTACCCCGTCAAAAAATTTCCAAACCTGCAAAAATTCCTTTGA
chiA CfMNPV      TCCCGCTTGCAGAGTGGGTTGGCGCCTTTGCGCCCGGAAACTCCCAATCAATGTCACCCCGTCAAAAAATTTCCACACCTGCAAAAATTCCTTTGA
chiA EppoNPV     TTCGGATCGCCAATGGCCGATTAGCGCCTTTACCGCCCGAAATTTCCCAATCAATGTCACCCCGTCAAAAAATTTCCAAACCTGCAAAAATTCCTTTAA
chiA HycuNPV     TCCCGCTTGCAGAGCGCGGGTTGGCACCTTTGCGCCCGGAAACTCCCAATCAATGTCACCCCGTCAAAAAATTTCCAAACCTGCAAAAATTCCTTTGA
chiA OpMNPV      TCGCGCTTGCAGAGCGCGGGTTGGCGCCTTTGCGCCCGGAAACTCCCAATCGATGTCCACCCCGTCGAAAAATTTCCACACCTGCAAAAATTCCTTTAA
Consensus       TYBBBRTYRCRAKINGYGGRTTRGCRCCYTRCCRCGGAAYTCCARTCRATRTCYACNCCGTCRAARAAYTTCCAMACYTYAAAAAYTCYVTRA
Oligo Foward    -----
Oligo Reverse   -----

      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
chiA AnpeNPV-L2  CGGAGTCTACAAACACGCGCCGTTTTTCCGCGTCTGTCATGTAATAGAACGGGTCCGACAGTGTCCAGCCGCGATAGACGGCAGAAATTTTAAAGGTGTGG
chiA AnpeNPV-Z   CGGAGTCTACAAACACGCGCCGTTTTTCCGCGTCTGTCATGTAATAGAACGGGTCCGACAGTGTCCAGCCGCGATAGACGGCAGAAATTTTAAAGGTGTGG
chiA CfDEFMNPV   CAGAAATCCACAAACACGCGCCGTTTTATCGCGTCTGTCATGTAATAGAACGGGTCCGACAAATGTCCAGCCGCGATGGACGGCAAAATTTTAAAGGTGTGG
chiA CfMNPV      CCGAGTCCACAAACACGCGCCGTTTTTCCGCGTCTGTCATGAAATAGAACGGGTCCGACAACTCCAGCCGCGATGGACGGCAGAAATTTTAAAGGTGTGG
chiA EppoNPV     CCGAAATCAACGAAACGTTTCTTCTGTTGACATGTCGATGAAATAGAACGGGTCCGACAAAGTCCAGCCACCGATGGACGGTAAAACTTTTAAATGCGG
chiA HycuNPV     CGGAAATCGACAAACACGTCGCGTTTTTCCGCGTCTGTCATGAAATAGAACGGGTCCGACAACTCCAGCCGCGAAATAGATGGTAAAAATTTTATGTGAGG
chiA OpMNPV      CGGATTCGACAAACACGCGCCGTTTCTTCCGCGTCTGTCATGAAATAGAACGGGTCCGACAGCTCCAGCCGCGAAATGGACGGCAGGAATTTTCAATGCGG
Consensus       CVGADTCNACRAACRYKYKYYKKWYSRRCCTGTCGATRNAATAAARAASGGRTCSGACARHGTCCASCCRCRATRAGYGYARRAYTTTNAADRTGHGG
Oligo Foward    -----
Oligo Reverse   -----

