BRUNA TIBIRIÇÁ PEREIRA

SEQUENCIAMENTO DO BACULOVÍRUS QUE INFECTA A BROCA-DA-CANA-DE-AÇÚCAR *DIATRAEA SACCHARALIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo 2013

BRUNA TIBIRIÇÁ PEREIRA

SEQUENCIAMENTO DO BACULOVÍRUS QUE INFECTA A BROCA-DA-CANA-DE-AÇÚCAR *DIATRAEA SACCHARALIS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. José Luiz Caldas Wolff

Versão original

São Paulo 2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Pereira, Bruna Tibiriçá.

Sequenciamento do baculovírus que infecta a broca-da-cana-deaçúcar *Diatraea saccharalis* / Bruna Tibiriçá Pereira. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular.

Versão do título para o inglês: Sequencing of baculovirus that infects sugar cane borer *Diatraea saccharalis*.

 Baculoviridae 2. Granulovírus 3. Genoma Viral
Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 5. Análise de sequência de DNA 6. Filogenia I. Wolff, Prof. Dr. José Luiz Caldas II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0216/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO **Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia** Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Universidade de São Paulo, Instituto Butantari, Instituto de Pesquisas Techologicas

Candidato(a):	Bruna Tibiriçá Pereira.
Título da Dissertação:	Sequenciamento do baculovírus que infecta a broca-da- cana-de-açúcar <i>Diatraea saccharalis.</i>
Orientador(a):	Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/....../......, considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

DECANATO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COORDENADORIA DE PESQUISA - COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 24 de setembro de 2013.

Ao Senhor

Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

À Acadêmica

Bruna Tibiriçá Pereira

Considerando que o desenvolvimento do projeto de pesquisa **Sequenciamento do** *baculovírus que infecta a broca-da-cana-de-açúcar <u>Diatraea saccharalis</u>, não inclui a utilização de animais em seus experimentos, comunicamos que o referido projeto está isento de ser submetido à análise do Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Presbiteriana Mackenzie.*

Atenciosamente,

Prof. Dr. Elizeu Coutinho de Macedo Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais

Em memória a minha tia-mãe Laís Tibiriçá T. dos Santos, que sempre viverá no meu coração.

Aos meus pais, Jessé e Sandra, por todo amor e confiança que depositaram em mim, por serem responsáveis pelo meu crescimento profissional e pessoal.

A toda família, pela compreensão e incentivo nos momentos mais difíceis dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu porto seguro nessa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização desse trabalho.

À Universidade Presbiteriana Mackenzie por ceder o espaço físico do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular, para realização da maior parte das análises experimentais.

Ao meu orientador Dr. José Luiz Caldas Wolff por todo incentivo, ensinamentos, compreensão e confiança depositada em mim. Obrigada por toda aprendizagem que contribuiu imensamente para o meu crescimento profissional.

Ao Dr. Flávio Moscardi (1949-2012), pelo fornecimento de lagartas infectadas pelo baculovírus DsGV, deixo aqui meu agradecimento póstumo.

Ao Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática (LEMB), em especial ao Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, cujo auxílio foi essencial para a realização desse trabalho. Carla T. Braconi e Danielle Ferreira: muito obrigada pela ajuda!!!

Ao Dr. Bergmann Morais Ribeiro e a toda sua equipe, em especial ao Ms. Daniel Mendes Pereira Ardisson-Araújo, pela colaboração e contribuição na elaboração deste trabalho; e ao Dr. Fernando Lucas Melo, pelos ensinamentos, apoio e suporte de bioinformática para o desenvolvimento dessa dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

Aos participantes da banca de qualificação, Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça, Dra. Camila Malta Romano e Dra. Dolores Ursula Mehnert, pelos conselhos que contribuíram para o enriquecimento do meu trabalho.

A Heloisa Dourado, Nathalia Roja, Raquel Akemi Mori, Vanessa Nozaki e à Ms. Natália Góes dos Santos Barom, técnica do Laboratório de Virologia e Biologia Molecular da Universidade Presbiteriana Mackenzie, pela amizade, apoio e ajuda na realização dos protocolos experimentais. Garotas, muito abrigada por tudo! Vocês estão no meu coração.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." (José de Alencar)

RESUMO

PEREIRA, B. T. Sequenciamento do baculovírus que infecta a broca-da-canade-açúcar *Diatraea saccharalis.* 2013. 156 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Baculovírus são vírus específicos de insetos que infectam principalmente membros da ordem Lepidoptera. Diatraea saccharalis granulovírus (DsGV) foi isolado de larvas de Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae), a broca-da-cana-deaçúcar, um dos insetos-praga de maior importância na cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Para entender melhor esse baculovírus, o genoma completo de DsGV foi determinado e analisado. O genoma de DsGV foi obtido através do seguenciamento pelo sistema 454 (454 GS FLX Titanium, Roche). Na segunda etapa do estudo, foram utilizados os eletroferogramas obtidos através do seguenciamento por interrupção de cadeia (método de Sanger) para a confirmação das regiões de cobertura reduzida. O genoma de DsGV apresentou 98.463 pb, tornando-se o menor betabaculovírus sequenciado até o momento. O genoma possui um conteúdo A+T de 65% e potencialmente codifica 116 genes. Sete seguências ricas em AT contendo múltiplas repetições em tandem, conhecidas como regiões homólogas (hrs), foram identificadas. A estrutura dessas regiões revelou ser bem parecida com a das hrs dos demais baculovírus. Foram identificados os 37 genes conservados em todos os baculovírus e 19 genes específicos de betabaculovírus. Um grupo de 17 genes de DsGV não foi encontrado em nenhum baculovírus seguenciado até o momento. DsGV é o primeiro betabaculovírus que possui o gene gp64, que codifica uma proteína de fusão, originalmente encontrado apenas em alfabaculovírus do grupo I. Parece ainda codificar a proteína F, porém a análise indica a existência de vírus nessa população com grandes pedaços deletados do gene, o que sugere a perda de função da proteína F para a GP64. A análise da distribuição da diversidade de SNPs ao longo do genoma sugere que o DsGV é um vírus com poucas variações. A comparação de ordem entre genomas de baculovírus e análise de identidade das seguências identificadas no presente estudo mostraram que ele está mais proximamente relacionado aos betabaculovírus. A análise filogenética utilizando a concatenação das sequências deduzidas de aminoácidos de 30 genes conservados em 61 baculovírus totalmente sequenciados sugere que DsGV está inserido no clado b do grupo dos betabaculovírus. Esse vírus parece estar mais estritamente relacionado a 5 GVs (ChocGV, PiraGV, ClanGV, CpGV e CrleGV) e parece ser o baculovírus mais próximo do provável ancestral comum desse grupo.

Palavras-chave: *Diatraea saccharalis* granulovirus. DsGV. Baculovírus. Genoma. Sequenciamento 454. Análise da sequência. Filogenia.

ABSTRACT

PEREIRA, B. T. **Sequencing of baculovirus that infects sugar cane borer** *Diatraea saccharalis.* 2013. 156 p. Masters thesis (Biotechnology) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Baculoviruses are insect specific viruses that infect mainly members of the Order Lepidoptera. Diatraea saccharalis granulovirus (DsGV) was isolated from Diatraea saccharalis (Lepidoptera: Crambidae), one of the most important insect pest of the sugar cane culture in Brazil. To better understand this baculovirus, the complete genome sequence of DsGV was determined and analysed. The genome of DsGV was obtained by 454 sequencing system (454 GS FLX Titanium, Roche). The next step of study was to use the electropherograms obtained by chain termination sequencing (Sanger sequencing) for confirmation of low coverage regions. Our results showed that the nucleotide sequence of the DsGV genome is 98 463 bp in length, which makes it the smallest betabaculovirus sequenced to date. The genome has a A+T content of 65% and potentially encodes 116 putative genes. Seven ATrich sequences containing multiple tandem repeats, known as homologous regions (hrs) were identified. Their structure showed to be very similar to the other hrs of baculoviruses. It contains the 37 baculovirus core genes and a set of 19 betabaculovirus-specific genes. A group of 17 putative DsGV genes were not found in any genome of the baculoviruses sequenced up to the present. DsGV is the first betabaculovirus sequenced so far that has the gp64 envelope fusion protein gene, originally found only in alphabaculovirus group I. It seems still encode the F protein, but the analysis indicates the presence of viruses in this population with large portions deleted of gene, which suggested the loss of function of the F protein to GP64. The SNPs diversity distribution along genome suggests that this isolate of DsGV has few variations. The genome order comparisons and analysis of sequence identity identified in this study revealed that DsGV is more closely related to betabaculoviruses. Phylogenetic analysis performed with concatamers of 30 conserved proteins from 61 fully sequenced baculovirus genomes suggests that DsGV is a member of clade b of the betabaculovirus. This virus seems to be closer to 5 GVs (ChocGV, PiraGV, ClanGV, CpGV e CrleGV) and the closest to the putative common ancestor of this group.

Keywords: *Diatraea saccharalis* granulovirus. DsGV. Baculovirus. Genome. 454 Sequencing. Sequence analysis. Phylogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Morfologia dos nucleopoliedrovírus (NPVs) e granulovírus (GVs)19
Figura 2 - Fenótipos virais durante ciclo de infecção de baculovírus21
Figura 3 - Modo de infecção oral (<i>in vivo</i>) de uma larva de inseto lepidóptero por baculovírus
Figura 4 - Ciclo de vida de Diatraea saccharalis26
Figura 5 - Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura do baculovírus <i>Diatraea saccharalis</i> GV
Figura 6 - Método de obtenção de baculovírus recombinantes por recombinação homóloga, baseado no gene da <i>poliedrina</i>
Figura 7 - Sistema Bac-to-Bac de expressão
Figura 8 - Fenograma mostrando a relação entre <i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV-2D (AgMNPV-2D) e outros 27 genomas de baculovírus totalmente sequenciados39
Figura 9 – Replicação do DNA em baculovírus45
Figura 10 – Árvore filogenética de 56 baculovírus, totalmente sequenciados, baseada na concatenação das sequências deduzidas de aminoácidos dos genes <i>lef- 8</i> e <i>pif-2</i>
Figura 11 – Plasmídeo pUC19 usado como vetor de clonagem na biblioteca HaeIII.
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da granulina de DsGV67
Figura 13 – Sequência completa do gene da <i>granulina</i> de DsGV68
Figura 14 – Sequência deduzida de aminoácidos do gene da granulina de DsGV68
Figura 15 – Alinhamento múltiplo das sequências deduzidas de aminoácidos dos genes da <i>granulina</i> de DsGV e dos outros 14 betabaculovírus completamente sequenciados
Figura 16 – Mapa circular do genoma de DsGV72
Figura 17 – Conteúdo AT (%AT) das 116 ORFs do genoma de DsGV
Figura 18 – Posicionamento das 7 regiões homólogas (<i>hrs</i>) no genoma de DsGV .77
Figura 19 – Alinhamento da região palindrômica imperfeita encontrada dentro das 7 regiões homólogas (<i>hrs</i>) do genoma de DsGV78
Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos amplicons purificados <i>lef8/gp64</i> e <i>rr2a/gp64</i>
Figura 21 – Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do gene <i>gp64</i> encontrado em DsGV e em todos alfabaculovírus do grupo I completamente sequenciados
Figura 22 – Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de <i>d</i> s35 com a sequência correspondente a um receptor da classe B acoplado à proteína G presente no inseto <i>Danaus plexippus</i> 101
Figura 23 – Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de <i>ds</i> 36 com uma sequência presente em <i>Wiseana iridescent</i> vírus101

Figura 25 – Distribuição de SNPs gênicos ao longo do genoma de DsGV103

Figura 26 – Mapa sintênico de AcMNPV, DsGV e dos demais betabaculovírus 108

Figura 27 – Relação filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos do gene da *granulina/poliedrina* de DsGV e de 60 baculovírus totalmente sequenciados....110

Figura 28 – Árvore filogenética construída a partir das sequências deduzidas de aminoácidos do gene *gp64* de DsGV, de todos alfabaculovírus do grupo I completamente sequenciados, dos baculovírus *Anagrapha falcifera* MNPV (AfMNPV), *Choristoneura occidentalis* (ChocNPV), *Choristoneura rosaceana* NPV (ChroNPV), *Philosamia cynthia ricini* NPV (PhcyNPV) e *Galleria mellonella* MNPV (GmMNPV) e dos ortomixovírus Dhori virus (DHOV), Jos virus (JOSV), Thogoto virus (THOV), Quaranfil virus (QRFV), Tjuloc virus (TJUV) e Johnston Atoll virus (JAV).112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genomas completos de todos os baculovírus sequenciados até o Tabela 2 – Os 37 genes conservados ("core genes") entre todos os baculovírus sequenciados até o momento43 Tabela 3 – Sequência dos primers universais do gene da granulina/poliedrina utilizados na reação de amplificação do gene da granulina de DsGV......57 Tabela 4 – Procedimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizado para a amplificação do gene da granulina de DsGV57 Tabela 5 – Programa utilizado para amplificar o gene da granulina de DsGV.......58 Tabela 6 – Procedimento de seguenciamento do gene da granulina de DsGV.......58 Tabela 7 – Programa utilizado para sequenciar o gene da granulina de DsGV.......59 Tabela 8 – Localização e tamanho das 8 maiores regiões de sobreposição de ORFs adjacentes no genoma de DsGV.....74 Tabela 9 – Localização e tamanho das 16 regiões intergênica maiores que 100 pb no genoma de DsGV......75 **Tabela 10** – Genes identificados em DsGV, agrupados por função, de acordo com a comparação realizada com os outros baculovírus80 Tabela 12 – Distribuição da diversidade de SNPs ao longo do genoma de DsGV.102 Tabela 13 - Número de SNPs sinônimos e SNPs não sinônimos em regiões codificadoras103 Tabela 14 – SNPs sinônimos e não sinônimos nos 29 genes variáveis de DsGV..104 **Tabela A.1** – Características gerais do genoma de DsGV......146

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Baculovírus	18
2.2 Classificação dos baculovírus	20
2.3 Infecção e modo de ação	20
2.4 Regulação da expressão gênica	24
2.5 Broca-da-cana-de-açúcar Diatraea saccharalis	25
2.6 Principais aplicações de baculovírus	28
2.6.1 Baculovírus no controle biológico	28
2.6.2 Baculovírus como vetores de expressão	31
2.7 Genomas de baculovírus	35
2.8 Conteúdo gênico	41
2.8.1 Genes conservados: os "core genes"	41
2.8.2 Replicação do DNA	44
2.8.3 Transcrição do RNA	45
2.8.4 GP64 e proteína F	46
2.8.5 Outras descobertas	46
2.9 Diversidade populacional	48
2.10 Análise filogenética de baculovírus e organização genômica	49
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1 Desenho esquemático da metodologia	54
4.2 Amostra viral	55
4.3 Extração dos grânulos virais	55
4.4 Extração e purificação do DNA viral	55
4.5 Amplificação genômica pelo sistema Phi29	56
4.6 Amplificação e sequenciamento do gene da granulina	56
4.7 Construção da biblioteca <i>Hae</i> lll e clonagem de fragmentos de DN plasmídeo pUC19	A viral no 59
4.8 Sequenciamento das extremidades dos clones	62
4.9 Pirosequenciamento	62
4.10 Montagem e anotação do genoma viral	63
4.11 Confirmação das regiões de baixa cobertura no genoma	64
4.12 Análise da distribuição da diversidade de SNPs	64

SUMÁRIO

4.13 Análise do conteúdo gênico, sintenia e filogenia	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Amplificação e sequenciamento do gene da granulina	67
5.2 Características gerais do genoma	71
5.3 Análise do conteúdo gênico	79
5.3.1 Genes envolvidos na transcrição viral	81
5.3.2 Genes envolvidos na replicação viral	85
5.3.3 Genes com papel estrutural	87
5.3.4 Genes auxiliares e de interação com o hospedeiro	90
5.3.5 Genes específicos de GVs	92
5.3.6 GP64	94
5.3.7 Genes únicos de DsGV	
5.4 Análise das variações (SNPs) ao longo do genoma	
5.5 Organização genômica e análise filogenética	
6 CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS	117
APÊNDICE - Características gerais do genoma de DsGV	146

1 INTRODUÇÃO

A lagarta *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como broca-da-cana-de-açúcar, é um dos insetos-praga de maior importância da cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Inúmeros patógenos acometem esse inseto, tais como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) (Ascomycota: Clavicipitaceae), *Beauveria bassiana* (Bals.) (Ascomycota: Cordycipitaceae) e, particularmente, o granulovírus de *Diatraea saccharalis* (DsGV) (ALVES et al., 1990; GALLO, 2002; LECUONA; ALVES, 1988; VENDRAMIM, 1987).

Os baculovírus, maior e mais estudado grupo de vírus patogênicos de insetos, são vírus de DNA dupla-fita circular (80-180 Kpb), que se caracterizam principalmente pela presença de corpo de oclusão ("*occlusion body*" - OB) e um cristal proteico (POLIEDRINA ou GRANULINA), que envolve e protege as partículas virais (KING; POSSEE, 1992). Já foram encontrados baculovírus em mais de 700 espécies de insetos, cuja maioria pertence à ordem Lepidoptera (HERNIOU; JEHLE, 2007; THEILMANN et al., 2005).

Desde a década de 60, os primeiros estudos focavam no uso de baculovírus como agentes de biocontrole de insetos-praga na agricultura e na silvicultura (MOSCARDI, 1998; PAYNE, 1986), tais como larvas de insetos lepidópteros (HOKKANEN; LYNCH, 2003¹ apud ANTONY et al., 2011). A utilização desses vírus no controle de pragas é uma alternativa ecológica e sustentável, diferenciando-se do controle químico, principalmente em relação ao custo, ao impacto ambiental, à especificidade, à segurança e ao desenvolvimento da resistência (SUN; PENG, 2007; SZEWCZYK et al., 2006).

A partir das décadas de 70 e 80, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, os baculovírus começaram a ser utilizados como vetores de expressão de proteínas exógenas (PENNOCK et al., 1984; SMITH et al., 1983). As proteínas produzidas nas células de insetos são, geralmente, biologicamente ativas e imunologicamente similares às proteínas naturais. Essa nova aplicação permitiu sua ampla utilização na medicina como agentes profiláticos (vacinas) e terapêuticos e para diagnose, além de permitir a produção de proteínas de interesse agrônomo e

¹ HOKKANEN, H. M. T.; LYNCH, J. M. **Biological control**: Benefits and risks. Cambridge University press publ. 2003.

para pesquisa básica (GRABHERR; ERNST, 2010; KABA et al., 2004; KOST, 2000; O'REILLY et al., 1992).

Outra aplicação é o uso de baculovírus como vetores de transferência para terapia gênica, utilizando células de mamíferos (AIRENNE et al., 2000). Sabe-se que esses vírus são capazes de entrar em células de mamíferos e liberar o material genético no núcleo, sem a ocorrência de replicação viral. A utilidade dos baculovírus em terapia gênica consiste em associar a elevada produção de proteínas exógenas com a ausência de efeitos citopáticos nas células de mamíferos infectadas (TANI et al., 2003).

No Brasil, os baculovírus têm sido investigados por vários grupos, tanto em termos de utilização no controle biológico, quanto na expressão de proteínas exógenas e nos aspectos básicos da biologia molecular destes vírus (LAUZON et al., 2005; RIBEIRO et al., 1998; WOLFF et al., 2008). O sequenciamento de baculovírus contribui para o maior conhecimento da estrutura de seu genoma, sequência e função de cada gene e, consequentemente, permite entender os mecanismos moleculares que envolvem a infecção viral. A caracterização de um novo baculovírus pode inclusive ser útil para identificar seu grau de segurança para aplicação no campo, descobrindo, dessa forma, a melhor maneira de manipulação do vírus para seu uso no controle biológico. Além disso, possibilita a realização de comparações genômicas com baculovírus já sequenciados, permitindo a análise de dados filogenéticos relevantes (CASTRO et al., 1999; HERNIOU; JEHLE, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Baculovírus

A família Baculoviridae compreende um dos maiores e mais estudado grupo de vírus específico de insetos conhecido. Os baculovírus são encontrados espalhados na natureza, infectando mais de 700 espécies de artrópodes, que pertencem principalmente às ordens Lepidoptera, Himenoptera e Diptera (HERNIOU; JEHLE, 2007; O'REILLY et al., 1992; VOLKMANN et al., 1995; XU et al., 2010).

O nome baculovírus deriva do latim *baculum*, que significa bastão, devido ao formato dos vírions. Eles possuem DNA circular dupla-fita (superenovelado), vírion com envelope em formato de bastão (báculo) e tamanho variável entre 80 a 180 Kpb (BLISSARD et al., 2000² apud JAKUBOWSKA et al. 2005; MOSCARDI, 1998). Seu genoma codifica de 90 a 180 proteínas, que possuem papel importante na replicação do DNA, transcrição do RNA, na estrutura e reprodução dos vírus (NEGREIRO et al., 2004; THEILMANN et al., 2005). A estrutura básica dos baculovírus é o nucleocapsídeo, um "core" cilíndrico constituído de DNA e proteína, que possui de 40-50 nm de diâmetro e 200-300 nm de comprimento. Dentro do nucleocapsídeo, a dupla-fita de DNA se une de forma heterogênea a uma proteína básica e origina um "core" cilíndrico (O'REILLY et al., 1992; VALICENTE et al., 2010).

A presença de vírions oclusos em corpos proteicos (OB – "occlusion body") é a principal característica da família Baculoviridae. Existem dois tipos morfológicos em baculovírus, os nucleopoliedrovírus (NPVs) e os granulovírus (GVs). Os corpos de oclusão são cristais proteicos que envolvem as partículas virais, recebendo a denominação de poliedros (formados principalmente pela proteína POLIEDRINA) nos NPVs e de grânulos (formados principalmente pela proteína GRANULINA) nos GVs. A POLIEDRINA possui cerca de 30.000 Daltons (Da) de massa molecular, similar à GRANULINA, e representa cerca de 95% do conteúdo do OB nos NPVs. A

² BLISSARD, G. W.; BLACK, B.; CROOK, N.; KEDDIE, B. A.; POSSEE, R.; ROHRMANN, G. F.; THEILMAN, D. A.; VOLKMAN, L. 2000. Family baculoviridae. In: VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOV, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. (Eds.). Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, California. 2000.

oclusão das partículas virais é uma propriedade importante nos baculovírus, pois garante proteção, por ser uma estrutura de resistência, e permite a transmissão do vírus entre insetos no ambiente (BLISSARD; ROHRMANN, 1990³ apud VALICENTE et al., 2010; SUMMERS et al., 1980).

Nos NPVs os tamanhos dos corpos proteicos, que possuem formato poliédrico, estão compreendidos entre 1 a 15µm de diâmetro (FEDERICI, 1997). Os GVs contêm corpos de oclusão de forma oval (pequenos grânulos), com 0,3 a 0,5µm de tamanho, possuindo uma partícula viral ou duas (raro) em seu interior (Figura 1). Após a ruptura da membrana nuclear de células infectadas, ocorre a montagem destas partículas entre os conteúdos nuclear e citoplasmático (THEILMANN et al., 2005).

A maneira como o nucleocapsídeo está organizado dentro dos envelopes proteicos, produz dois tipos morfológicos distintos dentro dos NPVs: o tipo simples (SNPV), apresentando somente um nucleocapsídeo, ou o tipo múltiplo (MNPV), com vários nucleocapsídeos empacotados por envelope (Figura 1). No entanto, os dois fenótipos não apresentam validade taxonômica (VAN REGENMORTEL et al., 2000; ZANOTTO et al., 1993).

Figura 1 – Morfologia dos nucleopoliedrovírus (NPVs) e granulovírus (GVs). A presença de oclusões virais é a principal característica dos baculovírus, recebendo o nome de poliedros nos NPVs e grânulos nos GVs. Os NPVs podem ser do tipo simples (SNPV), contendo um vírion por envelope, ou múltiplo (MNPV), com vários vírions por envelope. Os GVs são menores, ovalados e possuem geralmente apenas um vírion em seu interior.



Fonte: Adaptada de Guarino (2011)

³ BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 35, p. 127-155, 1990.

2.2 Classificação dos baculovírus

Os baculovírus são nomeados taxonomicamente de acordo com a espécie do hospedeiro do qual foram isolados. O baculovírus isolado da lagarta da alfafa, *Autographa californica*, por exemplo, recebe o nome de *Autographa californica* múltiplo nucleopoliedrovírus (AcMNPV) (VAIL, 1971) e o baculovírus isolado da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, é o *Anticarsia gemmatalis* múltiplo nucleopoliedrovírus (AgMNPV) (ALLEN; KNELL, 1977).

Inicialmente, a família Baculoviridae foi dividida em dois gêneros, nucleopoliedrovírus (NPVs) e granulovírus (GVs), de acordo com diferenças na morfologia do corpo de oclusão e análises filogenéticas de suas sequências de DNA e aminoácidos (LANGE; JEHLE, 2003). Recentemente, tem sido proposta a divisão da família Baculoviridae em quatro gêneros, com base no hospedeiro e na estrutura do corpo de oclusão. Comparações de 29 genomas de baculovírus mostraram que a história evolutiva dos baculovírus acompanhava a classificação dos insetos hospedeiros mais próximos do que as propriedades morfológicas que foram utilizadas anteriormente para classificá-los (JEHLE et al., 2006).

A nova classificação de baculovírus inclui: alfabaculovírus (NPVs específicos de insetos lepidópteros); betabaculovírus (GVs específicos de insetos lepidópteros); gamabaculovírus (NPVs específicos de insetos himenópteros) e deltabaculovírus (NPVs específicos de insetos dípteros). Estudos filogenéticos do gene da poliedrina e de outros genes conservados em baculovírus permitiram ainda a subdivisão dos alfabaculovírus em grupo I e II (HERNIOU; JEHLE, 2007; JEHLE et al., 2006; ROHRMANN, 2008; ZANOTTO et al., 1993).

2.3 Infecção e modo de ação

Durante o ciclo infectivo, há a formação de dois fenótipos virais, que são produzidos em diferentes fases do processo de infecção: uma forma não oclusa, os BVs ("budded virus"), e outra oclusa, os ODVs ("occlusion-derived virus"), fundamentais para os processos de infecção e propagação do vírus (Figura 2). Os BVs e ODVs diferem-se em relação à morfologia e composição proteica, forma de penetração no hospedeiro, natureza dos envelopes virais e infectividade (BRAUNAGEL; SUMMERS, 1994; THEILMANN et al., 2005; ZHOU et al., 2005).

O vírus derivado da oclusão (ODV) é responsável pela primeira fase da infecção (infecção primária) dentro da larva hospedeira, possuem a função de transmissão do vírus entre os insetos no ambiente e mantêm os vírions viáveis no ambiente por anos contanto que não recebam a luz do sol. O vírus extracelular (BV) é responsável pela segunda fase de infecção (infecção secundária) e apresenta um papel de dispersão do vírus de célula a célula no interior do inseto (ANDRADE et al., 2004; ROHRMANN, 2011).

Figura 2 – Fenótipos virais durante ciclo de infecção de baculovírus: forma não oclusa, "Budded virus" (BVs), e forma oclusa, "Occlusion-derived virus" (ODVs). À esquerda se encontra um BV com um único nucleocapsídeo (em vermelho) dentro do envelope celular, com proteínas virais inseridas (GP64/Proteína F). À direita observa-se um ODV com várias partículas virais dentro do mesmo envelope (vírus do tipo múltiplo).



Fonte: Adaptada de http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/ baculo/ baculo.html

A principal rota de infecção pelos baculovírus é oral (*in vivo*), provocando a morte do inseto cerca de 6 a 8 dias após o início da infecção (Figura 3). As larvas hospedeiras, única fase susceptível à infecção pelo vírus, ingerem os poliedros (ou OBs) dos baculovírus ao se alimentar de folhas. Os poliedros são dissolvidos no meio alcalino (pH 8-11) do intestino dos insetos, liberando as partículas virais (ODVs) no lúmen digestivo (FEDERICI, 1997; ZHOU et al., 2005). Os ODVs liberados penetram nas células colunares do intestino médio a partir da interação direta das suas proteínas específicas associadas ao envelope (PIFs) com receptores celulares específicos, ou seja, ocorre fusão das membranas viral e celular mediada por esses receptores. Dentro da célula epitelial, os nucleocapsídeos podem

apresentar diferentes rotas: ser direcionado ao núcleo, infectar células da traquéia e infectar células regenerativas anexas ao intestino e/ou atingir a hemolinfa (KIKHNO et al., 2002; SLACK; ARIF, 2007; WASHBURN et al., 1995).

