

ANDERSON FERNANDES DE BRITO

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÔMICA DE ISOLADOS
GEOGRÁFICOS DO NUCLEOPOLIEDROVÍRUS DE
Anticarsia gemmatalis (AgMNPV)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

RESUMO

BRITO, A. F. Análise da diversidade genômica de isolados geográficos do nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). 2013. 166 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus é o bioinseticida viral mais amplamente utilizado no mundo que tem sido empregado no Brasil por mais de 30 anos como agente de controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Diversos variantes derivados de populações naturais deste vírus já foram analisados previamente por meio de perfis de restrição de DNA, evidenciando a presença de diversos polimorfismos, muitos dos quais, no entanto, não foram caracterizadas em detalhes. Um destes variantes, o protótipo da espécie (AgMNPV-2D), teve seu genoma sequenciado em 2006. O presente trabalho de mestrado avaliou a diversidade genômica de 17 isolados geográficos selvagens de AgMNPV obtidos entre os anos de 1980 a 1990, no Brasil, Argentina e Uruguai. As amostras coletadas são populações virais genéticamente heterogêneas de ocorrência natural em cultivos de soja sem histórico de uso de baculovírus como bioinseticida. Entre os 17 genomas reconstruídos a alta compactação da informação genética manteve-se conservada ao longo da história evolutiva de AgMNPV, com a maioria das ORFs dispostas de maneira contígua ou sobrepostas umas as outras. Rearranjos estruturais significativos, tais como inversões e translocações, não foram observados. Por outro lado, deleções e inserções de uma ou mais bases foram comuns, muitas das quais mudaram o quadro de leitura de algumas ORFs. A partir de dados do proteoma estrutural do isolado 2D, foi possível identificar um novo peptídeo codificado por uma ORF aninhada e conservada em todos os isolados analizados (ORF29b). Um novo gene hipotético com possível origem em lepidóptero (ORF25b) foi identificado em dois genótipos; e o gene *bro-a* mostrou-se ausente em muitos isolados. Análises de diversidade genética interpopulacionais mostraram que a maioria dos genes de AgMNPV é pouco variável, sendo os genes mais diversos localizados em *loci* que coincidem com regiões variáveis mapeadas em estudos anteriores. Os resultados obtidos reforçam a percepção de que grandes vírus de DNA evoluem principalmente sob baixas taxas de substituição, e por meio de duplicações, ganhos e perdas gênicas.

Palavras-chave: AgMNPV. *Anticarsia gemmatalis*. Baculovírus. Diversidade Genética. Evolução Molecular. Genoma.

ABSTRACT

BRITO, A. F. Genomic diversity analysis of geographic isolates of nucleopolyhedroviruses *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). 2013. 166 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus is the most widely used viral bioinsecticide in the world. In Brazil, this virus has been used during the last 30 years as a biological control agent against velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). Several variants derived from natural viral populations were previously analyzed by DNA restriction analysis, which evidenced the presence of multiple polymorphisms; many of which were not characterized in details. One of these variants, the prototype of AgMNPV (isolate 2D), was sequenced in 2006. This Masters degree project evaluated the genomic diversity of 17 AgMNPV geographic isolates obtained from 1980 to 1990, in the Brazil, Argentina and Uruguay. The samples are essentially heterogeneous viral populations of natural occurrence in soybean crops with no history of use of baculovirus as bioinsecticide. Among 17 genomes reconstructed the high compaction of the genetic information was maintained during AgMNPV evolutionary history, with most ORFs are arranged contiguously or overlapping each other. Significant structural rearrangements, such as inversions and translocations, were not observed. Otherwise, deletions and insertions of one or more bases were common, many of which changed the reading frame of some ORFs. Using available data from a strucutral proteome study, it was possible to identify a novel peptide codified by a nested ORF conserved in all analyzed isolates (ORF29b). A new hypothetical gene with possible lepidopteran origin (ORF25b) was identified in two genotypes; and the gene *bro-a* is absent in many isolates. Interpopulational genetic diversity analysis pointed that most AgMNPV genes shows little variation, and the highly diverse genes are located in *loci* which coincide with variable regions mapped in previous studies. The results obtained reinforce the perception that large DNA viruses evolve mainly under low rates of substitution, and through duplications, gain and loss of genic regions.

Keywords: AgMNPV. *Anticarsia gemmatalis*. Baculovirus. Genetic Diversity. Genome. Molecular Evolution.

1 INTRODUÇÃO

1.1 VISÃO GERAL SOBRE A FAMÍLIA *BACULOVIRIDAE*

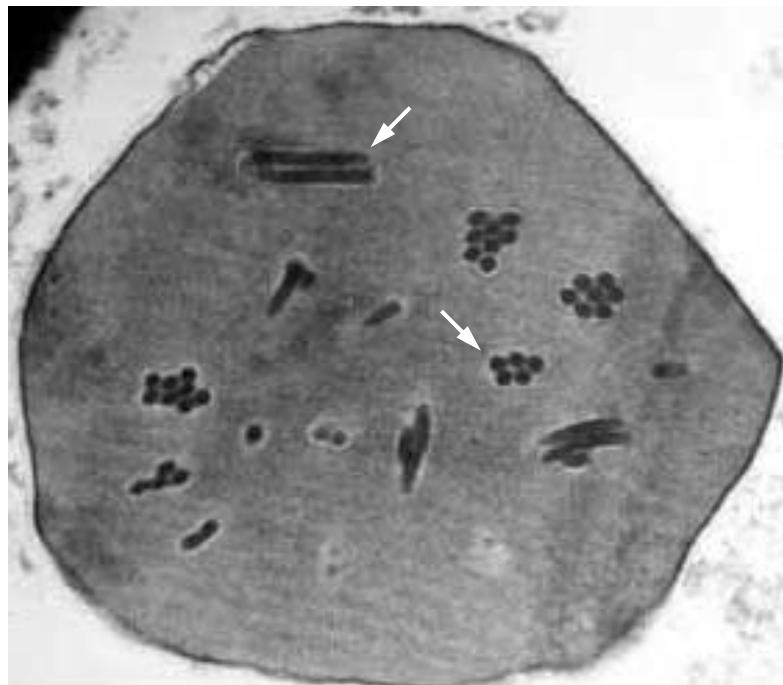
1.1.1 *Morfologia e classificação dos baculovírus*

Os membros da família *Baculoviridae* infectam artrópodes, em especial insetos das ordens *Lepidoptera*, *Hymenoptera* e *Díptera*. Diversos baculovírus foram isolados de mais de 600 espécies de insetos destas ordens (MARTIGNONI & IWAI, 1986). Vírus com características semelhantes à baculovírus já foram observados em outras ordens de organismos da classe *Insecta*, como: *Coleoptera*, *Neuroptera*, *Siphonaptera*, *Thysanura* e *Trichoptera*. Muitos dos vírus que infectam estas ordens ainda não foram caracterizados a nível molecular, logo não é possível afirmar que são de fato baculovírus (JEHLE et al., 2006).

Os capsídeos dos baculovírus medem de 30 a 60 nm de diâmetro e de 250 a 300 nm de comprimento, possuem forma de bastão, morfologia da qual deriva o nome da família (*baculo*, do latim *baculum* = bastão) (BILIMORIA, 1991; BONNING, 2005; HARRAP, 1972; JEHLE et al., 2006). A maioria dos baculovírus apresenta dois fenótipos de partículas virais geneticamente idênticas, porém morfologicamente distintas: BV (*Budded Virus*), partículas envelopadas compostas por um único nucleocapsídeo por envelope, que são responsáveis pela infecção célula-célula; e ODV (*Occlusion-Derived Virus*), que são partículas envelopadas com um ou vários nucleocapsídeos por envelope. Estas são adicionalmente envoltas por uma matriz protéica cristalina que forma o corpo de oclusão (*Occlusion Body - OB*). Os OBs participam da infecção hospedeiro-hospedeiro, geralmente medem de 1 a 5 µm de diâmetro, e sua matriz paracrystalina garante estabilidade física e biológica às partículas virais (BILIMORIA, 1991; O'REILLY et al., 1993).

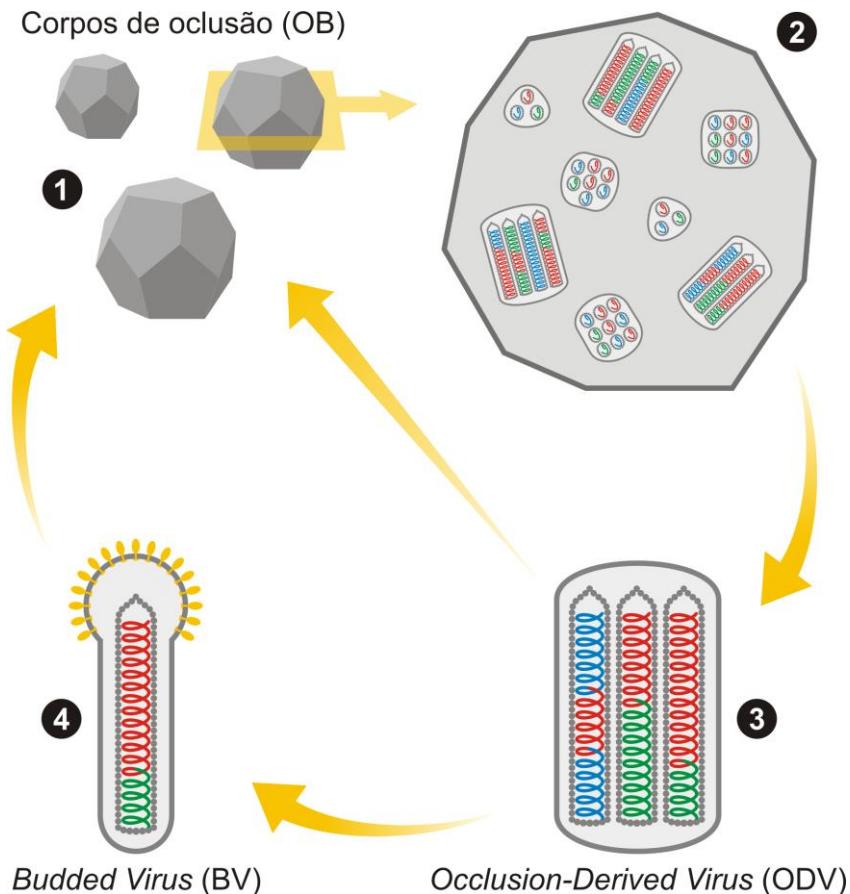
Até recentemente, a família *Baculoviridae* era subdividida em dois grupos: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV). Os NPVs por sua vez eram classificados como SNPV (S = *single*, apenas um nucleocapsídeo) ou MNPV (M = *Multiple*, múltiplos nucleocapsídeos), em referência a quantidade de nucleocapsídeos contidos nas partículas ODV (Figura 1 e 2). Atualmente, *Baculoviridae* está organizada em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* (NPVs de Lepidoptera), *Betabaculovirus* (GVs de Lepidoptera), *Gammabaculovirus* (NPVs de Hymenoptera) e *Deltabaculovirus* (NPVs de Diptera) (JEHLE et al., 2006; ROHRMANN, 2011).

Figura 1 - Eletromicrografia de um corpo de oclusão (OB) de nucleopoliedrovírus.



As setas indicam nucleocapsídeos imersos na matriz protéica de poliedrina de um OB.
Fonte: pt.wikipedia.org (Domínio público).

Figura 2 – Partículas virais de nucleopoliedrovírus (MNPV).