      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
chiA AnpeNPV-L2  ATTAGCCAGTTTGGCCGCCATCAACTGACCAAAGTTGCCTTTGTAGGGCTCGTTCCAAGCAGACACGCCCTTTTGCGGTTTTTGTACTGCGGCCCAAGGG
chiA AnpeNPV-Z   ATTAGCCAGTTTGGCCGCCATCAACTGACCAAAGTTGCCTTTGTAGGGCTCGTTCCAAGCAGACACGCCCTTTTGCGGTTTTTGTACTGCGGCCCAAGGG
chiA CfDEFMNPV   ATTGGCCAAATTTGGCCGCCATTAGCTGACCAAAGTTGCCTTTGTAGGGCTCGTTCCAAGCAGATACACCTTTCTGCGGTTTTTGTATTGCGGCCCAAGGA
chiA CfMNPV      ATTGGCCAGCTTTGGCCGCCATTAGCTGACCAAAGTTGCCTTTGTAGGGCTCGTTCCATGCGGACACGCCCTTTTGCGGTTTTTGTATTGCGGCCCAAGGA
chiA EppoNPV     GTTGGCCAACTTTGGCCGCCATTATCTGACCAAAGTTGCCTTTGTAGGGCTCGTTCCAAGCGGATACACCTTTTGTGGTTTTTGTATTGCGGCCCAAGGA
chiA HycuNPV     GTTGGCCAACTTTGGCCGCCATCAATTTGGCCAAAGTTGCCTTTGTAGGGTTCTGTTCCAGCAGACACGCCCTTTCTGCGGTTTTTGTATTGCGGCCCAAGGG
chiA OpMNPV      GTTGGCCAGCTTTGGCCGCCATCAACTGGCCAAAGTTGCCTTTGTAGGGCTCGTTCCATGCGGATACGCCCTTTTGCGGTTTTTGTATTGCGGCCCAAGGG
Consensus       RTTDGCARYTTGGSCCATTYADYTRGCCRAARTTGCCTTTGTAVGGYTCGTTCCAHCGRGAYACRCCYTYTYTGYYVTTTTGTAVKGCCKCCAVGGR
Oligo Foward    -----
Oligo Reverse   -----

```

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
chiA AnpeNPV-L2 TCGTGAAATAGCAACTTTAAAATCTGAACGGCCCTGGCAAGAGCGTTGCAGCGCTTCAAAACTACCGGGTATGGTTTTAAGGGCATCGTTAAGGCCGTGCG
chiA AnpeNPV-Z TCGTGAAATAGCAACTTTAAAATCTGAACGGCCCTGGCAAGAGCGTTGCAGCGCTTCAAAACTACCGGGTATGGTTTTAAGGGCATCGTTAAGGCCGTGCG
chiA CfDEFMNPV TCGTGAAATAGCAACTTTAAAATCTGAACGGCCCTGGCAAGAGCGTTGCAGCGCTTCAAAACTACCGGGTATGGTTTTAAGGGCATCGTTAAGGCCATCGC
chiA CfMNPV TCGTGAAATGGCACTTTGAAATCTGAACGACCCCTTGCAGGAGCGCTGCAGCGCTTCAAAACTGCCGGGAATGGTTTTGAGGGCGTCTGTAGGCCGTGCG
chiA EppoNPV TCGTGATGGAAACTTTAAAATCATCGCGTCTTTTGCAGATCGTTGCAAAATTTTCAAAACTACCAGGTATGGTTTTGAGGGCATCGTTAATCCATCGC
chiA HycuNPV TCGTGAAATGGCAACTTTAAGTCTGCGGCGCTTTGCAGGAGCGTTGCAGCGCTTCAAAACTGCCGGTATCGTTTTGAGGGCATCGTTAGTCCGTGCG
chiA OpMNPV TCGTGAAATAGCAACTTTAAGTCTGCGGCGCTTTGCAGGAGCGTTGCAGCGCTTCAAAACTGCCGGGAATGGTCTTGAGCGCGTCTGTAGCCCGTGC
Consensus TCGTGDA TRGM RACY TTRAA RT CWK MRC GDCCY TKGCAV GADCG YTGCA RMKY TCAAAACT RCCV GWA TBGTY TTRAGS GCRT CGTTDARBCCRT CGC
Oligo Foward
Oligo Reverse

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
chiA AnpeNPV-L2 CGCCACAAATGGGTATAAACCCGTACAACAAATGTGACAAAGTTGGGCAGCGGCACCTTTGCCACCGGAAAGTTACGACCATACACGCCCATTTCCACAAA
chiA AnpeNPV-Z CGCCACAAATGGGTATAAACCCGTACAACAAATGTGACAAAGTTGGGCAGCGGCACCTTTGCCACCGGAAAGTTACGACCATACACGCCCATTTCCACAAA
chiA CfDEFMNPV CGCCACAAATGGGTATAAACCCGTACAACAAATGTGAGAGTTGGGCAGCGGCACCTTTGCCACCGGAAAGTTACGACCATACACGCCCATTTCCACAAA
chiA CfMNPV CGCCGAAATGGGTATAAACCCGTACAACAGATGCGAGAGATTGGGCAGCGGCACCTTTGTCTACCGGAAATTCGGCCGTACACGCCCATTTCCACAAA
chiA EppoNPV CTCCGAAATGGGTATAAACCCGTACAACAGATGGGCAAAATTTGGCAGCGGCACCTTTGTGATTGGAAGTTCCGTCCGTACACGCCCATTTCCACAAA
chiA HycuNPV CGCCGAAATAGGAAATAAATCCGTACAACAGATGCGCAAAATTTGGGCAACGGCACTTTGTCTATTGGGAAATTCGCCCGGTACACGCCCATTTCCACAAA
chiA OpMNPV CGCCGAAATCGGGATGAAGCCGTACAGCAGATGGGCAAGTTGGGCAGCGGCACCTTTGCCACCGGAAAGGCCGCGGTACACGCCCATTTCCAGAA
Consensus CGCCRCAAATVGGDATRAANCCGTACARCARATBGBASARRTTKGGCARCGGCACYTTGTCBAYYGGRAARYRRCNCCRTACACGCCCAAYTHACRAA
Oligo Foward
Oligo Reverse

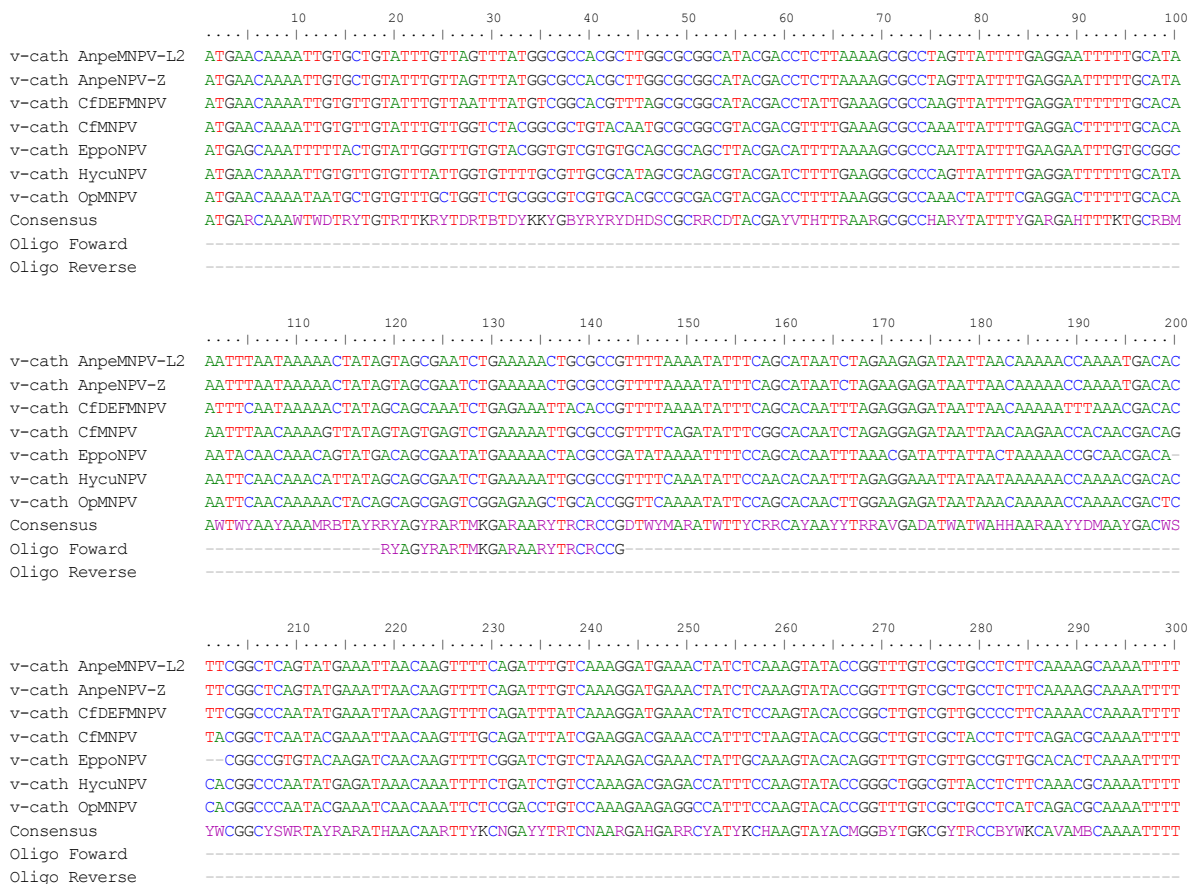
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300
chiA AnpeNPV-L2 ATACGAGCGATGGTTTTGTCTTGGCGTCGGTTAGGTTTGTATTCTCCGCCAAATGATTTCCAGCGGGGACAGATGACCACCGTCCGTGTCGCCAACT
chiA AnpeNPV-Z ATACGAGCGATGGTTTTGTCTTGGCGTCGGTTAGGTTTGTATTCTCCGCCAAATGATTTCCAGCGGGGACAGATGACCACCGTCCGTGTCGCCAACT
chiA CfDEFMNPV ATACGAGCAATTGTTTTGTCTTGGCGCCGCCAGGTTTGTATTCTCCGCCAAACATATTTCCAGCGGATTCAAATGACCACCGTCAAGTTCGCCAACT
chiA CfMNPV ATACGAGCGACGGTCTTGTCTTGGCGCGTCCGGGTTGTTTCTCCGCCAAACATATTTCCAGCGGAGACAAATGACCACCGTCCGTGTCGCCAACT
chiA EppoNPV GTACGCGCGACGGTCCGCTTATTGGCGTCTACCAGGTTTGTGTTTTCTCCGCCAAACATATTTAGCGGAGTCAAATGACCACCGTCAAGTTCAGCGACC
chiA HycuNPV ATACGAGCGACGGTCTTGTGTTGGCGCGCGCCGGGCTGTTGTTTTCTCCGCCAAACATATTTCCATCGGAAGCAAATGTCGCCCGTCCGTGTCGCCGACT
chiA OpMNPV ATACGCGGCCACGGTCTTGTGTTGGGGCGCGCCGGGCTGTTGTTTTCTCCGCCAAGCGTACTCTAGCGGACAAAGTCCGCCCGTCCGTGTCGCCGACC
Consensus RTACGRCGVAYKGTYKYGTYNKBSGBCKDYIRGGYTTGTRRTTYTCBYSCCAARYRTATYCYAKCGVDDCARRTHGCCRCGTCTMGTGTCVGCVACY
Oligo Foward
Oligo Reverse

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
chiA AnpeNPV-L2 TTAACTAAGACAGGTTCACTCACGAGCAGCCGTCCTCATCACACCTTGACGCGCATGCTAAACTGTCCGCTTTTAGTCACATCCACCGTGGCTTTCT
chiA AnpeNPV-Z TTAACTAAGACAGGTTCACTCACGAGCAGCCGTCCTCATCACACCTTGACGCGCATGCTAAACTGTCCGCTTTTAGTCACATCCACCGTGGCTTTCT
chiA CfDEFMNPV TTAACTAAGACAGGTTCACTCACGAGCAGCCATCCTCATCGCACACCTTGACGCGCATGCTAAACTGTCCGCTTTTGGACACGCAACCGTGGCTTTTT
chiA CfMNPV TTGACGGCTACCGTTCCGCTCACGAGCAGCCGTCCTCATCGCACACCTTGACGCGCATGCTAAACTGTCCGCTTTTGAAGACGTTGACCGTGGTCCCTT
chiA EppoNPV CTAACAAATACAGAGTCTGCTCACCGAACAAACCTCCTCGTTACACAATTTAAGCGCGCATGTTAAATGTCCGCTTTTGTAAACAATAACGTTGGCTTTT
chiA HycuNPV TTGACAGTTACCGTTCCGCTCACGGAACAGCCGTCATCATCGCAAAATTTGACGCGCATGCCAAATGCCGCTTTTGAACAAGTTAACGCTAGCTTTTT
chiA OpMNPV CTGACGGTACCGGCTCGCTCACGAGAACCGCTCGTCTCGCACAGTTGACGCGCATGTTAAACTGTCCGCTTTTGGACACGTCGATCGTGGCTCGCT
Consensus YTRACDRHBACMRBTRCTYACSGARMARCCRTCVTCRTYRCACAVYTTTRACGVCATSYRAAHTGYCCGCTYTTTRDHVACRWVYAVYSTRGYYKYT
Oligo Foward
Oligo Reverse

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
chiA AnpeNPV-L2 TGGCGTCAGCGTCGCCTTTCCAGACCTGTTTATCGTTAAACAACAGTAGGCCATGTCACCGACGCCACCATTCACACAGTTCCAAAGAAACTTGCACACT
chiA AnpeNPV-Z TGGCGTCAGCGTCGCCTTTCCAGACCTGTTTATCGTTAAACAACAGTAGGCCATGTCACCGACGCCACCATTCACACAGTTCCAAAGAAACTTGCACACT
chiA CfDEFMNPV TAGCGTCAGCGTCGCCTTTCCAGACCTGTTTATCATTAACAAGCACATAAGCCATATCACCGACGCCACCATTCACACAGTTCCAAAGAAACTTGTACGTT
chiA CfMNPV TAGCGAGCGCATCGCCTTTCCAAACTTGTATTATCGTTAAACAAGCACAGTAAGCCATGTCACCGATTCCACCATTCACACAGTTCCAAAGAAACTTGCACGCT
chiA EppoNPV TTGCGCCGGCATCGCCTTTCCACATTTGTTGTTGGTCAACAGTACGTAAGCAATGTCGCCAAATTCGCCATTCACAAACGTTCCAGCTCACTTGCACGAT
chiA HycuNPV TAGCGGCGCGCTCGCCTTTCCATACCTGTTTGTGTTCAACAGTACGTAAGCAATGTCGCCAAATTCGCCATTCACAAACGTTCCAGCTCACTTGCACGAT
chiA OpMNPV TGGCGCGCGCGGCCCTTCCACACTTGATTTTCTGTTAAACAACAGTACGCCATGTCGCCACCGCCGTTCCACAGCTTCCAGCACGGGACGCT
Consensus TDGCGNCRGCRKCCYTTCCANAYTGWTKDTSRTYAAACARYACRTAVGCMATRTCVCCSAHKYRCRCRTTCCAMACGTTCCAVSWMACBKYACRHT
Oligo Foward
Oligo Reverse



Anexo 1. Alinhamento do gene quitinase (*chiA*) dos representantes dos *Alphabaculovirus* do Grupo I Clado B. Utilizado para o desenho de oligonucleotídeos degenerados (oligo *foward* e oligo *reverse*) visando investigar a presença desse gene no genoma do CoveMNPV. Alinhamento realizado no programa BioEdit/ClustaW.