Após a ingestão e entrada dos vírus nas células intestinais, OS nucleocapsídeos entram no núcleo pelo movimento dos filamentos de actina e ocorre a transcrição de certos genes virais e posteriormente a replicação do DNA. Logo após a replicação e transcrição de genes tardios há a montagem de vários nucleocapsídeos. Estes vão para o citoplasma da célula e originam os BVs, uma partícula viral que sai da célula por brotamento da membrana plasmática (possui inserção de proteínas virais GP64/proteína F). Esse fenótipo viral produz uma infecção sistêmica de vários tecidos da lagarta (HAAS-STAPLETON et al., 2004; WANG; GRANADOS, 1998). Os BVs entram nas células por endocitose adsortiva, isto é, o vírion liga-se ao receptor celular, ocorre a invaginação da membrana plasmática, geração de uma vesícula endocítica com o vírion envelopado, aumento da acidez do endossomo, ativação da proteína de fusão do envelope viral, fusão da membrana do vírus e do endossomo e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (BLISSARD, 1996; CHARLTON, VOLKMAN, 1993: VOLKMAN: GOLDSMITH, 1985).

Os poliedros são produzidos depois dos BVs, na fase final da infecção. Os ODVs são envoltos no núcleo pela POLIEDRINA (NPVs) ou GRANULINA (GVs), se polimerizando para originar os OBs (MARUNIAK, 1986). Diversos OBs podem ser produzidos por célula e cada um pode apresentar dezenas de partículas virais. No final da infecção, ocorre a ruptura das células e a liberação dos poliedros no ambiente. Após a morte da lagarta, ocorre a liquefação dos tecidos (CASTRO; SOUZA, 2006).

Mudanças morfológicas e comportamentais são sintomas típicos da infecção nos insetos hospedeiros, tais como redução da alimentação e do crescimento, descoloração do tegumento (acúmulo de vírus nos núcleos das células adiposas da epiderme), redução dos movimentos e, após a sua morte, rompimento do tegumento, o que favorece a liberação dos poliedros e consequentemente novos ciclos infectivos (FEDERICI, 1997; FEDERICI, 1999⁴ apud VALICENTE et al., 2010).

⁴ FEDERICI, B. A. Naturally occuring baculoviruses for insect pest control. In: HALL, F. R.; MENN, J. J. (Ed.). Methods in biotechnology: biopesticides, use and delivery. Totowa: Humana Press, v. 5, p. 301-320, 1999.

A presença dos baculovírus no inseto-praga inativa o hormônio (ecdisona) responsável pelo seu processo de muda (ecdises) através da expressão de uma proteína, Ecdisteróide UDP-Glicosil Tranferase (EGT). A deleção ou inativação do hormônio ecdisteróide retarda o desenvolvimento da larva e, consequentemente, reduz o tempo letal e o dano econômico provocado à cultura (O'REILLY; MILLER, 1989; PINEDO et al., 2003). A permanência maior na fase larval permite a obtenção de produtos metabólicos utilizados para replicar o vírus (RODRIGUES et al., 2001; SMITH; GOODALE, 1998).

Figura 3 – Modo de infecção oral (*in vivo*) de uma larva de inseto lepidóptero por baculovírus. Poliedros (OBs) liberados no ambiente, a partir da infecção e morte de outro inseto por baculovírus, são ingeridos pela larva e dissolvidos no intestino médio (pH alcalino), liberando as partículas virais. Estas atravessam a membrana peritrófica e chegam às células do intestino médio. Posteriormente, o vírus infecta outras células (hemócitos e traqueócitos). Quando os ODVs entram na célula são direcionados ao núcleo, ocorrendo replicação e transcrição viral. Com a montagem de novos nucleocapsídeos, estes vão para o citoplasma e saem da célula por brotamento, originando os BVs, que irão infectar outras células. No final do ciclo são produzidos os corpos de oclusão que são liberados no ambiente após a morte do hospedeiro.



Fonte: Adaptada de Ghosh et al. (2002)

2.4 Regulação da expressão gênica

A expressão gênica nos baculovírus é dividida em três fases: fase imediata precoce ("immediately early") / fase precoce ("early"), fase tardia ("late") e fase muito tardia ("very late") (PASSARELLI; GUARINO, 2007). A fase imediata precoce corresponde aos genes expressos logo nas primeiras horas de infecção. Antes da replicação do DNA viral ocorre a expressão dos genes da fase precoce; são genes dependentes da enzima RNA polimerase II do hospedeiro e participam do processo de replicação viral, que ocorre logo em seguida. A fase tardia inicia-se após a replicação viral, período em que a expressão gênica da célula hospedeira é interrompida e há produção do fenótipo viral BV. A fase muito tardia caracteriza-se pela expressão de genes após 24 horas de infecção; a proteína mais produzida nessa fase é a POLIEDRINA nos NPVs e GRANULINA nos GVs. Os genes da fase tardia são responsáveis pela montagem do vírus e os genes da fase muito tardia participam do processo de oclusão viral (LU; MILLER, 1997; MARUNIAK, 1986; RIBEIRO et al., 1998).

A fase precoce inicia-se a partir de 30 minutos após a infecção (p.i) e termina cerca de 6 horas após a infecção (h.p.i.). A maioria dos genes expressos nessa fase são fatores de transcrição, mas também podem estar relacionados à replicação do DNA viral. Os genes expressos nessa fase são importantes para as fases tardia e muito tardia e, dessa forma, a maioria deles é expressa logo após a infecção (GUARINO et al., 1998; PASARELLI; MILLER, 1993). A proteína IE-1 é a principal proteína relacionada à transregulação transcricional da expressão de genes precoces, cuja função é aumentar ou diminuir a transcrição de genes (CHOI; GUARINO, 1995; GUARINO; SUMMERS, 1986).

Os genes da fase tardia são expressos entre 6 e 18 h.p.i., sendo responsáveis pelo início da replicação do DNA viral. Durante essa fase, são produzidas as proteínas do fenótipo viral BV, como a proteína GP64, principal proteína do envelope viral. Esse fenótipo é gerado quando há o empacotamento dos DNA virais em nucleocapsídeos, no núcleo da célula infectada, e saída do vírus da célula por brotamento da membrana plasmática (LU; MILLER, 1997).

Os genes da fase muito tardia são expressos a partir de 18 h.p.i. e participam da produção de corpos de oclusão. Os OBs são produzidos no final da infecção quando as vírions são envoltos por uma matriz proteica cristalina (POLIEDRINA ou GRANULINA) originando os poliedros nos NPVs e grânulos nos GVs (LU; MILLER, 1997).

2.5 Broca-da-cana-de-açúcar Diatraea saccharalis

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) e maior exportador de açúcar e álcool. A safra 2013/2014 está prevista em 8.799.150 mil hectares, com uma produção de 595,13 milhões de toneladas e uma produtividade de 74.100 kg/ha. A região Centro-Sul é responsável por cerca de 594,1 milhões de toneladas; 11,5% maior que a produção da safra de 2012/2013. O estado de São Paulo é o maior produtor, sendo responsável por 51,31% (4.515.360 hectares) da produção nacional (CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, 2013).

O setor sucroenergético tem grande valor na produção de divisas para o país, devido principalmente à sua importância na exportação mundial de açúcar. Em 2011, o complexo sucroalcooleiro foi responsável por 21,6% das exportações agrícolas em valor, o que mostrou um crescimento de quase 4% em relação ao ano anterior. No mesmo ano, as exportações do setor foram maiores que as exportações de carnes, colocando-o como o segundo maior exportador, imediatamente atrás do complexo soja (MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011).

Apesar da elevada produção de cana-de-açúcar, um dos fatores principais que afetam a produtividade da indústria sucroalcooleira é o ataque de pragas; a cultura de cana-de-açúcar contabiliza, mundialmente, perdas que chegam a 20% ao ano (ROSSETTO; SANTIAGO, 2007). Aproximadamente 80 espécies de pragas atingem a cana, tais como cigarrinha-das-raízes (*Mahanarva fimbriolata*), cupins, o besouro migdolus (*Migdolus fryanus*), o bicudo da cana (*Sphenophorus levis*), formigas e lagartas. A lagarta *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como broca-da-cana-de-açúcar, é um dos insetos-praga de maior relevância da cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Isso deve-se ao seu hábito alimentar, que dificulta o seu controle, pois a praga se desenvolve no interior dos colmos, à amplitude de distribuição, à intensidade do ataque e aos danos econômicos provocados à agroindústria sucroalcooleira (CAMPOS; MACEDO, 2004; POLANCZYK et al., 2004).

A praga, cuja origem provável é a América Central e do Sul, está amplamente distribuída em todas as regiões produtoras de cana, especialmente na Região Sudeste (DINARDO-MIRANDA, 2008). A broca-da-cana-de-açúcar pertence à ordem Lepidoptera, que compreende insetos com desenvolvimento holometabólico, ou seja, passam pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto. A fase larval é a que causa prejuízos à cultura da cana. O seu ciclo de vida se inicia com a mariposa adulta depositando vários e pequenos ovos amarelados nas folhas. Após a eclosão, as pequenas larvas (1 a 2 milímetros), que inicialmente se alimentam das folhas, sofrem a primeira muda, migram em direção ao colmo (caule) da planta, penetram e se alimentam da polpa. No interior da planta, as larvas crescem até 3 a 4 milímetros, saem para o exterior e, do estágio de pupa, se transformam em mariposas (Figura 4) (GALLO et al., 2002; LIMA FILHO; LIMA, 2001).

Figura 4 – Ciclo de vida de Diatraea saccharalis. Ovos na folha (5-7 dias) (A), lagarta com 4-9 dias (B), pupa após ciclo da lagarta de 40-60 dias (C) e mariposa adulta após 9-14 dias (D).



Fonte: Adaptada de http://www.assocana.com.br/restrito/AlmeidaPragasCanaCrua-9Outubro 2009-Orplana.pdf

Os prejuízos gerados à cultura são diretos e indiretos. Os danos são diretos, pois o inseto-praga provoca abertura de galerias, resultando em perda de peso da

cana, falhas na germinação, morte da gema apical (coração morto), brotação lateral, enraizamento aéreo, atrofia dos entrenós, afinamento dos colmos, tombamento dos colmos através do vento e atraso na maturação, causando redução do rendimento agrícola (GITAHY et al., 2006).

Os danos indiretos também são importantes, visto que as galerias formadas pela broca criam um ambiente propício para a proliferação dos fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, que causam a podridão vermelha do colmo. Esses fungos invertem a sacarose em glicose e frutose, resultando em redução na produção do açúcar, e causam contaminação do caldo, diminuindo a eficiência das leveduras na fermentação alcoólica (BOTELHO; MACEDO, 2002; GALLO et al., 2002; POLANCZYK et al., 2004).

Segundo Dinardo-Miranda et al. (2008), para cada 1% de intensidade de infestação por *Diatraea saccharalis* as perdas podem chegar a 1,5% na produtividade de colmos, 0,49% na produção de açúcar e 0,28% na produtividade do etanol.

O controle químico da praga por pulverização se torna inviável, pois a larva passa a maior parte do tempo dentro do colmo, impedindo que o inseticida chegue até o local em que elas estão, elevando o custo do controle, devido ao porte da cultura. Isso resultou num interesse maior por agentes biológicos para a realização desse controle (GHINI; KIMATI, 2000; GITAHY et al., 2006).

A cana-de-açúcar é uma das culturas em que mais tem sido utilizado o método biológico de combate às pragas. O controle biológico aplicado consiste em criar e multiplicar o parasitóide em laboratório e liberar no campo, resultando em equilíbrio da população da praga. Na década de 80, com o uso da vespinha *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), importada da Ásia e criada em vários laboratórios distribuídos pelo Brasil, a intensidade de infestação reduziu de 11 para 2,8%, causando uma economia de mais de 80 milhões de dólares por ano. Esse método de controle ainda é muito utilizado (BOTELHO; MACEDO, 2002; DINARDO-MIRANDA, 2008; GALLO et al., 2002; POLANCZYK et al., 2004).

O uso do *Bacillus thuringiensis* é outra forma de controle biológico da praga, porém ainda em estudo. O inseticida formulado se mostrou muito eficiente para quase 200 pragas lepidópteras. Posteriormente, com a descoberta do gene Bt, que codifica uma proteína tóxica para insetos, foram produzidas plantas transgênicas resistentes à praga (BOBROWSKI et al., 2003; POLANCZYK; ALVES, 2003). Devido à sua especificidade e segurança, os baculovírus tem grande potencial como agentes de controle biológico de pragas (ERLANDSON, 2008; MOSCARDI, 1999). O caso de maior sucesso mundial é o uso do baculovírus AgMNPV para o controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (RIBEIRO; PINEDO, 2001). Outras formas de controle biológico, dentre elas o uso do baculovírus isolado da lagarta *Diatraea saccharalis*, DsGV (Figura 5), poderia complementar ou aumentar a eficiência dos controles atuais. O conhecimento da biologia dos baculovírus recombinantes para o controle de pragas e o seu uso como vetor de expressão de proteínas exógenas (PENNOCK et al., 1984; SMITH et al., 1983; SUMMERS; SMITH, 1987).

Figura 5 – Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura do baculovírus Diatraea saccharalis GV. Em A, vários corpos de oclusão de forma ovalada (grânulos). Em B, a seta vermelha mostra a presença de apenas um vírion por grânulo.



Fonte: Cedida pelo Dr. Elliot Kitajima

2.6 Principais aplicações de baculovírus

2.6.1 Baculovírus no controle biológico

Os primeiros estudos com baculovírus focavam na utilização destes vírus no controle biológico de pragas agrícolas e da silvicultura (MARTIGNONI, 1986;

PAYNE, 1986⁵ apud CASTRO et al., 1999). O uso de baculovírus no controle de pragas é muito vantajoso, pois são específicos em relação ao hospedeiro, não poluem o ambiente e são inofensivos aos outros animais, às plantas e ao homem. Além das vantagens ecológicas do uso de baculovírus, estudos mostram que há uma vantagem econômica de cerca de 70% em relação ao uso de agrotóxicos (MOSCARDI, 1999; MOSCARDI; SOUZA, 2002;).

Nos Estados Unidos, os baculovírus têm sido usados para o controle das pragas *Cydia pomonella* (CpGV), *Lymantria dispar* (LdMNPV), *Spodoptera exigua* (SeMNPV), *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* (ambos por HzSNPV). Na Europa, esses vírus são utilizados para o controle de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) e *Cydia pomonella* (CpGV). Soma-se a isso, o uso de baculovírus no controle de pragas florestais tais como *Orgyia pseudosugata* (OpMNPV), *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV) e *Neodiprion sertifer* (NeseNPV) em vários países, como Canadá, Estados Unidos e Reino Unido (SOUZA et al., 2002).

O Brasil se destaca no cenário mundial pelo uso, em larga escala, do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV) contra a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*) (RIBEIRO et al., 1998; RIBEIRO; PINEDO, 2001). Essa forma de controle foi desenvolvida pela Embrapa Soja (Londrina, Paraná) no final da década de 70 e início da década de 80 e resultou na morte de mais de 80% das larvas infectadas, enquanto o desfolhamento da soja se manteve abaixo do limite de prejuízo econômico. Isso permitiu a formulação do bioinseticida e sua industrialização e comercialização (MOSCARDI, 1983, 1989; MOSCARDI; CORREA-FERREIRA, 1985; MOSCARDI; SOSA-GOMEZ, 1996). Estima-se que no final da década de 90 para cada 1 milhão de hectares de soja tratados com o bioinseticida, aproximadamente 1,6 milhões de litros de agrotóxicos deixaram de ser utilizados, contabilizando uma economia de 13 milhões de reais ao ano (MOSCARDI; SOUZA, 2002).

Utiliza-se o cultivo *in vivo*, a partir dos próprios hospedeiros, para propagar o baculovírus AgMNPV. As lagartas infectadas, obtidas no campo, são encaminhadas ao laboratório para a realização dos processos de purificação e formulação viral. No entanto, esse cultivo não é eficiente, pois depende da presença de lagartas na cultura de soja e somente tem aplicação durante o período de seu cultivo. Isso

⁵ PAYNE, C. C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. **Fortschritte der Zoologie**, v. 32, p. 183-200, 1986.

aumentou o interesse pelo cultivo *in vitro*, isto é, a produção de baculovírus em larga escala utilizando o cultivo de células embrionárias ou epiteliais dos hospedeiros (CASTRO et al., 2006; MOSCARDI; SOUZA, 2002).

Existem também aplicações de baculovírus, em escala experimental, para o controle do mandarová da mandioca (*Erinnyis ello*) (COSTA et al., 2005; FAZOLIN et al., 2007; VALICENTE; TUELHER, 2009). A partir de 1984, iniciaram-se os estudos com o baculovírus SfMNPV para o controle da lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda*, na Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas, Minas Gerais). Entre 1984 e 1989, realizou-se um levantamento dos principais inimigos dessa praga nas regiões produtoras de milho do estado de Minas Gerais. Das mais de 14.000 lagartas coletadas, foram encontrados muitos parasitas das ordens Diptera e Hymenoptera, incluindo lagartas mortas por vírus. O levantamento foi feito até o estado do Paraná e mostrou uma grande quantidade de lagartas mortas por vírus (VALICENTE, 1989; VALICENTE; BARRETO, 1999).

Atualmente, 22 isolados de SfMNPV amostrados em muitas regiões do Brasil foram estudados (BARRETO et al., 2005). Dentre os isolados de SfMNPV mais conhecidos e que mostraram ser eficientes no controle da referida praga, o genoma do isolado 19 já foi completamente sequenciado (WOLFF et al., 2008). Os isolados 6 e 18 também mostraram alta eficiência no controle da praga. O isolado 6 apresenta uma peculiaridade, visto que não resulta em rompimento do tegumento da lagarta infectada logo após a sua morte. Isso favorece a produção do vírus em larga escala. Vários hectares já foram tratados com o baculovírus SfMNPV, produzido na forma de pó molhável (VALICENTE; CRUZ, 1991; VALICENTE et al., 2010).

Um fator limitante que inviabiliza o uso de baculovírus pela indústria e agricultores no controle de pragas é a baixa velocidade de ação, visto que a larva infectada pode demorar vários dias para morrer e, consequentemente, ainda poderá causar danos à cultura (MOSCARDI, 1999).

A partir de técnicas da engenharia genética, os baculovírus têm sido modificados geneticamente com o intuito de aumentar a virulência sobre o insetopraga e, consequentemente, reduzir o tempo de ação. Esse uso é considerado seguro, pois os baculovírus recombinantes só se multiplicam dentro do hospedeiro (MOSCARDI; SOUZA, 2002; PINEDO et al., 2003).

Um dos primeiros baculovírus recombinantes construídos, que se mostrou eficaz para o controle biológico de *Bombyx mori*, possuía o gene do hormônio

diurético. Esse vírus recombinante mostrou ser capaz de provocar a morte dos insetos 20% mais rápido que o vírus selvagem (MAEDA, 1989). As larvas infectadas com baculovírus cujo gene egt se encontra deletado se alimentam menos e também morrem mais rápido (O'REILLY; MILLER, 1991). Para o controle de Plutella xylostella, foram utilizados os genes Cry de Bacillus thuringiensis (Bt) inseridos em baculovírus. O baculovírus recombinante, que expressa Cry1Ac, mostrou um aumento significativo, em relação ao vírus selvagem, do modo de ação e da infectividade (CHANG et al., 2003; RIBEIRO; CROOK, 1993; RIBEIRO et al., 1998). O gene da toxina (efeito paralisante) do ácaro Pyemotes tritici (TxP-1) foi inserido em AcMNPV e resultou na morte rápida das larvas infectadas (LU et al., 1996). Outros baculovírus recombinantes construídos utilizando as toxinas AaIT do escorpião Androctonus australis, Lqh&IT2 de escorpiões, aranhas, ácaros e anêmonas do mar também mostraram ser eficazes em provocar a morte rápida do inseto (BURDEN et al., 2000; FROY et al., 2000; PRIKHOD'KO et al., 1998). Bioensaios com o vírus recombinante de AcMNPV, construído a partir do promotor da poliedrina modificado e do gene da serino-protease (queratinase) do fungo Aspergillus fumigatus, demonstrou diminuição do tempo letal em relação ao vírus selvagem (PERECMANIS, 2004).

2.6.2 Baculovírus como vetores de expressão

A partir da década de 80, com o surgimento da biologia molecular e das técnicas de recombinação genética, os baculovírus começaram a ser usados como vetores de expressão de proteínas provenientes de diferentes organismos (O'REILLY et al., 1992). Algumas vantagens da utilização desse sistema incluem rápida expressão e maior concentração de proteínas recombinantes (PALOMARES; RAMIREZ, 2002). Alguns medicamentos de uso veterinário e humano, produzidos através desse sistema de expressão, como a Lysodase (PEGylated-glucocerebrosidase), passam por testes clínicos (PALOMARES et al., 2003).

Um dos primeiros trabalhos, utilizando o baculovírus *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) como vetor de expressão, tinha como finalidade a produção de βinterferon e β-galactosidase em culturas de células de *Spodoptera frugiperda* (IPLB SF-21 AE) (PENNOCK et al., 1984; SMITH et al., 1983). Proteínas importantes para a medicina e agricultura, incluindo vacinas e testes de diagnose para a saúde animal e humana, foram expressas em cultura de células de insetos, em grande quantidade, utilizando os baculovírus como vetores de expressão (RIBEIRO et al., 1998).

O sistema consiste na introdução de genes desses vírus no lugar de um gene que não é essencial para o processo de replicação, comandado por um promotor forte. O modelo mais simples de vetores para o sistema de expressão em baculovírus ("baculovirus expression system" BEV) se baseia na substituição do gene da *poliedrina* por um gene heterólogo de interesse sob o controle do promotor da *poliedrina*. A geração de um vírus que consegue se multiplicar em células de inseto através da inativação do gene da *poliedrina* por deleção ou inserção de outro gene impede a síntese da *poliedrina* e, consequentemente, a produção dos corpos de oclusão. As células infectadas por esses vírus são localizadas muito facilmente em microscopia óptica devido à ausência do corpo de oclusão (POSSEE, 1997; SMITH et al., 1983). Também foram produzidos vírus recombinantes a partir da deleção do gene não afeta a replicação viral em cultura de células ou em insetos. No entanto, essa deleção faz com que a capacidade de derreter ou liquefazer o corpo da larva hospedeira seja perdida (HAWTIN et al., 1997).

Primeiramente, os baculovírus recombinantes eram produzidos pela deleção do gene da *poliedrina* e posterior seleção por placas ocluso-negativas. Outro vírus contendo genes marcadores como o lac-Z foram produzidos para facilitar a identificação (SUMMERS; SMITH, 1987). O lac-Z atua no transporte e metabolismo da lactose, codificando a enzima β-galactosidase, responsável pela quebra da lactose em glicose e galactose. Apenas na presença de lactose os genes do operon Lac são expressos. A facilidade de seleção de um clone recombinante baseia-se na utilização do substrato sintético X-Gal (5-bromo-4-clorindolil-β-galactosidase). As células infectadas com o vírus recombinante, isto é, possui o gene da β-galactosidase interrompido, apresenta coloração branca e aquelas com vírus sem inserto permanecem azuladas (O'REILLY et al., 1992; SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

A construção de vetores virais é realizada a partir de plasmídeos de transferência. Os plasmídeos são estruturas replicativas que possuem regiões homólogas ao vírus selvagem flanqueando o gene de interesse. A origem de replicação e genes de seleção são provenientes de plasmídeos como o pUC (MILLER et al., 1986). Posteriormente à construção, utiliza-se o DNA viral e o

plasmidial para a realização da co-transfecção da célula do hospedeiro. Durante a infecção, o gene viral é substituído, por recombinação homóloga, pelo gene de interesse presente no plasmídeo. No final do processo, o baculovírus recombinante é selecionado através de plaqueamento (Figura 6) (CASTRO et al., 1999).

Figura 6 – Método de obtenção de baculovírus recombinantes por recombinação homóloga, baseado no gene da *poliedrina*.



Fonte: Adaptada de van Oers (2011)

Um dos métodos mais utilizados para a obtenção de baculovírus recombinantes é a recombinação sítio-específica em bactérias *Escherichia coli*. O gene alvo é clonado num plasmídeo que possui o promotor da *poliedrina* ou outro de interesse, flanqueado por regiões de transposição. Esse plasmídeo é inserido na bactéria *E. coli* modificada, que possui um plasmídeo auxiliar (pHelper), produtor de transposase, e o bacmídeo, DNA recombinante do baculovírus AcMNPV, apresentando regiões de transposição (Tn7), origem de replicação, gene lac-Z e gene de resistência ao antibiótico canamacina (Manual Bac-to-Bac Expression System, Invitrogen, 2004). O sistema Bac-to-Bac (Figura 7) insere o gene de interesse no lugar do gene da *poliedrina* e no meio do gene lac-Z, que codifica β-galactosidase no DNA viral difundido nessas bactérias. Essa metodologia permite selecionar as colônias brancas, que contém o DNA recombinante, diferenciando-se

das demais colônias, que na presença de X-Gal (análogo de lactose) e do indutor IPTG (isopropiltiogalactosídeo, análogo de cAMP) produzem β-galactosidase (LacZ+) e permanecem com coloração azul. Os bacmídeos selecionados e isolados são transfectados em cultura de células de inseto visando à produção de baculovírus recombinantes (LUCKOW et al., 1993).

Figura 7 – Sistema Bac-to-Bac de expressão. Obtenção de baculovírus recombinantes por recombinação sítio-específica através de transposição do gene de interesse para um bacmídeo original. No final do processo, os bacmídeos recombinantes são transfectados em células de insetos.



Fonte: Adaptada de Montor e Sogayar (2003)

Recentemente, os baculovírus têm sido utilizados em estudos de terapia gênica. Esses vírus não se replicam dentro de células de mamíferos, porém podem entrar no núcleo das células sob determinadas condições, sem resultar em danos e, os genes serem expressos a partir de promotores de mamíferos introduzidos. Consequentemente, os baculovírus podem ser usados como vetores para a transferência de genes ("gene delivery") em células de mamíferos (CONDREAY; KOST, 2007; Hu, 2008; KOST et al., 2005). Além da falta de toxicidade e replicação,

outras vantagens do uso de baculovírus como vetores são a facilidade de construção e produção e clonagem de longos fragmentos de DNA (HU, 2006).

2.7 Genomas de baculovírus

O primeiro baculovírus a ser totalmente sequenciado foi o *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), apresentando 133.894 pb e 154 ORFs ("open reading frames") codificando cerca de 150 genes (AYRES et al., 1994). Este vírus é o mais estudado, desde a sua descoberta, devido à sua fácil propagação, estabilidade relativa em cultura de células e amplo espectro de hospedeiros (aproximadamente 145 espécies) (GOULSON, 2003; SOUZA et al., 2002). O modelo de replicação do AcMNPV, um alfabaculovírus do grupo I, é caracterizado e aceito como protótipo para os outros baculovírus. Os genomas completos de 61 baculovírus estão depositados no GenBank, incluindo 43 alfabaculovírus, 14 betabaculovírus, 3 gamabaculovírus e somente 1 deltabaculovírus (Tabela 1).
Tabela 1 - Genomas completos de todos os baculovírus sequenciados até o momento divididos pelo gênero ao qual pertencem.

Gênero	Nome	Abreviação	Número de acesso (NCBI)	Tamanho do genoma (bp)	Número de ORFs anotadas	GC%	Referência
	Antheraea pernyi NPV	AnpeNPV	NC_008035	126629	147	53.5	Nie et al. (2007)
	Antheraea pernyi NPV-L2	AnpeNPV-L2	EF207986	126246	144	53.5	Fan et al. (2007)
	Anticarsia gemmatalis MNPV-2D	AgMNPV-2D	NC_008520	132239	152	44.5	Oliveira et al. (2006)
	Autographa californica MNPV	AcMNPV	NC_001623	133894	154	41.0	Ayres et al. (1994)
	Bombyx mori NPV	BmNPV	NC_001962	128413	143	40.4	Gomi et al. (1999)
SI	Bombyx mandarina NPV	BomaNPV	NC_012672	126770	141	40.2	Xu et al. (2010)
víru I	Choristoneura fumiferana MNPV	CfMNPV	NC_004778	129593	146	50.1	De Jong et al. (2005)
aculo rupo	Choristoneura fumiferana DEF MNPV	CfDEFMNPV	NC_005137	131160	149	45.8	Lauzon et al. (2005)
fab. G	Epiphyas postvittana NPV	EppoNPV	NC_003083	118584	136	40.7	Hyink et al. (2002)
Ali	Hyphantria cunea NPV	HycuNPV	NC_007767	132959	148	45.5	lkeda et al. (2006)
	<i>Maruca vitrata</i> MNPV	MaviMNPV	NC_008725	111953	126	38.6	Chen et al. (2008)
	Orgyia pseudotsugata MNPV	OpMNPV	NC_001875	131995	152	55.1	Ahrens et al. (1997)
	<i>Plutella xylostella</i> MNPV	PlxyMNPV	NC_008349	134417	152	40.7	Harrison e Lynn (2007)
	Rachiplusia ou MNPV	RoMNPV	NC_004323	131526	149	39.1	Harrison e Bonning (2003)
	Thysanoplusia orichalcea MNPV	ThorMNPV	JX467702	132978	145	37.9	Wang et al. (2012)
	Adoxophyes honmai NPV	AdhoNPV	NC_004690	113220	125	35.6	Nakai et al. (2003)
írus	Adoxophyes orana NPV	AdorNPV	NC_011423	111724	121	35.0	Hilton e Winstanley (2008a)
lov II o	Agrotis ipsilon NPV	AgipNPV	NC_011345	155122	163	48.6	Harrison (2009)
acu rup	Agrotis segetum NPV	AgseNPV	NC_007921	147544	153	45.7	Jakubowska et al. (2006)
Alfabi G	Apocheima cinerarium NPV	ApciNPV	FJ914221	123876	118	33.4	Dados não publicados
	Chrysodeixis chalcites NPV	ChChNPV	NC_007151	149622	151	39.0	Van Oers et al. (2005)
	Clanis bilineata NPV	ClbiNPV	NC_008293	135454	129	37.7	Zhu et al. (2009)
	<i>Ecotropis obliqua</i> NPV	EcobNPV	NC_008586	131204	126	37.6	Ma et al. (2007)
	Euproctis pseudoconspersa NPV	EupsNPV	NC_012639	141291	139	40.4	Tang et al. (2009)
	Helicoverpa armigera SNPV-	HearSNPV-C1	NC_003094	130759	137	38.9	Zhang et al. (2005)

Alfabaculovírus

C1

(continua)

Tabela 1. Genomas completos de todos os baculovírus sequenciados até o
momento divididos pelo gênero ao qual pertencem.