Em (1) observa-se o aspecto global da morfologia dos poliedros (corpos de oclusão - OB), representado em corte transversal e ampliado em (2). Internamente estão representadas as partículas ODV (*Occlusion-Derived Virus*), em cortes transversais e longitudinais, contendo variadas quantidades de nucleocapsídeos. Em (3) observa-se corte longitudinal e ampliado de uma partícula viral ODV, contendo nucleocapsídeos que encerram diferentes genomas, gerados em decorrência de recombinações entre diferentes variantes (em cores). Estas partículas, liberadas pela dissolução dos poliedros, iniciam o estágio de infecção primária, e em seguida podem dar origem às partículas do fenótipo BV (*Budded Virus*). Os BVs (4) procederão as infecções secundárias, célula a célula, promovendo a síntese adicional de novos poliedros.

1.1.2 Características dos genomas dos baculovírus

Os baculovírus apresentam genoma composto por DNA dupla fita, circular, superenovelado, com tamanho variando em torno de 80 a 180 Kbp, o qual é capaz de codificar de 90 a 183 genes, organizados de maneira contígua, podendo inclusive apresentarem-se sobrepostos uns aos outros (MIELE et al., 2011; ROHRMANN, 2011; VOLKMAN et al., 1995). O conteúdo GC dos genomas de baculovírus varia de 32,4% a 57,5% (HAYAKAWA et al., 2000; VAN OERS & VLAK, 2007). Seus genes estão dispostos

em ambas as fitas de DNA, sem qualquer padrão de agrupamento relativo a promotores (precoce ou tardio) ou categorias funcionais, estando homogeneamente distribuídos nos senso positivo e negativo dos genomas (COHEN *et al.*, 2009; VAN OERS & VLAK, 2007). Por convenção, a ORF (*Open Reading Frame*) do gene 1 dos baculovírus corresponde a ORF de *polh* (VLAK & SMITH, 1982), gene que codifica a proteína que majoritariamente compõe o corpo de oclusão viral (ROHRMANN, 1986).

No genoma de muitos baculovírus é comum a ocorrência de *loci* constituídos por múltiplas repetições de sequências em tandem, ricas em AT, e com motivos palindrômicos. Estes *loci*, por sua vez, apresentam-se em múltiplas cópias, espalhadas em várias posições dos genomas, caracterizando “regiões altamente repetitivas” (*homologous regions, hrs*) (COCHRAN & FAULKNER, 1983; POSSEE & ROHRMANN, 1997; RODEMS & FRIESEN, 1995). A quantidade de cópias presentes nos genomas de baculovírus varia de três (LANGE & JEHLE, 2003) a 17 (PANG *et al.*, 2001), e juntas podem compreender de 3 a 7% do material genômico viral (HAYAKAWA *et al.*, 2000); por outro lado, em alguns vírus não foram encontrados *loci* semelhantes àquelas regiões altamente repetitivas (LUQUE *et al.*, 2001; VAN OERS *et al.*, 2005; WILLIS *et al.*, 2005; WORMLEATON *et al.*, 2003). Estas regiões têm sido apontadas como intensificadores da expressão gênica precoce, e como origens de replicação do genoma viral (POSSEE & ROHRMANN, 1997).

Excetuando-se as regiões não-codificantes identificadas como *hrs*, os espaços intergênicos podem corresponder de 4 a 17 Kbp do genoma dos baculovírus (HAYAKAWA *et al.*, 2000), locais onde estão principalmente localizados elementos de regulação da expressão gênica, tais como promotores e terminadores de transcrição (NELSON *et al.*, 2004).

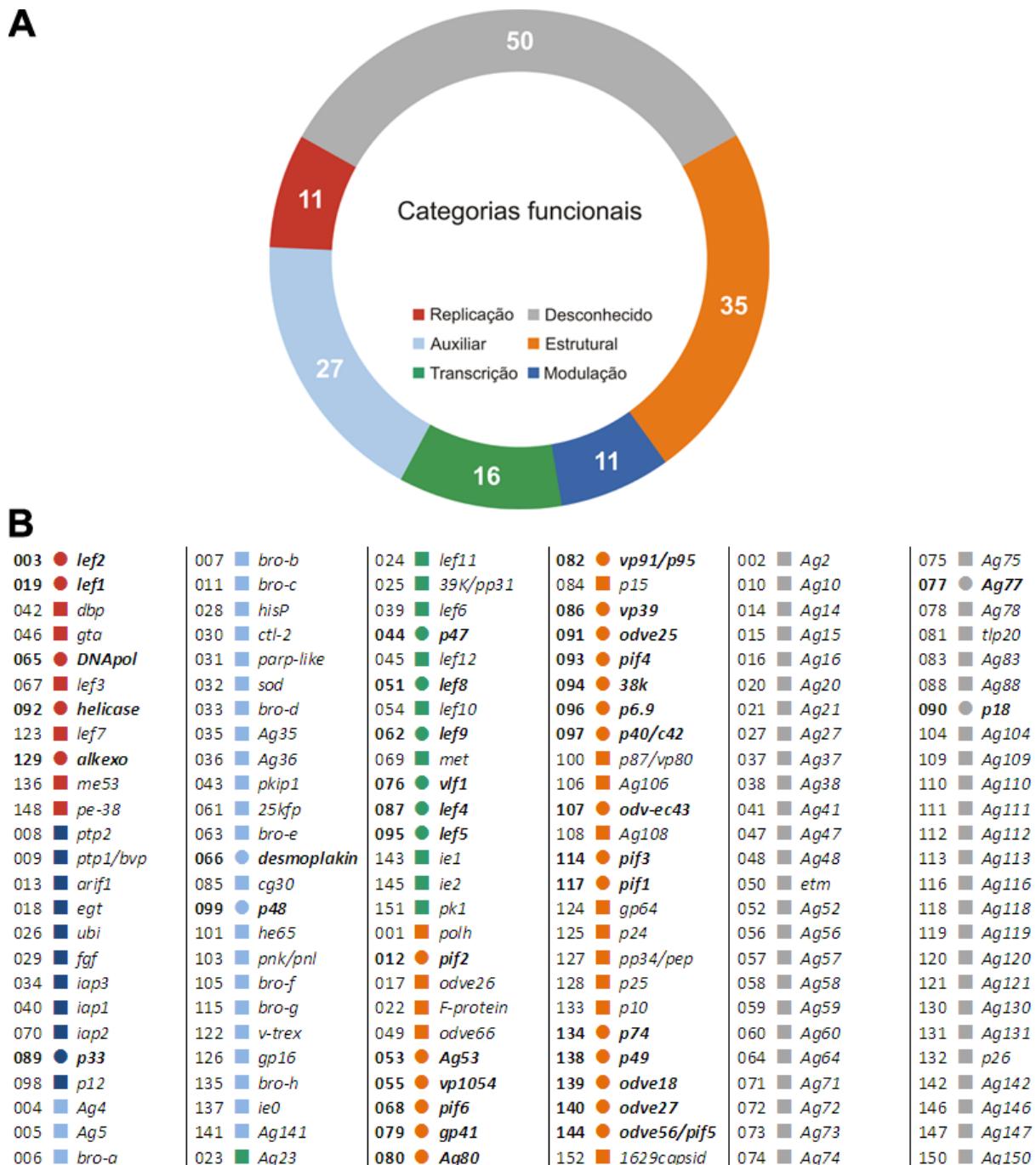
1.1.3 Composição gênica

Os genes de baculovírus podem ser principalmente divididos em três grupos: (*i*) genes compartilhados por todos os baculovírus; (*ii*) genes presentes apenas em vírus filogeneticamente próximos ou relacionados (dos 4 gêneros da família); e (*iii*) genes restritos a uma única espécie (HAYAKAWA *et al.*, 2000; MIELE *et al.*, 2011). O viés de uso de códons é bastante variável entre genes de um mesmo vírus, e até mesmo entre genes homólogos de diferentes vírus (LEVIN & WHITTOME, 2000).

Entre os 58 genomas de baculovírus sequenciados e disponíveis no *GenBank*, foram identificados 37 genes compartilhados por todos os membros da família *Baculoviridae* (GARAVAGLIA et al., 2012). Estes desempenham funções essenciais a infectividade viral, sendo denominados *core genes* (BLISSARD & ROHRMANN, 1990; COHEN et al., 2009; VAN OERS & VLAK, 2007).

Quanto às funções desempenhadas pelos produtos dos genes, estes podem ser classificados em cinco categorias funcionais, de acordo as suas principais funções (COHEN et al., 2009; GARAVAGLIA et al., 2012; MIELE et al., 2011; VAN OERS & VLAK, 2007): Replicação de DNA; Transcrição; Estrutural; Modulação (do metabolismo do hospedeiro); e Auxiliar (Figura 3).

Figura 3 – Categorias funcionais de genes de baculovírus (apresentados de acordo com os genes presentes em AgMNPV).



Genes com mais de uma função tiveram sua categoria definida com base na sua principal função segundo a literatura. A) Proporção de genes entre as 5 categorias funcionais e com função desconhecida. Os números indicam a quantidade de genes em cada categoria. B) Lista de genes associados à AgMNPV. As cores correspondem a apresentada em A. A esquerda, o número da ORF em AgMNPV, a direita o nome do gene. Os 37 genes *core* estão identificados em **negrito** e por um círculo (●) ao centro.

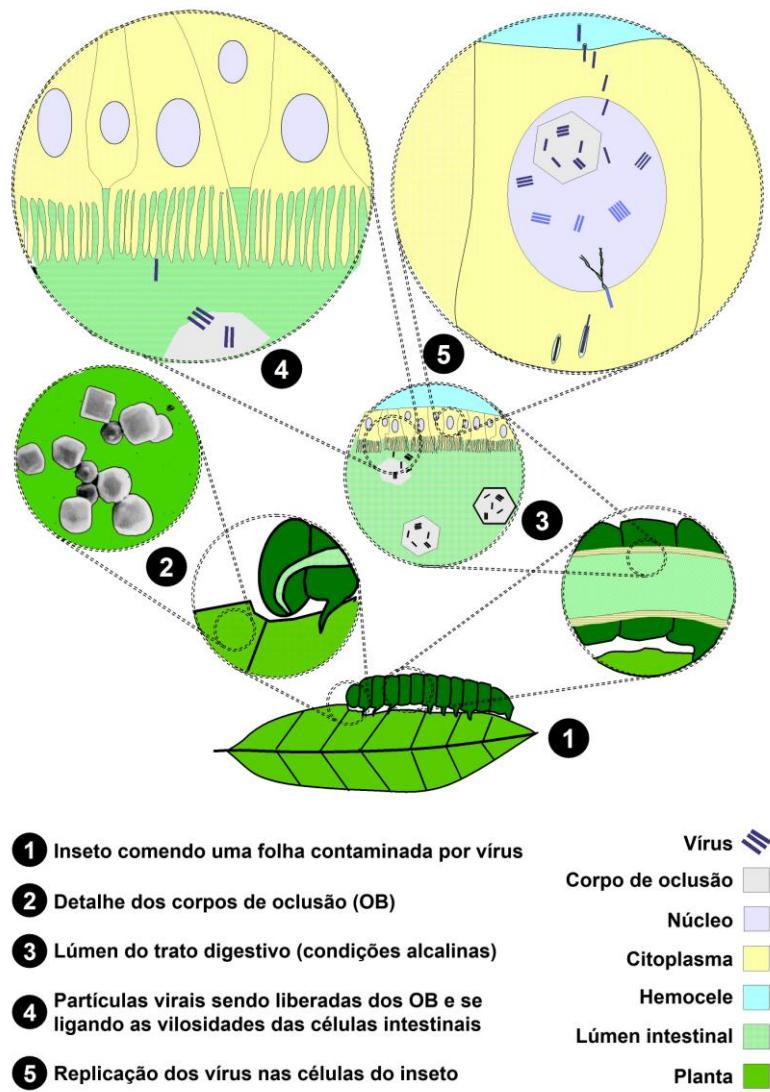
1.2 CICLO BIOLÓGICO E ECOLOGIA DOS BACULOVÍRUS

O início do ciclo biológico dos baculovírus pode ser definido pela ingestão de corpos de oclusão (OB) pelos hospedeiros, que em sua maioria são insetos em fase larval (juvenil). Nesta fase, o organismo está passando por constantes divisões e diferenciações celulares, condições ideais à replicação viral, nas quais os baculovírus evoluíram e se adaptaram. Depois de ingeridos junto com o alimento, os OB são dissolvidos assim que atingem o ambiente alcalino do intestino médio do hospedeiro, uma das poucas regiões que permitem o contato direto do vírus com as células do epitélio colunar, uma vez que a membrana peritrófica é porosa (FRIESEN & MILLER, 2001; ROHRMANN, 2011).