```

          310          320          330          340          350          360          370          380          390          400
v-cath AnpeMNPV-L2  TGGGAGGTCGTAGTTTGGACCCGCCGCCGATAAAGGGCCATTAGAAATTTGACTGGCCGCCCTAAACAAGTGACTAGTGTGAAAAATCAAGGCATGT
v-cath AnpeNPV-Z    TGGGAGGTCGTAGTTTGGACCCGCCGCCGATAAAGGGCCATTAGAAATTTGACTGGCCGCCCTAAACAAGTGACTAGTGTGAAAAATCAAGGCATGT
v-cath CfDEFMNPV   TGGGAGGTCGTAGTTTAAACCCGCCGCCGATAAAGGGCCCTTAGAGTTTACTGGCCGCCCTAAACAAGTGACTAGTGTCAAAAAATCAAGGCATGT
v-cath CfMNPV      TGGGAAGTCGTGGTCTGGACCCGCCGCCGATAAAGGACCCCTCGAATTTGACTGGCCGCCCTAAACAAGTGACTAGTGTAAAGAAATCAAGGCATGT
v-cath EppoNPV     TGGGAAGTCGTGGTCTGGACCCGCCGCCGATAAAGGACCCCTCGAATTTGACTGGCCGCCCTAAACAAGTGACTAGTGTAAACAAAGTAACTAGCCTTAAAAACCCAGGGCATGT
v-cath HycuNPV     TGGGAGGTCGTGGTCTAAATCGTCCGCCGATAAAGGACCTTTAGAGTTTACTGGCCGCCCTAAACAAGTGACTAGTGTAAAAACCCAGGCATAT
v-cath OpMNPV      TGGGAGGTCGTAAATCTGGACCCGCCGCCGATAAGGGCCCTCTCGAGTTTACTGGCCGCCCTAAACAAGTGACTAGTGTAAAAATCAAGGCATGT
Consensus          TGGCARGTMGTRRTBYTVRAYCGBCCCGSGRYARAGGVCNNTYMGARTTTGAYTGGCGHCRBYTHAACARRTRACYAGYGNARAAAYCARGGCRYDT
Oligo Foward
Oligo Reverse

```

```

          410          420          430          440          450          460          470          480          490          500
v-cath AnpeMNPV-L2  CGCGGCGGTGTGGGCTTTGCCACCCCTTGGCAGTTTGGAAAGCCAGTTTGCATTAACACGATCAACTTATAAATTTGTAGAGCAGCAACTTATCGA
v-cath AnpeNPV-Z    CGCGGCGGTGTGGGCTTTGCCACCCCTTGGCAGTTTGGAAAGCCAGTTTGCATTAACACGATCAACTTATAAATTTGTAGAGCAGCAACTTATCGA
v-cath CfDEFMNPV   CGCGGCGGTGTGGGCTTTGCCACCCCTTGGCAGTTTGGAAAGCCAGTTTGCATTAACACGATCAACTTATAAATTTGTAGAGCAGCAACTTATCGA
v-cath CfMNPV      CGCGGCGGTGTGGGCTTTGCTACCCCTTGGCAGTTTGGAAAGCCAGTTTGCATTAACACCAATCAATTCATAAACTGTCCGAGCAACAGCTCATTGA
v-cath EppoNPV     CGCGGCGGTGTGGGCTTTGCAACTTTGGCCAGTTTGGAAAGCCAGTTTGCATTAACACCAATCAATTCATAAACTGTCCGAGCAACCAATGATCGA
v-cath HycuNPV     CGCGGCGATGTGGGCTTTGCTACACTCCGAGTTTAGAGAGTCAGTTTGTATCAAAACCAATCAACTCATAAATTTGTCCGAACCAACTCATAAGA
v-cath OpMNPV      CGCGGCGGTGTGGGCTTTGCCACCCCTTGGCAGTTTGGAAAGCCAGTTTGCATTAACACCAAGCCATAAATTTGTCCGAAACCAACTCATTGA
Consensus          CGGGYCDTGTGGGCTTTCGCHACHYTBGSCAGTTTRGARAYCARTTYGCNATYRMAYAYRAYCRVYTHATWAAAYTGTGCVGARCARCARHTBATHGA
Oligo Foward
Oligo Reverse

```