Gênero	Nome	Abreviação	Número de acesso (NCBI)	Tamanho do genoma (bp)	Número de ORFs anotadas	GC%	Referência
	Helicoverpa armigera SNPV NNɑ1	HearSNPV- NNg1	NC_011354	132425	143	39.1	Chen e ljkel (1999)
	Helicoverpa armigera NPV G4	HearNPV-G4	NC_002654	131405	135	39.0	Zhang et al. (2005)
	Helicoverpa armigera MNPV	HearMNPV	NC_011615	154196	162	40.1	Ogembo et al. (2007)
	Helicoverpa zea SNPV	HzSNPV	NC_003349	130869	139	39.1	Chen et al. (2002)
	<i>Leucania</i> separata NPV- AH1	LeseNPV-AH1	NC_008348	168041	169	48.6	Xiao e Qi (2007)
	<i>Lymantria dispar</i> MNPV	LdMNPV	NC_001973	161046	164	57.5	Kuzio et al. (1999)
	<i>Lymantria xylina</i> MNPV	LyxyMNPV	NC_013953	156344	157	53.5	Nai et al. (2010)
<i>(</i>)	Mamestra configurata NPV-90-2	MacoNPV-90-2	NC_003529	155060	169	41.7	Li et al. (2002b)
vírus II	Mamestra configurata NPV-B	MacoNPV-B	NC_004117	158482	168	40.0	Li et al. (2002a)
aculo rupo	<i>Mamestra</i> configurata NPV-90-4	MacoNPV-90-4	AF539999	153656	168	41.7	Li et al. (2005)
lifabă G	Orgyia leucostigma NPV	OrleNPV	NC_010276	156179	135	39.9	Dados não publicados
٩	Spodoptera exigua MNPV	SeMNPV	NC_002169	135611	139	43.8	ljkel et al. (1999)
	Spodoptera frugiperda MNPV-3AP2	SfMNPV-3AP2	NC_009011	131331	143	40.2	Harrison et al. (2008)
	Spodoptera frugiperda MNPV-19	SfMNPV-19	EU258200	132565	141	40.3	Wolff et al. (2008)
	Spodoptera frugiperda MNPV-G defective	SfMNPV-G defective	JF899325	128034	143	40.0	Simón et al. (2012)
	Spodoptera litura NPV-G2	SpliNPV-G2	NC_003102	139342	141	42.8	Pang et al. (2001)
	Spodoptera litura NPV-II	SpliNPV-II	NC_011616	148634	147	45.0	Dados não publicados
	Trichoplusia ni SNPV	TnSNPV	NC_007383	134394	145	39.0	Willis et al. (2005)
	Adoxophyes orana GV	AdorGV	NC_005038	99657	119	34.5	Wormleaton et al. (2003)
(0	Agrotis segetum GV	AgseGV	NC_005839	131680	132	37.3	Dados não publicados
a- vírus	Choristoneura occidentalis GV	ChocGV	NC_008168	104710	116	32.7	Escasa et al. (2006)
Bet Iculo	Clostera anachoreta GV	ClanGV	NC_015398	101487	123	44.4	Liang et al. (2011)
bac	Cryptophlebia leucotreta GV	CrleGV	NC_005068	110907	128	32.4	Lange e Jehle (2003)

(continuação)

 Tabela 1. Genomas completos de todos os baculovírus sequenciados até o momento divididos pelo gênero ao qual pertencem.

Gênero	Nome	Abreviação	Número de acesso (NCBI)	Tamanh o do genoma (bp)	Número de ORFs anotadas	GC%	Referência
	Cydia pomonella GV	CpGV	NC_002816	123500	143	45.3	Luque et al. (2001)
	Epinotia aporema GV	EpapGV	NC_018875	119082	133	41.5	Ferrelli et al. (2012)
rus	Helicoverpa armigera GV	HearGV	NC_010240	169794	179	40.8	Harrison e Popham (2008)
ονί	Phthorimaea operculella GV	PhopGV	NC_004062	119217	130	35.7	Dados não publicados
cul	Pieris rapae GV	PiraGV	NC_013797	108592	120	33.2	Dados não publicados
aba	Plutella xvlostella GV	PlxyGV	NC_002593	100999	120	40.7	Hashimoto et al. (2000)
3eti	Pseudaletia unipuncta GV	PsunGV	NC_013772	176677	183	39.8	Dados não
-	Spodoptera litura GV-K1	SpliGV	NC_009503	124121	136	38.8	Wang et al. (2008)
	Xestia c-nigrum GV	XecnGV	NC_002331	178733	181	40.7	Hayakawa et al. (1999)
írus	Neodiprion abietis NPV	NeabNPV	NC_008252	84264	93	33.4	Duffy et al. (2006)
abaculov	Neodiprion lecontei NPV	NeleNPV	NC_005906	81755	89	33.3	Lauzon et al. (2004)
Gam	Neodiprion sertifer NPV	NeseNPV	NC_005905	86462	90	33.8	Garcia- Maruniak et al. (2004)
Delta- Baculovírus	Culex nigripalpus NPV	CuniNPV	NC_003084	108252	109	50.9	Afonso et al. (2001)

Nota: Abreviaturas:

NPV: nucleopoliedrovírus MNPV: nucleopoliedrovírus do tipo múltiplo SNPV: nucleopoliedrovírus do tipo simples GV: granulovírus. pb: pares de base ORFs: "Open Reading Frames" GC%: percentual guanina-citosina NCBI: National Center for Biotechnology Information (www.**ncbi**.nlm.nih.gov/)

Estudos de comparação genômica mostraram a divisão dos alfabaculovírus em dois grupos (I e II). No Brasil, foi publicado o genoma completo do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), que possui um DNA genômico com 132.239 pb e 152 ORFs. Este estudo revelou que o AgMNPV pertence aos

(conclusão)

alfabaculovírus do grupo I e apresenta maior identidade de sequências e organização do genoma com os baculovírus *Choristoneura fumiferana defective* MNPV (CfDEFMNPV), *Epiphyas postvittana* NPV (EppoNPV), *Choristoneura fumiferana* MNPV (CfMNPV) e *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV) (Figura 8). Uma característica interessante no genoma de AgMNPV é a ausência dos genes da *quitinase* e *catepsina*, encontrados em AcMNPV, CfDEFMNPV entre outros baculovírus (BULACH et al., 1999; HERNIOU et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006; ZANOTTO et al., 1993).

Figura 8 – Fenograma mostrando a relação entre *Anticarsia gemmatalis* MNPV-2D (AgMNPV-2D) e outros 27 genomas de baculovírus totalmente sequenciados.



Fonte: Oliveira et al. (2006)

Outro baculovírus interessante é o *Choristoneura fumiferana* MNPV. O vírus selvagem isolado apresenta dois vírus diferentes: CfMNPV e CfDEFMNPV. O genoma de CfMNPV possui 129.593 pb e 146 ORFs enquanto que no CfDEFMNPV há 131.160 pb e 149 ORFs. O CfDEFMNPV é defeituoso, pois o vírus não é capaz de infectar larvas de *C. fumiferana* pela rota de infecção via proteínas PIFs (*per os*) no fenótipo viral ODV. No entanto, um estudo demonstrou que na presença do vírus

CfMNPV, o vírus CfDEFMNPV é capaz de infectar larvas hospedeiras de *C. fumiferana* pela rota natural de infecção (LAUZON et al., 2005).

O menor baculovírus é o *Neodiprion lecontei* NPV (NeleNPV - 81.755 pb) e o maior é o *Xestia c-nigrum* GV (XecnGV - 178.733 pb). Esses vírus possuem de 89 (NeleNPV) a 183 ORFs (*Pseudaletia unipuncta* GV - PsunGV). No geral, os baculovírus possuem baixo conteúdo GC (menor que 50%). O baculovírus com menos GC% é o *Pieris rapae* GV (PrGV - 33.2%) e aquele com mais GC% é o *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV - 57.5%) (Tabela 1) (HAYAKAWA et al., 1999; KUZIO et al., 1999; LAUZON et al., 2004; MIELE et al., 2011).

Os 14 granulovírus totalmente sequenciados até o momento apresentam um genoma de tamanho entre 99.657 pb (*Adoxophyes orana* GV) e 178.733 pb (*Xestia c-nigrum* GV). Quanto às ORFs, os GVs possuem de 116 (*Choristoneura occidentalis* GV – 104.710 bp) até 183 regiões codificadoras (CDS) (*Pseudaletia unipuncta* GV – 176.677 pb). O conteúdo GC% varia de 32.4 em *Cryptophlebia leucotreta* GV (110.907 bp e 128 ORFs) e 44.4 em *Clostera anachoreta* GV (101.487 e 123 ORFs) (Tabela 1) (HAYAKAWA et al., 1999; ESCASA et al., 2006; LANGE; JEHLE, 2003; LIANG et al., 2011; WORMLEATON et al., 2003). Estudos mostram que os GVs possuem um alto conteúdo AT, média de 63,5%, em comparação com os alfabaculovírus do grupo I (média de 57.5%) e alfabaculovírus do grupo II (média de 56.4%) (JEHLE et al., 2006).

O sequenciamento completo dos genomas de baculovírus permitiu estimar o conteúdo gênico em torno de 900 genes. Todos os baculovírus sequenciados até o momento apresentam 37 genes comuns ("core genes") (GARAVAGLIA et al., 2012). Esses genes conservados são fatores essenciais para algumas das principais funções biológicas em baculovírus (MIELE et al., 2011).

Nos baculovírus, os promotores precoces possuem uma sequência conhecida como TATA-box e/ou início de transcrição CAGT. Esses motivos também são encontrados em promotores do genoma do inseto hospedeiro e são característicos de genes transcritos pela RNA polimerase II da célula hospedeira. Os genes tardios e muito tardios são expressos pela RNA polimerase viral a partir de promotores que possuem o motivo DTAAG. Alguns genes apresentam os dois promotores (precoce e tardio) e são expressos durante toda a infecção. No entanto, alguns genes não são precedidos por motivos conhecidos (VAN OERS; VLAK, 2007).

2.8 Conteúdo gênico

2.8.1 Genes conservados: os "core genes"

Todos os baculovírus sequenciados até o momento apresentam 37 genes conservados (os "core genes"), que possuem papel na replicação do DNA, transcrição do RNA, empacotamento e montagem, infectividade oral e regulação do ciclo celular e/ou interação com proteínas do hospedeiro (GARAVAGLIA et al., 2012; MIELE et al., 2011; YANG; ZHANG, 2012). Quatro genes têm sido descritos como genes essenciais para a replicação viral (*dna polimerase, lef-1, lef-2 e helicase*) e quase metade desses genes conservados tem papel estrutural. Embora ainda não se conheça a função específica de certos genes, provavelmente os mesmos desempenham papéis importantes na infectividade dos baculovírus (KE et al., 2008; VANARSDALL et al., 2007). Genes essenciais para a replicação e transcrição receberão uma atenção maior mais adiante.

As proteínas VP39, VP91 e VP1054 são responsáveis pela formação do nucleocapsídeo e, portanto, possuem um papel importante na montagem e oclusão dos vírions. Proteínas como P74 (PIF-0), PIF-1, PIF-2, PIF-3, PIF-4 E PIF-5 (ODV-E56) se encontram no envelope dos ODVs e participam do processo de infecção oral. A GP41, presente em ODV, forma o tegumento entre o envelope de origem celular e o capsídeo. Nesse local, muitas proteínas virais são inseridas. A proteína P33, uma silfridil oxidase, parece estar associada à produção adequada de vírions no núcleo da célula infectada. A P6.9, uma proteína básica presente em ambos fenótipos virais, é responsável pela condensação e empacotamento do DNA. A ODV-EC43 é sugerida ser uma componente estrutural envolvida com a geração dos dois fenótipos virais. A P49, presente em BV e ODV, é uma proteína presente no capsídeo, essencial nos processos de empacotamento do DNA e morfogênese da cápside. Identificou-se também um gene em particular (38k), em BV e ODV, que codifica uma proteína que faz parte da estrutura do capsídeo. Além disso, o gene ac68 pode estar envolvido na morfogênese do poliedro; a proteína codificado por ac81 parece interagir com actina 3 no citoplasma da célula infectada, mas está ausente em BVs e ODVs; a proteína ODV-E18 pode estar relacionada à produção de BVs; ODV-E27, presente em BV e ODV, atua como uma ciclina, regulando o ciclo celular do hospedeiro; e DESMOPLAKIN parece atuar na liberação de processos do

estroma virogênico (local de intensa replicação viral e montagem dos nucleocapsídeos) para o citoplasma (BELYAVSKYI et al., 1998; BRAUNAGEL et al., 1996, 2003; CHEN et al., 2007; FANG et al., 2003, 2009; FAULKNER, 1992; GUARINO et al., 1992; HARRISON et al., 2010; MCCARTHY; THEILMANN, 2008; LI et al., 2008; RUSSEL; ROHRMANN, 1997; WHITFORD; FAULKNER, 1992; WILSON et al., 1987; VANARSDALL et al., 2007; WANG et al., 2008; WU; PASSARELLI, 2010). As funções dos 37 genes conservados se encontram na Tabela 2.

Na literatura são descritos 9 genes comum aos alfa-, beta- e gamabaculovírus. A proteína POLIEDRINA/GRANULINA, de expressão muito tardia e produzida em alta quantidade, é a principal proteína do corpo de oclusão; DBP, proteína de ligação ao DNA; LEF-11, papel na expressão de genes tardios; FP/25K, proteína estrutural de BVs e ODVs; gene *ac75*, papel na produção de BVs; *ac106/107*, função desconhecida; *ac108*, codifica a proteína P11 associada ao complexo PIF; PP34, proteína envolvida na morfogênese do envelope do poliedro e gene *ac145*, codifica uma proteína do OB relacionada à infecção oral. Somente o gene *ac23* é comum aos alfa-, beta- e deltabaculovírus; codifica uma proteína de fusão em alfa- (grupo II), beta- e deltabaculovírus e é fator de patogenicidade em alfabaculovírus do grupo I (GARAVAGLIA et al., 2012).

Segundo Garavaglia et al. (2012) existem 16 core genes encontrados somente em alfa- e betabaculovírus. Os membros desses dois gêneros apresentam PK-1, proteína quinase; gene *ac13*, função desconhecida; LEF-6, proteína relacionada à expressão de genes tardios e muito tardios; UBIQUITINA, parece estabilizar proteínas virais atuando na via de degradação do hospedeiro; PP31, fator de expressão tardio; *ac38*, ADP-ribose pirofosfatase; GP37, proteína de ligação à quitina; LEF-3, proteína de ligação ao ssDNA; TLP, função desconhecida; P12, relacionada a localização nuclear da actina-G; *ac110*, função desconhecida; P24, proteína do ODV; ME53, regula a síntese de DNA e é importante para a produção eficiente de BVs; EXONO, papel na saída de nucleocapsídeo do núcleo para o citoplasma; *ac146*, função desconhecida e IE-1, transativador de transcrição da fase imediata precoce e também atua na replicação do DNA.

ORFs em <i>Autographa californica</i> MNPV (AcMNPV)	Nome do gene	Descrição
6	lef-2	Replicação do DNA/ fator associado à primase
14	lef-1	DNA primase
22	pif-2	Infecção oral
40	p47	Subunidade da RNA polimerase
50	lef-8	Subunidade da RNA polimerase
53	ac53	Provavelmente envolvido na montagem de nucleocapsídeos
54	vp1054	Proteína do nucleocapsídeo
62	lef-9	Subunidade da RNA polimerase
65	Dnapol	Replicação do DNA
66	desmoplakin	Presente no nucleocapsídeo
68	ac68	Infecção Oral (PIF-6)
77	vlf-1	Envolvido na expressão dos genes p10 e poliedrina
78	ac78	Função desconhecida
80	gp41	Proteína do tegumento
81	ac81	Função desconhecida
83	p95	Proteína associada ao capsídeo viral
89	vp39	Principal proteína do capsídeo
90	lef-4	Subunidade da RNA polimerase
92	p33	Sulfidril oxidase
93	p18	Saída do nucleocapsídeo
94	odv-e25	Proteína do envelope de ODV
95	helicase	Desenrola o DNA
96	ac96	Infecção oral (PIF-4)
98	38k	Montagem do nucleocapsídeo
99	lef-5	Fator de iniciação de transcrição
100	p6.9	Proteína do nucleocapsídeo
101	p40	Subunidade do complexo proteico
103	p48	Produção de BV e envelopamento de ODV
109	odv-ec43	Associado ao ODV
115	pif-3	Infecção oral
119	pif-1	Medeia ligação do ODV com célula do intestino
133	alk-exo	Envolvido na recombinação e replicação de DNA
138	p74	Medeia ligação do ODV com célula do intestino (PIF-0)
142	49k	Produção de BV
143	odv-e18	Proteína do envelope de ODV
144	odv-e27	Proteína do envelope de ODV
148	odv-e56	Proteína do envelope de ODV (PIF-5)

Tabela 2 – Os 37 genes conservados ("core genes") entre todos os baculovírus
sequenciados até o momento.

Fonte: Adaptada de Garavaglia et al. (2012)

2.8.2 Replicação do DNA

Os baculovírus possuem ao longo do genoma múltiplas origens de replicação denominadas regiões homólogas (*homologous regions* ou *hrs*), locais em que se inicia a replicação do DNA. As *hrs* são sequências repetitivas, em geral, palíndromos imperfeitos de cerca de 30 pb. As *hrs* também possuem papel na expressão de genes precoces, atuando como *enhancers*. Promotores de genes precoces e regiões conhecidas como *non hr sequences* também podem atuar como origens de replicação (WU et al., 1999).

Seis genes são considerados essenciais para a replicação do DNA (Figura 9): *lef-1*, que codifica uma primase; *lef-2*, que codifica o fator acessório da primase; *helicase*, que desenrola as fitas de DNA; *dna polimerase*, polimeriza a nova fita de DNA; *lef-3*, que produz uma proteína ligante (estabilizadora) à fita simples de DNA, além de estar relacionada ao transporte da helicase ao núcleo; e o *ie-1*, um transativador transcricional, sem função definida na replicação, porém pode atuar como um facilitador para a entrada do complexo de replicação a partir da origem de replicação (LU; MILLER, 1995a; ROHRMANN, 2011).

Outras enzimas importantes para o processo de replicação em gualguer organismo considerado são as topoisomerases, papel em desenovelar e empacotar o DNA, e DNA ligases, função de ligação dos fragmentos de Okazaki na fita descontínua. Não foram encontradas topoisomerases em baculovírus; possivelmente esses vírus utilizem a topoisomerase do inseto hospedeiro. Foram encontradas DNA ligases em todos betabaculovírus e em alguns alfabaculovírus, tais como Mamestra configurata NPV-B (MacoNPV-B), Plutella xylostella MNPV (PIxyMNPV), Lymantria dispar MNPV (LdMNPV), Lymantria xylina MNPV (LxMNPV), entre outros (HARRISON; LYNN, 2007; KUZIO et al., 1999; LI et al., 2002a; NAI et al., 2010). Durante a replicação, as proteínas ALK-EXO (nucleases alcalinas), LEF-3 e VLF-1 atuam no processo de recombinação, permitindo montar mais rapidamente os genomas virais (OKANO et al., 2006). Outros genes que parecem inflenciar a replicação de DNA são p35, ie-2, pe38, lef-7, lef-11, dbp e me53 (MIKHAILOV, 2003). Alguns baculovírus podem apresentar uma segunda proteína helicase (HELICASE-2) e genes que codificam as subunidades redutase ribonucleotídeo (rr1 e rr2a) e dutpase, que participam da biossíntese de dTTP (HERNIOU et al., 2003).

Figura 9 – Replicação do DNA em baculovírus. Os genes importantes para o processo de replicação são: *lef-1*, codifica uma primase; *lef-2*, codifica o fator acessório da primase; *dna polimerase*; *helicase* e *topoisomerase* celular, desenovelam e desanelam o DNA; *lef-3*, codifica uma proteína ligante à fita simples de DNA, que permite a ação da LEF-1 e LEF-2; *dna ligase*, liga os fragmentos de Okazaki da fita descontínua produzida; e *ie-1*, um transativador transcricional.



Fonte: Adaptada de Rohrmann (2008)

2.8.3 Transcrição do RNA

Um dos primeiros genes transcritos é o *ie-1*, que se liga às sequências *hrs* e ativa a expressão dos genes precoces ao interagir com a maquinaria transcricional do hospedeiro. Homólogos de *ie-1* são encontrados em alfabaculovírus e betabaculovírus. Outros fatores de transcrição de genes precoces presentes em baculovírus são o *ie-2* e *pe-38* (ROHRMANN, 2011).

Durante a fase tardia da infecção, outros genes são transcritos. A enzima RNA polimerase é constituída de quatro subunidades ("core genes"): *lef-4*, *lef-8*, *lef-9* e *p47*. LEF-4 é uma enzima de capeamento do RNA. LEF-8 e LEF-9 possuem motivos comuns para a subunidade grande de RNA polimerases bacteriana e eucariótica. LEF-8 possui uma região C-terminal conservada em RNA polimerases e o restante da proteína não apresenta homologia para outras sequências presentes em RNA polimerases. LEF-9 possui um sítio de ligação de Mg⁺² do centro catalítico presente em outras RNA polimerases. P47 não possui homólogos com outras subunidades de RNA polimerases (VAN OERS; VLAK, 2007).

Outros genes relacionados à transcrição tardia são: *lef-5*, *lef-6*, *lef-10*, *lef-12*, *vlf-1* e *pp31* (*39k*). LEF-5 pode ser um fator de iniciação em AcMNPV, LEF-6 parece

ser um fator de exportação de mRNA e VLF-1 (fator de expressão muito tardio-1) está presente em BV e ODV e atua na hiper-expressão de genes muito tardios como *poliedrina* e *p10*. A presença de metiltransferase (*ac69*) em todos alfa- do grupo I, em alguns alfabaculovírus do grupo II e em *Neodiprion sertifer* NPV (NeseNPV) parece estimular a transcrição de genes tardios, resultando em capeamento do mRNA. Assim como VLF-1, LEF-2 pode estar atuando na ativação da transcrição muito tardia independentemente de sua função na replicação do DNA. PK-1 (*ac10*), encontrada em todos baculovírus que infectam insetos lepidópteros, pode também ter influência na expressão de genes tardios e pode se ligar ao complexo de transcrição muito tadio e atuar na fosforilação de LEF-8 (GUARINO et al., 2002; ROHRMANN, 2011; WU; GUARINO, 2003).

2.8.4 GP64 e proteína F

Quanto aos alfabaculovírus, a maior diferença entre os grupos I e II é a natureza da glicoproteína presente no fenótipo viral BV, que medeia a saída do BV por brotamento da membrana celular e o reconhecimento de membrana durante o processo de adsorção do vírus para a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma da célula (VAN OERS, 2011).

Alfabaculovírus do grupo I possuem a proteína de fusão GP64, localizada na região peplomérica (com projeções de superfície) do fenótipo BV, porém não foram encontrados homólogos de GP64 nos alfabaculovírus do grupo II. Em contrapartida, os alfabaculovírus do grupo II apresentam homólogos de proteínas LD130 conhecidas como proteína F, usada como proteína de adsorção e posterior fusão (PEARSON et al., 2000; WANG et al., 2005). A proteína F também é encontrada em betabaculovírus e deltabaculovírus. Além da GP64, alfabaculovírus do grupo I apresentam homólogos da proteína F com função auxiliar na entrada do vírus na célula. A infecção por gamabaculovírus é restrita ao intestino e esses vírus não possuem a proteína de fusão do fenótipo BV (WANG et al., 2008).

2.8.5 Outras descobertas

O estudo de baculovírus também permitiu descobrir um gene muito tardio (p10 - 10kDa), que parece ter um papel na estabilidade dos poliedros e eficiência na

sua disseminação no meio (FUNK; ROHRMANN, 1997). Outros genes importantes, presentes em muitos alfabaculovírus do grupo I, são os da *quitinase* e da *catepsina*, genes responsáveis pela degradação do integumento da lagarta infectada (HAWTIN et al., 1997). Estes não ocorrem no genoma do AgMNPV, o que sugere que esta ausência é responsável pela integridade observada nas lagartas mortas pelo AgMNPV, uma característica que facilita o manuseio destas lagartas na produção comercial (OLIVEIRA et al., 2006).

Outra grande descoberta foi que os baculovírus apresentam genes antiapoptóticos das células dos hospedeiros (*p*35 e *iap*); ou seja, os hospedeiros, ao detectarem uma infecção em algumas de suas células, "marcam" as mesmas para que sofram apoptose e inibam a infecção. Os genes anti-apoptóticos dos baculovírus são genes da fase precoce que impedem essa "marcação", impedindo a morte celular, possibilitando a infecção e podendo ocasionar a morte do hospedeiro (CLEM, 2001). P35/P49, presente em alguns alfabaculovírus, atua como um inibidor direto de proteases. Existem cinco tipos de genes iaps em baculovírus, que atuam "upstream" prevenindo a ativação das proteases. O gene *iap-5* somente foi encontrado em betabaculovírus (DU et al., 1999; WORMLEATON et al., 2003).

Metaloproteinase, *pep1*, *pep2* e *pep/p10* também são genes exclusivos de betabaculovírus. *Metaloproteinase* (*mp-nase*) atua na ruptura da membrana peritrófica do intestino do hospedeiro. *Pep1* e *pep2* são genes altamente conservados em betabaculovírus e estão em posições similares no genoma. PEP é uma proteína do corpo de oclusão e tem papel na estabilidade e prevenção de fusão dos grânulos, durante sua formação. PEP/P10 é um outro domínio PEP N, que apresenta ainda um domínio central P10 (com hepta-repetições de aminoácidos hidrofóbicos e uma região rica em prolina) e um domínio C terminal (BATEMAN et al., 2004; HASHIMOTO et al., 2000).

Muitos baculovírus possuem ainda genes que se repetem ao longo do genoma, sendo denominados genes *bro* (*Baculovirus repeated orf*). Esses genes são similares, compartilham uma sequência central, porém não são idênticos. As proteínas *bro* não têm homologia com outras proteínas conhecidas, o que torna difícil caracterizar sua função. No entanto, um estudo envolvendo *Bombyx mori* NPV (BmNPV), mostrou que possivelmente essas proteínas se ligam à fita simples de DNA, influenciando a replicação e/ou a transcrição (ZEMSKOV et al., 2000).

2.9 Diversidade populacional

A população de baculovírus possui inúmeras variantes genéticas, porém pouco se conhece a respeito do grau dessas variações em genes específicos desses vírus (HITCHMAN et al., 2007; PARNELL et al., 2002). Essa alta diversidade tem sido caracterizada nos estudos de diferentes isolados geográficos do mesmo vírus e de isolados individuais, em que se encontra uma mistura de genótipos (CORY et al., 2005; WILLIAMS et al., 2011). A diversidade genotípica parece ser o principal fator colaborador da sobrevivência dos vírus frente às condições ambientais, favorecendo sua adaptação em diferentes condições do meio ambiente (HODGSON et al., 2004).

Vários métodos têm sido utilizados para a análise de variação genotípica em baculovírus. Um estudo, envolvendo análise de diferentes variantes de AcMNPV, realizou a sua separação, utilizando enzimas de restrição para digerir o DNA genômico; também conhecido como análise de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs). No entanto, esse método é capaz de detectar somente polimorfismos existentes dentro de sítios reconhecidos pelas enzimas de restrição (LEE; MILLER, 1978; YIP et al., 2007). A variação genotípica também pode ser determinada através de PCR (reação em cadeia da polimerase). Entretanto, essa análise permite detectar somente o polimorfismo mais dominante, enquanto os demais existentes nos amplicons são perdidos (GHARIZADEH et al., 2005).