Com auxílio de metaloproteases virais, os vírions ODV liberados cruzam a membrana peritrófica, uma camada de consistência gelatinosa que reveste o intestino médio; ligam-se a receptores celulares; e se fundem com as microvilosidades das células do epitélio colunar intestinal (VOLKMAN, 2007). Quando os nucleocapsídeos alcançam o citosol, estes são direcionados ao núcleo, com o auxílio ativo de filamentos de actina e miosina do citoesqueleto, onde penetram por meio dos poros nucleares. O material genético viral é desnudado, possibilitando a transcrição, tradução e replicação do genoma viral neste sítio celular (GRANADOS & LAWLER, 1981).

Após a entrada nas células intestinais, o vírus leva de 30 minutos a duas horas para produzir sua primeira progénie de BVs, os quais após as infecção das células basais do intestino médio, irão brotar na hemocele, possibilitando a infecção sistêmica no corpo do inseto (FLIPSEN *et al.*, 1995; GRANADOS & LAWLER, 1981). Em seguida, outros tecidos e órgãos da larva são sequencialmente infectados: células traqueais; hemócitos (hemolinfa); músculos; tecido adiposo (corpo gorduroso); túbulos de Malpighi; e gânglios nervosos (SOARES & RIBEIRO, 2005). Nestes diferentes sítios de replicação viral são originadas partículas virais na forma oclusa. A infecção de um único inseto pode produzir por volta de 2×10^9 poliedros, os quais mediante a desintegração do corpo dos insetos mortos servirão de inóculo para infecções futuras (Figura 4) (KUNIMI *et al.*, 1996).

Figura 4 – Ciclo biológico de um nucleopoliedrovírus.



Fonte: pt.wikipedia.org (com permissão).

Fatores bióticos e abióticos podem contribuir para a dispersão viral nos ecossistemas naturais (FUXA, 2004). Os corpos de oclusão podem ser ingeridos por pássaros ou outros insetos que se alimentam dos hospedeiros moribundos ou mortos, promovendo a dispersão viral num raio de poucos centímetros (em decorrência de insetos predadores) (LEE & FUXA, 2000) a até dezenas de quilômetros (transportados por pássaros) (ENTWISTLE et al., 1983).

Uma vez dispersos no ambiente, os poliedros podem persistir viáveis por 5 a 40 anos no solo (JAQUES, 1967; THOMPSON *et al.*, 1981). A chuva é um dos principais fatores responsáveis pelo transporte de inóculos virais do solo para a parte áerea de plantas como a soja (YOUNG & YEARIAN, 1986). Especialmente em cultivos desta planta, um estudo prévio apontou que corpos de oclusão presentes no solo por pelo menos 2 anos foram capazes

de iniciar epizootias por AgMNPV em populações de lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) (FUXA & RICHTER, 1999).

1.3 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Em geral, a replicação dos baculovírus pode ser dividida em três fases: *early*, *late* e *very late*. A fase *early* (precoce) em média se estende de 0 a 6 h.p.i (horas pós infecção): é a etapa que precede a replicação do genoma viral (FRIESEN & MILLER, 1986;2001). Genes *early* são regulados pela ação transativadora de proteínas codificadas pelos genes *ie1*, *ie0*, *ie2* e *pe-38* (CARSON *et al.*, 1991; KRAPPA *et al.*, 1995). Os genes desta fase são transcritos pela RNA polimerase II celular, e seus produtos atuam em processos de: replicação do DNA viral; expressão de genes *late* e *very late*; e modificação do metabolismo celular, por meio de vias de sinalização (BLISSARD *et al.*, 1992; FRIESEN & MILLER, 1986;2001; HUH & WEAVER, 1990).

A fase *late* (tardia), que compreende o período de 6 a 24 h.p.i, é marcada pela síntese de DNA viral, assim como pela expressão de proteínas estruturais que irão compor os nucleocapsídeos dos novos vírus em formação (FRIESEN & MILLER, 1986; LU & MILLER, 1997). É nesta fase – onde os genes são transcritos por meio da uma RNA polimerase viral (GUARINO *et al.*, 1998) – que são formadas a maioria das partículas BV, que brotam da membrana celular e espalham a infecção por diversas células e tecidos do hospedeiro (O'REILLY *et al.*, 1993). Na fase *very late* (muito tardia), que tem início após 24 h.p.i., são expressas proteínas que atuarão na formação dos corpos de oclusão viral, em especial a codificada pelo gene *polh*. Neste estágio da infecção o *polh* é super expresso, tendo como produto uma proteína que compõe majoritariamente os OB (granulina, em *betabaculovirus*, ou poliedrina, para os demais gêneros) (BLISSARD & ROHRMANN, 1990; FRIESEN & MILLER, 1986;2001; LU & MILLER, 1997; O'REILLY *et al.*, 1993).

1.4 EVOLUÇÃO DOS BACULOVÍRUS

Os baculovírus compreendem um dos grupos de vírus de insetos mais diversos (BLISSARD & ROHRMANN, 1990). Diferentemente de muitos vírus de RNA, vírus de DNA, em especial aqueles com grandes genomas, como os baculovírus, apresentam baixas taxas de mutação e substituição (DUFFY *et al.*, 2008). Comumente, a história evolutiva

destes vírus é delineada por frequentes eventos de transferência horizontal de genes (HUGHES & FRIEDMAN, 2003) e sequência não-codificantes (*transposons*) de origem celular (BLISSARD & ROHRMANN, 1990); duplicação e perda de genes e fragmentos gênicos (HAYAKAWA *et al.*, 2000); e recombinações entre variantes virais (CROIZIER & RIBEIRO, 1992; HAJOS *et al.*, 2000; KAMITA *et al.*, 2003).

Os genomas dos grandes vírus de DNA evoluem pela agregação contínua de genes celulares (HUGHES, 2002b; SHACKELTON & HOLMES, 2004; ZANOTTO & KRAKAUER, 2008). Para pelo menos seis genes compartilhados por muitos baculovírus foi possível inferir a homologia destes com genes celulares. Análises filogenéticas dos genes *DNA ligase*; *rr1* (*ribonucleotide reductase 1*); e *iap* mostraram que estes, respectivamente, não formam um grupo monofilético em filogenias com ortólogos em outros organismos, o que sugere eventos independentes de perdas e ganhos destes genes entre os membros de *Baculoviridae* (HUGHES, 2002a; HUGHES & FRIEDMAN, 2003; VAN STRIEN *et al.*, 1997). Em análises semelhantes, os genes *chitinase*, *gta*, e *egt* apresentam-se como clados monofiléticos, indicando que tais genes estiveram incorporados no genoma de ancestrais comum aos baculovírus (HUGHES & FRIEDMAN, 2003). Além destes, conjuntos de genes das mais variadas categorias funcionais foram adquiridos por diferentes linhagens de baculovírus, sendo muitos destes exclusivamente encontrados numa única espécie de vírus (HERNIOU *et al.*, 2003).

Baculovírus possuem uma grande dinâmica de ganho e perda de genes, e muitos dos genes adquiridos podem desempenhar um importante papel na colonização de determinados grupos de hospedeiros (KRAKAUER & ZANOTTO, 2009; ZANOTTO & KRAKAUER, 2008). Um importante grupo de genes com interessante histórico de ganhos, perdas e duplicações são os componentes da família multigênica *bro* (*Baculovirus Repeated ORFs*) (IYER *et al.*, 2002; LOPEZ FERBER *et al.*, 2001). Os genes *bro* estão presentes em múltiplas cópias não só em baculovírus, como também em outras famílias virais, como *Poxviridae* (entomopoxvírus), *Iridoviridae* e *Phycodnaviridae*; assim como em bacteriófagos e elementos transponíveis bacterianos (das famílias IS3 e IS5). Entretanto, os eventos por trás dos ganhos e perdas de cópias destes genes ainda são incertos (BIDESHI *et al.*, 2003; IYER *et al.*, 2002). Além dos genes *bro*, uma série de outros genes estão implicados em eventos de ganhos, perdas ou duplicações, como *iap*, *ctl*, *enhancin*, *p10*, *fgf* e *ptp* (HAYAKAWA *et al.*, 2000). Muitos destes genes tem sido classificados como genes auxiliares, sendo, portanto, elementos que proporcionam vantagens em termos de infectividade, que no entanto não são essenciais a

replicação viral, fato que explicaria a perda destes genes ao longo da história evolutiva de algumas linhagens (HERNIOU et al., 2003).

Recombinações entre variantes de baculovírus são eventos bem documentados em situações de coinfecção (CROIZIER & RIBEIRO, 1992; HAJOS et al., 2000; KAMITA et al., 2003; KONDO & MAEDA, 1991; LEE & MILLER, 1979; MCINTOSH et al., 1987; MERRYWEATHER-CLARKE et al., 1994; MUÑOZ et al., 1997; SMITH & SUMMERS, 1980). Em condições ótimas *in vitro*, a frequência de geração de recombinantes pode chegar a 47%, correlacionando-se positivamente com a multiplicidade de infecção (MOI) utilizada (CROIZIER & RIBEIRO, 1992; HAJOS et al., 2000; KAMITA et al., 2003). Por outro lado, em condições sub-ótimas, como em infecções *in vivo*, as recombinações podem ser até 50 vezes menos frequentes (KAMITA et al., 2003).

Eventos de recombinação e rearranjos estruturais em genomas de baculovírus ocorrem especialmente entre regiões flanqueadas por *hrs* (ARENDS & JEHLE, 2002; HAYAKAWA et al., 2000), enquanto eventos de inserção e deleção de sequências têm sido observadas principalmente em regiões adjacentes a estes elementos repetitivos, onde são encontrados muitos dos genes *bro* (BLISSARD & ROHRMANN, 1990; COCHRAN & FAULKNER, 1983; HAYAKAWA et al., 2000; KUZIO et al., 1999).

Amostras selvagens de baculovírus apresentam grande diversidade genética intrapopulacional, onde diferentes genótipos virais coexistem e infectam populações de hospedeiros (BROWN et al., 1985; COOPER et al., 2003; GETTIG & MCCARTHY, 1982; HODGSON et al., 2001; KISLEV & EDELMAN, 1982; LEE & MILLER, 1978; MAEDA et al., 1990), as quais por sua vez também possuem uma diversidade genética intrínseca (PASHLEY & JOHNSON, 1986; SOSA-GÓMEZ, 2004). Em ensaios de infectividade *in vivo*, a patogenicidade de diferentes variantes virais frente a populações heterogêneas de hospedeiros (estimada como dose letal para 50% dos insetos (LD_{50})) pode variar em até sete vezes entre os vários genótipos (HODGSON et al., 2001). Por outro lado, uma maior patogenicidade foi observada em infecções com genótipos misturados, se comparadas a infecções por um único genótipo. Em situações de coinfecção, os diferentes tecidos e células podem favorecer uns genótipos em detrimento de outros, o que promoveria a compartimentalização dos recursos entre os diferentes genótipos, evitando a competição direta e levando a uma rápida colonização e consequente morte dos hospedeiros (HODGSON et al., 2004).