```

          510          520          530          540          550          560          570          580          590          600
v-cath AnpeMNPV-L2  CTGCGATTTTGTAGAGCTAGGCTGTGACGGGGATTGCTGCACACGGCGTACGAGGCCGTCATGAACATGGGCGGCATACAAGCCGAAAAATGATTATCCG
v-cath AnpeNPV-Z    CTGCGATTTTGTAGAGCTAGGCTGTGACGGGGATTGCTGCACACGGCGTACGAGGCCGTCATGAACATGGGCGGCATACAAGCCGAAAAATGATTATCCG
v-cath CfDEFMNPV   CTGCGATTTTGTGACATGGGCTGTGACGGGGTTTGTGCACACGGCGTACGAGGCCGTCATGAACATGGGCGGCATACAAGCCGAAAAATGATTATCCG
v-cath CfMNPV      CTGCGATTTTGTGACATGGGCTGTGACGGGGCTGCTGCACACGGCGTACGAGGCCGTCATGAACATGGGCGGCATACAAGCCGAAAAATGATTATCCG
v-cath EppoNPV     CTGCGATTTTGTGATGTCGGTTGCCAAGGGCTTTGCTGCACACAGCTTTTGAAGCTATATAGCATGGTGGTGTGCAAAATGAAAAACGATTACCCCT
v-cath HycuNPV     CTGTGATTTATGAGACGGGGTTGCAACGGGGCTTTGCTGCACACAGCTACGAAAGCCGTTATGCAAAATGGTGGCGTCCAAAGCCGAAAAATGATTATCCG
v-cath OpMNPV      TTGCGACCGTGTAAACGGGGCTGCGACGGGGCTTTGCTGCACACGGCTTCGAGTCTGCCATGAAATGGGCGGCATGCAAAATGGAAAGCCGACTACCCB
Consensus          YTYGAYNTGTDRAIRYVGGYTYGRAMGGVGGNYTYTKACACRCGDTWYGARKCYRYATKVRMATGGYGGYRTRCARRYEGAAARYGAYTAYCCB
Oligo Foward
Oligo Reverse

```

```

          610          620          630          640          650          660          670          680          690          700
v-cath AnpeMNPV-L2  TACGAAGCAAAACACGGCCCTTGTGAGTAAATCGGCCAAATTTGTAGTCAGGGTAAAAAATGCTACAGGTATGTCACACTATTTGAAGGAAAACTTA
v-cath AnpeNPV-Z    TACGAAGCAAAACACGGCCCTTGTGAGTAAATCGGCCAAATTTGTAGTCAGGGTAAAAAATGCTACAGGTATGTCACACTATTTGAAGGAAAACTTA
v-cath CfDEFMNPV   TACGAAGCAAAACACGGCCCTTGTGAGTAAATCGGCCAAATTTGTAGTAAAGTAAAAAATGCTACAGGTATGTCCTTATGATTTGAGGAAAACTTA
v-cath CfMNPV      TACGAGGCAAAACACGGCCCTTGTGAGTAAATCGGCCAAATTTGTAGTAAAGTAAAAAATGCTACAGGTATGTCACAGTGTGTTGAGGAAAACTTA
v-cath EppoNPV     TACGAATCCAGTAAACATTTGTCGATGATGATCCACAAATTTGTAGTCGAGTTAAACAAATGCAATCGTTACATTAACAATTTACGAAGAAAACTAA
v-cath HycuNPV     TATGAAGGAAGCGACGGCAATTTGCTGCGTGGACGTTGCCAAGTTTGTGGTTAAGGTGAAAAAATGTTACAGGTACATTTGCGGATTTGAAGAAAAATGA
v-cath OpMNPV      TACGAGACCCCAACGGCCATGCGGCATCAACCCCAACCGATTTGTGGTGGCGTTAGAAGCTGCCCGGTACATTTGTTATGTTTGGGAAAAAGCTCA
Consensus          TAYGARDSMRYRACRRYNMVTCYGHVYVRAYSYNRMCMRRTTTTRGTYYRVGTDARARMRTGYHRMYGKTAYRTRYDYDVTDTWYGARGARAARYTNA
Oligo Foward
Oligo Reverse

```

```

          710          720          730          740          750          760          770          780          790          800
v-cath AnpeMNPV-L2  AAGACCTGCTGCGCATCGTGGTCCAATTCCTCGCCATAGACGATCGGACATTTGGGTTACAAACGTGGCATATAAGATACTGTGAAAAACCTTGG
v-cath AnpeNPV-Z    AAGACCTGCTGCGCATCGTGGTCCAATTCCTCGCCATAGACGATCGGACATTTGGGTTACAAACGTGGCATATAAGATACTGTGAAAAACCTTGG
v-cath CfDEFMNPV   AAGACTTCTGCGCATTTGGGCCACTTCTGTCGCCATAGACGATCGGACATTTGAAATTAACAACTGGGCTTATACGATACTGTGCAAAACCCGG
v-cath CfMNPV      AAGACTTCTGCGCAGCTGGGCCAAATTCCTCGCAATAGACGATCGGACATAGTAAACTACAAACCGGCAATTAAGAAATACTGTGCCAAACCCGG
v-cath EppoNPV     AAGACTGTTAAGATTAGCAGGCCCATACCGGTAGCCATAGACGATCGGACATTTGAAATTAACAACTGGGCTTATACGATACTGTGCAAAACCCGG
v-cath HycuNPV     AAGACTTCTGCGTATTTGAGGCCATTCCTCGCATAGACGATCGGACATTTGAAATTAACAACTGGGCTTATACGATACTGTGCCAACTACGG
v-cath OpMNPV      AAGACTTCTGCGCAGCTGGGCCAAATTCCTCGCAATAGACGATCGGACATAGTAAACTACAAACCGGCAATTAAGAAATACTGTGCCAAACCCGG
Consensus          ARGAYBTRYTRMGHDBHGYRGGBCCHMTWCCBTNGCNATAGACGCRCTCSGACATWKTVRRYTYVYRMRHGGCRTHATDMRRYAHYTKMVAACHAYGG
Oligo Foward
Oligo Reverse

```