Considerando as populações de baculovírus, estudos revelaram que a variabilidade intraespecífica observada é devido a reorganizações genômicas, mutações, recombinações, inserções e deleções de DNA (CORY et al., 2005). Avanços nas tecnologias de sequenciamento e na computação nos últimos anos favoreceram a análise direta de variação genética de sequências de DNA. O pirosequenciamento é uma ferramenta de grande utilidade que permite avaliar as variações genotípicas dentro de populações virais e bacterianas (WELLEHAN et al., 2010). Uma análise interessante quando se tem uma amostra populacional é a dos SNPs ("single nucleotide polymorphism"), isto é, polimorfismos de nucleotídeos únicos. São variações de uma única base no genoma e ocorrem com frequência mínima de 1% na população estudada (BROOKES, 1999). Pode ocorrer a transição (base purina substituída por purina ou pirimidina por pirimidina) ou transversão (substituição de base purina por pirimidina ou vice-versa). Evolutivamente são

elementos estáveis e podem ocorrer em regiões expressas e não expressas. São muito estudados devido ao fato de poderem ser utilizados como marcadores genéticos (RAFALSKI, 2002; SYVANEN, 2001).

Quando os SNPs ocorrem em regiões codificadoras podem ser de dois tipos, SNPs não sinônimos ou sinônimos, dependendo se esses elementos alteram ou não o aminoácido quando aparecem, respectivamente. Se o SNP resultar em alteração do aminoácido, consequentemente, a estrutura e função da proteína codificada poderão ser afetadas. Devido à degeneração do código genético, nem todas as alterações de bases resultarão em modificação nos aminoácidos da proteína (ALBERTS 2002). Todavia, a análise de SNPs, et al., utilizando 0 pirosequenciamento, ainda não tem sido muito utilizada em populações de baculovírus. Muitas pesquisas ainda focam na utilização de clones, tais como os estudos envolvendo diferentes isolados de HearMNPV. Sabe-se que a principal limitação da clonagem é que esse método somente permite detectar os SNPs que estão dentro dos clones sequenciados (KHAN et al. 2003; ZHANG et al., 2005).

2.10 Análise filogenética de baculovírus e organização genômica

Na história evolutiva dos baculovírus ocorrem muitas duplicações gênicas, deleções, inserções e inversões, tornando o seu genoma bem flexível (HERNIOU et al., 2003). Além disso, a família Baculoviridae possui uma história de transferência horizontal de genes, como por exemplo, a aquisição de genes iaps, supressores de apoptose, dos insetos hospedeiros (HERNIOU et al., 2001; HUGHES, 2002).

Outro aspecto relevante a ser considerado nesses estudos é a existência da co-evolução entre os baculovírus e seus hospedeiros. Estudos têm demonstrado que provavelmente ancestrais de baculovírus tenham sido transmitidos de forma horizontal entre os hospedeiros de diferentes ordens com posterior ocorrência da co-especialização dos baculovírus em cada uma dessas ordens (FEDERICI, 1997; HERNIOU et al., 2004; ZANOTTO et al., 1993).

O primeiro gene de baculovírus sequenciado foi o gene da *poliedrina* de AcMNPV. A proteína codificada por esse gene é altamente conservada, altamente expressa e pode ser separada de outras proteínas estruturais com facilidade, o que favorece sua purificação em grande quantidade para posterior sequenciamento. Consequentemente, a *poliedrina* (NPVs) e a *granulina* (GVs) foram os primeiros

genes utilizados para inferir relação evolutiva entre os baculovírus, a partir de suas sequências de nucleotídeos e sequências deduzidas de aminoácidos (ROHRMANN, 2011; ZANOTTO et al., 1993).

Existem duas abordagens em análises filogenéticas: estudo de genes individuais ou do genoma completo. Para inferir relação filogenética utilizando genes individuais é necessário que, pelo menos, o gene seja representativo da família que se quer estudar e o nível de conservação deve refletir a distância evolutiva (HERNIOU; JEHLE, 2007). Herniou et al. (2004) mostraram que análises utilizando os genes *lef-8* e *pif-2* suportam a necessidade de seguir esses dois critérios nas análises filogenéticas. A confirmação de que de fato as análises de genes individuais representariam a filogenia de baculovírus foi obtida a partir de estudos de comparação genômica, quando da disponibilidade de genomas completos sequenciados (HERNIOU; JEHLE, 2007). Herniou et al. (2001) foi o primeiro trabalho que focou na análise de genomas completos para inferir relação filogenética entre baculovírus e comparar as árvores geradas a partir de genomas inteiros com aquelas geradas para genes individuais.

A utilização dos métodos de concatenação dos "core genes" (genes presentes em todos baculovírus sequenciados), sintenia e conteúdo gênico dos genomas podem ser usados para inferir filogenia entre baculovírus a partir de genomas completos. Segundo Herniou et al. (2001) a concatenação de somente sete genes (*ac22/pif-2*, *ac81*, *ac119*, *ac142*, *ac145*, *lef-8* e *lef-9*) gera as mesmas informações filogenéticas das árvores baseadas em genomas completos. Quanto à sintenia dos genomas, a disponibilidade de genomas completos de baculovírus favoreceu a comparação da ordem dos genes ao longo do genoma de diferentes vírus. Análises comparativas da organização gênica de vários baculovírus mostraram a forte colinearidade gênica existente entre esses genomas e permitiram identificar rearranjos gênicos (FERRELLI et al., 2012).

Estudos filogenéticos utilizando o gene da *poliedrina* permitiram demonstrar que os alfabaculovírus podem ser subdivididos em dois grupos (I e II) com base no tipo de proteína fusogênica (Figura 10) (ZANOTTO et al., 1993). Análises genômicas comparativas revelaram que essa divisão estaria associada à utilização de diferentes proteínas de fusão do envelope, presentes na superfície do fenótipo viral BV (LUNG et al., 2002). Alfabaculovírus do grupo II e betabaculovírus, como dito anteriormente, possuem a proteína F, que é uma proteína ancestral, com papel de propagação viral de célula a célula dentro do hospedeiro; nos alfabaculovírus do grupo I esta função é desempenhada pela GP64. Foram encontradas, em outras famílias de vírus, proteínas homólogas à proteína F, similar a proteínas ENV de errantivírus (retrovírus de insetos), e à proteína GP64, semelhante a uma proteína de envelope de ortomixovírus (vírus de RNA que infecta invertebrados/vertebrados) (PEARSON; ROHRMANN, 2002). Além do gene da *poliedrina/granulina*, outros genes utilizados frequentemente em análises filogenéticas são os genes da *dna polimerase* e *ecdisteróide UDP-glucosiltransferase* (BULACH et al., 1999; CHEN et al., 1997).

Comparações genômicas mostraram ainda que o NPV isolado do mosquito *Culex nigripalpus* (CuniNPV) não possui um gene homólogo ao gene da *poliedrina/granulina* dos demais baculovírus, porém utiliza um outro gene para codificar a proteína do corpo de oclusão (AFONSO et al., 2001).

Os alfabaculovírus do grupo I também parecem estar subdivididos em dois clados monofiléticos bem definidos (Figura 10) (JEHLE et al., 2006). Um dos clados inclui *Autographa californica* NPV (AcMNPV), *Rachiplusia ou* MNPV (RoMNPV), *Bombyx mori* NPV (BmNPV) e *Plutella xylostella* MNPV (PlxyMNPV). O outro clado compreende *Adoxophyes orana* NPV (AdorNPV), *Leucania separata* NPV (LeseNPV), *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV) e *Spodoptera frugiperda* MNPV-3AP2 (SfMNPV-3AP2). O grupo I também pode ser subdividido nas linhagens do AcMNPV e do AgMNPV. Os alfabaculovírus do grupo II possuem comprimento de ramo mais longo e um suporte menor nos nós basais. Esse fato sugere que esse grupo é mais ancestral do que os alfabaculovírus do grupo I. No entanto, o leque de hospedeiros é restrito a poucas famílias de lepidópteros. Assim como os alfabaculovírus II, os betabaculovírus apresentam baixo suporte basal e comprimento de ramo longo; possivelmente houve radiação ancestral desses vírus (HERNIOU; JEHLE, 2007).

Estudos de comparações genômicas podem fornecer informações sobre a história evolutiva de baculovírus, e também ajudar a identificar fatores relacionados à infecção viral e replicação (LANGE; JEHLE, 2003). Soma-se a isso a descoberta de genes únicos que contribuem para as características específicas de cada baculovírus. A determinação da sequência genômica de um novo baculovírus, *Diatraea saccharalis* GV (DsGV), abre possibilidades para o maior entendimento dos processos biológicos e evolutivos deste importante grupo de vírus.

Figura 10 – Árvore filogenética de 56 baculovírus, totalmente sequenciados, baseada na concatenação das sequências deduzidas de aminoácidos dos genes *lef-8* e *pif-2*. Observa-se a divisão dos quatro gêneros da família Baculoviridae: alfabaculovírus (grupo I e II), betabaculovírus, gamabaculovírus e deltabaculovírus. Pode-se analisar ainda a subdivisão dos alfabaculovírus do grupo I em dois clados: um que possui o AcMNPV e outro, a linhagem AgMNPV.



Fonte: Thumbi et al. (2011)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Considerando a importância do estudo de um novo baculovírus em termos da sua biologia molecular e inferência evolutiva com os demais baculovírus sequenciados, o presente estudo teve como objetivo sequenciar o genoma completo do granulovírus que infecta a lagarta *Diatraea saccharalis*, praga de grande interesse econômico da cultura de cana-de-açúcar no Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Sequenciamento do genoma do granulovírus isolado de lagartas Diatraea saccharalis, através do equipamento 454 Genome Sequencer FLX Titanium (Roche);
- Montagem do genoma viral utilizando MIRA 3.4.1 (Bastien Chevreux) e Geneious R6 (Biomatters);
- 3. Anotação do genoma viral através do programa Geneious R6 (Biomatters);
- Utilização dos eletroferogramas obtidos através do sequenciamento por interrupção de cadeia (método de Sanger), para a confirmação das regiões de cobertura reduzida no genoma;
- 5. Comparação do genoma completo de *Diatraea saccharalis* GV (DsGV) com os genomas dos demais baculovírus em termos da presença de genes, da ordem e do grau de conservação dos mesmos. Bem como a realização da análise da distribuição de variações na população viral;
- Análise do genoma do baculovírus recém-descoberto, com o intuito de inferir relação filogenética com outros baculovírus já sequenciados.

4 MATERIAL E MÉTODOS



4.1 Desenho esquemático da metodologia

4.2 Amostra viral

O granulovírus isolado de larvas *Diatraea saccharalis* infectadas, coletadas no Paraná, Brasil, foi fornecido gentilmente pelo Dr. Flávio Moscardi (*in memoriam*), da EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. O extrato de *D. saccharalis* infectado foi mantido a uma temperatura de -10 °C, no Laboratório de Biologia Molecular e Virologia, da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

4.3 Extração dos grânulos virais

Para a obtenção dos grânulos virais, o extrato de larvas infectadas, maceradas em água estéril, foi filtrado em tecido de malha fina (filo) para a remoção dos resíduos teciduais. Adicionou-se 200 µl 1% SDS (sulfato dodecil de sódio) e realizou-se a centrifugação leve da amostra a 3.500 x g por 10 minutos, com o intuito de precipitar os grânulos (o DNA celular e debris celulares ficam em suspensão após a centrifugação).

Após a remoção do sobrenadante foi verificada, em microscopia óptica, a ausência de grânulos, pois caso contrário uma nova centrifugação seria realizada. O precipitado foi ressuspendido em 1 ml de água ultrapura (purificada através do equipamento Milli-Q, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) e refrigerado a -20 °C. A amostra foi diluída 10X e analisada utilizando-se a câmera de Newbauer, para a visualização dos grânulos.

4.4 Extração e purificação do DNA viral

Adicionou-se 30 µl 0.5 M de EDTA seguido de pré-tratamento com proteinase K (lise enzimática). Acrescentou-se cerca de 25 µl de proteinase K por ml de solução com grânulos. O material permaneceu em banho seco a 54 °C por 2 horas.

A próxima etapa foi adicionar 100 µl de carbonato de sódio (0.2 M, pH 10.8) para cada 1 ml de extrato, permanecendo o material à temperatura de 54 °C durante o período noturno (*overnight*). Esse procedimento foi necessário para a dissolução dos grânulos virais e consequente liberação do DNA viral. A amostra foi centrifugada a 10.000 x g durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para neutralizar a solução, adicionou-se 100 µl de Tris HCl (1.0 M, pH 7.0) e a amostra foi levada ao

agitador por 2 horas para homogeneizá-la. Adicionou-se proteinase K (25 µl/ml) e o material viral foi incubado a 54 °C por 2 horas.

Posteriormente, o DNA viral foi obtido através da extração com fenol:clorofórmio. Acrescentou-se volume igual de fenol à amostra viral e o material foi homogeneizado por inversão durante 5 minutos. A amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o restante do material foi tratado com igual volume de clorofórmio, repetindo o procedimento de inversão, centrifugação e retirada do sobrenadante. O material extraído foi colocado em tubo centricon (coluna) que permite concentrar o DNA purificado devido à presença de uma membrana interna ao tubo.

4.5 Amplificação genômica pelo sistema Phi29

A amplificação do DNA genômico de DsGV foi realizada através do kit GenomiPhi V2 Amplification Kit[®] (GenomiPhi V2 Amplification Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA). Esse protocolo baseia-se na amplificação isotérmica de todo o genoma pela DNA polimerase Phi29 (isolada do bacteriófago Phi29), permitindo obter uma maior quantidade de DNA viral a ser estudado. A enzima DNA polimerase Phi29 produz fragmentos relativamente grandes (12 a 100 kbp), possui atividade exonucleotídica (3' – 5') e baixa taxa de erro durante a replicação do DNA (Short et al., 2005). Para cada reação foi utilizado 1 µl de DNA original (10 ng) seguindo o protocolo do fabricante.

4.6 Amplificação e sequenciamento do gene da granulina

O gene da *granulina* de DsGV foi o primeiro gene a ser amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Na PCR, foram utilizados os primers universais para o gene da *granulina* prPH-1 forward e prPH-2 reverse (Tabela 3). Esse par de primers amplifica uma região de 507 a 510 nucleotídeos, representando a principal região do gene da *granulina* (LANGE et al., 2004).

Tabela 3 – Sequência dos primers universais do gene da *granulina/poliedrina* utilizados na reação de amplificação do gene da *granulina* de DsGV.

Nome do primer	Sequência (5' – 3')
prPH-1	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
prPH-2	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
Easter Lange at al. (2004)	

Fonte: Lange et al. (2004)

O procedimento utilizado na reação de PCR está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Procedimento da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizado para a amplificação do gene da *granulina* de DsGV para uma reação de 20 μl (volume final).

Reagentes	Volume (µl)	Concentração Final
Primer prPH-1(10 pM)	1	0,5 pM
Primer prPH-2 (10 pM)	1	0,5 pM
dNTP mix (2,5 mM) [*]	2	0,25 mM
10X Tampão com 2 mM	2	1X
MgCl ₂ **		
DNA polimerase (1 U/µl)**	1	-
DNA viral	1	10 ng
Água ultrapura (Milli-Q)	12	-

Nota: ^{*}Amersham Pharmacia Biotech ^{**} Biotools B&M Labs, S. A.

O programa de termociclagem utilizado para amplificar o gene da *granulina* de DsGV está descrito na Tabela 5.

Etapas	Temperatura (°C) Tempo (minutos)		Ciclos
			(Repetições)
1. Desnaturação	94	2	0
inicial			
2. Desnaturação	94	1	30
Anelamento	55	1	
Extensão	72	1	
3. Extensão final	72	5	0
4. Resfriamento	8	∞	-

Tabela 5 – Programa utilizado para amplificar o gene da granulina de DsGV, através
do termociclador modelo Mastercycler personal (Eppendorf).

Após a amplificação do gene da *granulina*, 5 µl do produto de PCR foram analisados em gel de agarose 1% e seu tamanho foi comparado com o marcador lambda DNA/*Hind*III (Fermentas).

O fragmento amplificado foi purificado com o kit GFX[®] (illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

A reação de sequenciamento, método de interrupção de cadeia (Sanger et al., 1977), foi realizada com o kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo as orientações do fabricante para um volume final de reação de 20 μ l (Tabela 6). Para isso, foram utilizados os primers universais da *granulina* descritos acima. As condições adotadas para a reação de sequenciamento estão descritas na Tabela 7.

uma reação de 20 µl (volume final).					
Reagentes	Volume (µl)	Concentração Final			
BigDye [*]	8	-			
Primer prPH-1ou prPH-2 (3.3 pM)	1	0,165 pM			
DNA viral	-	20 ng			
Água ultrapura (Milli-Q)	q. s. p. ^{**} 10	-			

Tabela 6 – Procedimento de sequenciamento do gene da *granulina* de DsGV para uma reação de 20 µl (volume final).

Nota: ^{*}Applied Biosystems

^{**} q. s. p.: quantidade suficiente para 10 µl

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos	
		(segundos)	(Repetições)	
1. Desnaturação	96	60	0	
inicial				
2. Desnaturação	96	15	35	
Anelamento	52	15		
Extensão	60	240		
3. Extensão final	60	300	0	
4. Resfriamento	4	×	-	

Tabela 7 – Programa utilizado para sequenciar o gene da *granulina* de DsGV, através do termociclador modelo Mastercycler personal (Eppendorf).

Após a reação de sequenciamento, foi realizada a purificação através da precipitação de DNA com isopropanol/etanol. O protocolo de purificação consiste em adicionar 80 µl de isopropanol 75% (gelado); homogeneizar e descansar por 15 minutos na geladeira; centrifugar por 35 minutos a 14.500 rpm; descartar o sobrenadante com o tubo inclinado; lavar o precipitado em 200 µl de etanol 70% (gelado) e homogeneizar; centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm; descartar novamente o sobrenadante com o tubo inclinado; secar o precipitado em banho seco a 96 °C por 2 minutos; e congelar o precipitado seco até a amostra ser analisada no sequenciador automático.

As amostras foram processadas no sequenciador automático ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) do Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática (ICB-USP), sob responsabilidade do Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto.

4.7 Construção da biblioteca *Ha*elll e clonagem de fragmentos de DNA viral no plasmídeo pUC19

O DNA genômico purificado foi digerido com a enzima de restrição *Hae*III (10.000 U/ml, New England Biolabs, MA, USA), sendo realizada a eletroforese em gel de agarose 1% para a confirmação da digestão, através da comparação com 1 µl do marcador lambda DNA/*Hind*III (0,5 µg/µl, Fermentas). Após a eletroforese, as bandas de DNA coradas com o corante "Blue Green" (LGC Biotecnologia) foram

visualizadas através do programa Alphalmager versão 4.1.0 (Alpha Innotech Corporation, CA), utilizando luz ultravioleta e foto-documentação de imagem.

Os fragmentos gerados na biblioteca *Hae*III foram inseridos em um plasmídeo pUC19 (250 ng/ml) (Life Technologies), previamente linearizado após ser cortado pela enzima *Sma*I (10 U/µl, Fermentas) e mantida a linearização através da desfosforilação alcalina, utilizando a enzima CIP (enzima fosfatase alcalina) (10.000 U/ml, New England Biolabs), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O plasmídeo pUC19 é um vetor de DNA circular de fita dupla (2686 bp) que contém o gene de resistência ao antibiótico ampicilina, uma origem de replicação, o gene *lac*Z que codifica β -galactosidase e um sítio múltiplo de clonagem (Figura 11).

Figura 11 – Plasmídeo pUC19 usado como vetor de clonagem na biblioteca HaeIII. O plasmídeo possui um gene de resistência ao antibiótico ampicilina, uma origem de replicação e o gene lacZ (codifica β-galactosidase). O sítio de restrição da enzima Smal, que está dentro do sítio múltiplo de clonagem, utilizada para cortar o plasmídeo está destacado em vermelho logo abaixo do mapa do plasmídeo pUC19.



Fonte: http://www.ufpe.br/biolmol/plasmideos-mapas_e_comentarios.htm

Cerca de 100 ng de DNA viral foram adicionados a 50 ng de pUC19 em uma reação de ligação com 1U T4 DNA ligase (Fermentas) e a solução tampão foi fornecida pelo fabricante. Foram realizadas duas reações: uma com 5 µl do inserto e outra com 5 µl de água ultrapura (Milli-Q, tubo controle). A incubação foi realizada em um período de 17 horas a 22 °C.

Células de *Escherichia coli* competentes, fornecidas pelo Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, foram transformadas a partir de uma mistura de ligação segundo procedimento descrito por Sambrook et al. (1989). Utilizaram-se três tubos contendo 100 µl de células competentes. No primeiro tubo havia 5 µl da ligação completa (plasmídeo + DNA viral), no segundo tubo, 5 µl da ligação controle (somente plasmídeo) e no terceiro tubo, 5 µl do plasmídeo pGEM[®] 3Zf (+) controle (plasmídeo íntegro, Promega). Os tubos foram incubados no gelo por 30 minutos. Prossedeu-se o choque térmico ao aquecer os tubos, em banho-maria, a 42 °C por 30 segundos e em seguida incubar no gelo por 2 minutos. Adicionou-se 250 µl de meio SOC a temperatura ambiente. Os tubos foram incubados a 37 °C com agitação (250 rpm) por 60 minutos.

Células de *E. coli* transformadas (100 µl de cada tubo) foram incubadas a 37 °C (*overnight*) em placas de Petri contendo meio LB Ágar, previamente preparadas com o antibiótico ampicilina, IPTG (isopropiltiogalactosídeo) e X-gal (5bromo-4-clorindolil- β -galactosidase). Para cada 250 ml de meio LB Ágar adicionouse 500 µl de ampicilina (50 µg/ml). Nas placas de Petri, acrescentou-se 40 µl da solução de estoque de X-gal (20 mg/ml) e 4 µl de IPTG (200 mg/ml).

Após a seleção das colônias brancas (possuem o plasmídeo recombinante), os plasmídeos destas foram extraídos utilizando o procedimento de lise alcalina segundo Sambrook et al. (1989). Antes da extração cada colônia selecionada foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio LB líquido estéril. Os tubos foram agitados a 180 rpm (*overnight*). No dia seguinte, o material dos tubos foi vertido em tubos falcon (15 ml). O próximo passo antes da extração foi a centrifugação do material, presente nos tubos falcon, a 2000 x g por 5 minutos a 4 °C e descarte do sobrenadante. A extração plasmidial foi realizada baseando-se no protocolo do kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

4.8 Sequenciamento das extremidades dos clones

O DNA de cada clone obtido foi quantificado no equipamento NanoDrop[®] (Nano Drop 2000c, Thermo Cientific, Wilmington, DE, USA) e armazenado a -20 °C até sua utilização. O sequenciamento das extremidades dos clones foi realizado utilizando o kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), conforme descrito para o sequenciamento do gene da *granulina* de DsGV.

Nestas reações foram utilizados os primers universais M13 (-21) forward (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') e M13 (-46) reverse (5' GAGCGGATAACAATTTCACACAGG 3') (região M13 imediatamente adjacente ao inserto a ser sequenciado). Os produtos obtidos foram purificados utilizando o kit BigDye XTerminator[®] Purification Kit (Applied Biosystems), seguindo o protocolo do fabricante, e analisados no sequenciador automático ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.9 Pirosequenciamento

Paralelamente à construção da biblioteca *Hae*III, surgiu a oportunidade de realizar, com a colaboração do Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Universidade de Brasília), o pirosequenciamento do DNA genômico de DsGV por síntese acoplada a picorreatores de alta densidade (454 Genome Sequencer (GS) FLX[®] Titanium, Roche). Todo o processamento da amostra viral foi realizado no Centro de Genômica de Alto desempenho do Distrito Federal (Universidade Católica de Brasília).

O pirosequenciamento é uma técnica de sequenciamento de ácidos nucléicos que se baseia na detecção de pirofosfato (PPi) liberados durante a síntese de DNA. O PPi liberado no processo é transformado em uma molécula de Adenosina Trifosfato (ATP), através da enzima ATP Sulfurilase. A enzima Luciferase oxida luciferina, à custa da molécula de ATP, gerando fóton de luz. A quantidade de luz transmitida é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados (CARVALHO; SILVA, 2010; SOUZA E BRUSAMARELLO, 2009).

Nessa tecnologia, o DNA genômico viral foi fragmentado mecanicamente em sequências de 400 a 1000pb por meio de nebulização; os fragmentos foram separados em fitas únicas e os adaptadores específicos, A e B, foram ligados às

extremidades 3' e 5' dos fragmentos, respectivamente. Na extremidade 5', o adaptador B consiste de biotina, permitindo o isolamento dos fragmentos ligados ao adaptador A e ao adaptador B (A-B). Na extremidade 3', o adaptador A é usado no anelamento do primer que iniciará a reação de sequenciamento. Os fragmentos A-B foram ligados às microesferas magnéticas. Somente um tipo de fragmento se liga a uma determinada microesfera. Realizou-se a PCR em emulsão em que as microesferas são capturadas individualmente em gotículas oleosas, isto é, o óleo em solução forma micelas, que capturam as esferas, e funcionarão como microrreatores. Nessa fase são produzidas milhares de cópias do fragmento alvo. Cada esfera com várias cópias do fragmento alvo, que foi amplificado, é capturada em poços na placa de sequenciamento (placa PicoTiter). O diâmetro de cada cavidade na placa PicoTiter permite a inserção de somente uma microesfera (CARVALHO; SILVA, 2010). Na última etapa, a placa foi carregada no equipamento Genome Sequencer FLX. Todas as etapas foram realizadas com a utilização do kit GS FLX Titanium[®], de acordo com as recomendações do fabricante (454 GS FLX-Titanium, Life Sciences, Roche).

4.10 Montagem e anotação do genoma viral

A montagem *De novo* do genoma de DsGV foi realizada utilizando os programas MIRA versão 3.4.1 (Bastian Chevreux, disponível em http://www.chevreux.org/projects_mira.html) e Geneious versão 6.0.6 (Biomatters, disponível em http://www.geneious.com/).

A anotação das possíveis ORFs no genoma de DsGV foi realizada de forma automática, utilizando o programa Geneious. Todas as regiões com início ATG (Metionina), apresentando no mínimo 150 nucleotídeos (50 aminoácidos) e com sobreposição mínima entre ORFs adjacentes foram selecionadas para análises posteriores.

A confirmação das prováveis ORFs foi realizada manualmente, utilizando a ferramenta ORFFINDER (Open Reading Frame Finder; disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/). A análise de similaridade das possíveis ORFs foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) (disponível em http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Realizou-se ainda a procura de motivos conservados do promotor precoce ("early": TATA-box: TATAW, TATAWAW,

TATAWTW + iniciador CAKT (INR)) e tardio ("late": motivo DTAAG + iniciador CAKT) dentro da região de 200 pb "upstream" de cada ORFs (FRIESEN, 1997; LU; MILLER, 1997).

4.11 Confirmação das regiões de baixa cobertura no genoma

Após a montagem dos reads (fragmentos sequenciados), provenientes do pirosequenciamento, no programa Geneious, utilizou-se os eletroferogramas obtidos na biblioteca Haelli para corrigir os possíveis erros presentes nessas regiões que foram sequenciadas. Para as regiões no genoma que apresentavam cobertura reduzida (< 5 reads por base), foram confeccionados primers específicos (Primer3Plus; disponível em http://www.bioinformatics.nl/) com o intuito de amplificar e resequenciar essas regiões. Em especial, as extremidades do gene gp64 foram GATAAAAATACCGGCGTGGA/ amplificadas com primers os TTCCCTAGGCGGAGTAATTG (final do gene rr2A/início do gene gp64) e GTGGTGTCGGAACGAGTTTA/CGTTTATCGGAGGGGTTACA (final do gene gp64 e final do gene *lef-8*) e resequenciadas. Os programas e procedimentos utilizados para a amplificação e seguenciamento desses fragmentos foram os mesmos realizados para o gene da granulina.

4.12 Análise da distribuição da diversidade de SNPs

Toda a análise de diversidade de SNPs foi realizada utilizando a ferramenta Geneious. Os reads obtidos no sequenciamento 454, que apresentavam identidade mínima de 92% na região de sobreposição, foram mapeados ao longo do genoma de DsGV. Para a análise dos SNPs, o critério escolhido para a busca dessas variações foi: cobertura mínima de 10 reads, frequência mínima de 10%, método aproximado de cálculo do valor p, análise de variações nas duas fitas (reverse e forward) e redução de qualidade em região homopolimérica (30%). O valor p, probabilidade de ocorrer um erro de sequenciamento, considera a qualidade de cada base analisada, e quanto menor o seu valor, maior é a probabilidade dessa variação ser real. Determinou-se o número total de SNPs detectados, quais genes eram mais variáveis e se os SNPs eram sinônimos ou não sinônimos.