A diversidade em populações selvagens de AgMNPV já foi documentada em estudos anteriores, onde diferentes *loci* variáveis foram identificados. No entanto, nem todos elementos genéticos impactados por estas variações foram caracterizados, e a influência destes polimorfismos sobre a evolução viral ainda não foram esclarecidas (CROIZIER & RIBEIRO, 1992; MARUNIAK, 1989; MARUNIAK *et al.*, 1999).

1.5 BACULOVÍRUS *Anticarsia gemmatalis* MNPV

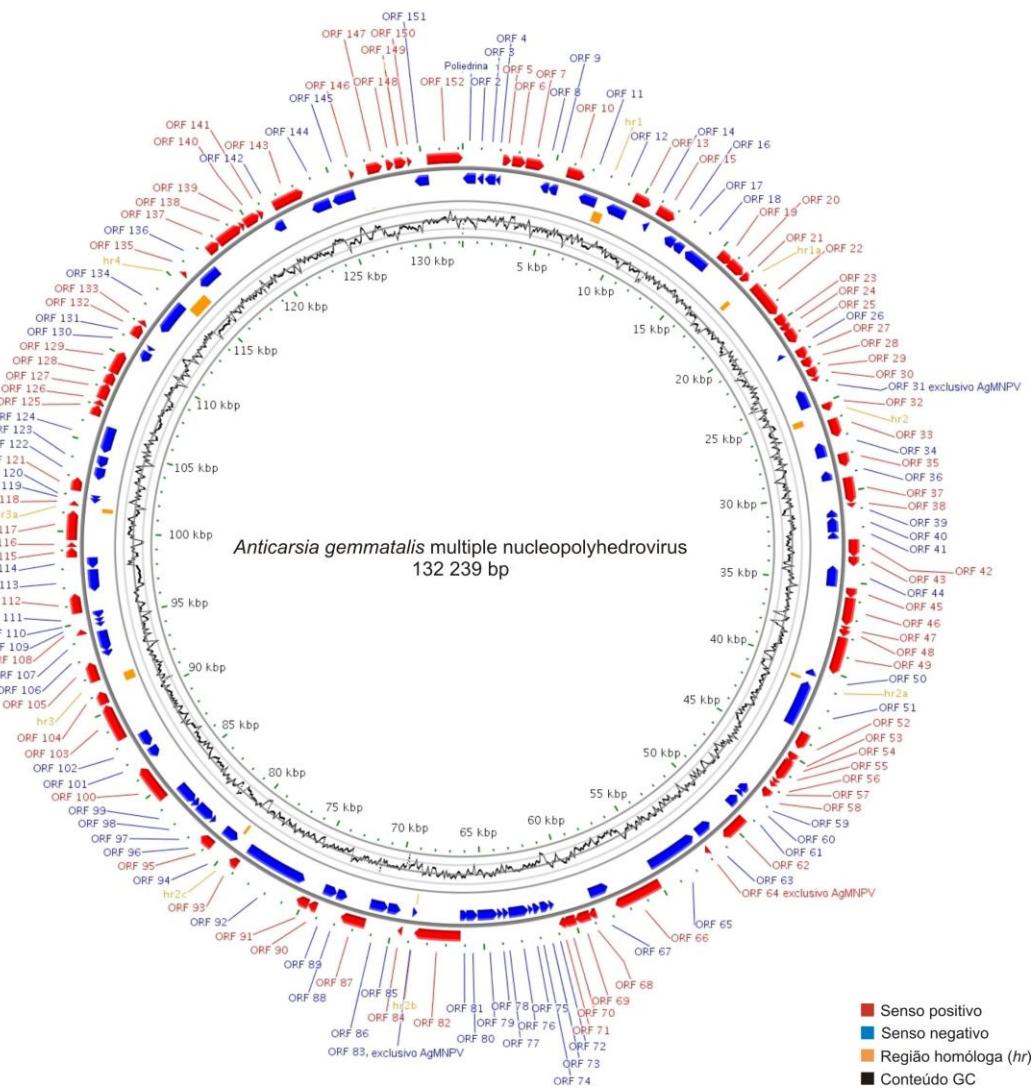
O primeiro registro de um NPV de *Anticarsia gemmatalis* ocorreu no Peru, em 1962, onde lagartas com sintomas de poliedrose nuclear foram detectadas em cultivos de alfafa (STEINHAUS & MARSH, 1962). Em 1972, em Campinas-SP, ocorreu o primeiro registro de um AgMNPV em território brasileiro. Análises de infectividade *in vivo* a partir desta amostra apontaram a alta patogenicidade deste nucleopoliedrovírus contra a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Hubner), o que colocou este vírus como um eficiente agente de controle biológico de populações deste lepidóptero (ALLEN & KNELL, 1977). Amostras desta população viral detectada em Campinas foram utilizadas para controle biológico na Florida (EUA) em 1979. A partir de larvas mortas por variantes selvagens derivados dos vírus aplicados neste ano (AgMNPV-79), seis variantes foram isolados por *plaque assay*, o que resultou na obtenção de um protótipo deste nucleopoliedrovírus, o isolado AgMNPV-2D, o qual representava o genótipo predominante (1/3) desta população viral (JOHNSON & MARUNIAK, 1989; MARUNIAK, 1989).

No final da década de 70, variantes de AgMNPV derivados diretamente do isolado de Campinas (1972) estavam sendo utilizados em cultivos de soja na Florida, enquanto no Brasil outro isolado, obtido em Londrina, estava sendo empregado em um programa piloto de controle biológico conduzido pela CNPSo-EMBRAPA em meados de 1980 (MOSCARDI, 1989). A multiplicação viral de AgMNPV em lagartas *A. gemmatalis* por anos seguidos em condições ambientais distintas (tanto climáticas como de hospedeiros) proporcionaram a fixação de polimorfismos com origens independentes nestas duas populações de AgMNPV (MARUNIAK, 1989).

No Brasil, entre os anos de 1982 e 1985, a extensão da área de cultivos de soja tratados com baculovírus cresceu 100 vezes, isto é, de 2.000 para 200.000 ha. Com a implementação de unidades de produção de baculovírus no sul do país, um isolado obtido em 1985 (AgMNPV-85) passou a ser produzido em larga escala, fator que fez com que a área plantada tratada com baculovírus subisse para 500.000 ha em 1988 (MARUNIAK et al., 1999; MOSCARDI, 1989). Em termos de extensão, o auge do programa de controle biológico com o baculovírus *Anticarsia* se deu na safra 2003/2004, onde cerca de 2 milhões de hectares foram tratados com o vírus, representando 10% da área plantada com soja naquele ano no Brasil (MOSCARDI et al., 2011). Testes comparativos entre áreas tratadas com baculovírus; com inseticidas químicos; e não tratadas, revelaram que AgMNPV foi capaz de reduzir em 80% a população de *A. gemmatalis*, alcançando o mesmo rendimento demonstrado pelo inseticida químico (MOSCARDI, 1999; MOSCARDI et al., 2011). O sucesso na utilização de AgMNPV no controle da lagarta-da-soja no Brasil fez dele o bioinseticida viral mais amplamente utilizado no mundo (MOSCARDI, 1999; OLIVEIRA et al., 2006).

Diferentes variantes virais utilizados em controle biológico tiveram seus genomas comparados por perfis de restrição do DNA. Variantes purificados a partir dos isolados 79 (Florida) e 85 (Londrina) evidenciaram a ocorrência de diversas inserções e deleções no genoma destes vírus ao longo de suas histórias evolutivas independentes (MARUNIAK, 1989; MARUNIAK et al., 1999). Os isolados geográficos analisados neste trabalho de mestrado correspondem a populações virais de ocorrência natural em cultivos de soja sem histórico de uso de baculovírus como agente de controle biológico (MOSCARDI, comunicação pessoal)¹. Neste sentido, muitas das variações genômicas identificadas nos isolados geográficos podem corresponder a alterações ocorridas na linhagem viral que deu origem ao isolado AgMNPV-85 e seus descendentes. Os polimorfismos presentes nos variantes do isolado 85 não foram caracterizadas em detalhes, e tais variações certamente não estão presentes nos genomas dos variantes de AgMNPV-79, isolado de origem do protótipo AgMNPV-2D (MARUNIAK, 1989; MARUNIAK et al., 1999). O genoma do protótipo 2D possui 132.239, bp e codifica 152 ORFs, das quais três são exclusivas deste variante (Figura 5) (OLIVEIRA et al., 2006).

Figura 5 – Mapa circular do genoma do AgMNPV-2D.

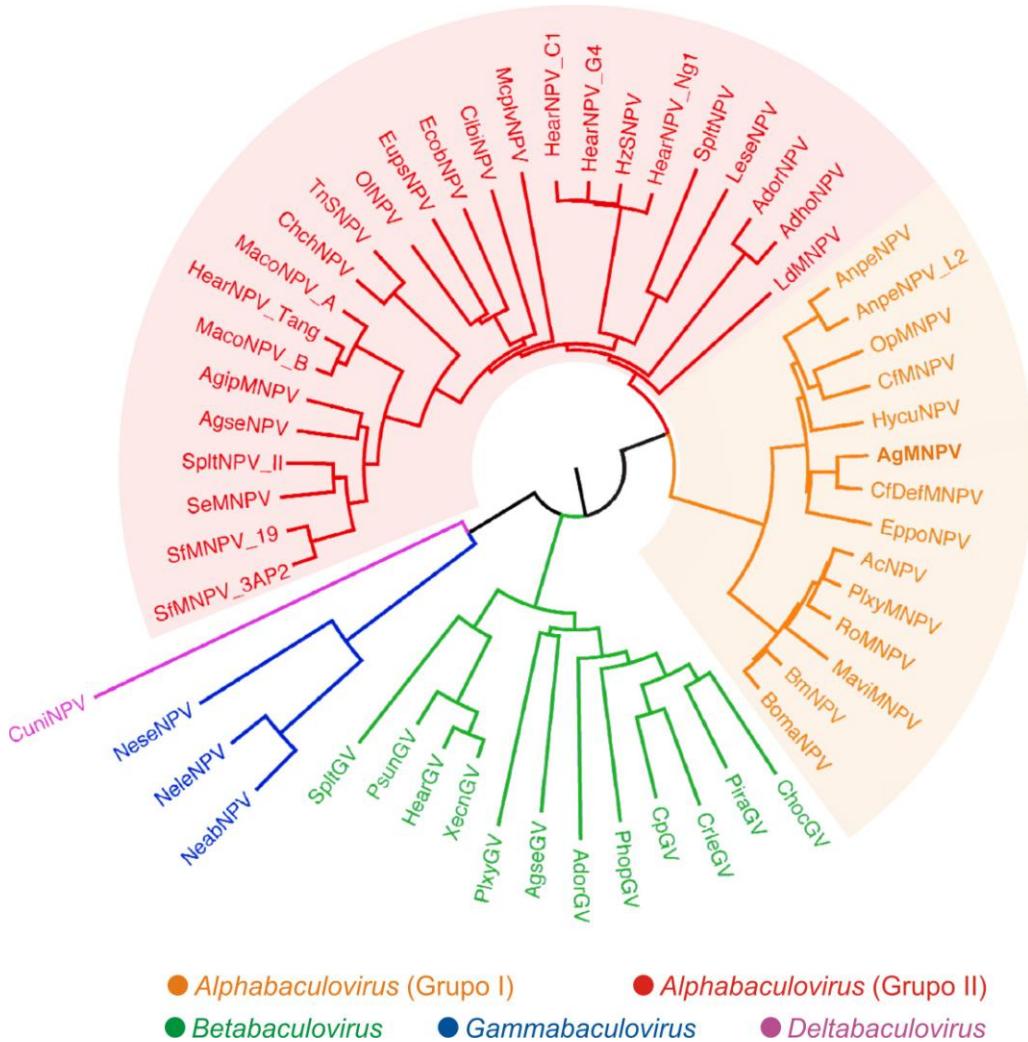


As setas vermelhas e azuis indicam ORFs em senso positivo e negativo, respectivamente. As regiões em amarelo representam regiões homólogas (*hr*). O gráfico circular mais interno ilustra o conteúdo GC (%) ao longo do genoma.