```

          810          820          830          840          850          860          870          880          890          900
v-cath AnpeMNPV-L2  GTTAAACCACCGGTGCTTTTGTAGTGGCTACGGAGTTGAAACCGGAATACCGTTTGGATTTTAAAAACACTTTGGGCGCGGACTGGGGAGAACAGGGC
v-cath AnpeNPV-Z    GTTAAACCACCGGTGCTTTTGTAGTGGCTACGGAGTTGAAACCGGAATACCGTTTGGATTTTAAAAACACTTTGGGCGCGGACTGGGGAGAACAGGGC
v-cath CfDEFMNPV   GTTAAACCACCGAGTCTTTTGTAGTGGCTACGCCCTCGAAGAACGGAGTACCGTTTGGATTTTAAAAACACTTTGGGCTACGGACTGGGGAGAACAGGGT
v-cath CfMNPV      GTTGAATCAGCAGTCTCTTAGTGGCTACGCCCTCGAAGAACGGAGTACCGTTTGGATTTTAAAAACACTTTGGGCTACGGACTGGGGAGAACAGGGT
v-cath EppoNPV     CCTCAACCATGCAGTGTGCTGGTGGCTATGGCGTGGAAATTAAGTGGCGTACTGGAATTTGAAAAACAGTTGGGGAACCTGATTTGGGTTGAACAGGT
v-cath HycuNPV     GCTCAACCCACCGGTTCTGTTGGTTGGATACGGCGTTGAAACCAACGTTCCCTTATTTGGAATCTTAAAAACACTTTGGGCTGAAAGTATGGGGAGACAGGG
v-cath OpMNPV      CCTCAACCCACCGGTGCTTTGTTGGCTAGCCCTCGAAGAACGGAGTACCGTTTGGATTTTAAAAACACTTTGGGCTGAAAGTATGGGGAGACAGGG
Consensus          SYTVAAYCAYGCRGTYBYTRGKGGMTAYGSMGTBAAAAAYRRHRTDCCBTWYTGGAATHTDAAAAACASDTGGGGRHMDGATTTGGGGWARSADGN
Oligo Foward
Oligo Reverse

```