4.13 Análise do conteúdo gênico, sintenia e filogenia

Realizou-se a análise do conteúdo gênico de DsGV, utilizando a ferramenta BLAST, comparando com outros genomas já sequenciados depositados no GenBank (NCBI), em termos da presença de "core genes", de genes específicos de betabaculovírus, de prováveis genes únicos e de outros genes importantes, associando sua provável função de acordo com a literatura.

Foram realizados alinhamentos múltiplos de sequências deduzidas de aminoácidos do gene da *granulina* de DsGV e dos outros 14 betabaculovírus totalmente sequenciados, bem como das sequências deduzidas de aminoácidos do gene *gp64* de DsGV e de todos alfabaculovírus do grupo I (nomenclatura na Tabela 1). Os alinhamentos foram construídos utilizando o algoritmo ClustalW. Sequências repetidas (*hrs*) ao longo do genoma foram identificadas através do programa Geneious e uma das regiões palindrômicas localizadas dentro das regiões *hrs* de DsGV foram alinhadas também utilizando ClustalW (LARKIN et al., 2007).

O genoma de DsGV também foi comparado com os genomas de outros baculovírus através da construção de mapas sintênicos, utilizando a ferramenta MAUVE 2.3.1, que emprega o algoritmo de alinhamento "progressive mauve algorithm" e gera blocos locais colineares (LCBs) ao longo de cada genoma comparado (DARLING et al., 2004).

Para a análise filogenética foram construídas 3 árvores a partir dos seguintes genes: *granulina/poliedrina*, *gp64* e concatenação de genes conservados. Todos os alinhamentos foram realizados utilizando o programa ClustalW. O método de reconstrução filogenética usado foi PhyML 2.2.0 (implementa um algoritmo de busca de máxima verossimilhança, MV). O modelo de evolução escolhido para cada árvore foi determinado utilizando os programas Jmodeltest 2.1.2 e Prottest 2.4 para nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (DARRIBA et al., 2011, 2012; GUINDON; GASCUEL, 2003). Tanto os alinhamentos quanto a filogenia foram realizados utilizando o programa Geneious. A edição de cada árvore construída foi feita utilizando o software FigTree v1.4.0 (Andrew Rambaut) (disponível em http://tree.bio.ed.ac.uk/software/).

A árvore individual da granulina/poliedrina foi construída a partir das sequências de nucleotídeos dos referidos genes, presentes em DsGV e em 60 baculovírus completamente sequenciados, exceto CuniNPV (nomenclatura na

Tabela 1). O modelo de evolução escolhido foi GTR (TAVARÉ, 1986) e os valores de bootstrap foram anotados para 100 replicatas.

A árvore individual do gene *gp64* foi confeccionada a partir das sequências deduzidas de aminoácidos do gene *gp64* de DsGV, de todos alfabaculovírus do grupo I completamente sequenciados depositados no GenBank (nomenclatura na Tabela 1), dos baculovírus *Anagrapha falcifera* MNPV (AfMNPV), *Choristoneura occidentalis* (ChocNPV), *Choristoneura rosaceana* NPV (ChroNPV), *Philosamia cynthia ricini* NPV (PhcyNPV) e *Galleria mellonella* MNPV (GmMNPV) e de 6 ortomixovírus (Dhori virus (DHOV), Jos virus (JOSV), Thogoto virus (THOV), Quaranfil virus (QRFV), Tjuloc virus (TJUV) e Johnston Atoll virus (JAV)). O modelo de evolução escolhido foi LG (LE; GASCUEL, 2008) e os valores de bootstrap foram anotados para 100 replicatas.

A árvore concatenada foi construída utilizando as sequência deduzidas de aminoácidos de 30 core genes, escolhidos aleatoriamente (*38k*, *49k*, *ac68*, *ac81*, *desmoplakin*, *dna polimerase*, *gp41*, *helicase*, *lef-1*, *lef-2*, *lef-4*, *lef-5*, *lef-8*, *lef-9*, *odv-e18*, *odv-e25*, *odv-e27*, *odv-e56*, *p18*, *p33*, *p47*, *p48*, *pif-0*, *pif-1*, *pif-2*, *pif-3*, *pif-4*, *vlf-1*, *vp39* e *vp1054*), de 61 genomas de baculovírus totalmente sequenciados disponíveis no GenBank (nomenclatura na Tabela 1). O modelo de evolução escolhido foi LG (LE; GASCUEL, 2008) e os valores de bootstrap foram anotados para 100 replicatas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amplificação e Sequenciamento do gene da granulina

Sabe-se que a família Baculoviridae é constituída por vírus oclusos, em forma de bastão, com DNA dupla fita circular. No final do ciclo de infecção, os vírions são rodeados por uma matriz proteica, originando o corpo de oclusão (PEARSON et al., 2000). A proteína predominante nos corpos de oclusão é a POLIEDRINA ou GRANULINA nos alfa-, beta- e gamabaculovírus, apresentando peso molecular em torno de 30 000 daltons e ocupando 95% do total de proteínas presentes nessa estrutura (SUMMERS et al., 1980; PAROLA et al., 2003).

Com a finalidade de se confirmar se o vírus isolado da lagarta *Diatraea saccharalis* era realmente um baculovírus, a primeira etapa do trabalho foi realizar a amplificação e sequenciamento do gene da *granulina*. O gene da *granulina* de DsGV amplificado (volume total = 4 tubos de 20 µl de reação cada) e purificado (amplicon) foi submetido à eletroforese para avaliação da quantidade de amplicon que seria usada na reação de sequenciamento. A partir da análise da eletroforese, estabeleceu-se o uso de cerca de 20 ng de DNA viral no protocolo de sequenciamento. A Figura 12 representa uma eletroforese em gel de agarose 1% com duas "canaletas" marcadas com **1** e **2**, sendo que **1** é o padrão 100 pb (1 µl) e **2** (2,5 µl) é o resultado da PCR do gene da *granulina* purificado (amplicon).

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% do gene da granulina de DsGV amplificado (volume total = 4 tubos de PCR contendo 20 μl de reação cada) e purificado; na canaleta 1 se encontra 5 μl do padrão 100 pb e na canaleta 2, a amostra DsGV purificada com tamanho de 747 pb (2,5 μl).



O sequenciamento do gene da *granulina*, realizado através do método de interrupção de cadeia e utilizando os primers universais da *granulina*, permitiu obter e analisar uma sequência de 747 pb. A Figura 13 mostra a sequência completa do gene da *granulina* de DsGV e a Figura 14 representa a sequência deduzida de 248 aminoácidos codificada por esse gene.

Figura 13 – Sequência completa do gene da *granulina* de DsGV. Um total de 747 bases foram sequenciadas utilizando-se primers universais para o gene da *granulina*.

5'ATGGGATATAAATAAATCTTTGAGATACAGCCGTCACGCCGGCACAAGTTGTGTGATAA ACAATTATCAATTGAAAAGTTTAGGATCTGTTCTAAATGATGTACGTAGAAAAAAGGAAC ATATTCGAGAGGCCGAGTACGAGCCCATGATCGACATCGCCGATCAATATATGGTGACC GAGGATCCCTTTCGTGGCCCTGGTAAAAACGTTAGAATAACATTATTTAAAGAGATTAGA CGCATTCAACCAGATACAATGAAACTTGTGTGTAATTGGAGCGGAAAAGAATTTCTACGC GAAACTTGGACTAGATTTATTTCTGAGGAGTTTCCAATTACGACCGATCAAGAAATTATG GATTTGTGGTTCGAGCTTCAATTGAGACCAATGCACCCTAATCGTTGTTATAAATTTACC ATGCAATACGCACTAGGAGCCAATCCAGATTATATCGCACATGACGTTATCAGACAACA AGACCCCTATTATGTGGGACCTAACAATATCGAGCGAATCAATTTGACCAAGAAAGGATT TGCGTTCCCATTGACGTGTCTACAGTCTGTGTACAATGAAAACTTTGACCAAGAAAGGATT TGCGTTCCCATTGACGTGTCTACAGTCTGTGTACAATGAAAACTTTGAATGTTTCTTCGA CAATGTTCTCTGGCCATATTTGAGGTATCTCTAATCTTCAAGATTAAAGAGTTTGCGCCCGA AATAGAGGAAATCATGATTGAGGTATCTCTAATCTTCAAGATTAAAGAGTTTGCGCCCGA TGTGCCCCTGTTCACTGGTCCTGCATACTAA*3' Nota: * Codon de terminação (TAA).

Figura 14 – Sequência deduzida de aminoácidos do gene da *granulina* de DsGV. O tamanho da proteína deduzida foi de 248 aminoácidos.

MGYNKSLRYSRHAGTSCVINNYQLKSLGSVLNDVRRKKEHIREAEYEPMIDIADQYMVTEDP FRGPGKNVRITLFKEIRRIQPDTMKLVCNWSGKEFLRETWTRFISEEFPITTDQEIMDLWFEL QLRPMHPNRCYKFTMQYALGANPDYIAHDVIRQQDPYYVGPNNIERINLTKKGFAFPLTCLQ SVYNENFECFFDNVLWPYFYRPLVYVGTTSAEIEEIMIEVSLIFKIKEFAPDVPLFTGPAY

A ferramenta Blast (blastp) mostrou que a sequência da GRANULINA de DsGV apresenta 93%, 91%, 91% e 81% de identidade de aminoácidos (% id aa) em relação a sequências de GRANULINA de *Cydia pomonella* GV (CpGV),

Cryptophebia leucotreta GV (CrleGV), Choristoneura occidentalis GV (ChocGV) e Pieris rapae GV (PiraGV), respectivamente (Tabela A.1). A Figura 15 mostra o alinhamento múltiplo da sequência deduzida de aminoácidos do gene da granulina de DsGV e dos outros 14 betabaculovírus totalmente sequenciados até o momento. Observa-se, na Figura 15, a presença dos mesmos resíduos de aminoácidos na maioria das colunas alinhadas. lsso era esperado, pois а GRANULINA/POLIEDRINA, principal componente dos corpos de oclusão (OBs), são proteínas altamente conservadas nos baculovírus (BRAUNAGEL et al., 2003; SEUFI, 2008).

O conteúdo AT (% adenina-timina) do gene da *granulina* obtido foi de 60,1%. O gene da *granulina* dos 14 betabaculovírus sequenciados completamente possui um conteúdo AT variando entre 49,3% (CpGV) e 57,7% (ChocGV) (NCBI). No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre os dados obtidos e as propriedades biológicas.

Figura 15 – Alinhamento múltiplo das sequências deduzidas de aminoácidos dos genes da granulina de DsGV e dos outros 14 betabaculovírus completamente sequenciados (CpGV, CrleGV, PiraGV, ChocGV, PhopGV, ClanGV, PlxyGV, SpliGV, HearGV, PsunGV, XecnGV, AgseGV, EpapGV e AdorGV; ver nomenclatura na Tabela 1). As colunas brancas mostram resíduos de aminoácidos 100% similares, enquanto as demais apresentam resíduos em tons de cinza escuro, cinza claro ou preto, correspondendo a 80-100%, 60-80% e valores inferiores a 60% de similaridade, respectivamente.



5.2 Características gerais do genoma

O genoma completo de DsGV foi coberto, em média, 36 vezes pelo sequenciamento 454, através da geração de 18 230 reads com tamanho médio de 234,5 nucleotídeos. O genoma de DsGV apresentou 98 463 pb. DsGV é o menor granulovírus sequenciado até o momento, seguido por *Adoxophyes orana* GV (AdorGV – 99 657 pb) (WORMLEATON et al., 2003) e *Plutella xylostella* GV (PlxyGV – 100 999 pb) (HASHIMOTO et al., 2000). O maior granulovírus sequenciado é o Xestia c-nigrum GV (XecnGV), cujo genoma possui 178 733 pb (HAYAKAWA et al., 1999).

O conteúdo AT do genoma de DsGV foi de 65%. Em geral os baculovírus possuem genomas com baixo conteúdo de guanina-citosina (GC%) (<50%) (ESCASA et al., 2006; LANGE; JEHLE, 2003; WOLFF et al., 2008). DsGV é o terceiro granulovírus com maior conteúdo AT, depois de CrleGV (67,6%) (LANGE; JEHLE, 2003) e ChocGV (67,3%) (ESCASA et al., 2006). Os granulovírus com menor conteúdo AT no genoma são CpGV (54,7%) (LUQUE et al., 2001) e ClanGV (55,6%) (LIANG et al., 2011).

A adenina do códon de início do gene da *granulina* foi designado como nucleotídeo 1 e as demais ORFs foram numeradas na direção da transcrição do gene da *granulina*, estabelecendo a orientação no sentido horário do mapa circular do genoma de DsGV (Figura 16). A análise da sequência completa de DsGV permitiu identificar 116 prováveis ORFs, sendo que 63 (54,3%) estão no sentido horário e 53 (45,7%), no sentido anti-horário, baseando-se na orientação transcricional do gene da *granulina* (ORF 1).
Figura 16 – Mapa circular do genoma de DsGV com todos os genes identificados dentro de 98 463 pb. As setas indicam a direção de transcrição e o tamanho relativo das ORFs. Os nomes dos principais genes estão destacados e a posição de cada um deles é indicado por uma escala (pb). As setas azuis, vermelhas e verdes mostram a presença dos genes conservados (core genes), únicos e específicos de betabaculovírus, respectivamente. As demais ORFs estão em amarelo.



Estudos mostram que o número de ORFs encontradas em betabaculovírus varia de 116 em ChocGV (ESCASA et al., 2006) a 183 (Pseudaletia unipuncta GV – PsunGV) (NCBI). As menores ORFs encontradas no presente estudo foram *ds44* (150 pb, 50 aminoácidos) e *ds62* (153 pb, 51 aminoácidos) e as maiores foram *helicase-1* (*ds78*) (3384 pb, 1127 aminoácidos) e *dna polimerase* (*ds92*) (3078 pb, 1025 aminoácidos). A média do conteúdo AT das ORFs foi de 64,1% (Figura 17) e

esse valor está próximo da média do conteúdo AT do genoma de DsGV (65%). No entanto, *ds72* apresentou uma composição AT significativamente mais baixa (48,4%) enquanto que algumas ORFs mostraram um conteúdo mais alto que a média, tais como *ds33* (76,8%), *ds36* (75,4%), *ds41* (75%), *ds44* (78%) e *ds47* (76,4%).

Figura 17 – Conteúdo AT (%AT) das 116 ORFs do genoma de DsGV. A média da composição AT foi de 64,1%. Ds72 apresentou o menor conteúdo AT (48,4%) e ds44, o maior (78%).



A análise ainda mostrou a ocorrência de baixa sobreposição entre 31 ORFs adjacentes. Sabe-se que os baculovírus possuem mínima sobreposição de regiões codificantes no seu DNA genômico (WANG et al., 2011). As maiores sobreposições foram observadas em apenas 8 regiões do genoma de DsGV (Tabela 8), em especial nas regiões entre *lef-11* (*ds49*) e *p74* (*ds50*) (77 pb), *alk-exo* (*ds105*) e *helicase-2* (*ds106*) (98 pb) e *lef-10* (*ds114*) e *vp1054* (*ds115*) (140 pb).

Sobreposições	Localização no genoma	Tamanho em pares de base
		(pb)
1	ds12 – ds13 (pep1)	50
2	ds19 (gp41) – ds20	56
3	ds24 – ds25	44
4	ds49 (lef-11) – ds50 (p74)	77
5	ds66 – ds67	59
6	ds73 (lef-5) – ds74 (38k)	51
7	ds105 (alk-exo) – ds106 (helicase-2)	98
8	ds114 (lef-10) – ds115 (vp1054)	140

Tabela 8 – Localização e tamanho das 8 maiores regiões de sobreposição de ORFs adjacentes no genoma de DsGV.

O genoma de DsGV apresentou apenas 16 regiões intergênicas maiores que 100 pb (Tabela 9). Os maiores espaços encontrados foram de 735 pb (coincide com a presença da região homóloga, hr-4), 689 pb (entre ds17 e ds18), 572 pb (entre p49 e ds10) e 558 pb (coincide com a hr-7). Era esperado encontrar sequência homóloga para cp5 (entre ds4 e ds5), cp121, cp122 e cp123 (entre ds103 e ds104) e cp140 e cp141 (entre ds115 e ds116) (LUQUE et al., 2001), porém nenhuma dessas ORFs foi encontrada dentro dessas regiões (Tabela A.1).

Regiões Intergênicas	Localização no genoma	Tamanho em pares de bases (pb)
1 ¹	ds3 (pk-1) – ds4	253
2	ds4 – ds5 (ie-1)	230
3	ds9 (p49) – ds10	572
4	ds17 – ds18	689
5	ds23 (efp) – ds24	235
6	ds25 – ds26	177
7	ds31 – ds32 (lef-2)	135
8 ²	ds38 (p13) – ds39 (pif-2)	468
9 ³	ds55 (bv-e31) – ds56 (p24)	735
10	ds70 – ds71 (p40)	231
11⁴	ds84 (odv-e27) – ds85	435
12 ⁵	ds93 (desmoplakin) – ds94 (lef-3)	353
13	ds103 (dna ligase) – ds104	282
14 ⁶	ds111 – ds112	558
15	ds112 – ds113	169
16	ds115 (vp1054) – ds116 (me53)	223

Tabela 9 – Localização e tamanho das 16 regiões intergênica maiores que 100 pb no genoma de DsGV.

Nota: ^{1,2,3,4,5,6} Coincide com *hr*-1, *hr*-2, *hr*-4, *hr*-5 e *hr*-6, respectivamente.

Quanto à expressão gênica em baculovírus, esta é regulada por promotores precoces, tardios e muito tardios (KELLY et al., 2007). A análise da região de 200 pb "upstream" do início ATG (metionina) de cada ORF permitiu identificar motivos conhecidos do promotor precoce TATA-box (TATAWAW, TATAWTW e TATAW) em 29 ORFs; 12 ORFs apresentaram o motivo DTAAG do promotor tardio, sendo D = A, T ou G, e 69 ORFs, ambos promotores. A maioria das ORFs analisadas apresentou o iniciador CAKT (INR), sendo K = T ou G (FRIESEN, 1997; LU; MILLER, 1997).

A fase precoce (30 minutos a 8 horas h.p.i.) ocorre antes da replicação viral e os genes expressos nesse período são dependentes da RNA polimerase II do hospedeiro. A RNA polimerase II reconhece e transcreve promotores precoces que

possuem estrutura semelhante aos promotores da célula hospedeira. O consenso TATA, localizado anteriormente ao ponto de início da transcrição, é conservado em muitos promotores dessa classe e importante para o processo de transcrição precoce. Consequentemente, esses genes possuem papel importante no processo de replicação do DNA viral (FRIESEN, 1997; GUARINO et al., 1998).

A partir da replicação viral, inicia-se a fase tardia, com a expressão de genes tardios, envolvidos na montagem da partícula viral (6 a 18 h.p.i.), e de genes muito tardios (a partir de 18 h.p.i.), essenciais para a oclusão viral, gerando os corpos de oclusão (OBs). Na fase muito tardia, a proteína viral mais produzida é a POLIEDRINA/GRANULINA (MARUNIAK, 1986). Genes tardios ou muito tadios são transcritos pela RNA polimerase viral a partir de promotores que possuem a sequência DTAAG (VAN OERS; VLAK, 2007). A presença de uma região conservada de iniciação de transcrição (CAKT) é comum em baculovírus e também ocorre em eucariotos. Alguns vírus não apresentam essa região; provavelmente o vírus utilize outros mecanismos para expressão desses promotores (BLISSARD; ROHRMANN, 1989⁶; 1990⁷; 1991⁸ apud CASTRO et al., 1999).

Foi possível ainda identificar ORFs não codificantes, que apresentam diferentes padrões de repetições; estruturalmente muito parecidas com as regiões homólogas (*hrs*) encontradas em baculovírus. PlxyGV apresenta 4 *hrs* distribuídas ao longo do seu genoma, enquanto CpGV possui 14 *hrs* (HASHIMOTO et al., 2000; LUQUE et al., 2001). DsGV apresentou 7 regiões repetidas (*hrs*) dentro do genoma (Figura 18), variando em tamanho e número de repetições diretas. Os tamanhos das sequências analisadas foram 227 pb (*hr-1*, posição 1920 – 2147), 358 pb (*hr-2*, posição 29553 – 29910), 173 pb (*hr-3*, posição 40126 - 40298), 659 pb (*hr-4*, posição 42390 - 43048), 428 pb (*hr-5*, posição 65031 - 65458), 415 pb (*hr-6*, posição 73804 - 74218) e 513 pb (*hr-7*, posição 94471 - 94983). A primeira sequência (*hr-1*) apresentou 4 repetições diretas em tandem com tamanho entre 46 e 60 pb. Em *hr-2*, 7 sequências repetidas foram encontradas, sendo que 5 possuíam 60 pb e as outras duas eram curtas (34 pb e 24 pb). *Hr-3* apresentou 5 sequências diretas, cujo

⁶ BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. **Virology**, v. 170, p. 537- 555, 1989.

⁷ BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus diversity and molecular biology. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 127-155, 1990.

⁸ BLISSARD, G. W.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus gp64 gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE-1. **Journal of Virology**, v. 65, p. 5820-5827, 1991.

tamanho variava de 17 a 33 pb. Outro aspecto da sequência *hr-3* é o fato de estar totalmente dentro de Ds53, que pode não ser transcrita. Em *hr-4*, identificou-se 6 sequências repetidas com tamanho de aproximadamente 120 pb, exceto para uma repetição pequena de 25 pb. Em *hr-5*, foram encontradas 5 repetições com tamanho médio de 100 pb, exceto para duas repetições de 52 pb cada. Em *hr-6*, foram identificadas 6 repetições de 59 pb, exceto para uma sequência de 34 pb. Por último, *hr-7* apresentou 8 repetições entre 50 e 60 pb.

Essas regiões parecem ter um papel importante na transcrição de genes precoces e atuam como origens de replicação (ori). As *hrs* possuem múltiplas repetições em tandem, incluindo um palíndrome imperfeito dentro de uma repetição direta. Essas regiões apresentam similaridade significativa dentro do genoma, mas são muito variáveis quando se compara *hrs* de duas espécies diferentes (BERRETTA; ROMANOWSKI, 2008; KOOL et al., 1995). Em particular, observou-se que as *hrs* de DsGV não são tão similares entre si quanto deveriam ser. Mais estudos são necessários para o maior entendimento dessa característica no genoma de DsGV.

As sequências analisadas mostraram ser ricas em AT e o alinhamento das 7 *hrs* indicou a presença de palíndromes conservados de aproximadamente 14 pb nas extremidades do alinhamento analisado (Figura 19). Essa característica das *hrs* de DsGV também foi encontrada em todos betabaculovírus sequenciados completamente. CpGV, CrleGV, ChocGV, AdorGV e EpapGV, por exemplo, possuem palíndromes de cerca de 63-76 pb com blocos conservados de 13-15 pb nas extremidades dos mesmos (HILTON; WINSTANLEY, 2008).



Figura 18 – Posicionamento das 7 regiões homólogas (hrs) no genoma de DsGV.

Figura 19 – Alinhamento da região palindrômica imperfeita encontrada dentro das 7 regiões homólogas (*hrs*) do genoma de DsGV. O palíndrome apresenta um bloco conservado de cerca de 14 pb nas extremidades do mesmo (destacado por um quadrado) e localiza-se no meio de uma repetição direta. Colunas em preto, cinza escuro, cinza claro e branco denotam bases com similaridade de 100%, 80-100%, 60-80% e inferior a 60%, respectivamente. A posição (inicial e final) de cada sequência no genoma e a sequência consenso estão anotadas do lado esquerdo e acima do alinhamento, respectivamente.



5.3 Análise do conteúdo gênico

Das 116 ORFs analisadas no genoma de DsGV, 99 são semelhantes a sequências presentes em outros baculovírus, de acordo com a análise realizada através da ferramenta Blast (blastp). Dezessete ORFs não apresentaram possível homologia com sequências já conhecidas desses vírus, sendo, portanto, ORFs únicas de DsGV. Das 17 ORFs únicas de DsGV, 13 não apresentaram similaridade significativa em relação às sequências depositadas no GenBank.

A análise do genoma completo, comparando com o estudo de Garavaglia et al. (2012), permitiu identificar os 37 "core genes", genes conservados em todos os baculovírus sequenciados até o momento. Sessenta e três ORFs de DsGV mostraram similaridade significativa a sequências presentes em AcMNPV e em betabaculovírus, tais como CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV. Ds23 (efp) codifica uma proteína de 456 aminoácidos que se mostrou similar a uma seguência presente em AcMNPV (ac23, 22% id aa), em betabaculovírus, tais como crle30, pira27 e choc23 (40% id aa) e em deltabaculovírus (Culex nigripalpus NPV – cuni104: 22% id aa). Oito ORFs (granulina (ds1), ac145 (ds7), ac106 (ds43), lef-11 (ds49), iap-3 (ds61), dbp (ds65), ac75 (ds90) e fp25k (ds99)) parecem ser semelhantes a sequências comuns de representantes dos alfa-, beta- e gamabaculovírus. Quatorze ORFs (ds3, ds5, ds6, ds21, ds44, ds45, ds48, ds55, ds56, ds57, ds64, ds69, ds94 e ds116) mostraram ser similares a sequências presentes somente em membros dos alfa- e betabaculovírus. Dezenove ORFs foram encontradas somente em betabaculovírus e, portanto, foram consideradas ORFs específicas de GVs (Tabela 10).

Onze ORFs de DsGV se mostraram mais conservadas (66 – 93% id aa) em comparação com sequências de CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV: granulina (ds1; a mais conservada), odv-e18 (ds8), odv-e56 (ds11), pep2 (ds16), ds20, pif-2 (ds39), ds43, ubq (ds45), bv-e31 (ds55), vlf-1 (ds88) e lef-9 (ds98). As ORFs menos conservadas (23 – 41% id aa) encontradas nesse vírus foram: efp (ds23), metaloproteinase (ds37), ds41, ds60, ds63, ds67, ds85, ds91 (a menos conservada), desmoplakin (ds93), ds96, ds112 (Tabela A.1).

Tabela 10 – Genes identificados em DsGV, agrupados por função, de acordo com a comparação realizada com os outros baculovírus, baseando-se em Garavaglia et al. (2012). Alguns genes foram representados pelas ORFs de AcMNPV.

	Genes presentes	Genes	Genes	Genes	Genes
Euncõos	em todos os	presentes em	presentes em	específicos	presentes
Fullções	baculovírus	alfa-, beta- e	alfa- e beta-	de beta-	em alguns
	(core genes)	gama-	baculovírus	baculovírus	baculovírus
		baculovírus			
	p47 (ds54), lef-5 (ds73),		pk-1 (ds3), ie-1		
Transcrição	lef-4 (ds82), vlf-1 (ds88), lef-9 (ds98) e lef-8 (ds110)	lef-11 (ds49)	(ds5), 39k (ds48) e lef-6 (ds64)		lef-10 (ds114)
Replicação	lef-2 (ds32), lef-1 (ds58), helicase-1 (ds78) e dna polimerase (ds92)	dbp (ds65)	bv-e31 (ds55), lef- 3 (ds94) e me53 (ds116)		dutpase (ds75), dna ligase (ds103), helicase-2 (ds106), rr1 (ds107) e rr2a (ds108)
Estrutural	odv-e18 (ds8), p49/49k (ds9), odv-e56/pif-5 (ds11), p6.9, gp41 (ds19), vp91 (ds22), pif- 3 (ds27), pif-2 (ds39), odv-ec43 (ds46), pif- 0/p74 (ds50), pif-1 (ds59), p48 (ds68), p40 (ds71), 38k (ds74), pif- 4/odv-e28 (ds77), odv- e25 (ds79), ac93 (ds80), p33 (ds81), vp39 (ds83), desmoplakin (ds93), pif- 6 (ds95), ac53 (ds111) e vp1054 (ds115)	granulina (ds1), ac145 (ds7), ac75 (ds90) e fp25k (ds99)	tlp20 (ds21) e p24 (ds56)	ds13 (pep1), ds15 (pep/p10) e ds16 (pep2)	efp (ds23)*, odv-e66 (ds28), p13 (ds38) e gp64 (ds109)
Auxiliar /interação com o hospedeiro	ac81 (ds20), odv-e27 (ds84), e alk-exo (ds105)	iap-3 (ds61)	ubiquitina (ds45)	iap-5 (ds97) e mp-nase (ds37)	acetiltransferase (ds52)
Função des- conhecida	ac78 (ds87)	ac106 (ds43)	ac146 (ds6), 38.8kda (ds57), ac102 (ds69) e ac110 (ds44)	ds4, 17, 26, 29, 42, 47, 53, 63, 67, 85, 86, 96, 112 e 113	

Nota: * Único gene comum a alfa-, beta- e deltabaculovírus.