Fonte: Modificado de (OLIVEIRA, 2010), com permissão.

Análises filogenéticas entre AgMNPV e outros baculovírus classifica este vírus entre os alfabetaculovírus do grupo I (ZANOTTO *et al.*, 1993), com grande proximidade filogenética com CfDefMNPV, com o qual possui similaridade de sequências de proteínas superior a 92% (OLIVEIRA *et al.*, 2006) (Figura 6). Uma das principais diferenças entre esses dois vírus é a ausência dos genes *chitinase* e *cathepsina* em AgMNPV, genes cujos produtos podem ser responsáveis pela liquefação do inseto infectado. Esta característica fenotípica não é observada em infecções por AgMNPV, o que favorece a coleta dos insetos mortos para reapplycação futura, fator que explica parte do sucesso deste vírus como agente de controle biológico (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Figura 6 – Relações filogenéticas entre os baculovírus dos quatro gêneros: *Alphabaculovirus*; *Betabaculovirus*; *Gammabaculovirus*; e *Deltabaculovirus*.



Em destaque (região laranja), o AgMNPV, aqui representado pelo isolado 2D, inserido no grupo I entre os alfabaculovírus.

Fonte: Modificado de (OLIVEIRA, 2010), com permissão.

O presente trabalho visou o sequenciamento de 17 populações selvagens de AgMNPV. As análises que serão realizadas possibilitam a identificação de polimorfismos em regiões codificantes e regulatórias. As diferentes observadas entre os diferentes haplótipos presentes nestas populações heterogêneas trarão importantes evidências sobre o modo de evolução deste vírus em ambiente natural, onde esta espécie viral foi progressivamente utilizada ao longo das décadas de 80, 90 e 2000 como agente de controle biológico da lagarta-da-soja. As informações levantadas neste trabalho serão de importância ímpar para a retomada do uso deste vírus como bioinseticida.

6 CONCLUSÕES

- (i) A alta cobertura e a grande extensão média das leituras (entre 250 e 500 bp) em sequenciamentos em larga escala 454 Roche® garantem a montagem de genomas de baculovírus com grandes chances de recuperação da ligação genética entre polimorfismos de haplótipos curtos. Porém, a reconstrução global de genótipos individuais mostra-se impraticável, principalmente em sistemas que evoluem por recombinação homóloga;
- (ii) Erros de sequenciamento inerentes à tecnologia 454 Roche®, em especial os relativos a inserções de Adeninas em regiões homopoliméricas, dificultam o processo de anotação genômica e as estimativas de diversidade genética intrapopulacional;
- (iii) Ao longo da histórica evolutiva de AgMNPV, eventos de inversão ou translocação de regiões genômicas não foram observados, o que sugere que a sintenia possa ser importante para modular a expressão gênica e definir a infectividade viral frente a diferentes hospedeiros;
- (iv) Foram identificados até 27 ORFs de supostos novos genes localizados em regiões intergênicas e sobrepostas a ORFs pré-anotadas no isolado 2D. A presença destas não são evidências suficientes para assegurar a sua funcionalidade como regiões codificadoras de proteínas. Por outro lado, a conservação da maioria destas ORFs nos 17 isolados geográficos sugere a existência de alguma pressão evolutiva que mantém as regiões intergênicas pouco variáveis;
- (v) A descoberta de uma possível ORF aninhada a um gene de baculovírus (*fgf*) abre precedentes para a possível existência de novos níveis de organização gênica ainda não descritos para baculovírus;
- (vi) Alguns genes de AgMNPV sofrem severas mudanças estruturais em função de substituições, deleções e inserções de um ou poucos nucleotídeos, eventos que causam mudanças de fase e levam a sobreposições, fissões ou fusões gênicas. Deleções e inserções de nucleotídeos em múltiplos de três também foram

observadas em alguns genes, tendo por consequência alterações estruturais ou truncamento de domínios protéicos;

- (vii) A ausência de *bro-a* em algumas populações dão indícios sobre como tais genes (presentes em múltiplas cópias) podem ter sido adquiridos e perdidos nos genomas de AgMNPV. Ademais, a presença de *bro-a* em alguns isolados, assim como a diversidade estrutural observada em *bro-b* e *bro-c*, reforçam a hipótese de participação das proteínas BRO como fatores determinantes da infectividade viral frente a diferentes hospedeiros;
- (viii) Um suposto novo gene (Ag25b) que codifica uma proteína com domínio RING *Finger* está presente em alguns genótipos de AgMNPV, mas pode ter sido perdido em alguns isolados geográficos deste vírus. O produto deste gene provavelmente atua na via de ubiquitinação (como uma ligase proteína-ubiquitina (E3)) em associação com o produto do gene adjacente, *ubi* (ORF26), que codifica uma ubiquitina viral;
- (ix) A maioria dos genes de baculovírus é pouco variável. Entre os genes mais conservados estão os genes *core*, em especial aqueles cujos produtos estão associados à formação de partículas virais (genes estruturais, de categorias funcionais “capsídeo” e “vírion”).

REFERÊNCIAS*

- ABBOTT, J. C.; AANENSEN, D. M.; BENTLEY, S. D. WebACT: an online genome comparison suite. **Methods Mol. Biol.**, v. 395, p. 57-74, 2007.
- ADELMAN, J. P.; BOND, C. T.; DOUGLASS, J.; HERBERT, E. Two mammalian genes transcribed from opposite strands of the same DNA locus. **Science**, v. 235, n. 4795, p. 1514-1517, 1987.
- ADHYA, S.; GOTTESMAN, M. Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. **Cell**, v. 29, n. 3, p. 939-944, 1982.
- AFONSO, C. L.; TULMAN, E. R.; LU, Z.; OMA, E.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. The genome of *Melanoplus sanguinipes* entomopoxvirus. **J. Virol.**, v. 73, n. 1, p. 533-552, 1999.
- ALLEN, G. E.; KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*: I, ultrastructure, replication, and pathogenicity. **Fl. Entomol.**, n. 60, p. 233-240, 1977.
- APIC, G.; GOUGH, J.; TEICHMANN, S. A. An insight into domain combinations. **Bioinformatics**, v. 17 Suppl 1, p. 83-89, 2001.
- ARENDS, H. M.; JEHLE, J. A. Homologous recombination between the inverted terminal repeats of defective transposon TCp3.2 causes an inversion in the genome of *Cydia pomonella* granulovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 83, n. Pt 7, p. 1573-1578, 2002.
- ASSER-KAISER, S.; FRITSCH, E.; UNDORF-SPAHN, K.; KIENZLE, J.; EBERLE, K. E.; GUND, N. A.; REINEKE, A.; ZEBITZ, C. P.; HECKEL, D. G.; HUBER, J.; JEHLE, J. A. Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1916-1918, 2007.
- AYRES, M. D.; HOWARD, S. C.; KUZIO, J.; LOPEZ-FERBER, M.; POSSEE, R. D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 202, n. 2, p. 586-605, 1994.
- BECKER, D.; KNEBEL-MORSDORF, D. Sequence and temporal appearance of the early transcribed baculovirus gene HE65. **J. Virol.**, v. 67, n. 10, p. 5867-5872, 1993.
- BEERENWINKEL, N.; GUNTHARD, H. F.; ROTH, V.; METZNER, K. J. Challenges and opportunities in estimating viral genetic diversity from next-generation sequencing data. **Front. Microbiol.**, v. 3, p. 329, 2012.
- BEERENWINKEL, N.; ZAGORDI, O. Ultra-deep sequencing for the analysis of viral populations. **Curr. Opin. Virol.**, v. 1, n. 5, p. 413-418, 2011.
- BELOV, A. A.; MOHAMMADI, M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 5, n. 6, p. 111, 2013.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIDESHI, D. K.; RENAULT, S.; STASIAK, K.; FEDERICI, B. A.; BIGOT, Y. Phylogenetic analysis and possible function of bro-like genes, a multigene family widespread among large double-stranded DNA viruses of invertebrates and bacteria. **J. Gen. Virol.**, v. 84, n. Pt 9, p. 2531-2544, 2003.

BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, INC, 1991. p.1-72.

BLANCA, J.; CAÑIZARES, J. sff_extract — Bioinformatics at COMAV 0.1 documentation. 2012. Disponível em: < http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/index.html >. Acesso em: 19 set. 2012.

BLISSARD, G. W.; KOGAN, P. H.; WEI, R.; ROHRMANN, G. F. A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. **Virology**, v. 190, n. 2, p. 783-793, 1992.

BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 35, p. 127-155, 1990.

BOND, C. T.; HAYFLICK, J. S.; SEEBURG, P. H.; ADELMAN, J. P. The rat gonadotropin-releasing hormone: SH locus: structure and hypothalamic expression. **Mol. Endocrinol.**, v. 3, n. 8, p. 1257-1262, 1989.

BONNING, B. C. Baculoviruses: biology, biochemistry and molecular biology. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K. e GILL, S. S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. p.233-270.

BORST, P.; GREAVES, D. R. Programmed gene rearrangements altering gene expression. **Science**, v. 235, n. 4789, p. 658-667, 1987.

BROWN, S. E.; MARUNIAK, J. E.; KNUDSON, D. L. Baculovirus (MNPV) genomic variants: characterization of Spodoptera exempta MNPV DNAs and comparison with other *Autographa californica* MNPV DNAs. **J. Gen. Virol.**, v. 66 (Pt 11), p. 2431-2441, 1985.

CARSON, D. D.; SUMMERS, M. D.; GUARINO, L. A. Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. **Virology**, v. 182, n. 1, p. 279-286, 1991.

CARVER, T. J.; RUTHERFORD, K. M.; BERRIMAN, M.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. ACT: the Artemis Comparison Tool. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3422-3423, 2005.

CASTRO, M. E.; SOUZA, M. L.; ARAUJO, S.; BILIMORIA, S. L. Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 69, n. 1, p. 40-45, 1997.

CHEN, C. N.; MALONE, T.; BECKENDORF, S. K.; DAVIS, R. L. At least two genes reside within a large intron of the dunce gene of *Drosophila*. **Nature**, v. 329, n. 6141, p. 721-724, 1987.

CHEVREUX, B.; WETTER, T.; SUHAI, S. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. German Conference on Bioinformatics, 1999. Hannover, Germany. p.45-56.

CHIRICO, N.; VIANELLI, A.; BELSHAW, R. Why genes overlap in viruses. **Proc. Biol. Sci.**, v. 277, n. 1701, p. 3809-3817, 2010.

CHISHOLM, G. E.; HENNER, D. J. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. **J. Virol.**, v. 62, n. 9, p. 3193-3200, 1988.

CHOI, J.; GUARINO, L. A. The baculovirus transactivator IE1 binds to viral enhancer elements in the absence of insect cell factors. **J. Virol.**, v. 69, n. 7, p. 4548-4551, 1995.