```

          910      920      930      940      950      960      970
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
v-cath AnpeMNPV-L2 TATTTTAGAGTGCACAAAACATAAACGCTTGCGGTATAAAAAATGAATTACCATCAAGCGCGGAAATCTATTAA
v-cath AnpeNPV-Z   TATTTTAGAGTGCACAAAACATAAACGCTTGCGGTATAAAAAATGAATTACCATCAAGCGCGGAAATCTATTAA
v-cath CfDEFMNPV  TATTTTAGAGTGCACAAAACATAAACGCTTGCGGCATACAAAATGAATTACCTCAAGCGCGGAAATCTATTAA
v-cath CfMNPV     TATTTTAGGGTGCACAAAACATAAACGCGTGCGGCATACAAAACGAATTGCCCTCAAGTGCAGGAAATATATTGA
v-cath EppoNPV    TTCCTTAAATACACAAAATGTTAATGCTTGCGGCATTA AAAATGAACTGGCGCTACAGCGGAAATAAAATTAA
v-cath HycuNPV    TATTTTAGGGTGCACAAAACATAAACGCTTGCGGTATACGAAATGAATTGCTTCAAGCGCAGAAATTTATTAA
v-cath OpMNPV     TATTTTAGGGTGCAGCAAAAACATAACGCTTGCGGCATACGAAATGAAGTAGTATCAAGTGCAGGAAATTTATTAA
Consensus         TWYTTTARRRTRCARCAAAAYRTHAAYGCKTGYGGYATWMRAAAYGAA YTRS YDKCWASHGCRGAAATHWATTRA
Oligo Foward      -----
Oligo Reverse     -----GCKTGYGGYATWMRAAAYGAA YTRS-----

```

Anexo 2. Alinhamento do gene catepsina (*v-cath*) dos representantes dos *Alphabaculovirus* do Grupo I Clado B. Utilizado para o desenho de oligonucleotídeos degenerados (oligo *foward* e oligo *reverse*) visando investigar a presença desse gene no genoma do CoveMNPV. Alinhamento realizado no programa BioEdit/ClustalW.

Anexo 3. Genes identificados no genoma de CoveMNPV e sua identidade com outros baculovírus. Para cada ORF são listadas características como: posição no genoma, direção da transcrição, tamanho do gene e da proteína, e identidade com ORFs de AcMNPV, CfDEFMNPV e AgMNPV, e baculovírus com a maior identidade de nucleotídeos (nt).

ORF	Gene	Posição e Direção	Tamanho (nt)	Tamanho (aa)	ORF correspondente em:	Identidade de nt maior com:	
					AcMNPV	CfDEFMNPV	AgMNPV
1	Poliédrina ^b	1 > 738	738	245	8	1	1
2	Proteína associada ao capsídeo viral	719 < 2,503	1,785	594	9	149	152
3	Proteína quinase 1 ^c	2,505 > 3,317	813	270	10	148	152
4	Proteína hipotética	3,330 < 3,548	219	72	-	147	150
5	Proteína como a p638	3,578 < 4,801	1,224	407	153	146	149 e 148
6	Proteína hipotética	5,026 < 5,919	894	297	-	145	147
7	Proteína hipotética	6,341 < 6,478	138	45	-	144	146
8	Proteína imediatamente precosse 2	6,681 > 7,907	1,227	408	151	143	145
9	Fator de infectividade oral-5 ^a	8,109 > 9,233	1,125	374	148	141	144
10	Proteína imediatamente precosse 1 ^c	9,311 < 11,005	1,695	564	147	140	143
11	Proteína hipotética ^c	11,061 > 11,657	597	198	146	139	142
12	Proteína hipotética ^b	11,705 < 11,992	288	95	145	138	141
13	odv-e27 ^a	12,005 < 12,898	894	297	144	137	140
14	odv-e18 ^a	12,913 < 13,176	264	87	143	136	139
15	49k ^a	13,173 < 14,636	1,464	487	142	135	138
16	Proteína imediatamente precosse 0 ^c	14,652 < 15,380	729	242	141	134	137
17	Regulador de síntese de DNA ^c	15,621 > 16,997	1,377	468	139	133	136
18	ORF repetitiva de baculovírus-a	17,101 < 18,039	939	312	-	-	-
19	Fator de infectividade oral-0 ^a	19,654 > 21,588	1,935	644	138	132	134
20	p10	21,591 < 21,872	282	93	137	131	133
21	p26	21,928 < 22,638	711	236	136	130	132
22	Proteína hipotética	23,289 > 23,966	678	225	-	129	130
23	Exonuclease alcalina ^a	24,012 < 25,274	1,263	420	133	128	129
24	p25	25,280 < 25,927	648	215	132	127	128
25	pp34 ^b	25,930 < 26,802	873	290	131	126	127
26	Proteína hipotética	26,850 < 27,164	315	104	130	125	126
27	p24 ^c	27,179 < 27,763	585	194	129	124	125
28	gp64	28,082 > 29,581	1,500	499	128	123	124
29	Fator de expressão tardio 7	29,767 > 30,414	648	215	125	120	123
30	EXO III v-trex	30,440 > 31,132	693	230	-	119	122
31	Proteína hipotética	31,253 < 31,981	729	242	124	118	121
32	Proteína hipotética	32,352 < 32,603	252	83	120	115 e 118	-
33	Fator de infectividade oral-1 ^a	32,788 < 34,383	1,596	531	119	114	117
34	Proteína hipotética	34,496 < 34,756	261	86	117	113	116
35	ORF repetitiva de baculovírus-b	34,788 < 35,321	534	177	-	112	115
36	Fator de infectividade oral-3 ^a	35,346 > 35,957	612	203	115	111	114
37	Proteína hipotética	35,976 > 37,238	1,263	420	114	109	113

Cont. Anexo 3

ORF	Gene	Posição e Direção	Tamanho (nt)	Tamanho (aa)	ORF correspondente em:		Identidade de nt maior com:	