5.3.1 Genes envolvidos na transcrição viral

No presente estudo, foram identificados os 6 genes conservados em todos os baculovírus sequenciados ("core genes") envolvidos na transcrição viral: lef-4 (ds82), lef-5 (ds73), lef-8 (ds110), lef-9 (ds98), p47 (ds54) e vlf-1 (ds88). Como descrito anteriormente, os genes tardios e muito tardios são transcritos pela RNA polimerase viral, que é constituída por 4 fatores de expressão tardios (conhecidos como LEFs): lef-4, lef-8, lef-9 e p47. Esses genes foram identificados primeiramente em AcMNPV; posteriormente, homólogos foram encontrados demais baculovírus nos sequenciados totalmente até o momento (OKANO et al., 2006). O fator de expressão tardio lef-4 é um componente essencial da RNA polimerase viral e codifica a enzima guanililtransferase (com atividade na região C terminal), importante para o processo de capeamento da extremidade 5' do RNA mensageiro, e RNA trifosfatase (com atividade na região N terminal), não essencial para a replicação viral em larvas e em cultura de células (LI; GUARINO, 2008). Estudos de mutantes lef-4 sensíveis a temperatura e experimentos de silenciamento de RNA mostraram que sua função de capeamento é essencial para o processo de replicação do DNA viral. Além disso, lef-4 também possui papel na expressão transitória de genes tardios e muito tardios (KNEBEL-MORSDORF et al., 2006; PARTINGTON et al., 1990; PASSARELLI; MILLER, 1993).

As proteínas codificadas por *lef-8* e *lef-9* possuem motivos comuns àquelas que participam do centro catalítico de RNAs polimerases conhecidas e, possivelmente, desempenham papel na formação do sítio catalítico (CROUCH et al., 2007; TITTERINGTON et al., 2003). LEF-8 possui um motivo C terminal de 13 aminoácidos que é conservada em outras polimerases (animais, plantas, bactérias e arqueobactérias) (PASSARELLI et al., 1994). Esse motivo de 13 aminoácidos está presente na região H conservada da RNA polimerase de *Escherichia coli* e é sugerida ser parte do sítio catalítico do complexo enzimático dessa bactéria (SCHULTZ et al., 1993). *Lef-9* codifica um motivo semelhante (NADFDGF) àquele encontrado na subunidade β da RNA polimerase de *E. coli* e em outras subunidades maiores da RNA polimerase (LU; MILLER, 1994). É proposto que os resíduos de ácido aspártico conservados presentes no motivo de LEF-9 sejam essenciais para a atividade da subunidade maior da RNA polimerase da *E. coli*, necessária para a expressão de genes tardios (CROUCH et al., 2007).

O papel de *p47* ainda não foi elucidado, porém o produto codificado pelo gene já foi localizado no núcleo de células infectadas (CARSTENS et al., 1993⁹ apud ACHARYA; GOPINATHAN, 2002). Embora a função exata de *p47* seja desconhecida, estudos mostram que vírus com um alelo *p47* sensível a temperatura é defeituoso no processo de produção de proteínas tardias e muito tardias em temperaturas não permissivas (CARSTENS et al., 1994; PARTINGTON et al., 1990). Experimentos *in vitro* sugerem que *lef-5*, identificado inicialmente em AcMNPV, atue como um fator de iniciação, que não interage com o DNA; em vez disso, aumenta a capacidade da polimerase em formar complexos de iniciação logo após a enzima reconhecer os promotores de baculovírus (GUARINO et al., 2002a). Berretta e Passarelli (2006) mostraram ainda que a proteína LEF-5 de *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) pode substituir a proteína LEF-5 de AcMNPV em ensaios de expressão tardia transitória.

O fator de expressão muito tardio (VLF-1) é uma provável tirosina recombinase necessária para a expressão de genes muito tardios e também possui papel estrutural na produção dos fenótipos BV e ODV. Experimentos mostram que a proteína VLF-1, localizada no nucleocapsídeo, é indispensável para a montagem do capsídeo e possui papel essencial nas fases finais do processo de empacotamento do DNA (VANARSDALL et al., 2006). Yang e Miller (1998)¹⁰ apud Mistretta e Guarino (2005) sugerem que a expressão da POLIEDRINA/GRANULINA é regulada pela concentração intracelular de VLF-1. Isto é, quanto maior for o nível de VLF-1, que deve ocorrer após 24 horas de infecção, maior será a expressão da proteína POLIEDRINA/GRANULINA.

Genes encontrados em baculovírus, que infectam insetos lepidópteros, também foram detectados em DsGV: *pk-1* (*ds3*), *39k* (*ds48*), *lef-6* (*ds64*) e *lef-11* (*ds49*) (presente também em gamabaculovírus). DsGV apresentou ainda o gene *lef-10* (*ds114*), encontrado na maioria dos alfa- e betabaculovírus. Em relação ao gene *lef-6* (*ds64* codifica uma proteína de 81 aminoácidos), estudos mostram que geralmente esse gene é menor em GVs (86 -102 aminoácidos) do que em NPVs (138-187 aminoácidos). Estudos funcionais são necessários para se confirmar se

⁹ CARSTENS, E. B.; LU, A. L.; CHAN, H. L. B. Sequence, transcriptional mapping, and overexpression of p47, a baculovirus gene regulating late gene expression. Journal of Virology, v. 67, p. 2513-2520, 1993.

 ¹⁰ YANG, S.; MILLER, L. K. Control of baculovirus polyhedrin gene expression by very late factor
 1. Virology, v. 248, p. 131-138, 1998.

esse gene em GVs realmente é um gene homólogo ao *lef-6* de NPVs (WORMLEATON et al., 2003).

O gene *pk-1* codifica uma proteína quinase que pode estar atuando como fator de transcrição de genes muito tardios, regulando, por exemplo, o promotor da *poliedrina* (MISHRA et al., 2007, 2008). *Lef-6* e *39k/pp31* não apresentam papel essencial na replicação viral, porém parecem acelerar a transcrição tardia ou aumentar os níveis da maioria dos transcritos virais, respectivamente (LIN; BLISSARD, 2002a; YAMAGISHI et al., 2007). O gene *lef-11*, identificado inicialmente em AcMNPV, mostrou ser um fator de transcrição importante para a expressão de genes muito tardios. Posteriormente, descobriu-se que ele é essencial para a replicação do DNA durante o ciclo de infecção (LIN et al., 2001; LIN; BLISSARD, 2002b). *Lef-10* parece ser um cofator transcricional em baculovírus. Estudos envolvendo o baculovírus BmNPV demonstraram que esse gene atua tanto na replicação quanto na transcrição e que sua deleção prejudica diretamente o nível de expressão de genes precoces (YU et al., 2013).

Outros genes que possuem papel na transcrição viral de alguns baculovírus são *ie-0, ie-1* e *ie-2*. No entanto, somente *ie-1* (*ds5*) está presente em DsGV e mostrou pouca conservação, em torno de 41-47% de identidade de aminoácidos, em relação a sequência correspondente em CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV (Tabela A.1). Esses genes mostram-se pouco conservados entre baculovírus (WORMLEATON et al., 2003).

O gene *ie-1*, expresso na fase imediata precoce, é o principal regulador da transcrição de baculovírus e está presente em todos betabaculovírus. Ensaios envolvendo transfecção de plamídeos mostram que IE-1, uma proteína de 66.9 kDa, é uma transativadora de expressão de vários genes precoces e alguns genes de manutenção celular (genes housekeeping) (KOOL et al., 1994¹¹ apud LIN et al., 2010). O gene *ie-0*, não identificado no presente estudo, é outro transativador encontrado em alguns baculovírus. *Ie-0*, presente em *Plutella xylostella* GV (PLxyGV) (FAN et al., 2012), codifica uma proteína de cerca de 72.6 kDa que é idêntica a IE-1, exceto pelos 54 aminoácidos na porção N terminal. É a única proteína conhecida de baculovírus que é produzida por processo de splicing. IE-0

¹¹ KOOL, M.; AHRENS, C. H.; GOLDBACH, R. W.; ROHRMANN, G. F.; VLAK, 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.

mostrou ser capaz de promover a replicação de um plasmídeo, a partir da origem de replicação hr-5 de AcMNPV, em experimentos de transfecção transitória, utilizando 8 plasmídeos que expressavam os genes de AcMNPV: dnapol, helicase, lef-1, lef-2, lef-3, p35, ie-2 e lef-7. Além disso, IE-0 foi capaz de transativar a expressão dos promotores 39k, ie-1 e poliedrina de AcMNPV. Baixos níveis da proteína IE-0 são observados guando se tem máxima expressão de genes muito tardios. Altos níveis de IE-0 resultam em declínio da expressão gênica. No entanto, necessita-se de altos níveis de IE-1 para obter a máxima expressão desses genes. De forma curiosa, a co-expressão de IE-0 e IE-1 resulta num efeito antagônico sobre a expressão de genes muito tardios (HUIJSKENS et al., 2004; LURIA et al., 2012). Outro gene não identificado em DsGV e nos demais betabaculovírus e alfabaculovírus do grupo II é o ie-2. A proteína IE-2 foi detectada no período de 2 horas a 12-24 horas após a infecção em células de Spodoptera frugiperda e sabe-se que seu promotor é transcrito pela RNA polimerase II do hospedeiro e, portanto, também é um gene da fase precoce (KRAPPA et al., 1995; WANG et al., 2011). Liu et al. (2009) sugere que ie-2 é um transativador que poderia favorecer significativamente o uso de baculovírus para transferência gênica em células de mamíferos e produção proteica.

Vale ressaltar que os genes relacionados à transcrição tardia encontrados em DsGV (*lef-4*, *lef-5*, *lef-6*, *lef-8*, *lef-9*, *lef-10*, *lef-11*, *39 k*, *p47* e *vlf-1*) geralmente são mais conservados que os ativadores de transcrição precoce (IJKEL et al., 1999). Dentro do grupo dos fatores de transcrição tardia, os três genes que se mostraram mais conservados em DsGV em relação a CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV foram *vlf-1* (*ds88*) (67-77% id aa), *lef-9* (*ds98*) (72-75%), *lef-5* (*ds73*) (66-71%) e *lef-8* (*ds110*) (67-70%). Os genes menos conservados foram *39k* (*ds48*) (41-51%) e *lef-6* (*ds64*) (39-56%) (Tabela A.1).

DsGV não apresentou o gene *lef-12*, presente em alfabaculovírus do grupo I, que atua na expressão de genes tardios (GUARINO et al., 2002; RAPP et al., 1998) e *pe38*, que parece ser um transativador transcricional em AcMNPV para a produção de BVs, além de aumentar a replicação do DNA em ensaios transitórios. *Pe38* foi encontrado em alguns betabaculovírus tais como CpGV, CrleGV, PhopGV e PiraGV. Esses genes parecem não ser essenciais em baculovírus (FERRELLI et al., 2012; MILKS et al., 2003).

5.3.2 Genes envolvidos na replicação viral

O genoma de DsGV apresentou os "core genes" *dna polimerase* (*ds92*), *lef-1* (*ds58*), *lef-2* (*ds32*) e *helicase-1* (*ds78*). A DNA POLIMERASE se mostrou mais conservada (65-68% id aa) enquanto a LEF-2, menos conservada (48-54%), quando comparadas às sequências correspondentes de CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV. Esses 4 genes são essenciais para a replicação do DNA viral e são moderamente bem conservados (WORMLEATON et al., 2003). Soma-se a esse grupo de genes essenciais para a replicação, *ie-1* (*ds5*) e *lef-3* (*ds94*) (presentes em alfa- e betabaculovírus) (MIKHAILOV, 2003) que, diferentemente dos outros 4 genes, são pouco conservados entre os granulovírus analisados no presente estudo (35-47%) (Tabela A.1).

A *dna polimerase* (*dnapol*) de DsGV codifica um polipeptídeo de 1025 aminoácidos (aa) (Tabela A.1). Estudos bioquímicos demonstram que a DNApol de baculovírus está estritamente relacionada à α - e δ DNApols de outros vírus, tais como adenovírus, poxvírus e herpes simples ("herpes simplex virus" – HSVs). A DNApol possui 7 regiões conservadas que provavelmente são domínios funcionais relacionados com o reconhecimento do substrato (FENG et al., 2012; HANG; GUARINO, 1999; HWANG et al., 2004). A HELICASE é uma enzima essencial para a abertura das fitas de DNA e a presença de um domínio ATPase é requerida para essa separação (ROHRMANN, 2008).

LEF-1 é uma DNA primase (MIKHAILOV; ROHRMANN, 2002) e LEF-2 é um fator associado a primase. A interação dessas proteínas é importante para o processo de replicação viral. Estudos sugerem que LEF-2 não é necessário para o início da replicação, apresentando papel durante a amplificação do DNA viral. A proteína codificada por *lef-2* está presente nos dois fenótipos virais (BVs e ODVs), estando concentrada no nucleocapsídeo da partícula viral. Isso sugere que a proteína é necessária imediatamente após a entrada do vírus na célula hospedeira para a eficiência da replicação (PASSARELLI; MILLER, 1993; WU et al., 2010). *Lef-3* codifica uma proteína que se liga a fita simples de DNA e também realiza o transporte da helicase (P143) para o núcleo durante o processo de replicação. Possivelmente também está envolvido com a regulação da atividade de uma nuclease alcalina (AN) durante a replicação do DNA (HANG et al., 1995; MIKHAILOV et al., 2004; WU; CARSTENS, 1998). IE-1 além de ser um regulador

transcricional também promove a replicação; provavelmente se liga às origens de replicação (*hrs*) (TAGGART et al., 2012).

Soma-se a essas descobertas, a identificação de genes encontrados em outros baculovírus que infectam lepidópteros: *bv-e31* (*ds55*), *dbp* (*ds65*) (presente em gamabaculovírus) e *me53* (*ds116*). Desses genes aquele que apresentou a mais alta similaridade em relação à sequência de CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV foi *bv-e31* (72-76% id aa). Esses genes influenciam a replicação, porém suas funções nesse processo ainda não foram elucidadas (ROHRMANN, 2008). No entanto, sabese que DBP é uma proteína de ligação ao DNA, BV-E31 parece estar associada ao envelope de BVs e ME53 regula a síntese do DNA, sendo necessária para a produção eficiente de BVs (GARAVAGLIA et al., 2012; WANG et al., 2005).

O genoma de DsGV não apresentou o gene *lef-7* encontrado em alfabaculovírus do grupo I, alguns alfabaculovírus do grupo II e 4 betabaculovírus (*Xestia c-nigrum* GV, *Helicoverpa armigera* GV, *Pseudaletia unipuncta* GV e *Epinotia aporema* GV). A proteína codificada pelo *lef-7* parece ser um acentuador ("enhancer") da replicação em AcMNPV e BmNPV (GOMI et al., 1997; LU et al., 1997).

DsGV parece codificar uma DNA LIGASE (*ds103*) de 545 aminoácidos e uma segunda helicase (HELICASE-2) (*ds106*) de 430 aminoácidos (Tabela A.1). O gene da *dna ligase* é encontrado em outros betabaculovírus assim como em 3 alfabaculovírus do grupo II (*Lymantria dispar* NPV, *Lymantria xylina* NPV e *Orgyia leucostigma* NPV) e sua presença estaria associado à existência de *helicase-2* (FERRELLI et al., 2012). Esses genes podem ainda estar envolvidos com a reparação do DNA e recombinação (KUZIO et al., 1999).

Outros genes detectados em DsGV foram: *dutpase* (*ds75*), *rr1* (*ds107*) e *rr2a* (*ds108*). A maior (RR1) e a menor subunidade (RR2A) da redutase ribonucleotídeo também foram encontradas em apenas 3 betabaculovírus (EpapGV, *Phthorimaea operculella* GV e CpGV). Em relação às sequências de CpGV (*cp127* e *cp128*), RR1 (*ds107*) e RR2A (*ds108*) mostraram 54 e 57% id aa, respectivamente (Tabela A.1). O gene da *dutpase* está presente em alfabaculovírus e alguns betabaculovírus, tais como EpapGV, *Spodoptera litura* GV e *Agrotis segetum* GV. Quando comparada à sequência presente em EpapGV (*epap13*), a proteína DUTPASE de DsGV mostrou 58% id aa. É uma desoxiuridina trifosfato nucleotídeohidrolase, que associada às

subunidades RR1 e RR2A, está envolvida no metabolismo de nucleotídeos. Essas enzimas reduzem rNTPs da célula hospedeira para dNTPs (HERNIOU et al., 2003).

5.3.3 Genes com papel estrutural

Foram identificados 23 "core genes" estruturais: *p*49/49*k* (*d*s9), *p*6.9 (*d*s72), *odv-e18* (*ds8*), *gp*41 (*ds19*), *odv-ec43* (*ds46*), *vp39* (*ds83*), *vp1054* (*ds115*), *vp91* (*ds22*), *pif-0/p74* (*ds50*), *pif-1* (*ds59*), *pif-2* (*ds39*), *pif-3* (*ds27*), *pif-4/odv-e28* (*ds77*), *odv-e56/pif-5* (*ds11*), *pif-6* (*ds95*), *38k* (*ds74*), *odv-e25* (*ds79*), *ac93* (*ds80*), *p48/ac103* (*ds68*), *p33* (*ds81*), *desmoplakin* (*ds93*), *p40/ac101* (*ds71*) e *ac53* (*ds111*). Os genes mais conservados em relação às sequências equivalentes em CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV foram *odv-e18/pif-5*, *odv-e56*, *gp41*, *pif-2*, *p48/ac103* e *odv-e25* cuja identidade de aminoácidos variou de 66 a 76%. Dentre esses genes, os menos conservados foram *desmoplakin* (*31-33%* id aa) e *ac93* (40-49% id aa).

Outros achados em DsGV foram: *granulina* (*ds1*), *ac145* (*ds7*), *tlp20* (*ds21*), *efp* (*ds23*), *odv-e66* (*ds28*), *p13* (*ds38*), *p24* (*ds56*), *ac75* (*ds90*) e *fp25k* (*ds99*). Como visto anteriormente, o gene da *granulina* é o mais conservado observado em betabaculovírus. *Fp25k* mostrou alta similaridade (66-72% id aa) em relação à sequência correspondente presente nos 4 granulovírus comparados na Tabela A.1. O gene estrutural *efp* apresentou a menor conservação dentre esses genes (38-40% id aa).

Em geral, o ciclo de infecção por baculovírus, inicia-se com a formação do fenótipo viral BV, vírus extracelular, e no final da infecção é produzido o segundo fenótipo viral (ODVs – vírus derivado de oclusão). Os ODVs estão presentes dentro dos corpos de oclusão (OBs), também denominados grânulos. Esses fenótipos virais apresentam várias diferenças, incluindo a origem dos envelopes virais, morfologia, composição protéica do envelope e papel funcional (BLISSARD, 1996). Os BVs, constituídos por apenas um nucleocapsídeo, são formados a partir do envelope da membrana plasmática do inseto hospedeiro. Os ODVs possuem um ou vários nucleocapsídeos envoltos por um envelope derivado do núcleo da célula hospedeira, que possui proteínas diferentes do envelope dos BVs, facilitando a infecção sistêmica (BRAUNAGEL et al., 2003; ROHRMANN, 2011). As proteínas exclusivas de BVs, GP64 e proteína F (*efp/ds23*), serão discutidas mais adiante (tópico 5.3.6.).

A principal proteína estrutural do corpo de oclusão é a GRANULINA (em ou POLIEDRINA (em alfabaculovírus). POLIEDRINA betabaculovírus) е GRANULINA estão estritamente relacionadas e são proteínas muito tardias, produzidas em níveis muito altos. Essas proteínas possuem aproximadamente 250 aminoácidos (30 kDa) e são uma das mais conservadas encontradas nos baculovírus (GARCIA-MARUNIAK et al., 2004; WANG; GRANADOS, 1997). Curiosamente, a proteína presente no corpo de oclusão do único deltabaculovírus sequenciado totalmente (Culex nigripalpus NPV - CuniNPV) parece não ser homóloga à proteína dos OBs dos demais baculovírus e apresenta um tamanho 3 vezes maior (AFONSO et al., 2001).

O gene *p49* (*ac142*) está relacionado aos dois fenótipos virais BV e ODV. Aparentemente, o gene deletado em baculovírus parece afetar a formação do nucleocapsídeo, porém não prejudica a síntese de DNA (VANARSDALL et al., 2007). Microscopia eletrônica mostra que a proteína codifica por *ac142* é necessária para o envelopamento do nucleocapsídeo para formar ODV e sua posterior oclusão (MCCARTHY et al., 2008).

Em relação ao gene p6.9 (ds72), a ferramenta Blast não encontrou possíveis sequências homólogas (Tabela A.1). No entanto, o alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica de ds72 com outras p6.9 disponíveis no GenBank, tais como de AcMNPV e CpGV, mostrou similaridade significativa entre elas (AcMNPV: 41% id; CpGV: 58% id). Além disso, a sequência deduzida de aminoácidos de ds72 apresentou grande quantidade do aminoácido arginina e foi encontrado um motivo de promotor tardio (DTAAG) dentro dos 200 pb antes do ATG. Sabe-se que p6.9, um gene tardio, codifica uma proteína básica, pequena e rica em arginina, que possui papel na condensação e empacotamento do DNA viral dentro do capsídeo (TWEETEN et al., 1980¹² apud LIU et al., 2012).

P33 é uma sulfidril oxidase associada aos dois fenótipos virais, sendo essencial para a produção de BVs e a formação de múltiplos nucleocapsídeos nos ODVs (WU; PASSARELLI, 2010). P40, também conhecida como ODV-C42, pode atuar na formação dos nucleocapsídeos, mas não parece afetar a replicação viral (VANARSDALL et al., 2007). O produto codificado pelo gene *38k*, associado ao BV e ODV, parece interagir com VP39 (principal proteína do capsídeo) e VP1054 e essa

¹² TWEETEN, K. A.; BULLA, L. A.; CONSIGLI, R. A. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsids. J. Virol., v. 33, p. 866–876, 1980.

interação é essencial para a montagem do nucleocapsídeo (WU et al., 2006). VP91 (*ac83*) pode ter papel importante na montagem de nucleocapsídeos e no estabelecimento da infecção oral (ZHU et al., 2013). *Ac93* parece desempenhar um papel importante na formação do envelope do ODV e na saída dos nucleocapsídeos do núcleo (YUAN et al., 2011). Embora a função de P48 (*ac103*) seja desconhecida, acredita-se que a proteína tenha papel na produção de BV e no envelopamento de ODV no ciclo de vida de AcMNPV (YUAN et al., 2008). Liu et al. (2008) sugerem que o gene *ac53* seja essencial para a produção viral e esteja envolvido na montagem de nucleocapsídeo. A proteína GP41, proteína do tegumento, está presente entre o envelope viral e o capsídeo. É uma proteína essencial para a saída dos nucleocapsídeos do núcleo (OLSZEWSKI; MILLER, 1997). DESMOPLAKIN também é uma proteína relacionada à saída dos nucleocapsídeos do núcleo, porém também possui papel na formação do corpo de oclusão (ZHANG et al., 2012).

P74 (PIF-0), PIF-1, PIF-2, PIF-3, PIF-4 (ODV-E28), PIF-5 (ODV-E56), PIF-6 (ac68), ODV-E18, ODV-E25, ODV-EC43 e ODV-E66 são proteínas presentes no fenótipo ODV. P74, PIF-1, PIF-2 e PIF-3 são proteínas essenciais no processo de infecção oral (per os infectivity – PIFs), isto é, de entrada do vírus ocluso (ODV) na célula hospedeira (PENG et al., 2012). Os genes PIFs são genes conservados nos baculovírus. Sugere-se que todas as proteínas associadas ao ODV se ligam (interagem) com as células intestinais do hospedeiro e atuam como moléculas sinalizadoras de localização nuclear, facilitando o tráfico da proteína para o núcleo (LI et al., 2007; PENG et al., 2010). Odv-e18 é um gene tardio que codifica uma proteína do envelope de ODV, porém estudos mostram que também é essencial para mediar a produção de BVs (MCCARTHY; THEILMANN, 2008). Odv-e66, presente em baculovírus que infectam insetos lepidópteros, podem ser importantes para a penetração do vírus através das barreiras extracelulares durante a infecção primária (HERNIOU et al., 2003; VIGDOROVICH et al., 2007). Ac68 (pif-6) parece estar envolvido na morfogênese do poliedro/grânulo. A proteína PIF-6 foi detectada em ODVs e também em BVs, porém a perda do gene *pif-6* parece não prejudicar o desenvolvimento de ODV e formação da partícula oclusa (NIE et al., 2012).

Foi demonstrado que quando *fp25k*, um gene altamente conservado em alfa-, beta- e gamabaculovírus, é deletado a produção de BV aumenta e a produção de ODVs diminui. Pouco se sabe sobre a transição da produção de BVs para ODVs, porém parece que *fp25* possui um papel importante nesse processo (GARAVAGLIA et al., 2012; WU et al., 2005). A presença da proteína P13, encontrada em alfabaculovírus do grupo II, parece acelerar a morte da larva infectada, porém mais estudos são necessários para se conhecer a função exata dela no ciclo viral (DU et al., 2007; LU et al., 2012). TLP20, presente em alfa- e betabaculovírus, pode não ser uma proteína essencial, pois quando o gene foi deletado em *Bombyx mori* NPV (Bm68), o vírus aparentemente não mostrou alteração, porém a produção de BVs e a replicação do DNA foram afetadas (ROHRMANN, 2008). P24, presente em alfa- e betabaculovírus, pode estar associada a BVs e ODVs, porém sua função ainda é desconhecida (ROHRMANN, 2011). *Ac75 (ds90)* codifica uma proteína necessária para a produção de BVs e *ac145 (ds7)* codifica uma proteína de OBs, que está envolvida na infeção oral (GARAVAGLIA et al., 2012).

5.3.4 Genes auxiliares e de interação com o hospedeiro

Os genes auxiliares não são essenciais para a replicação, porém proporcionam vantagens seletivas ao vírus no processo de invasão e infecção nos insetos hospedeiros. Estudos mostram que esses genes possuem papel no controle da fisiologia, desenvolvimento e comportamento do hospedeiro (O'REILLY, 1997; THIEM, 2009). O genoma de DsGV apresentou os genes auxiliares *alk-exo* (*ds105*), *ubiquitina* (*ds45*), *acetiltransferase* (*ds52*) e *iap-3* (*ds61*). DsGV parece não conter ORFs repetidas encontradas em alguns baculovírus (genes *bro* – "Baculovirus repeated orf"), *egt, quitinase, catepsina*, entre outros genes.

Estudos sugerem que alguns genes auxiliares, tais como *iap* e *ubiquitina*, tenham sido adquiridos a partir do hospedeiro através da transferência lateral de genes, visto que durante a replicação viral no núcleo da célula hospedeira, o vírus pode incorporar DNA do inseto (HUGHES; FRIEDMAN, 2003).

O gene *alk-exo* (exonuclease alcalina) é um gene conservado em todos os baculovírus sequenciados (core gene). Em DsGV, o gene mostrou 53-64% id aa em relação a provável sequência homóloga presente em 4 granulovírus (Tabela A.1). Essas nucleases alcalinas quando associadas a LEF-3 formam uma cauda de DNA fita simples na extremidade 3' de cada DNA recém sintetizado ao digerir uma porção das fitas de DNA na direção 5'-3' (MIKHAILOV et al., 2003). O gene da *acetiltransferase*, sem função definida, mostrou alta similaridade para *pira56* (66% id aa) e *choc48* (58% id aa).

A *ubiquitina* (*ubq*) foi o segundo gene mais conservado encontrado em DsGV, atingindo o valor de 75% de id aa em relação a AcMNPV (*ac35*) e 82-85% em relação a *cp54*, *crle52*, *pira45* e *choc39* (Tabela A.1). A proteína codificada por esse gene foi encontrada em todos alfabaculovírus do grupo I e betabaculovírus e maioria dos alfabaculovírus do grupo II. É um gene altamente conservado que parece inibir passos na via de degradação do hospedeiro com o intuito de impedir a destruição de uma proteína (s) viral (s) de vida curta (HAAS et al., 1996).

Os genes *p35* e iaps, inibidores de apoptose não homólogos, possuem um papel central no processo apoptótico e inflamatório, prevenindo a morte da célula hospedeira. Esse fato, consequentemente, aumenta o tempo necessário para a replicação do vírus. O gene *p35*, encontrado em alguns alfabaculovírus tais como AcMNPV e BmNPV, não foi identificado em DsGV. As proteínas iaps, presentes em alfa- e betabaculovírus, apresentam como característica principal a presença de uma ou mais repetições do baculovírus IAP (BIR) e um anel de zinco Cys/His C-terminal (RING). O domínio BIR é constituído de uma dobra de ligação ao zinco de cerca de 70 aminoácidos que é essencial para a interação e inibição das caspases (KIM et al., 2011).