CLEM, R. J. Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. **Cell Death Differ.**, v. 8, n. 2, p. 137-143, 2001.

CLEM, R. J.; MILLER, L. K. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, n. 8, p. 5212-5222, 1994.

COCHRAN, M. A.; BROWN, S. E.; KNUDSON, D. L. Organization and expression of the baculovirus genome. In: GRANADOS, R. R. e FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculovirus**. Florida: CRC Press, v.I, 1986. p.239-258.

COCHRAN, M. A.; FAULKNER, P. Location of Homologous DNA Sequences Interspersed at Five Regions in the Baculovirus AcMNPV Genome. **J. Virol.**, v. 45, n. 3, p. 961-970, 1983.

COHEN, D.; MAREK, M.; DAVIES, B.; VLAK, J. M.; VAN OERS, M. Encyclopedia of *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus Genes. **Virol. Sin.**, v. 24, n. 5, p. 359-414, 2009.

COOPER, D.; CORY, J. S.; MYERS, J. H. Hierarchical spatial structure of genetically variable nucleopolyhedroviruses infecting cyclic populations of western tent caterpillars. **Mol. Ecol.**, v. 12, n. 4, p. 881-890, 2003.

CORRADI, N.; GANGAEVA, A.; KEELING, P. J. Comparative profiling of overlapping transcription in the compacted genomes of microsporidia *Antonospora locustae* and *Encephalitozoon cuniculi*. **Genomics**, v. 91, n. 4, p. 388-393, 2008.

CROIZIER, G.; RIBEIRO, H. C. T. Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus wild populations. **Virus Res.**, v. 26, p. 183-196, 1992.

DANFORD, T.; DOWELL, R.; AGARWALA, S.; GRISAFI, P.; FINK, G.; GIFFORD, D. Discovering regulatory overlapping RNA transcripts. **J. Comput. Biol.**, v. 18, n. 3, p. 295-303, 2011.

DAUGHERTY, M. D.; MALIK, H. S. Rules of engagement: molecular insights from host-virus arms races. **Annu. Rev. Genet.**, v. 46, p. 677-700, 2012.

DINGER, M. E.; GASCOIGNE, D. K.; MATTICK, J. S. The evolution of RNAs with multiple functions. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. 2013-2018, 2011.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nat. Rev. Genet.**, v. 9, n. 4, p. 267-276, 2008.

ENTWISTLE, P. F.; ADAMS, P. H. W.; EVANS, H. F.; RIVERS, C. F. Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus (Baculoviridae) in European spruce sawfly (*Gilpinia hercyniae*): spread of disease from small epicentres in comparison with spread of baculovirus diseases in other hosts. **J. Appl. Ecol.**, v. 20, p. 473-487, 1983.

ERIKSSON, N.; PACTER, L.; MITSUYA, Y.; RHEE, S. Y.; WANG, C.; GHARIZADEH, B.; RONAGHI, M.; SHAFER, R. W.; BEERENWINKEL, N. Viral population estimation using pyrosequencing. **PLoS Comput. Biol.**, v. 4, n. 4, p. e1000074, 2008.

FLIPSEN, J. T.; MANS, R. M.; KLEEFMAN, A. W.; KNEBEL-MORSDORF, D.; VLAK, J. M. Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene induces early degeneration of Malpighian tubules in infected insects. **J. Virol.**, v. 69, n. 7, p. 4529-4532, 1995.

FREEMONT, P. S. Ubiquitination: RING for destruction? **Curr. Biol.**, v. 10, n. 2, p. R84-87, 2000.

FRIESEN, P. D.; MILLER, L. K. Temporal regulation of baculovirus RNA: overlapping early and late transcripts. **J. Virol.**, v. 54, n. 2, p. 392-400, 1985.

_____. The regulation of baculovirus gene expression. In: DERFLER, W. e BOEHM, P. (Ed.). **The molecular biology of baculoviruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.31-50.

_____. Insect viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B. e STRAUS, S. E. (Ed.). **Field's virology**. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

FUNK, C. J.; BRAUNAGEL, S. C.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Springer, 1997. p.7-32.

FURIA, M.; D'AVINO, P. P.; CRISPI, S.; ARTIACO, D.; POLITO, L. C. Dense cluster of genes is located at the ecdysone-regulated 3C puff of *Drosophila melanogaster*. **J. Mol. Biol.**, v. 231, n. 2, p. 531-538, 1993.

FUXA, J. R. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v. 103, p. 27-43, 2004.

FUXA, J. R.; RICHTER, A. R. Classical biological control in an ephemeral crop habitat with *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **BioControl**, v. 44, p. 403-419, 1999.

GARAVAGLIA, M. J.; MIELE, S. A.; ISERTE, J. A.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. The ac53, ac78, ac101, and ac103 genes are newly discovered core genes in the family Baculoviridae. **J. Virol.**, v. 86, n. 22, p. 12069-12079, 2012.

GARCIA-MARUNIAK, A.; PAVAN, O. H.; MARUNIAK, J. E. A variable region of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences. **Virus Res.**, v. 41, n. 2, p. 123-132, 1996.

GELENTER, W. D.; FEDERICI, B. A. Virus epizootics in Californian populations of *Spodoptera exigua*: dominance of a single viral genotype. **Biochem. System. Ecol.**, v. 18, p. 461-466, 1990.

GETTIG, R. R.; MCCARTHY, W. J. Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis* spp nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. **Virology**, v. 117, n. 1, p. 245-252, 1982.

GIBSON, C. W.; THOMSON, N. H.; ABRAMS, W. R.; KIRKHAM, J. Nested genes: biological implications and use of AFM for analysis. **Gene**, v. 350, n. 1, p. 15-23, 2005.

GOLDBERG, S. M.; JOHNSON, J.; BUSAM, D.; FELDBLYUM, T.; FERRIERA, S.; FRIEDMAN, R.; HALPERN, A.; KHOURI, H.; KRAVITZ, S. A.; LAURO, F. M.; LI, K.; ROGERS, Y. H.; STRAUSBERG, R.; SUTTON, G.; TALLON, L.; THOMAS, T.; VENTER, E.; FRAZIER, M.; VENTER, J. C. A Sanger/pyrosequencing hybrid approach for the generation of high-quality draft assemblies of marine microbial genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 30, p. 11240-11245, 2006.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GRANADOS, R. R.; LAWLER, K. A. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**, v. 108, n. 2, p. 297-308, 1981.

GREENE, G. L.; LEPPA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J. Econ. Entomol.**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GRÖNER, A. Specificity and safety of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. e FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press, v.1, 1986. p.177-202.

GUARINO, L. A. Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 1, p. 409-413, 1990.

GUARINO, L. A.; GONZALEZ, M. A.; SUMMERS, M. D. Complete Sequence and Enhancer Function of the Homologous DNA Regions of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. **J. Virol.**, v. 60, n. 1, p. 224-229, 1986.

GUARINO, L. A.; XU, B.; JIN, J.; DONG, W. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. **J. Virol.**, v. 72, n. 10, p. 7985-7991, 1998.

HAJOS, J. P.; PIJNENBURG, J.; USMANY, M.; ZUIDEMA, D.; ZAVODSZKY, P.; VLAK, J. M. High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture. **Arch. Virol.**, v. 145, n. 1, p. 159-164, 2000.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAPP, B.; LI, J.; DOERFLER, W. Proteins encoded in the 81.2- to 85.0-map-unit fragment of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA can be translated in vitro and in *Spodoptera frugiperda* cells. **J. Virol.**, v. 65, n. 1, p. 89-97, 1991.

HARRAP, K. A. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. II. The virus particle. **Virology**, v. 50, n. 1, p. 124-132, 1972.

HARRISON, R. L. Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 101, n. 3, p. 181-186, 2009.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. The nucleopolyhedroviruses of *Rachiplusia ou* and *Anagrapha falcifera* are isolates of the same virus. **J. Gen. Virol.**, v. 80 (Pt 10), p. 2793-2798, 1999.

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

HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. Sudbury, Boston, Toronto, London, Singapore: Jones and Bartlett Publishers, 2005.

HENIKOFF, S.; KEENE, M. A.; FECHTEL, K.; FRISTROM, J. W. Gene within a gene: nested *Drosophila* genes encode unrelated proteins on opposite DNA strands. **Cell**, v. 44, n. 1, p. 33-42, 1986.

HERNIOU, E. A.; LUQUE, T.; CHEN, X.; VLAK, J. M.; WINSTANLEY, D.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. R. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. **J. Virol.**, v. 75, n. 17, p. 8117-8126, 2001.

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

HODGSON, D. J.; HITCHMAN, R. B.; VANBERGEN, A. J.; HAILS, R. S.; POSSEE, R. D.; CORY, J. S. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. **J. Evol. Biol.**, v. 17, n. 5, p. 1018-1025, 2004.

HODGSON, D. J.; VANBERGEN, A. J.; WATT, A. D.; HAILS, R. S.; CORY, J. S. Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a Lepidopteran baculovirus. **Evol. Ecol. Res.**, v. 3, p. 687-701, 2001.

HOSTETTER, D. L.; PUTTLER, B. A new broad spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from the celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby), (Lepidoptera: Noctuidae). **Environ. Entomol.**, v. 20, p. 1480-1488, 1991.

HUGHES, A. L. Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts. **Infect. Genet. Evol.**, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2002a.

_____. Origin and evolution of viral interleukin-10 and other DNA virus genes with vertebrate homologues. **J. Mol. Evol.**, v. 54, n. 1, p. 90-101, 2002b.

HUGHES, A. L.; FRIEDMAN, R. Genome-wide survey for genes horizontally transferred from cellular organisms to baculoviruses. **Mol. Biol. Evol.**, v. 20, n. 6, p. 979-987, 2003.

HUGHES, T. A. Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. **Trends Genet.**, v. 22, n. 3, p. 119-122, 2006.

HUH, N. E.; WEAVER, R. F. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Gen. Virol.**, v. 71 (Pt 1), p. 195-201, 1990.

HURST, L. D.; WILLIAMS, E. J.; PAL, C. Natural selection promotes the conservation of linkage of co-expressed genes. **Trends Genet.**, v. 18, n. 12, p. 604-606, 2002.

HUSE, S. M.; HUBER, J. A.; MORRISON, H. G.; SOGIN, M. L.; WELCH, D. M. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. **Genome Biol.**, v. 8, n. 7, p. R143, 2007.

HYINK, O.; DELLOW, R. A.; OLSEN, M. J.; CARADOC-DAVIES, K. M.; DRAKE, K.; HERNIOU, E. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. R.; WARD, V. K. Whole genome analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 83, n. Pt 4, p. 957-971, 2002.

IJKEL, W. F.; VAN STRIEN, E. A.; HELDEN, J. G.; BROER, R.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 80 (Pt 12), p. 3289-3304, 1999.

IMAI, N.; MATSUDA, N.; TANAKA, K.; NAKANO, A.; MATSUMOTO, S.; KANG, W. Ubiquitin ligase activities of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus RING finger proteins. **J. Virol.**, v. 77, n. 2, p. 923-930, 2003.

IYER, L. M.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors. **Genome Biol.**, v. 3, n. 3, p. RESEARCH0012, 2002.

JAKUBOWSKA, A. K.; PETERS, S. A.; ZIEMNICKA, J.; VLAK, J. M.; VAN OERS, M. M. Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV. **J. Gen. Virol.**, v. 87, n. Pt 3, p. 537-551, 2006.

JAKUBOWSKA, A. K.; VOGEL, H.; HERRERO, S. Increase in Gut Microbiota after Immune Suppression in Baculovirus-infected Larvae. **PLoS Pathog.**, v. 9, n. 5, p. e1003379, 2013.