					AcMNPV	CiDEFMNPV		AgMNPV
38	Proteína hipotética	37,791 > 38,198	408	135	-	107	111	CiDEFMNPV
39	Proteína hipotética	38,226 > 38,441	216	71	111	106	110	CiDEFMNPV
40	Proteína hipotética ^c	38,489 > 38,671	183	60	110	105	109	CiDEFMNPV
41	Proteína hipotética	38,644 < 38,952	309	102	-	104	108	CiDEFMNPV
42	odv-ec43 ^a	38,971 > 40,149	1,179	392	109	103	107	CiDEFMNPV
43	Proteína hipotética ^b	40,121 > 40,465	345	114	108	102	106	AgMNPV
44	ORF repetitiva de baculovírus-c	40,513 < 41,535	1,023	340	-	101	105	AgMNPV
45	ORF repetitiva de baculovírus-d	41,571 < 42,365	795	264	-	-	-	CiDEFMNPV
46	Proteína hipotética ^b	43,160 < 43,888	729	242	106 e 107	100	104	AgMNPV
47	Proteína associada ao capsídeo viral	43,976 < 45,976	2,001	666	104	96	100	CiDEFMNPV
48	p48 ^a	46,003 > 47,229	1,227	408	103	95	99	CiDEFMNPV
49	p12 ^c	47,207 > 47,551	345	114	102	94	98	CiDEFMNPV
50	p40 ^a	47,561 > 48,634	1,074	357	101	93	97	CiDEFMNPV
51	p6.9 ^a	48,678 > 48,839	162	53	100	92	96	CiDEFMNPV/AgMNPV
52	Fator de expressão tardio 5 ^a	48,836 < 49,630	795	264	99	91	95	CiDEFMNPV
53	38k ^a	49,577 > 50,509	933	310	98	90	94	CiDEFMNPV
54	Fator de infectividade oral-4 ^a	50,781 < 51,293	513	170	96	89	93	AgMNPV
55	helicase ^a	51,283 > 54,951	3,669	1222	95	88	92	CiDEFMNPV
56	odv-e25 ^a	54,986 < 55,675	690	229	94	87	91	CiDEFMNPV
57	p18 ^a	55,683 < 56,162	480	159	93	86	90	AgMNPV
58	p33 ^a	56,161 > 57,012	852	283	92	85	89	CiDEFMNPV
59	Proteína hipotética	57,026 > 57,646	621	206	91	84	88	CiDEFMNPV
60	Fator de expressão tardio 4 ^a	57,633 < 59,000	1,368	455	90	83	87	CiDEFMNPV
61	vp39 ^a	59,012 > 60,040	1,029	342	89	82	86	CiDEFMNPV
62	cg90	60,046 > 60,774	729	242	88	81	85	CiDEFMNPV
63	Suposta proteína do capsídeo viral	60,804 < 61,040	237	78	87	80	84	CiDEFMNPV
64	p95 ^a	61,408 < 63,924	2,517	838	83	78	82	CiDEFMNPV
65	Proteína como a telokina 20 ^c	63,893 > 64,354	462	153	82	77	81	AgMNPV
66	Proteína hipotética ^a	64,245 > 64,892	648	215	81	76	80	AgMNPV
67	gp41 ^a	64,885 > 66,027	1,143	380	80	75	79	AgMNPV
68	Proteína hipotética	66,024 > 66,326	303	100	79	74	78	CiDEFMNPV
69	Proteína hipotética ^a	66,323 > 66,664	342	113	78	73	77	CiDEFMNPV
70	fator de expressão muito tardio 1 ^a	66,670 > 67,803	1,134	377	77	72	76	CiDEFMNPV
71	Proteína hipotética	67,814 > 68,068	255	84	76	71	75	CiDEFMNPV
72	Proteína hipotética ^b	68,076 > 68,468	393	130	75	70	74	CiDEFMNPV
73	Proteína hipotética	68,487 > 69,020	534	177	74	69	73	CiDEFMNPV
74	Proteína hipotética	69,017 > 69,292	276	91	73	68	72	AgMNPV

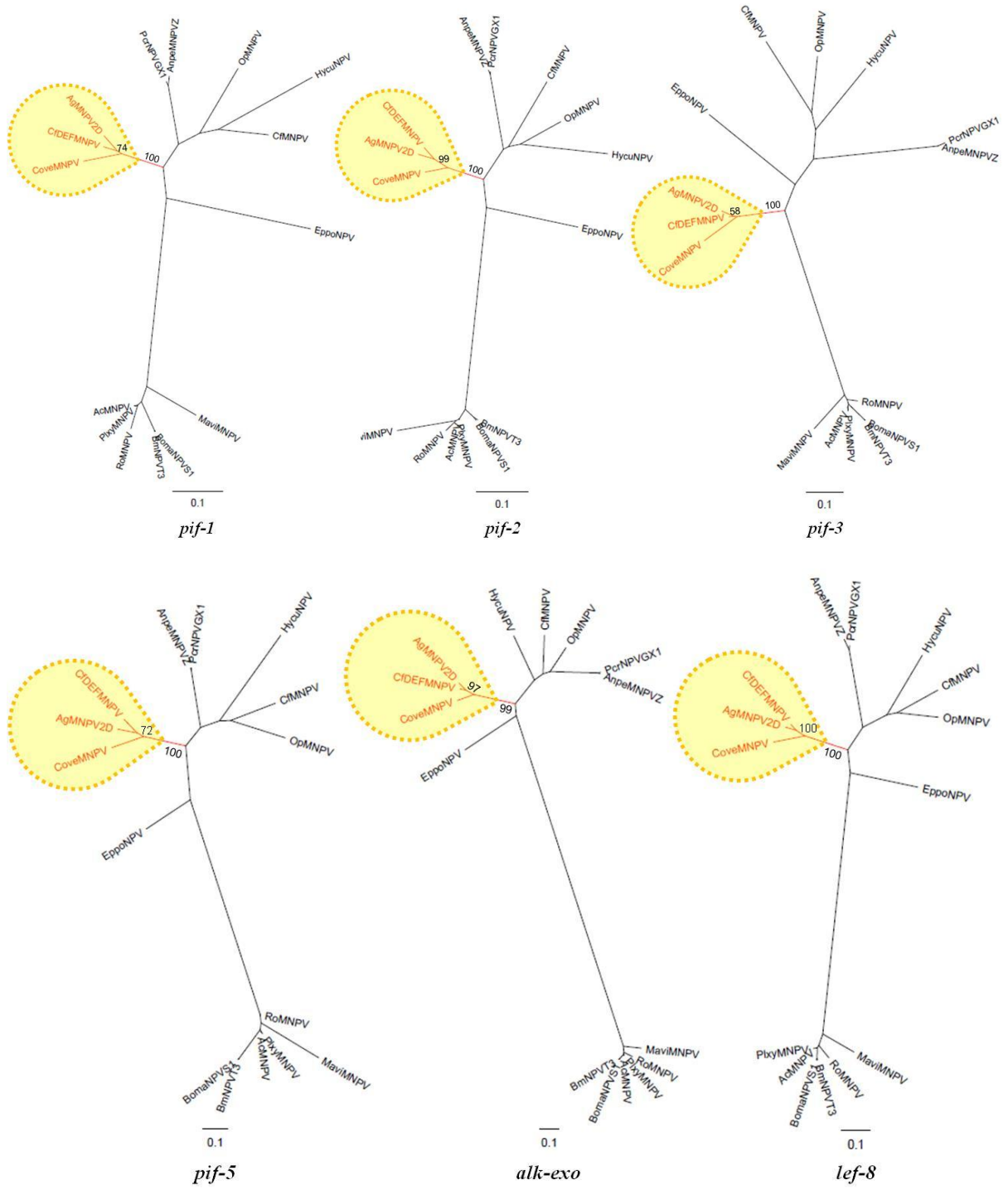
Cont. Anexo 3

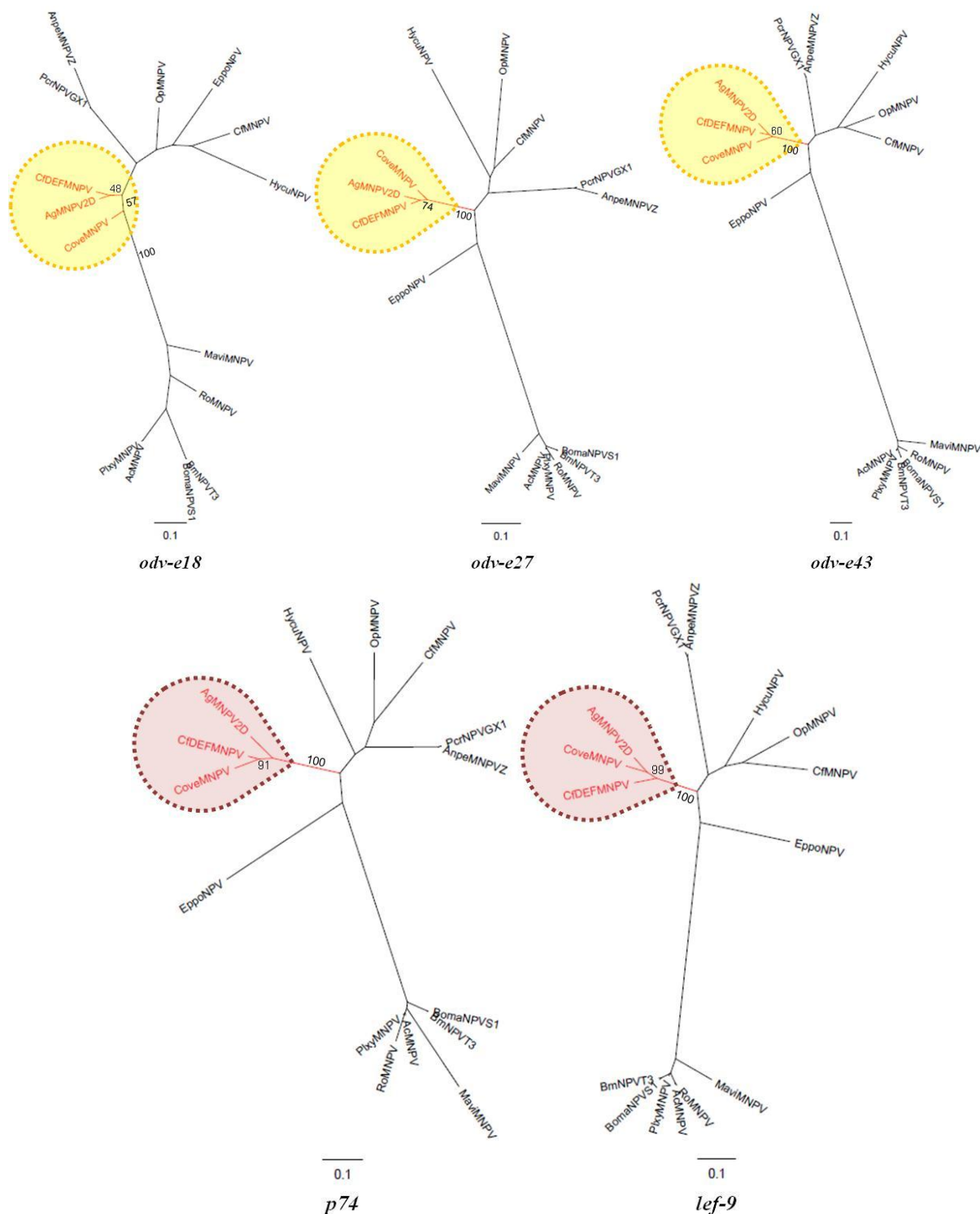
ORF	Gene	Posição e Direção	Tamanho (nt)	Tamanho (aa)	ORF correspondente em:	Identidade de nt maior com:
					AcMNPV C1DEFMNPV AgMNPV	AgMNPV
75	Proteína hipotética	69,289 < 69,570	282	93	72	71
76	Proteína inibidora de apoptose 2	69,495 < 70,211	717	238	71	70
77	Suposta metiltransferase	70,192 < 71,019	828	275	69	69
78	Proteína hipotética ^a	70,976 < 71,374	399	132	68	68
79	Fator de expressão tardio 3 ^c	71,376 > 72,512	1,137	378	67	67
80	desmoplakin ^a	72,505 < 75,009	2,505	836	66	66
81	DNA polimerase ^a	75,019 > 77,979	2,961	986	65	65
82	ORF repetitiva de baculovirus-e	78,001 > 78,285	285	94	-	-
83	ORF repetitiva de baculovirus-f	78,903 > 79,865	963	320	2	-
84	Fator de expressão tardio 9 ^a	79,904 < 81,376	1,473	490	62	62
85	fp25k ^b	81,375 > 82,070	696	231	61	61
86	Proteína hipotética	82,186 > 82,464	279	92	60	60
87	Proteína hipotética	82,448 > 82,939	492	163	59	59
88	Proteína hipotética	82,954 < 83,442	489	162	57	58
89	Proteína hipotética	83,626 < 83,880	255	84	56	57
90	Proteína hipotética	83,882 < 84,091	210	69	55	56
91	vp1054 ^a	84,167 < 85,303	1,137	378	54	55
92	Fator de expressão tardio 10	85,164 < 85,397	234	77	53a	54
93	Proteína hipotética ^a	85,366 < 85,806	441	146	53	53
94	Proteína hipotética	86,053 < 86,982	930	309	51	52
95	Fator de expressão tardio 8 ^a	87,012 > 89,633	2,622	873	50	51
96	etm	89,955 > 90,329	375	124	48	46
97	Proteína hipotética	90,457 < 90,828	372	123	44	48
98	Proteína hipotética	90,797 < 91,000	204	67	43	47