O gene eqt, não identificado em DsGV, modifica o hormônio da ecdise e retarda a mudança de instar da larva infectada (O'REILLY; MILLER, 1989). Os genes bro, encontrados em alguns baculovírus como em AcMNPV (ac2), CpGV (cp63), BmNPV (5 cópias) e Limantria dispar MNPV (16 cópias), são altamente repetitivos e conservados. Sua função ainda é desconhecida, porém sabe-se que eles se ligam ao DNA. Sua característica principal é a presença de um domínio conservado na região N terminal da proteína. Eles são resultado de vários eventos de duplicação gênica e podem variar em número e comprimento mesmo entre vírus proximamente relacionados (BIDESHI et al., 2003; KUZIO et al., 1999). Os genes da quitinase e da catepsina, também não detectados no presente estudo, foram encontrados em alfabaculovírus do grupo I, tais como AcMNPV e BmNPV. O gene da quitinase é expresso na fase tardia e seu produto associado à CATEPSINA resulta em liquefação do tecido do hospedeiro (HAWTIN et al., 1997). A ausência desses genes em alguns baculovírus como Anticarsia gemmatalis MNPV e ChocGV e, em especial, DsGV, pode ser responsável pela perda da capacidade do vírus liquefazer o corpo do inseto infectado após sua morte. O processo de liquefação após a morte do hospedeiro seria uma forma de favorecer a dispersão do vírus no ambiente (FEDERECI, 1997). Esses genes foram provavelmente adquiridos horizontalmente pelos baculovírus a partir de bactérias (HAWTIN et al., 1995, HUGHES; FRIEDMAN, 2003).

Odv-e27 (*ds84*), um core gene, pode estar associado à regulação do ciclo celular do hospedeiro, funcionando como uma ciclina e sendo encontrada tanto em BVs quanto em ODVs. A proteína ODV-E27 é sugerida ser uma ciclina multifuncional que pode interagir com qualquer ciclina quinase CDC2 ou CDK6 e o complexo proteico ODV-E27-CDK6 também pode se ligar ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (BELYAVSKYI et al., 1998; HARRISON et al., 2010). *Ac81 (ds20)* é um core gene com função pouco conhecida, porém parece interagir com actina 3 do hospedeiro no citoplasma da célula durante a fase tardia e não foi encontrada nos fenótipos BV e ODV, somente na célula que sofreu lise. Esse dado sugere que ela é uma proteína funcional não estrutural (CHEN et al., 2007). Outro core gene identificado em DsGV com função ainda desconhecida foi *ac78 (ds87)* (GARAVAGLIA et al., 2012).

5.3.5 Genes específicos de GVs

Comparando os genomas analisados por Luque et al. (2001), Lange e Jehle, 2003, Escasa et al. (2006) e Ferrelli et al. (2012) com o genoma do presente estudo, foi possível identificar 19 genes específicos de betabaculovírus: *ds4, ds13 (pep1), ds15 (pep/p10), ds16 (pep2), ds17, ds26, ds29, ds37 (metaloproteinase), ds42, ds47, ds53, ds63, ds67, ds85, ds86, ds96, ds97 (iap-5), ds112 e ds113*.

Cinco genes específicos presente em DsGV, *pep1*, *pep/p10*, *pep2*, *metaloproteinase* e *iap-5*, já foram caracterizados anteriormente (ROHRMANN, 2011). *Pep2* se mostrou mais conservado (66-71% id aa) enquanto *metaloproteinase*, o menos conservado (36-40% id aa), em relação a CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV.

PEP1 e PEP2 possuem sequências correspondentes à região N terminal da proteína do envelope viral (superfamília Baculo PEP N; pfam04512). PEP é a principal proteína presente na superfície de corpos de oclusão (OBs) e possui papel na estabilidade e prevenção de fusão dos grânulos, durante sua formação (BATEMAN et al., 2004; VAN LENT et al., 1990). São membros de uma família de genes altamente conservados e específicos de GVs, tais como CpGV, PiraGV,

CrleGV, ChocGV, *Phthorimaea operculella* GV e *Clostera anachoreta* GV (53-71% id aa) (blastp). Lange e Jehle (2003) sugerem que esses genes são provavelmente parálogos que foram duplicados no ancestral comum num período anterior ao início da radiação de GVs em diferentes espécies.

P10, um gene hiperexpresso durante a fase muito tadia (12-15 horas após a infecção) (ROHEL et al., 1983), assim como a POLIEDRINA/GRANULINA, é encontrado em todos os alfabaculovírus do grupo I e II e na maioria dos betabaculovírus. P10 parece ser necessária para a formação adequada do envelope do poliedro/grânulo. No caso de PlxyGV, o genoma desse vírus apresenta múltiplas cópias de P10. Uma provável sequência homóloga ao gene P10 de baculovírus foi encontrada em um entomopoxvírus (ALAOUI-ISMAILI; RICHARDSON, 1998; HASHIMOTO et al., 2000).

No entanto, alguns baculovírus possuem outro domínio PEP N fundido com P10. Esse gene fundido (*pep/p10*) foi identificado em DsGV e possui homólogos nos quatro GVs citados na Tabela A.1. Nenhum outro gênero de baculovírus apresenta essa combinação de genes somente os betabaculovírus. Esse gene possui, além da região PEP N, um domínio central P10 e um domínio C terminal. O domínio P10 possui como característica principal a presença de hepta-repetições de aminoácidos hidrofóbicos e uma região rica em prolina (HASHIMOTO et al., 2000). Em alguns GVs a associação funcional entre PEP e P10 pode estar conservada em uma única proteína. Análises filogenéticas utilizando sequências P10 sugeriram a origem monofilética do domínio P10 em CrleGV (*crle23*) e em seus homólogos em outros baculovírus (LANGE; JEHLE, 2003).

Como dito anteriormente, DsGV não apresentou em seu genoma os genes da *catepsina* e da *quitinase*. No entanto, estudos sugerem que os baculovírus codificam outras enzimas que compensariam a perda desses genes. Um desses genes é o da *metaloproteinase* encontrado em todos os betabaculovírus sequenciados totalmente até o momento. A enzima pode estar sendo continuamente ativada dentro da célula e não é secretada. Sabe-se que a enzima em XcGV digere proteínas e é inibida por inibidores de *metaloproteinase*. A presença desse gene em betabaculovírus pode ser importante para a transmissão viral, facilitando a desintegração das células após o término da replicação viral (ROHRMANN, 2011).

Como descrito no tópico anterior, os genes iaps são supressores de apoptose. Todos os baculovírus possuem esses genes. Há cinco tipos de genes

IAPs em baculovírus (nomeados de 1 a 5), mas segundo Ikeda et al. (2004) nem todos são inibidores ativos de apoptose. O primeiro gene iap foi encontrado em CpGV e recebeu a denominação *iap-3*. *Iap-3*, presente em DsGV, foi encontrado em alfa-, beta- e gamabaculovírus. No entanto, *iap-5* somente foi encontrado em betabaculovírus o que torna sua aquisição específica de DsGV e dos demais granulovírus (WORMLEATON et al., 2003). Análises filogenéticas envolvendo sequências de genes iaps suportam a ideia de que houve no mínimo dois eventos separados de transferência lateral dos insetos hospedeiros para baculovírus (HUGHES, 2002).

5.3.6 GP64

O aspecto mais curioso e importante analisado no genoma de DsGV foi a presença do gene *gp64* (*ds109*), encontrado somente em alfabaculovírus do grupo I, que mostrou alta similaridade (74% id aa) para a sequência da proteína GP64 de AcMNPV (*ac128*) (Tabela A.1). A Figura 20 representa uma eletroforese em gel de agarose 1% com três "canaletas" marcadas com **1**, **2** e **3** sendo que **1** é o padrão lambda/*Hind*III (1 µI) e **2** e **3** (ambos 2,5 µI) são os amplicons obtidos entre os genes *gp64* e *lef-8* e entre *rr2a* e *gp64*, respectivamente. Esse resultado mostrou que não houve contaminação, isto é, DsGV realmente possui o gene *gp64*.

Figura 20 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos amplicons purificados lef8/gp64 e rr2a/gp64. Na canaleta 1 se encontra 1 μl do marcador lambda DNA/HindIII e nas canaletas 2 e 3, 2,5 μl dos amplicons lef8/gp64 (264 pb) e rr2a/gp64 (388 pb), respectivamente.



Nota: volume total de cada reação = 4 tubos de PCR contendo 20 µl. Após purificação, utilizou-se 2,5 µl de cada amplicon na eletroforese em gel de agarose.

Até agora nenhum betabaculovírus sequenciado totalmente apresentou o gene *gp64*, o que torna essa aquisição exclusiva de DsGV. A Figura 21 representa o alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos de *gp64* de DsGV e de todos alfabaculovírus do grupo I, mostrando a alta similaridade existente entre as sequências analisadas (colunas brancas). Outro aspecto relevante sobre o gene *gp64* do DsGV é que ele tem a porcentagem de bases AT semelhante a observada no restante do genoma (65,9%) e bem diferente do que é observado no gene *gp64* de AcMNPV (50,6%) e de AgMNPV (50,3%). A diferença na composição de bases AT e o uso preferencial de códons poderiam refletir uma adaptação do organismo. A maquinaria do hospedeiro deve fornecer quantidades suficientes de tRNAs, permitindo que o vírus se replique e se espalhe (LANGE; JEHLE, 2003).

A proteína GP64 é uma glicoproteína encontrada na região peplomérica em BVs (Figura 2), cuja função é reconhecer receptores da superfície das células e desencadear o processo de endocitose adsortiva (diferente da fusão direta observada em ODVs). A diminuição do pH promove uma modificação conformacional na GP64, resultando na fusão da membrana do envelope com a do endossoma e, consequentemente, a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula; este vai até o núcleo, iniciando a infecção. Além da entrada de BVs na célula, a GP64 também possui papel na dispersão viral de célula a célula. A deleção do gene em AcMNPV é letal; esses vírus se replicam dentro da célula, porém não conseguem sair e infectar outras (BLISSARD; WENZ, 1992; PEARSON et al., 2000).

O gene *gp64* é conhecido por ser regulado por ambos promotores: precoce e tardio (GARRITY et al., 1997). Ele é encontrado somente em alfabaculovírus do grupo I, que utilizam a proteína GP64 para a entrada de BVs nas células hospedeiras (JIANG et al., 2009). Os demais baculovírus, alfa-grupo II, beta- e deltabaculovírus, utilizam a proteína F como proteína de fusão (IJKEL et al., 2000; LUNG et al., 2002; YIN et al., 2013).

Estudos sugerem que GP64 e F podem ser proteínas distantemente relacionadas (KADLEC et al., 2008). Os alfabaculovírus do grupo I, como AcMNPV, possuem as proteínas GP64 e F (*ac23*), mas esta não atua de forma ativa como uma proteína de fusão do envelope (LUNG et al., 2003). DsGV possui tanto o gene *gp64* quanto o gene que codifica a proteína F (*ds23*, 22-40% id aa, Tabela A.1); embora observaram-se grandes deleções em vários reads que abrangiam o gene *f*. Esse fato sugere a perda/troca de funcionalidade do gene *f* pelo gene *gp64* em

DsGV. Os genomas dos gamabaculovírus, no entanto, não apresentam os dois genes (DUFFY et al., 2006). Análises de genomas completos revelaram que homólogos de GP64 são muito conservados (> 74% id aa) enquanto homólogos da proteína F são pouco conservados (20-40% id aa) (PEARSON; ROHRMANN, 2002¹³ apud LIANG et al., 2005). A presença da proteína F em alfabaculovírus do grupo I parece ter um papel acessório que pode ser importante na potogenicidade ou virulência do vírus (THEILMANN; BLISSARD, 2008).

Experimentos envolvendo os genes gp64 e f de DsGV estão sendo realizados no Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília sob a coordenação do Dr. Bergmann Morais Ribeiro. Inicialmente, realizou-se a clonagem de gp64 de DsGV no baculovírus AcMNPV, que tinha o gene deletado. Esse experimento mostrou que o vírus transfectado em células de insetos, começou a produzir BV e foi infeccioso. Isso comprova que o gene gp64 de DsGV está no genoma desse vírus e que é funcional. Com base nos reads analisados de DsGV, o gene f está inteiro, porém vários reads apresentaram deleções, o que indica a existência de vírus nessa população com pedaços deletados do gene f. Experimentos envolvendo a amplificação desses reads deletados para comparação com o gene f inteiro, previamente amplificado, estão em andamento. A ideia do estudo é mostrar que a proteína F é funcional e que teria uma outra função para o vírus, como por exemplo, papel auxiliar. Isso comprovaria a hipótese de perda da propriedade de fusão do gene f com deleção.

¹³ PEARSON, M. N.; ROHRMANN, G. F. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae*, and *Metaviridae* (insect retrovirus) families. J. Virol., v. 76, p. 5301–5304, 2002.

Figura 21 – Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos do gene gp64 encontrado em DsGV e em todos alfabaculovírus do grupo I completamente sequenciados (EppoNPV, ThorMNPV, MaviNPV, BmNPV, BomaNPV, RoMNPV, AcMNPV, PlxyMNPV, HycuNPV, OpMNPV, CfMNPV, AgMNPV, AnpeNPV e CfDEFMNPV). Os resíduos de coloração branca, cinza escura, cinza clara e preta em cada coluna do alinhamento apresentam similaridade de 100%, 80-100%, 60-80% e inferior a 60%, respectivamente.

1	10	20	30	40	50	60	70	80	9	0	100	110	120	130	140	150	160	170	180
MEELINE NUR MUSATIV MUSATIV MUSATIV MUSATIV MUSATIV MUSATIV MUSATIV			TOMATE PY TOMATE PW TOMATE PW TOMATE PW TOMATE PY TOMATE PY TOMATE PY TOMATE PY TOMATE PY TOMATE PY TOMATE PW TOMATE PW	RIKNIAI RIKSIBIAA RIKNIBIAP KIKNIBIAP KIKNIBIAP KIKNIBIAP KIKNIBIAP KIKNIBIAP RIKSIAI RIKSIBIAP RIKSIBIAP RIKSIBIAP RIKSIBIAP RIKSIBIAP	PRETLKKUV PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRETLQKUVE PRESLEKUVE PRESLEKUVE PRESLEKUVE PRESLEKUVE PRESLKKUVE		ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY ENVLIGYKGY	PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE PLAYSYNGGE	LINEE LINEE		Rédii Rédii	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS VGEELIDINGS			ELÜKRQ NINHEZ LÜKRQ NINHEZ LÜKRQ NINHEZ ELÜKRQ NINHEZ	副日でNRSWRCE 副日でNRSWRCE	STAKMYSKI USTAKMYTRI USTAKMYTRI USTAKMYSKI USTSKMYSKI USTSKMYSRI USTSKMYSRI USTSKMYTKI USTSKMYTKI USTSKMYTRI USTAKMYTRI USTAKMYTRI USTAKMYTRI	
_ 190	20	0 21	0 _ 2	220	230	240	250	260	270	280	2	90	300 3	310 32	0	330 3	40 35	036	0 37
VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD VEILD	ISKU INTE NSKU INVIB NSKU INVIB SNU INVIB SNU INVIB SNU INVID SNU INVID SNU INVID SNU INVID SKU INVIE SKU INVIE NSKU INVIE NSKU INVIE	NETLYRC VIN CLIHRC VSI CLIHRC VSI	MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET MILIGUET			STREHC STREHC	LIDSDIVELS LUDDIFELS LUDDIFELS LIDDIFELS LIDDIFELS LIDDIFELS LIDDIVELS LIDDIVELS LIDDIVELS LIDDIFELS LIDDIFELS LIDDIFELS LIDDIFELS						TRE DEMEND RE TRE DIAMID RE	LMYENDLLKWIL LMYENDLLRWIL LMYENDLLRWIL LMYENDLLRWIL LMYENDLLKWI LMYENDLLKWI LMYENDLLKWI LMYENDLLKWI LMYENDLLKWI LMYENDLLKWI LMYENDLLKWI LMYENDLLRWI LMYENDMLRWIL LMYENDMLRWIL LMYENDMLRWIL LIYYENDMLRWIL LIYYENDMLRWIL LIYYENDMLRWI	ELVHÖHM ELMHÖHI ELLHÖHI ELMÖHI ELMHÖHI ELMHÖHI ELMHÖHI ELMHÖHI ELLHÖHI ELLHÖHI ELLHÖHI ELLHÖHI	SILNN BELLI SILNN BELLI	STAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG SVAKVDERLIG	NIL / SV 55 NIL / SV 55 SV 55 NIL / SV 55 SV 55 NIL / SV 55 SV 55	FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM FLSDDTFILM
	380	390	400	410	420	430	440	450	46	50	470	480	490	500 8	507				
PCIMP PCIMPC	DETSNCYNN DETSNCYNN AETSNCYNN AETSNCYNN AETSNCYNN AETSNCYNN AETSNCYNN AETSNCYNN AETSNCYNN DETSNCYNN DETSNCYNN DETSNCYNN DETSNCYNN	SIYREG RAVE SIYKEG RAVE	NDTSECI NEDTSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSSQCI NEDSAQCI NEDSAQCI NEDSAQCI NEDSAQCI NEDSAQCI	DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA DFWYKEIA	INDOLERNIP INDOLERNIP INDOLERNIP INDOLERNIP INDOLERNIP INDOVERNIP INDOVERNIP INDOVERNIP INDOVERNIP INDOVERNIP INDOLERNIP INDOLERNIP INDOLERNIP INDOLERNIP	TIGNTTYHD TIGNTSYHE: TIGNTSYHE: TIGNTTYHD TIGNTTYHD TIGNTTYHD TIGNTTYHD TIGNTTYHD TIGNTTYHD TIGNTSYHE: TIGNTSFHE: TIGNTSFHE: TIGNTSFHE: TIGNTSFHE: TIGNTSFHE:	SWKDASG WSFY SWKDASG WSF SWKDASG WSF	AQQ KSNLIE IAQQ KSNLIE	IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG IMENTKROG	UTSLE INTSLE INTSLE UTSLE UTSLE UTSLE UTSLE UTSLE UTSLE UTSLE INTSLE INTSLE INTSLE INTSLE INTSLE		TAK IT			KK R R R R R R R R R R R R R R R R R R R				
		1 10 ME 10 10 10 10 10 ME 10 10 10 10 ME 1	1 10 20 MEELIA LAIMAETINATIA EEKK MIRT ALAIAA EEKKA MIRT ALAIAAA EEKKA MIRT ALAIAAA EEKKA MIRT ALAIAAA EEKKA MIRT ALAIAAA EEKKA MIRT ALAIAAA EEKKA MIRT ALAIAAA EEKKA MIRT ALAIAAAA EEKKA MIRT ALAIAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1 10 20 30 Met in the intervention of the second s	1 10 20 30 40 MELLAL AND ALL	1 10 20 30 40 50 MELLANDER LAND ALL AND ALL A	1 10 20 30 40 50 60 MELLAL MARKEN ALL SCHOOL AND SCHOLAR SCHO	1 10 20 30 40 50 60 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70	1 10 20 30 40 50 60 70 80 NET IN INCLUSION INCLUSIONE INCLUSIONE INVENTIALISI INCLUSION INCLUSIONE INCLUS	1 10 20 30 40 50 60 70 80 9 1 10 20 30 40 50 60 70 80 9 1 100	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 NUME WART RESIDENT ALL STATES AND ALL ALL ALL ALL ALL ALL ALL ALL ALL AL	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 WE WILLIAM STRUCTURE INCOMES WILLIAM INTERPETIKAN 6 60 WILLIAM TRANSLOVEN AND INCOMES TO BE STRUCTURE AND INCOMES AN	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 1100 100	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 120 100 120 120 100 110 120 <	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 MIRE MUNICATION AND HER MUNICIPATION AND	1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 10 120 130 140 No FARCENTY CHICK, MARCE PRINTERS MERGENT, KAN BERTER WILLEN TO MARCE TRANSPORTE FARCENTY CHICK, MARCE PRINTERS MERGENT, KAN BERTER WILLEN TO MARCE TRANSPORTE FARCENTY CHICK, MARCE PRINTERS MERGENT, KAN BERTER WILLEN TO MARCE TRANSPORTE FARCENTY CHICK, MARCE PRINTERS MERGENT, KAN BERTER WILLEN TO MARCE TRANSPORTE FARCENTY CHICK, MARCE PRINTERS MERGENT, MARCE TRANSPORTE, M	10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 100 120 130 140 150 Mile Market Marke	1 10 20 30 140 150 160 160 170 80 90 160 110 120 130 140 150 160 160 160 160 160 160 160 160 160 16	

5.3.7 Genes únicos de DsGV

Dezessete ORFs de DsGV não apresentaram qualquer similaridade, segundo a ferramenta Blast (blastp), para sequências presentes nos demais baculovírus sequenciados até o momento. Essas sequências foram designadas como ORFs únicas de DsGV e, provavelmente, foram adquiridas recentemente durante a evolução através de transferência lateral de genes (Tabela 11) (LANGE; JEHLE, 2003).

Considerando a região de 200 pb "upstream" do codon de início ATG de cada ORF considerada, 10 ORFs (ds12, 25, 31, 35, 36, 40, 70, 100, 101 e 102) apresentaram o promotor precoce TATA-box (motivos TATAW, TATAWAW, TATAWTW, onde W = A ou T) e 6 ORFs (Ds18, 24, 30, 34, 51 e 62), ambos promotores, precoce e tardio (DTAAG, onde D = A ou T). Nenhuma ORF única apresentou somente o promotor tardio. Somente para ds62 não foi encontrado o iniciador CAKT, onde K = G ou T. Para ds76 não foram encontrados motivos de promotores precoce e tardio conhecidos; provavelmente não seja transcrito.

Das 17 ORFs, 4 apresentaram similaridade para sequências depositadas no GenBank (*Ds31*, *35*, *36* e *40*). Essas ORFs codificam motivos conhecidos de promotores precoces (TATA-box). *Ds31*, que aparentemente codifica uma proteína de 310 aminoácidos, apresentou 37% e 26% de identidade de aminoácidos para sequências presentes em dois phycodnavírus (Phycodnaviridae) (proteínas hipotéticas 162281058 e 162300096 de 233 e 241 aminoácidos, respectivamente) e 26% de identidade de aminoácidos para uma sequência (247 aminoácidos) de um outro phycodnavírus, *Felmannia irregularis* vírus a (Firr V-1-A45). São vírus de plantas e protozoários que parecem compartilhar um ancestral comum com outros vírus de DNA dupla fita, tais como iridovírus e poxvírus (YAMADA, 2011), que por sua vez, compartilham genes com baculovírus. Isso mostra uma provável ocorrência de transferência lateral de genes entre phycodnavírus e baculovírus. Outra hipótese é que essa similaridade seja fruto do acaso, causada por baixa complexidade da sequência da proteína.

Tabela 11 – Presença de 17 genes únicos no genoma de DsGV. A posição e direção no genoma e o tamanho em pares de bases (pb) está anotado para cada ORF. Motivos de promotores precoce (TATA-box: TATAW, TATAWAW, TATAWTW) e tardio (DTAAG) foram encontrados dentro da região de 200 pb "upstream" do codon de início de cada ORF única considerada. Em vermelho estão destacadas as ORFs que apresentaram ambos promotores, precoce e tardio.

ORFs	Posição e	Tamanho	Motivo conservado no promotor
únicos	direção	(pb)	
12	9090 > 9302	213	ТАТАТ
18	13517 > 14014	498	TATAT + TTAAG
24	19133 > 19618	486	TATAT/TATAAT + ATAAG
25	19817 < 19575	243	ΤΑΤΑΤΤΑ
30	24128 < 23844	285	TATATAA/TATAT + ATAAG
31	25130 < 24198	933	ΤΑΤΑΤΑΑ/ΤΑΤΑΑ/ΤΑΤΑΑΑΑ
34	26006 > 26173	168	TATAAAA/TATAT/TATAA + ATAAG
35	26142 > 27281	1140	ΤΑΤΑΑΑΤ
36	27619 < 27278	342	ΤΑΤΑΤ/ΤΑΤΑΑΑΤ
40	31190 > 31573	384	TATATAT/TATAT
51	39477 < 39037	441	TATATTA + ATAAG/TTAAG
62 ¹	47604 > 47756	153	TATAT + TTAAG
70	52145 < 51369	777	ΤΑΤΑΤ/ΤΑΤΑΑΑΑ
76	55779 > 56153	375	_2
100	80157 < 79024	1134	ТАТАТ
101	80411 < 80160	252	ΤΑΤΑΑΑΑ/ΤΤΑΤΑΑΑΤ
102	82033 < 80522	1512	ΤΑΤΑΤ/ΤΑΤΑΑΑΑ

Nota: ¹ Única ORF que não apresentou o iniciador CAKT, onde K = G ou T ² Ausência de motivos de promotores precoce e tardio conhecidos

*Ds*35 codifica uma proteína de 379 aminoácidos e mostrou ser 49% idêntica a um receptor da classe B acoplado à proteína G (402 aminoácidos) presente no lepidóptero *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) (Figura 22), 37% idêntica à proteína correspondente (373 aminoácidos) em um entomopoxvírus (Poxviridae)

que infecta *Leucania separata* (Lepidoptera: Noctuidae) e 43% e 33% idêntica a um receptor acoplado a proteína G de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (391 aminoácidos) e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (420 aminoácidos), respectivamente. Esses receptores da classe B pertencem a uma grande família de secretinas que são proteínas da superfície celular responsáveis por vários estímulos fisiológicos com o intuito de controlar os processos celulares (POYNER; HAY, 2012).

Ds36 codifica uma proteína de 113 aminoácidos que apresentou 52% de identidade de aminoácidos para uma sequência de 131 aminoácidos de um vírus da família Iridoviridae (*Wiseana iridescent virus* - WIV) (Figura 23) e parece ser 46%, 43%, 32% e 27% idêntica a uma proteína hipotética presente em entomopoxvírus que infectam *Amsacta moorei* (Lepidoptera: Arctiidae) (158 aminoácidos), *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae) (164 aminoácidos), *Leucania separata* (136 aminoácidos) e *Choristoneura rosaceana* (122 aminoácidos) (Lepidoptera: Tortricidae), respectivamente. Além dos baculovírus, existem outros vírus patogênicos de insetos de DNA dupla fita, tais como iridovírus e entomopoxvírus. São vírus cuja replicação do DNA ocorre no citoplasma da célula infectada. Estudos mostram que vários genes de baculovírus foram encontrados nesses vírus, sugerindo a existência de transferência lateral durante a co-infecção no mesmo inseto hospedeiro (IYER et al., 2006; WILLIAMS, 1996; ZHAO et al., 2011).

Ds40 codifica uma proteína de 127 aminoácidos que mostrou ser 37%, 29% e 26% idêntica a uma proteína não estrutural (NS3) de densovírus (família Parvoviridae) que infectam *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) (PiDNV: 233 aminoácidos) (Figura 24), *Galleria mellonella* (GmDNV: 232 aminoácidos) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Helicoverpa armigera* (HaDNV: 231 aminoácidos) (Lepidoptera: Noctuidae), respectivamente. A proteína não estrutural NS3 também foi encontrada em *Junonia coenia* densovirus (JcDNV) (WANG et al., 2013) e *Bombyx mori* densovirus (BmDNV) (YIN et al., 2008) e parece estar envolvida na replicação viral, embora sua função ainda seja indefinida. Esse gene também foi encontrado em CrleGV (*crle9*). Essa similaridade significativa existente entre um gene de baculovírus, no caso *crle9* e *ds40*, e o gene NS3 presente em densovírus sugere que pode existir transferência lateral entre vírus, patogênicos de

insetos, de fita simples de DNA (família Parvoviridae) e de DNA dupla fita (família Baculoviridae) (LANGE; JEHLE, 2003).

Figura 22 – Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de *ds35* (379 aminoácidos) com a sequência correspondente a um receptor da classe B acoplado à proteína G presente no inseto *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae) (402 aminoácidos; número de acesso: EHJ73059). Dados fornecidos pela ferramenta BLAST (blastp): nota = 328 bits (840), valor E = 1e⁻¹⁰⁵, identidade = 178/361 (49%), positivos = 243/361 (67%), buracos ("gaps") = 13/361 (3%).