JAQUES, R. P. The persistence of a nuclear polyhedrosis virus in the habitat of the host insect, *Trichoplusia ni*. I. Polyhedra deposited on foliage. **Can. Entomol.**, v. 9, p. 785-794, 1967.

JEHLE, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the

classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Arch. Virol.**, v. 151, n. 7, p. 1257-1266, 2006.

JIN, J.; GUARINO, L. A. 3'-end formation of baculovirus late RNAs. **J. Virol.**, v. 74, n. 19, p. 8930-8937, 2000.

JOAZEIRO, C. A.; WEISSMAN, A. M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. **Cell**, v. 102, n. 5, p. 549-552, 2000.

JOHNSON, D. W.; MARUNIAK, J. E. Physical map of Anticarsia-gemmatalis nuclear polyhedrosis-virus (AgMNPV-2) DNA. **J. Gen. Virol.**, n. 70, p. 1877-1883, 1989.

JOJIC, V.; HERTZ, T.; JOJIC, N. Population sequencing using short reads: HIV as a case study. **Pac. Symp. Biocomput.**, p. 114-125, 2008.

JONES, K. A. Bioassays of entomopathogenic viruses. In: NAVON, A. e ASCHER, K. R. S. (Ed.). **Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes**. Orford: CABI, 2000. cap. 3, p.324.

KAMITA, S. G.; MAEDA, S.; HAMMOCK, B. D. High-frequency homologous recombination between baculoviruses involves DNA replication. **J. Virol.**, v. 77, n. 24, p. 13053-13061, 2003.

KANG, W.; SUZUKI, M.; ZEMSKOV, E.; OKANO, K.; MAEDA, S. Characterization of baculovirus repeated open reading frames (bro) in Bombyx mori nucleopolyhedrovirus. **J. Virol.**, v. 73, n. 12, p. 10339-10345, 1999.

KATSUMA, S.; KANG, W.; SHIN-I, T.; OHISHI, K.; KADOTA, K.; KOHARA, Y.; SHIMADA, T. Mass identification of transcriptional units expressed from the Bombyx mori nucleopolyhedrovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 92, n. Pt 1, p. 200-203, 2011.

KELLER, A.; NESVIZHSKII, A. I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Anal Chem.**, v. 74, n. 20, p. 5383-5392, 2002.

KIMELMAN, D.; KIRSCHNER, M. W. An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in Xenopus oocytes. **Cell**, v. 59, n. 4, p. 687-696, 1989.

KISLEV, N.; EDELMAN, M. DNA restriction-pattern differences from geographic isolates of Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 119, n. 1, p. 219-222, 1982.

KONDO, A.; MAEDA, S. Host range expansion by recombination of the baculoviruses Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus and Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol.**, v. 65, n. 7, p. 3625-3632, 1991.

KOOL, M.; AHRENS, C. H.; GOLDBACH, R. W.; ROHRMANN, G. F.; VLAK, J. M. Identification of genes involved in DNA replication of the Autographa californica baculovirus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 23, p. 11212-11216, 1994.

- KOOL, M.; VLAK, J. M. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **Arch. Virol.**, v. 130, n. 1-2, p. 1-16, 1993.
- KRAKAUER, D. C. Stability and evolution of overlapping genes. **Evolution**, v. 54, n. 3, p. 731-739, 2000.
- KRAKAUER, D. C.; ZANOTTO, P. M. A. Viral individuality and limitations of the life concept. In: RASMUSSEN, S.;BEDAU, M. A.;CHEN, L.;DEAMER, D.;KRAKAUER, D. C.;PACKARD, N. e STADLER, D. P. (Ed.). **Protocells: bridging nonliving and living matter**. Hong Kong: MIT Press 2009. p.513-536.
- KRAPPA, R.; KNEBEL-MORSDORF, D. Identification of the very early transcribed baculovirus gene PE-38. **J. Virol.**, v. 65, n. 2, p. 805-812, 1991.
- KRAPPA, R.; RONCARATI, R.; KNEBEL-MORSDORF, D. Expression of PE38 and IE2, viral members of the C3HC4 finger family, during baculovirus infection: PE38 and IE2 localize to distinct nuclear regions. **J. Virol.**, v. 69, n. 9, p. 5287-5293, 1995.
- KUMMERFELD, S. K.; TEICHMANN, S. A. Relative rates of gene fusion and fission in multi-domain proteins. **Trends Genet.**, v. 21, n. 1, p. 25-30, 2005.
- KUNIMI, Y.; FUXA, J. R.; HAMMOCK, B. D. Comparison of wild type and genetically engineered nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* for mortality, virus replication and polyhedra production in *Trichoplusia ni* larvae. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 81, p. 129–135, 1996.
- KUNIN, V.; ENGELBREKTSON, A.; OCHMAN, H.; HUGENHOLTZ, P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. **Environ. Microbiol.**, v. 12, n. 1, p. 118-123, 2010.
- KUZIO, J.; PEARSON, M. N.; HARWOOD, S. H.; FUNK, C. J.; EVANS, J. T.; SLAVICEK, J. M.; ROHRMANN, G. F. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. **Virology**, v. 253, n. 1, p. 17-34, 1999.
- LANDSCHULZ, W. H.; JOHNSON, P. F.; MCKNIGHT, S. L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. **Science**, v. 240, n. 4860, p. 1759-1764, 1988.
- LANGE, M.; JEHLE, J. A. The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus. **Virology**, v. 317, n. 2, p. 220-236, 2003.
- LAUZON, H. A.; JAMIESON, P. B.; KRELL, P. J.; ARIF, B. M. Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 86, n. Pt 4, p. 945-961, 2005.
- LEE, H. H.; MILLER, L. K. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol.**, v. 27, n. 3, p. 754-767, 1978.

_____. Isolation, Complementation, and Initial Characterization of Temperature-Sensitive Mutants of the Baculovirus *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. **J. Virol.**, v. 31, n. 1, p. 240-252, 1979.

LEE, Y.; FUXA, J. R. Transport of Wild-Type and Recombinant Nucleopolyhedroviruses by Scavenging and Predatory Arthropods. **Microb. Ecol.**, v. 39, n. 4, p. 301-313, 2000.

LEVERSON, J. D.; JOAZEIRO, C. A.; PAGE, A. M.; HUANG, H.; HIETER, P.; HUNTER, T. The APC11 RING-H2 finger mediates E2-dependent ubiquitination. **Mol. Biol. Cell.**, v. 11, n. 7, p. 2315-2325, 2000.

LEVIN, D. B.; WHITTOME, B. Codon usage in nucleopolyhedroviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 81, n. Pt 9, p. 2313-2325, 2000.

LEVINSON, B.; KENWRICK, S.; LAKICH, D.; HAMMONDS, G., JR.; GITSCHEIER, J. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. **Genomics**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 1990.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 3, p. 203-221, 1987.

LI, L.; DONLY, C.; LI, Q.; WILLIS, L. G.; KEDDIE, B. A.; ERLANDSON, M. A.; THEILMANN, D. A. Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. **Virology**, v. 297, n. 2, p. 226-244, 2002.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LILLO, F.; KRAKAUER, D. C. A statistical analysis of the three-fold evolution of genomic compression through frame overlaps in prokaryotes. **Biol. Direct**, v. 2, p. 22, 2007.

LO, H. R.; CHOU, C. C.; WU, T. Y.; YUEN, J. P.; CHAO, Y. C. Novel baculovirus DNA elements strongly stimulate activities of exogenous and endogenous promoters. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 7, p. 5256-5264, 2002.

LOPEZ FERBER, M.; ARGAUD, O.; CROIZIER, L.; CROIZIER, G. Diversity, distribution, and mobility of bro gene sequences in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes**, v. 22, n. 3, p. 247-254, 2001.

LORICK, K. L.; JENSEN, J. P.; FANG, S.; ONG, A. M.; HATAKEYAMA, S.; WEISSMAN, A. M. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 20, p. 11364-11369, 1999.

LOVERING, R.; HANSON, I. M.; BORDEN, K. L.; MARTIN, S.; O'REILLY, N. J.; EVAN, G. I.; RAHMAN, D.; PAPPIN, D. J.; TROWSDALE, J.; FREEMONT, P. S. Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 6, p. 2112-2116, 1993.

- LU, A.; MILLER, L. K. Identification of three late expression factor genes within the 33.8- to 43.4-map-unit region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol.**, v. 68, n. 10, p. 6710-6718, 1994.
- _____. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p.193–216.
- LUBBERT, H.; DOERFLER, W. Transcription of overlapping sets of RNAs from the genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a novel method for mapping RNAs. **J. Virol.**, v. 52, n. 1, p. 255-265, 1984.
- LUQUE, T.; FINCH, R.; CROOK, N.; O'REILLY, D. R.; WINSTANLEY, D. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 82, n. Pt 10, p. 2531-2547, 2001.
- MAEDA, S.; MUKOHARA, Y.; KONDO, A. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. **J. Gen. Virol.**, v. 71 (Pt 11), p. 2631-2639, 1990.
- MAINPRIZE, T. H.; LEE, K.; MILLER, L. K. Variation in the temporal expression of overlapping baculovirus transcripts. **Virus Res.**, v. 6, n. 1, p. 85-99, 1986.
- MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; OMELCHENKO, M. V.; ROBERTSON, C. L.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHANG, N.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, n. Database issue, p. D225-229, 2011.
- MARTIGNONI, M. E.; IWAI, P. J. A. **A catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks**. 4th. Portland: General Technical Report PNW-40, 1986. 51 Disponível em: < http://www.fs.fed.us/pnw/publications/pnw_gtr195/pnw_gtr195a.pdf >.
- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10-12, 2011.
- MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R. R. e FEDERICI, B. A. (Ed.). **The biology of baculovirus**. Florida: CRC Press, v.I, 1986. p.129-146.
- _____. Molecular biology of *Anticarsia gemmatalis* baculovirus. **Mem. Inst. O. Cruz**, n. 84, p. 107-111, 1989.
- MARUNIAK, J. E.; GARCIA-MARUNIAK, A.; SOUZA, M. L.; ZANOTTO, P. M.; MOSCARDI, F. Physical maps and virulence of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus genomic variants. **Arch. Virol.**, v. 144, n. 10, p. 1991-2006, 1999.
- MATTICK, J. S. The double life of RNA. **Biochimie**, v. 93, n. 11, p. viii-ix, 2011.

MCINTOSH, A. H.; RICE, W. C.; IGNOFFO, C. M. Genotypic variants in wild-type populations of baculovirus. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture**. New York: Academic Press, 1987. p.305-325.

MERRYWEATHER-CLARKE, A. T.; HIRST, M.; POSSEE, R. D. Recombination between genetically modified and unmodified *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in *Trichoplusia ni* larvae. **Acta Virol.**, v. 38, n. 6, p. 311-315, 1994.

MIELE, S. A.; GARAVAGLIA, M. J.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. **Int. J. Evol. Biol.**, v. 2011, 2011.

MOSCARDI, F. Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *anticarsia gemmatalis*. **Mem. Inst. O. Cruz**, v. 84, p. 51-56, 1989.

_____. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 44, p. 257-289, 1999.

MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D. R. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: COPPING, L. G.; GREEN, M. e REEDS, R. (Ed.). **Pest management in soybean**. London: Elsevier, 1992. p.98-109.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E.; MOSCARDI, M. L.; SZEWCZYK, B. Baculovirus pesticides: Present state and future perspectives. In: AHMAD, I.; AHMAD, F. e PICHTEL, J. (Ed.). **Microbes and microbial technology**. New York: Springer, 2011. p.415-445.