99	Proteína como o transativador global	91,094 < 92,587	1,494	497	42	46
100	Fator de expressão tardio 12	92,574 < 93,110	537	178	41	45
101	p47 ^a	93,115 > 94,299	1,185	394	40	44
102	Proteína que interage com a proteína quinase	94,314 < 94,829	516	171	24	43
103	Proteína que se liga a ssDNA ^b	94,843 < 95,760	918	305	25	42
104	Proteína hipotética	95,810 > 96,193	384	127	26	41
105	Proteína inibidora de apoptose 1	96,190 > 97,038	849	282	27	40
106	Fator de expressão tardio 6 ^c	97,041 > 97,466	426	141	28	39
107	Proteína hipotética	97,505 < 97,714	210	69	29	38
108	Proteína hipotética	97,760 < 99,142	1,383	460	30	37
109	Proteína inibidora de apoptose 3	99,551 > 100,399	849	282	-	34
110	ORF repetitiva de baculovirus-g	100,432 < 101,451	1,020	339	-	33
111	Proteína hipotética	102,186 > 104,069	1,884	627	-	-
						XnGV

Cont. Anexo 3

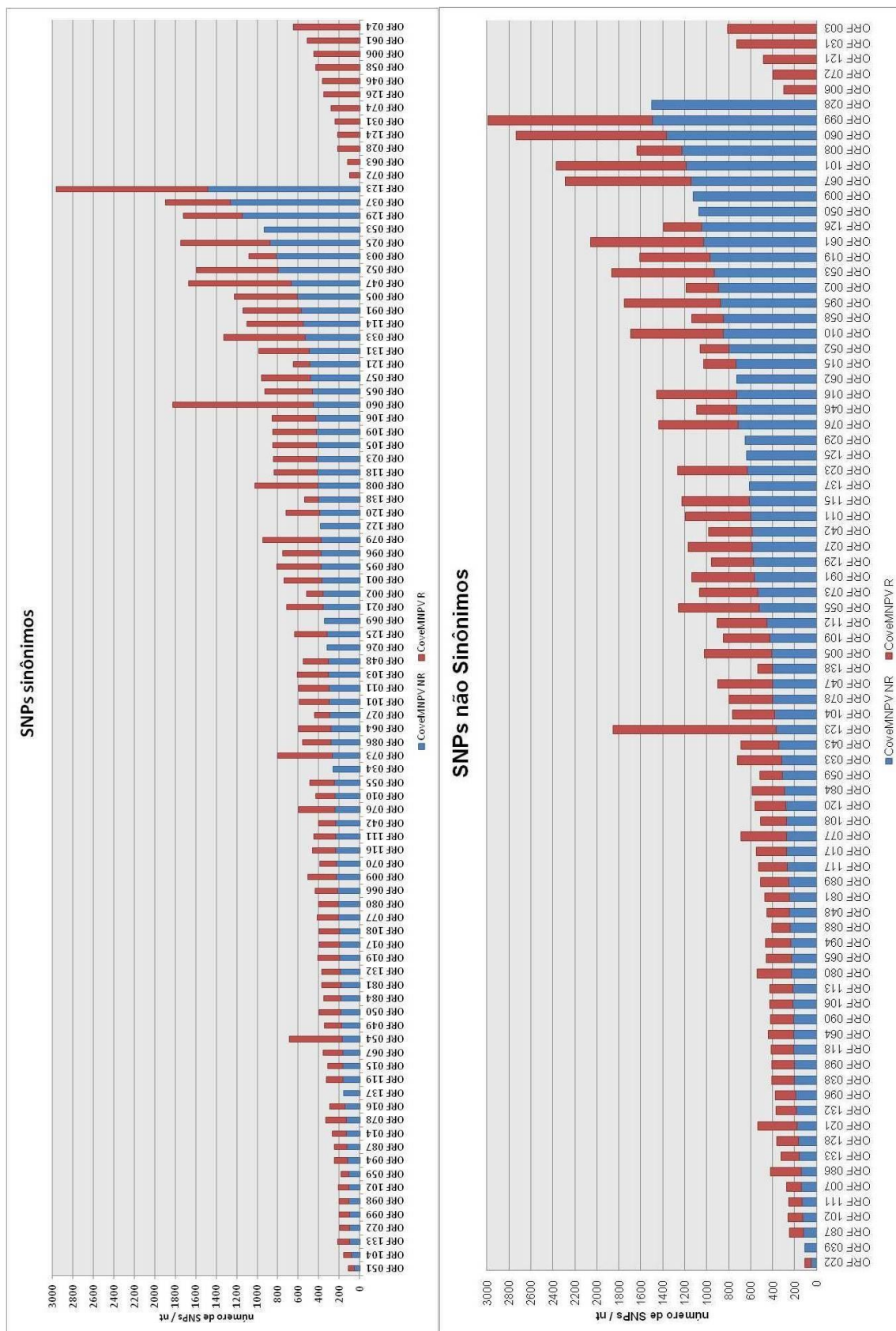
ORF	Gene	Posição e Direção	Tamanho (nt)	Tamanho (aa)	AcMNPV	CfDEFMNPV	ORF correspondente em:	AgMNPV	Identidade de nt maior com:
112	Superóxido dismutase	104,135 < 104,587	453	150	31	29	32	32	CfDEFMNPV
113	ctl	104,701 < 104,913	213	70	3	-	30	30	AgMNPV
114	Fator de crescimento do fibroblasto	104,923 < 105,471	549	182	32	28	29	29	CfDEFMNPV
115	Proteína hipotética	105,632 < 106,243	612	203	34	26	27	27	CfDEFMNPV
116	Proteína como a ubiquitina ^c	106,260 > 106,490	231	76	35	25	26	26	CfDEFMNPV
117	pp31 ^c	106,555 < 107,346	792	263	36	24	25	25	CfDEFMNPV
118	Fator de expressão tardio 11 ^b	107,286 < 107,702	417	138	37	23	24	24	AgMNPV
119	Proteína hipotética ^c	107,632 < 108,279	648	215	38	22	23	23	AgMNPV
120	Proteína F ^d	108,380 < 110,338	1,959	652	23	21	22	22	CfDEFMNPV
121	Proteína hipotética ^c	110,745 < 111,716	972	323	13	18	20	20	AgMNPV
122	Fator de expressão tardio 1 ^a	111,647 < 112,408	762	253	14	17	19	19	AgMNPV
123	Precursor da ecdisteróide UDP-glicosiltransferase	112,523 > 114,004	1,482	493	15	16	18	18	CfDEFMNPV
124	odv-e26	114,179 > 114,826	648	215	16	15	17	17	AgMNPV
125	Proteína hipotética	114,792 > 115,427	636	211	17	14	16	16	AgMNPV
126	Proteína hipotética	115,506 < 116,549	1,044	347	18	13	15	15	CfDEFMNPV
127	Proteína hipotética	116,566 > 116,880	315	104	19	12	14	14	CfDEFMNPV
128	Fator de indução do rearranjo da actina	116,980 < 117,975	996	332	21	11	13	13	AgMNPV
129	Fator de infectividade oral-2 ^a	118,002 > 119,150	1,149	382	20	10	12	12	AgMNPV
130	ORF repetitiva de baculovírus-h	120,226 > 120,654	429	142	-	-	-	-	AgMNPV
131	Proteína hipotética	120,692 < 121,675	984	327	11	9	10	10	CfDEFMNPV
132	Proteína tirosina fosfatase 1	121,784 > 122,341	558	185	1	8	9	9	AgMNPV
133	Proteína tirosina fosfatase 2	122,328 > 122,810	483	160	-	7	8	8	AgMNPV
134	ORF repetitiva de baculovírus-i	122,840 < 123,850	1,011	336	2	6	6 e 7	6 e 7	AgMNPV
135	Proteína hipotética	123,888 < 124,325	438	145	4	5	5	5	AgMNPV
136	Proteína hipotética	124,373 > 124,633	261	86	5	4	4	4	CfDEFMNPV
137	Fator de expressão tardio 2 ^a	124,636 > 125,250	615	204	6	3	3	3	CfDEFMNPV
138	Proteína hipotética	125,277 > 125,678	402	133	-	2	2	2	CfDEFMNPV

a: core genes; b: genes comuns aos *Alpha*-; *Beta*- e *Gammabaculovirus*; c: genes comuns aos *Alpha*- e *Betabaculovirus*; d: gene comum aos *Alpha*-; *Beta*- e *Deltabaculovirus*.





Anexo 4. Árvores filogenéticas do CoveMNPV e 14 *Alphabaculovirus* do Grupo I baseada em 11 *core genes*. Clados formados por CoveMNPV, AgMNPV e CfDEFMNPV apresentando o CoveMNPV como grupo externo estão destacados em amarelo. Clados formados por CoveMNPV, AgMNPV e CfDEFMNPV em que o CoveMNPV não é grupo externo estão destacados em rosa. Árvores geradas pelo PhyML (Guindon e Gascuel, 2003) com modelos evolutivos determinados pelo jModelTest (Darriba *et al.*, 2012) e editadas com o FigTree (Rambaut, 2008). Os números nos ramos indicam o valor de *bootstrap* (%). A escala em barra representa o número de substituição para cada sítio.



Anexo 5. Número de SNPs intergênicos sinônimos e não sinônimos compartilhados e únicos para os isolados CoveMNPV-NR e CoveMNPV-R. Em azul: SNPs do isolado CoveMNPV-NR; Em vermelho: SNPs do isolado CoveMNPV-R.