MUNOZ, D.; MURILLO, R.; KRELL, P. J.; VLAK, J. M.; CABALLERO, P. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. **Virus Res.**, v. 59, n. 1, p. 61-74, 1999.

MUNOZ, D.; VLAK, J. M.; CABALLERO, P. In vivo recombination between two strains of the genus Nucleopolyhedrovirus in its natural host, *Spodoptera exigua*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 8, p. 3025-3031, 1997.

MURPHY, P. R.; KNEE, R. S. Identification and characterization of an antisense RNA transcript (gfg) from the human basic fibroblast growth factor gene. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, n. 7, p. 852-859, 1994.

NELSON, C. E.; HERSH, B. M.; CARROLL, S. B. The regulatory content of intergenic DNA shapes genome architecture. **Genome Biol.**, v. 5, n. 4, p. R25, 2004.

NORMARK, S.; BERGSTROM, S.; EDLUND, T.; GRUNDSTROM, T.; JAURIN, B.; LINDBERG, F. P.; OLSSON, O. Overlapping genes. **Annu. Rev. Genet.**, v. 17, p. 499-525, 1983.

O'REILLY, D. R. Auxiliary genes of baculoviruses. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The Baculoviruses**. New York: Springer, 1997. cap. 3, p.267-300.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: A laboratory manual.** New York: Oxford University Press, 1993. 368

OELLIG, C.; HAPP, B.; MULLER, T.; DOERFLER, W. Overlapping sets of viral RNAs reflect the array of polypeptides in the EcoRI J and N fragments (map positions 81.2 to 85.0) of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **J. Virol.**, v. 61, n. 10, p. 3048-3057, 1987.

OLIVEIRA, J. V.; WOLFF, J. L.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; DE CASTRO, M. E.; DE SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 87, n. Pt 11, p. 3233-3250, 2006.

OLIVEIRA, J. V. C. **Expressão temporal dos genes do nucleopoliedrovírus *Anticarsia gemmatalis* e sua influência sobre a célula.** 2010. 243 (Doutorado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OOI, B. G.; MILLER, L. K. Regulation of host RNA levels during baculovirus infection. **Virology**, v. 166, n. 2, p. 515-523, 1988.

PANG, Y.; YU, J.; WANG, L.; HU, X.; BAO, W.; LI, G.; CHEN, C.; HAN, H.; HU, S.; YANG, H. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Virology**, v. 287, n. 2, p. 391-404, 2001.

PARK, E. J.; YIN, C. M.; BURAND, J. P. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. **J. Gen. Virol.**, v. 77 (Pt 3), p. 547-554, 1996.

PASHLEY, D. P.; JOHNSON, S. J. Genetic population structure of migratory moths: the velvetbean caterpillar Lepidoptera: Noctuidae. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 79, n. 1, p. 26-30, 1986.

PASSARELLI, A. L.; MILLER, L. K. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2. **J. Virol.**, v. 67, n. 4, p. 2149-2158, 1993.

_____. In vivo and in vitro analyses of recombinant baculoviruses lacking a functional cg30 gene. **J. Virol.**, v. 68, n. 2, p. 1186-1190, 1994.

POSSEE, R. D.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus genome organization and evolution. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p.109-140.

PRIKHOD'KO, E. A.; LU, A.; WILSON, J. A.; MILLER, L. K. In vivo and in vitro analysis of baculovirus ie-2 mutants. **J. Virol.**, v. 73, n. 3, p. 2460-2468, 1999.

PRIKHOD'KO, E. A.; MILLER, L. K. The baculovirus PE38 protein augments apoptosis induced by transactivator IE1. **J. Virol.**, v. 73, n. 8, p. 6691-6699, 1999.

RANCUREL, C.; KHOSRAVI, M.; DUNKER, A. K.; ROMERO, P. R.; KARLIN, D. Overlapping genes produce proteins with unusual sequence properties and offer insight into de novo protein creation. **J. Virol.**, v. 83, n. 20, p. 10719-10736, 2009.

RODEMS, S. M.; FRIESEN, P. D. The hr5 transcriptional enhancer stimulates early expression from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome but is not required for virus replication. **J. Virol.**, v. 67, n. 10, p. 5776-5785, 1993.

_____. Transcriptional enhancer activity of hr5 requires dual-palindrome half sites that mediate binding of a dimeric form of the baculovirus transregulator IE1. **J. Virol.**, v. 69, n. 9, p. 5368-5375, 1995.

ROHRMANN, G. F. Polyhedrin structure. **J. Gen. Virol.**, v. 67 (Pt 8), p. 1499-1513, 1986.

_____. Baculovirus structural proteins. **J. Gen. Virol.**, v. 73 (Pt 4), p. 749-761, 1992.

_____. Baculovirus Molecular Biology. Bethesda, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>>. Acesso em: 03 mar. 2012.

RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944-945, 2000.

SAURIN, A. J.; BORDEN, K. L.; BODDY, M. N.; FREEMONT, P. S. Does this have a familiar RING? **Trends Biochem. Sci.**, v. 21, n. 6, p. 208-214, 1996.

SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 10, p. 458-465, 2004.

SIMON, O.; WILLIAMS, T.; LOPEZ-FERBER, M.; CABALLERO, P. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 9, p. 5579-5588, 2004.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D. Restriction Map of *Rachiplusia ou* and *Rachiplusia ou*-*Autographa californica* Baculovirus Recombinants. **J. Virol.**, v. 33, n. 1, p. 311-319, 1980.

SMITH, I. Misleading messengers? Interpreting baculovirus transcriptional array profiles. **J. Virol.**, v. 81, n. 14, p. 7819-7820, 2007.

SOARES, J. S.; RIBEIRO, B. M. Pathology of *Anticarsia gemmatalis* larvae infected by two recombinant *A. gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedroviruses. **Res. Microbiol.**, v. 156, n. 2, p. 263-269, 2005.

SONNHAMMER, E. L.; DURBIN, R. A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. **Gene**, v. 167, n. 1-2, p. GC1-10, 1995.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, n. 3, p. 378-384, 2004.

STEINHAUS, E. A.; MARSH, G. A. Report of diagnoses of diseased insects 1951-1961. **Hilgardia** v. 33, p. 349-490, 1962.

TAJIMA, F. Measurement of DNA polymorphism. In: TAKAHATA, N. e CLARK, A. G. (Ed.). **Mechanisms of molecular evolution**. Sunderland, MA: Sinauer Associates. Inc., 1993. p.37-59.

TAUTZ, D.; DOMAZET-LOSO, T. The evolutionary origin of orphan genes. **Nat. Rev. Genet.**, v. 12, n. 10, p. 692-702, 2011.

THIEM, S. M.; CHENG, X. W. Baculovirus Host-Range. **Virol. Sin.**, v. 24, n. 5, p. 436-457, 2009.

THOMPSON, C. G.; SCOTT, D. W.; WICKMAN, B. E. Long-term persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the Douglas-fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae), in forest soil. **Environ. Entomol.**, v. 10, p. 254–255, 1981.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRIFINOV, E. N. The multiple codes of nucleotide sequences. **Bull. Math. Biol.**, v. 51, p. 417-432, 1989.

VAN OERS, M. M.; ABMA-HENKENS, M. H.; HERNIOU, E. A.; DE GROOT, J. C.; PETERS, S.; VLAK, J. M. Genome sequence of Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus, a baculovirus with two DNA photolyase genes. **J. Gen. Virol.**, v. 86, n. Pt 7, p. 2069-2080, 2005.

VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M. Baculovirus genomics. **Curr. Drug Targets**, v. 8, n. 10, p. 1051-1068, 2007.

VAN STRIEN, E. A.; FAKTOR, O.; HU, Z. H.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Baculoviruses contain a gene for the large subunit of ribonucleotide reductase. **J. Gen. Virol.**, v. 78 (Pt 9), p. 2365-2377, 1997.

VLAK, J. M.; SMITH, G. E. Orientation of the Genome of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus: a Proposal. **J. Virol.**, v. 41, n. 3, p. 1118-1121, 1982.

VOLKMAN, L. E. Baculovirus infectivity and the actin cytoskeleton. **Curr. Drug Targets**, v. 8, n. 10, p. 1075-1083, 2007.

VOLKMAN, L. E.; BLISSARD, G. W.; FRIESEN, P. D.; KEDDIE, B. A.; POSSEE, R. D.; THEILMANN, D. A. Baculoviridae. In: MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A. e SUMMERS, M. D. (Ed.). **Virus taxonomy**. New York: Springer-Verlag, 1995. p.104-113.

WATTERSON, G. A. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theor. Popul. Biol.**, v. 7, n. 2, p. 256-276, 1975.

WERTZ, G. W.; PEREPELITSA, V. P.; BALL, L. A. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 7, p. 3501-3506, 1998.

WHITT, M. A.; MANNING, J. S. Role of chelating agents, monovalent anion and cation in the dissociation of Autograph californica nuclear polyhedrosis virus occlusion body matrix by zinc chloride. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 49, p. 61-69, 1987.

WILLIAMS, B. A.; SLAMOVITS, C. H.; PATRON, N. J.; FAST, N. M.; KEELING, P. J. A high frequency of overlapping gene expression in compacted eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 31, p. 10936-10941, 2005.

WILLIS, L. G.; SEIPP, R.; STEWART, T. M.; ERLANDSON, M. A.; THEILMANN, D. A. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene. **Virology**, v. 338, n. 2, p. 209-226, 2005.

WORMLEATON, S.; KUZIO, J.; WINSTANLEY, D. The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome. **Virology**, v. 311, n. 2, p. 350-365, 2003.

WU, L. C.; WANG, Z. W.; TSAN, J. T.; SPILLMAN, M. A.; PHUNG, A.; XU, X. L.; YANG, M. C.; HWANG, L. Y.; BOWCOCK, A. M.; BAER, R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. **Nat. Genet.**, v. 14, n. 4, p. 430-440, 1996.

XING, K.; DENG, R.; WANG, J.; FENG, J.; HUANG, M.; WANG, X. Analysis and prediction of baculovirus promoter sequences. **Virus Res.**, v. 113, n. 1, p. 64-71, 2005.

YANAI, I.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. Evolution of gene fusions: horizontal transfer versus independent events. **Genome Biol.**, v. 3, n. 5, p. research0024, 2002.

YOUNG, S. Y.; YEARIAN, W. C. Movement of a nuclear polyhedrosis virus from soil to soybean and transmission in *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations on soybean. **Environ. Entomol.**, v. 15, p. 573-580, 1986.

ZAGORDI, O.; GEYRHOFER, L.; ROTH, V.; BEERENWINKEL, N. Deep sequencing of a genetically heterogeneous sample: local haplotype reconstruction and read error correction. **J. Comput. Biol.**, v. 17, n. 3, p. 417-428, 2010.

ZANOTTO, P. M.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 62, n. 2, p. 147-164, 1993.

ZANOTTO, P. M. A.; KRAKAUER, D. C. Complete genome viral phylogenies suggests the concerted evolution of regulatory cores and accessory satellites. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3500, 2008.

ZEMSKOV, E. A.; KANG, W.; MAEDA, S. Evidence for nucleic acid binding ability and nucleosome association of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus BRO proteins. **J. Virol.**, v. 74, n. 15, p. 6784-6789, 2000.

ZHU, S. Y.; YI, J. P.; SHEN, W. D.; WANG, L. Q.; HE, H. G.; WANG, Y.; LI, B.; WANG, W. B. Genomic sequence, organization and characteristics of a new nucleopolyhedrovirus isolated from *Clanis bilineata* larva. **BMC Genomics**, v. 10, p. 91, 2009.