Ds35	6	APHCCDDGSVVLKKKHMCWNPDTNITEKIKSLDCEKTLLLRKYNINTDGD-LYLTFEK	62
Danaus plexippus	17	ASDCCKHG-VVEDDGNVCVDLLTNKTSS-TSLTCSHVDHLSLQMFNFTVSEDSLILNLNE	74
Ds35	63	NITIQKYCLGNVTTKEMKKIVVSPLICATQDNSVINDKVHGYCMIVSVVFLFLTII	118
Danaus plexippus	75	DMVIELESDKFCVSNGTRFSDDPVAVICSDVDEKILEESVYGYCMIVSVVFLVITVI	131
Ds35	119	IYIALPELRDLQGKNIMAFCISLSFGMILLVIMKFMVYSDMKWCAVRGILAYYFFLSSFF	178
Danaus plexippus	132	VYSMLPKLRDLLGKSIINFCASLAIGLSTLAIMNIMEYSDLKWCAVRGFVAYFFILATFF	191
Ds35	179	WINSISIQVLMSIIRPTPINYRWKNFFWYALYAWGCPAVLTLILTTINFVPGNHSRPGIG	238
Danaus plexippus	192	WSNSISIQILRSLERPTSIDYSWKAFMWYALYAWGCPTILTIILAIVNFTPGKHRKPGIG	251
Ds35	239	LNHCWFYDIENQWYYMYSVISILISINICIYIYTVLYLWRNNFLKNTHLKEIKYKFSMSF	298
Danaus plexippus	252	LN CWEFD F WWINISVFFILI NF IFFI L LWRF F FINTR FRIF NF LNICWFFDYKQQWYYMYSVMIILIVSNMVIFMYISLSLWRHIF-ASTHIKALKYKFWMIV	310
Ds35	299	KLFILMGLSWIFEISSSFMGDSYFWIITDIYNTLOGVMIFLILVPFRRKTLKIMSNHGWF	358
Danaus plexippus	311	RMFIVMGLAWIFEMISSLSKPHIIWVILDFFNLLQGLLLFLVLVVFRKRVIKELYNKGWL	370
Ds35	359	N 359	
Danaus plexippus	371	E 371	

Figura 23 – Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de ds36 (113 aminoácidos) com uma sequência presente em Wiseana iridescent virus – WIV (Iridoviridae) (131 aminoácidos; número de acesso: YP_004732905). Dados fornecidos pela ferramenta BLAST (blastp): nota = 122 bits (305), valor E = 6e⁻³³, identidade = 57/110 (52%), positivos = 86/110 (78%), buracos ("gaps") = 0/110 (0%).

Ds36	4	SEIAIKIENMYEENETVENVKKFVFNKLLKNVLDESVNLEDYLLVYSGYCKVCDSNAEIF	63
WIV	22	SELSVAIESIYENKTMDKNIVKSVIHHLLKNILNDEIDLKNELLMYTGYCDMCDSEVKLF	81
Ds36	64	KVDIDDYENTLDYAHAIYSLYKKEKTLTYKDIFCKICARPLYEIDLFEIY 113	
WIV	82	KIEIEDYDNTLDYANAMCKASKHKQPLTYKDILCKICARPLYCIDPYEIY 131	

Figura 24 – Alinhamento da sequência deduzida de aminoácidos de ds40 (127 aminoácidos) com uma proteína não estrutural (NS3) presente no densovírus (família Parvoviridae) que infecta *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) (PiDNV: 233 aminoácidos; número de acesso: YP_007003822). Dados fornecidos pela ferramenta BLAST (blastp): nota = 42.0 bits (97), valor E = 0.018, identidade = 23/63 (37%), positivos = 37/63 (58%), buracos ("gaps") = 3/63 (4%).

```
Ds40 54 EQLNEWNEGGQG-KSLWKICKWCRDDKEENCFYIPFKDKMNLERD--EIVKLFFDKTMWC 110
++ N WN G+ K++WKICK+C + E+ Y ++ D EIV+ F D++ WC
DEFNTWNMNGKPFKTIWKICKFCYTNCEDPDEYRFMFNRTVFAEDAEEIVQRFQDESSWC 185
Ds40 111 ELC 113
E+C
PiDNV 186 EIC 188
```

5.4 Análise dos variações (SNPs) ao longo do genoma

Foram selecionados 76 SNPs ("single nucleotide polymorphism") de acordo com o critério escolhido e descrito anteriormente para a busca dessas alterações de única base ao longo do genoma de DsGV. A distribuição da diversidade dos SNPs está representada na Tabela 12. Das 116 ORFs, 29 apresentaram variações de base simples. Foram encontrados 52 SNPs dentro de regiões codificadoras (CDS) e 24 SNPs em regiões intergênicas.

Tabela 12 - Distribu	ção da diversidade	de SNPs ao longo de	o genoma de DsGV.
----------------------	--------------------	---------------------	-------------------

	Total no	ORFs com	SNPs	SNPs
	genoma	SNPs	intragênicos	intergênicos
Número de SNPs	76	29	52	24

A Tabela 13 mostra o número de SNPs sinônimos e não sinônimos localizados dentro das regiões codificadoras. A maioria dessas variações gênicas é do tipo não sinônimas (43). O tipo de SNP não sinônimo mais comum foi a transversão (26 SNPs), isto é, troca de A \leftrightarrow C e T \leftrightarrow A. Dos 9 SNPs sinônimos, 5 eram de transição e apresentaram substituição de A \leftrightarrow G e T \leftrightarrow C.

	SNPs sinônimos	SNPs não sinônimos
SNPs em regiões codificadoras	9	43
Tipo de SNP mais comum	Transição (5 SNPs)	Transversão (26 SNPs)
Substituições mais comuns	$\textbf{A}\leftrightarrow\textbf{G}~\textbf{e}~\textbf{T}\leftrightarrow\textbf{C}$	$\mathbf{A} \leftrightarrow \mathbf{C} \mathrel{\textbf{e}} \mathbf{T} \leftrightarrow \mathbf{A}$

Tabela 13 – Número de SNPs sinônimos (não altera o aminoácido) e SNPs não
sinônimos (altera o aminoácido) em regiões codificadoras.

A Figura 25 e a Tabela 14 mostram o número de variações por gene e todos os SNPs sinônimos e não sinônimos nos 29 genes variáveis de DsGV, respectivamente. Os 4 genes mais variáveis encontrados em DsGV foram *lef-9* (8 SNPs em 1479 pb), *iap-5* (5 SNPs em 795 pb), *lef-1* (4 SNPs em 708 pb) e *rr2a* (4 SNPs em 1237 pb). O número de reads observados para os genes foi de 467 para *lef-9* (cobertura 54x), 233 para *iap-5* (cobertura 29x), 96 para *lef-1* (cobertura 22x) e 126 para *rr2a* (cobertura 22x). O tamanho dos reads variou de 150 a 280 pb. A cobertura para cada gene considerado foi significamente maior que a de outros estudos sobre variantes genéticas em baculovírus. A baixa cobertura poderia ser um fator que limitaria a detecção do número de SNPs dentro do genoma (KLAN et al., 2003; ZHANG et al., 2005).





Genes	Troca de bases	Mudança de aminoácido
Granulina	T/A	Fenilalanina/Leucina
ds4	A/C	Glutamina/Prolina
ds6	A/C	Asparagina/Treonina
	A/T	Codon de parada/Tirosina
pep1	A/G	Tirosina/Cisteína
pep/p10	A/G	Lisina/Lisina
gp41	A/T	Lisina/Codon de parada
vp91	A/C	Treonina/Prolina
ds30	G/C	Ácido Aspártico/Histidina
lef-2	A/G	Treonina/Treonina
	A/T	Lisina/Asparagina
ds33	A/G	Lisina/Arginina
ds42	A/C	Asparagina/Histidina
	T/A	Serina/Treonina
ds43	A/G	Lisina/Arginina
odv-ec43	T/A	Tirosina/Asparagina
ds51	A/T	Isoleucina/Isoleucina
lef-1	T/A	Valina/Valina
	T/A e G/T	Triptofano/Metionina
	A/G	Lisina/Ácido glutâmico
ds62	T/G	Arginina/Arginina
ds63	T/G	Leucina/Codon de parada
p48	C/T	Treonina/Isoleucina
lef-5	G/A	Cisteína/Tirosina
p33	A/G	Arginina/Glicina
vp39	A/T	Isoleucina/Leucina
ds86	A/G	Histidina/Arginina
Dnapol	T/C	Fenilalanina/ Fenilalanina
	T/C	Fenilalanina/Serina
Desmoplakin	G/T	Leucina/ Fenilalanina
iap-5	T/C e T/C	Valina/Alanina
,	G/A	Cisteína/Tirosina
	A/C e A/C	Glutamina/Prolina
lef-9	A/C	Tirosina/Serina
	T/G. C/A. C/T	Serina/Ácido aspártico
	A/C. C/A. A/C	Tirosina/Histidina
	T/C	Fenilalanina/Serina
helicase-2	G/A	Alanina/Alanina
	G/C	Glutamina/Histidina
	G/A	Glicina/Arginina
rr1	T/G	Asparagina/Lisina
rr2a	A/C	Isoleucina/Isoleucina
	C/T	Tirosina/Tirosina
	T/C	Codon de parada/Arginina
	A/G	Lisina/Arginina

 Tabela 14. SNPs sinônimos e não sinônimos nos 29 genes variáveis de DsGV.

Para ser considerado um SNP, assume-se que tenha uma frequência mínima de 1%, impedindo que sejam confundidos com raras mutações pontuais e erros de sequenciamento (GUIMARÃES; COSTA, 2002). SNPs em regiões intergênicas podem ser utilizados como marcadores moleculares e aqueles que insidem em regiões promotoras ou reguladoras podem gerar alteração de expressão gênica (RAFALSKI, 2002). Variações em regiões reguladoras e em motivos conservados de promotores precoce e tardio não foram observados no presente estudo, exceto para 1 SNP localizado em uma região com TATAT, distante a 450pb do início ATG do gene *pif-2*.

SNPs sinônimos são conhecidos como "silenciosos" devido à degeneração do cógico genético, levando à substituição sinônima de códons. Dessa forma, essas variações não causam alteração de aminoácido na proteína resultante (KIMCHI-SARFATY et al., 2007). No geral, não há grandes variações na população de vírus analisada. No entanto, os genes mais variáveis apresentaram em sua maioria SNPs não sinônimos. Isso pode resultar em problemas na conformação protéica e, consequentemente, pode afetar o fenótipo do variante (BROOKES, 1999).

Estudos mostram que a modificação genotípica pode gerar alteração fenotípica, resultando em adaptação e sobrevivência do vírus. A patogenicidade, virulência, tempo de morte do inseto-hospedeiro, produção viral e tamanho dos OBs são fatores que podem sofrer modificações, favorecendo a adaptação frente a alterações ambientais e pressão seletiva do hospedeiro (HARRISON et al., 2009; HITCHMAN et al., 2007; SIMÓN et al., 2008).

Espera-se encontrar pouca variação em genes essenciais para o vírus, tais como os genes conservados (core genes). *Lef-1* e *lef-9* são core genes e, portanto, possuem papel essencial na replicação e transcrição viral, respectivamente. A análise de *lef-1* permitiu identificar 4 SNPs (1 SNP sinônimo e 3 SNPs não sinônimos). No entanto, essas variações parecem não ocorrer dentro do domínio conservado da primase (WVVDAD). O mesmo parece ocorrer com *lef-9*, que possui o domínio conservado NTDCDGD encontrado no centro catalítico da subunidade maior da RNA polimerase. A presença do resíduo D é essencial, visto que esse elemento coordena a ligação de magnésio (Mg⁺²) necessário para o funcionamento adequado da polimerase. Um fato interessante foi a presença de 6 SNPs juntos

formando um bloco em *lef-9*. Uma análise detalhada desses blocos poderia dar indícios se um variante do gene está sendo favorecido por seleção natural. Se conferir vantagem ao organismo a tendência e de que o bloco se espalhe pela população (ALBERTS et al., 2002; EVANS et al., 1997; LU; MILLER, 1994).

Genes cujos produtos atuam na interação patógeno-hospedeiro e genes menos conservados entre as espécies geralmente possuem maior frequência de SNPs, pois sofrem maior pressão para modificação. Estas observações estão de acordo com a maior incidência de SNPs nos genes *iap-5* e *rr2a*. Sabe-se que *iap-5* é um gene adquirido pelos betabaculovírus por transferência lateral a partir de insetos e que atua como supressor de células hospedeiras. Da mesma forma, a filogenia de genes ribonucleotídeos redutases (*rr1* e *rr2a*) sugere duas correntes de aquisição: proveniente de uma bactéria (caso do *rr1* de OpMNPV) ou herdada de insetos (hipótese mais provável). *Rr2a* está presente em apenas 3 beta-, 10 alfa- do grupo II e somente em um membro dos alfabaculovírus do grupo I (OpMNPV) e se mostra pouco conservado (ESTEBAN; DA SILVA, 2005; HUGHES, 2002b; HUGHES; FRIEDMAN, 2003).

Até o momento, apenas um trabalho utilizando o pirosequenciamento para estudar a variação genética dentro de populações de HearMNPV (7 isolados) foi publicado. O estudo mostrou que a variação encontrada no core gene *dna polimerase* e nos genes específicos de lepidópteros, *me53* e *dbp1*, era maior que a variação observada em outros estudos de isolados de HearMNPV e que a substituição de nucleotídeos era o principal fator contribuidor da diversidade genética desse vírus (BAILLIE; BOUWER, 2012). O pirosequenciamento ainda é uma técnica pouco utilizada e espera-se que os avanços das tecnologias de sequenciamento permitam esclarecer melhor a presença de SNPs nessas regiões codificadoras de DsGV. Como por exemplo, saber se existe um padrão de substituição de bases em regiões ricas em um determinado(s) nucleotídeo(s) e correlacionar com a presença de mutações não sinônimas. Ou ainda determinar se os SNPs não sinônimos poderão ter efeitos significativos sobre a funcionalidade das proteínas codificadas e no fitness dos variantes nessa população viral.

5.5 Organização genômica e análise filogenética

Os genomas de todos os betabaculovírus totalmente sequenciados apresentam uma forte colinearidade entre si (LUQUE et al., 2001; LANGE; JEHLE, 2003; FERRELLI et al., 2012). A Figura 26 mostra o alinhamento do genoma completo, utilizando a ferramenta MAUVE, de AcMNPV (organismo referência), DsGV e dos demais betabaculovírus completamente sequenciados. Os blocos locais colineares (LCBs) encontrados em cada genoma estão representados por cores diferentes para cada região conservada analisada e, provavelmente, sejam regiões homólogas entre si. As linhas conectam blocos conservados e a presença de linhas cruzadas demonstram rearranjos do tipo inversão. Dentro de cada LCB a altura do perfil de similaridade corresponde ao grau de conservação daquela região em particular.

O mapa de comparação genômica mostra grande sintenia entre os betabaculovírus, inexistindo grandes rearranjos nos genomas avaliados. Soma-se a isso a pouca sintenia e, consequentemente, pouca conservação entre os mesmos e o protótipo AcMNPV.

A análise detalhada do mapa sintênico mostrou que DsGV possui menor grau de sintenia em relação a 6 betabaculovírus (SpliGV, HearGV, PsunGV, XecnGV, PlxyGV e EpapGV). DsGV apresentou quatro LCBs invertidos (estão em fitas opostas do DNA) quando comparado aos genomas de SpliGV, HearGV, PsunGV e XecnGV; três LCBs estão localizados dentro do intervalo de 10.000 a 20.000 pb e o outro, próximo à posição 40.000 pb do genoma de DsGV. Para PlxyGV, também foram observados 4 LCBs invertidos: dois no intervalo de 10.000 a 20.000 pb e dois próximos às posições 78.000 pb e 95.000 pb de DsGV. DsGV mostrou ainda possuir uma região grande invertida de aproximadamente 15.000 pb no início do genoma (entre posições 5.000 e 20.000 pb) em relação a EpapGV. Para os demais betabaculovírus analisados, DsGV apresentou apenas uma ou duas regiões invertidas, mostrando elevada sintenia entre esse baculovírus. Segundo Escasa et al. (2006) a análise dos rearranjos de genes pode fornecer um maior conhecimento sobre a história evolutiva dos baculovírus. Aqueles vírus que são mais
proximamente relacionados compartilham um maior grau de colinearidade gênica (HU et al., 1998).

Figura 26 – Mapa sintênico de AcMNPV (organismo referência), DsGV e dos demais betabaculovírus. Os números mostram a posição dos nucleotídeos em cada genoma (pb). As linhas conectam blocos conservados (LCBs, blocos locais colineares); linhas cruzadas mostram possíveis rearranjos (inversões). Abaixo dos LCBs há uma linha preta, que simboliza um genoma em particular, com todas as regiões codificadoras (CDS) encontradas (nas duas fitas de DNA). Foram representados apenas os genomas dos betabaculovírus que forneceram dados mais informativos.



O uso de sequências da *granulina/poliedrina* nas inferências filogenéticas realizadas para membros da família Baculoviridae é bastante comum por ser uma das proteínas mais conservadas nos baculovírus que infectam lepidópteros. Para estimar as relações evolutivas de DsGV, a sequência de nucleotídeos do gene da *granulina* de DsGV foi comparada com outras 60 sequências de *granulina/poliedrina* depositadas no GenBank (Figura 27). *Culex nigripalpus* NPV (CuniNPV) não foi representado na análise, visto que ele não possui um homólogo para o gene da *poliedrina*; esse vírus codifica outra proteína do corpo de oclusão (AFONSO et al., 2001; HERNIOU et al., 2001; ZANOTTO et al., 1993).

A filogenia de DsGV baseada nas duas abordagens (gênica e proteica) confirmou a divisão de três dos quatro gêneros de baculovírus, isto é, alfa-, beta- e gamabaculovírus. Dentro dos alfabaculovírus, não foi possível observar uma clara divisão dos NPVs do grupo I e II. Na análise utilizando a sequência de nucleotídeos (Figura 27) observou-se que DsGV está posicionado no mesmo grupo filogenético de 7 GVs (ChocGV, PiraGV, ClanGV, AdorGV, PhopGV, CpGV e CrleGV), sendo sustentado por alto valor de bootstrap (98%). A sequência de DsGV parece estar mais proximamente relacionada a ChocGV, pois compartilham um ancestral comum mais recente.

Existem discrepâncias na disposição dos membros, que compõem os grupos alfa- e betabaculovírus, na análise individual da *granulina/poliedrina* em relação às árvores com genes concatenados (THUMBI et al., 2011) (Figura 10). No entanto, a árvore construída com as sequências nucleotídicas do gene da *poliedrina/granulina*, comprovou que o vírus coletado em *Diatraea saccharalis* era realmente um granulovírus.

Figura 27 – Relação filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos do gene da granulina/poliedrina de DsGV e de 60 baculovírus totalmente sequenciados. O método e modelo de evolução utilizados foram Máxima Verossimilança (MV) e GTR, respectivamente. Os valores de bootstrap (≥ 80%) foram anotados para 100 replicatas. A coloração azul, vermelha e verde dos ramos distinguem o grupo dos alfa-, beta- e gamabaculovírus, respectivamente.



Até o momento DsGV é o único betabaculovírus que possui o gene *gp64*. A Figura 28 representa uma árvore filogenética com as sequências deduzidas de aminoácidos do gene *gp64* de DsGV, de todos alfabaculovírus do grupo I completamente sequenciados (GenBank), dos baculovírus *Anagrapha falcifera* MNPV (AfMNPV), *Choristoneura occidentalis* (ChocNPV), *Choristoneura rosaceana* NPV (ChroNPV), *Philosamia cynthia ricini* NPV (PhcyNPV) e *Galleria mellonella* MNPV (GmMNPV) e dos ortomixovírus Dhori virus (DHOV), Jos virus (JOSV), Thogoto virus (THOV), Quaranfil virus (QRFV), Tjuloc virus (TJUV) e Johnston Atoll virus (JAV). Analisando essa árvore, não é possível determinar ainda se DsGV recebeu o gene *gp64* do clado a ou do clado b dos baculovírus, visto que o suporte é muito baixo para o seu agrupamento em um grupo ou em outro.

Comparações genômicas revelaram que a divisão dos alfabaculovírus em grupo I e II está relacionada ao tipo de proteína de fusão do envelope do fenótipo BV. Alfabaculovírus do grupo II e betabaculovírus possuem uma proteína de fusão ancestral (proteína F) cuja função é permitir que o vírus se espalhe de célula a célula, enquanto que nos alfabaculovírus do grupo I essa função é desempenhada pela GP64. Alfabaculovírus do grupo I também possuem a proteína F, mas esta desempenha um papel auxiliar na entrada do vírus (LUNG et al., 2002, 2003; WANG et al., 2008). Homólogos de GP64 também são encontrados em ortomixovírus, vírus de RNA que infectam artrópodes e mamíferos. Possivelmente, o ancestral desses vírus adquiriu um homólogo da GP64 do genoma do hospedeiro artrópode ou de um hospedeiro co-infectado com um baculovírus (MORSE et al., 1992).

Estudos sugerem que o gene *gp64* de baculovírus foi adquirido tardiamente, durante a evolução, do próprio hospedeiro ou de outros vírus que infectam insetos, resultando em vantagens seletivas, devido a maior eficiência da interação vírus-receptor e entrada do vírus (LUNG et al., 2002; MORSE et al., 1992). Mais estudos serão necessários para o maior entendimento dessa aquisição em DsGV.

Figura 28 – Árvore filogenética construída a partir das sequências deduzidas de aminoácidos do gene gp64 de DsGV (em vermelho), de todos alfabaculovírus do grupo I completamente sequenciados, dos baculovírus Anagrapha falcifera MNPV (AfMNPV), Choristoneura occidentalis (ChocNPV), Choristoneura rosaceana NPV (ChroNPV), Philosamia cynthia ricini NPV (PhcyNPV) e Galleria mellonella MNPV (GmMNPV) e dos ortomixovírus Dhori virus (DHOV), Jos virus (JOSV), Thogoto virus (THOV), Quaranfil virus (QRFV), Tjuloc virus (TJUV) e Johnston Atoll virus (JAV). O método utilizado foi Máxima Verrossimilhança (MV) e modelo de evolução LG; com os valores de bootstrap (≥ 70%) anotados para 100 replicatas.



A disponibilidade de genomas completos de baculovírus permitiu obter árvores mais robustas que aquelas geradas por genes individuais, visto que a concatenação de vários genes conservados fornece um grande número de sítios informativos (HERNIOU; JEHLE, 2007). A análise filogenética baseando-se na concatenação das sequêcias deduzidas de aminoácidos de 30 core genes (*38k, 49k, ac68, ac81, desmoplakin, DNA polimerase, gp41, helicase, lef-1, lef-2, lef-4, lef-5,* *lef-8, lef-9, odv-e18, odv-e25, odv-e27, odv-e56, p18, p33, p47, p48, pif-0, pif-1, pif-2, pif-3, pif-4, vlf-1, vp39 e vp1054*) de 61 baculovírus totalmente sequenciados está representada na Figura 29. O filograma mostra a clara divisão dos 4 gêneros (alfa-, beta-, gama- e deltabaculovírus) da família Baculoviridae.

Além disso, o grupo dos alfabaculovírus apresenta uma subdivisão bem evidente (grupo I e II). O grupo I dos alfabaculovírus também possui uma divisão em dois clados (la e lb) um que compreende 8 NPVs (OpMNPV, CfMNPV, AnpeNPV/AnpeNPV-L2, HycuNPV, CfDEFMNPV, AgMNPV-2D e EppoNPV) e outro que possui 7 NPVs (BmNPV, BomaNPV, PlxyMNPV, AcMNPV, RoMNPV, MaviNPV e ThorMNPV). Nos alfabaculovírus do grupo II não existe essa subdivisão evidente. Alguns alfabaculovírus do grupo II (HzSNPV, HearMNPV, LeseNPV-AH1 e SpliNPV-G2) parecem ter se separado do resto do grupo anteriormente na evolução. Os alfabaculovírus do grupo II mostraram comprimento de ramo mais longos, sugerindo que esse grupo é mais ancestral do que os alfabaculovírus do grupo I.

Dentro dos betabaculovírus observa-se a presença de dois clados monofiléticos bem separados (clado a e b) (Figura 29). O clado a inclui HearGV, XecnGV, PsunGV e SpliGV. O clado b é formado por 11 GVs (PlxyGV, AgseGV, EpapGV, ClanGV, AdorGV, PhopGV, ChocGV, PiraGV, CrleGV, CpGV e DsGV). Estudos sugerem que os betabaculovírus que infectam hospedeiros das famílias Noctuidae e Totricidae tendem a formar dois grupos distintos. O clado b é formado por granulovírus que infectam principalmente insetos da família Tortricidae tais como AdorGV, PiraGV, CrleGV, EpapGV, CpGV e PhopGV. DsGV, que também está inserido no clado b, infecta insetos da família Crambidae. PlxyGV (infecta insetos da família Plutellidae) e AgseGV (infecta insetos da família Noctuidae) são os vírus mais basais do clado b (HERNIOU; JEHLE, 2007; JEHLE et al., 2006).

Essas análises estão de acordo com os estudos de Miele et al. (2011), Thumbi et al. (2011) (Figura 10) e Wang et al. (2011). As maiores diferenças observadas nas análises ocorrem dentro do grupo formado pelos alfabaculovírus do grupo II, que parecem não ter uma clara subdivisão; embora o estudo de Wang et al. (2011) também tenha sugerido a formação de três clados distintos. Dentro do grupo formado pelos betabaculovírus, a análise do presente estudo não incluiu AgseGV e PlxyGV no clado a. Segundo Ferrelli et al. (2012), EpapGV parece ser o betabaculovírus mais próximo do ancestral comum do clado b. No entanto, a Figura 29 mostra que PlxyGV é o baculovírus mais basal. Além disso, o filograma coloca beta- e alfabaculovírus do grupo I mais próximos na escala evolutiva que beta- e alfabaculovírus do grupo II. Esse fato também foi sugerido no estudo de Thumbi et al. (2011) (Figura 10).

O filograma mostra a clara separação anterior do grupo formado pelos gamabaculovírus (NeseNPV, NeabNPV e NeleNPV) em relação aos alfa- e betabaculovírus (Figura 29). Análises filogenéticas suportam a ideia de que os gamabaculovírus teriam surgido anteriormente aos alfa- e betabaculovírus e que, dessa forma, poderiam ser vírus ancestrais (ARIF et al., 2011).

De todos os baculovírus analisados, CuniNPV é o vírus que teria se separado anteriormente a partir do ancestral comum dos 4 gêneros (Figura 29). Afonso et al. (2001) sugerem que a distância evolutiva entre o deltabaculovírus CuniNPV e alfa- e betabaculovírus é maior que a distância que separa esses últimos. Sabe-se que a co-evolução é um processo viável entre baculovírus e seus respectivos hospedeiros. Estudos moleculares demonstram que insetos da ordem Lepidoptera e Diptera se separaram do ancestral comum há cerca de 280 milhões de anos. As grandes diferenças existente entre CuniNPV e alfa- e betabaculovírus podem estar relacionadas a essa separação ancestral (BURMESTER et al., 1998). Figura 29 – Filogenia de DsGV e dos 61 baculovírus totalmente sequenciados, disponíveis no GenBank, inferida a partir da concatenação das sequências deduzidas de aminoácidos de 30 core genes. O método e o modelo de evolução utilizados foram Máxima Verossimilhança (MV) e LG, respectivamente. Os valores de bootstrap (> 90%) foram anotados para 100 replicatas. Os ramos em azul, vermelho e verde caracterizam o grupo dos alfa-, beta- e gamabaculovírus, respectivamente.



6 CONCLUSÃO

No presente estudo o genoma completo do recém-descoberto baculovírus, DsGV, foi caracterizado. O genoma de DsGV é o menor entre todos os baculovírus sequenciados totalmente até o momento (98 463 pb) e codifica 116 ORFs, sendo 17 ORFs únicas. Os 37 core genes, presentes em todos os baculovírus sequenciados totalmente, foram identificados, assim como um conjunto de 19 genes específicos de betabaculovírus. DsGV parece ser um vírus que não varia muito, apresentando SNPs em apenas 29 genes, sendo a maioria deles do tipo não sinônimos. Apresentou ainda 7 regiões homólogas (hrs) dentro do genoma, variando em tamanho e número de repetições diretas. A característica mais interessante observada foi a aquisição do gene gp64, diferenciando esse vírus dos demais betabaculovírus. O vírus também possui o gene f inteiro, porém observaram-se vários reads com grandes deleções, o que poderia sugerir a perda funcional da proteína F para a GP64.

A análise dos rearranjos gênicos mostrou que DsGV está mais proximamente relacionado ao grupo dos betabaculovírus. As análises de comparação genômica e de identidade sugerem que durante a evolução os baculovírus têm adquirido tanto genes individuais como blocos gênicos seguido de eventos de rearranjos, tais como inversões, deleções e aquisição de sequências previamente perdidas. A filogenia sugere que DsGV está inserido no clado b de betabaculovírus e que está mais proximamente relacionado ao grupo formado por ChocGV, PiraGV, ClanGV, CpGV e CrleGV, embora seja o baculovírus mais basal. Os dados gerados pelo sequenciamento do genoma de DsGV permitirão comparações com outros baculovírus sequenciados futuramente, além de fornecer informações para novas investigações, aumentando o conhecimento sobre a biologia molecular da patogenicidade de DsGV.

REFERÊNCIAS*

ACHARYA, A.; GOPINATHAN, K. P. Characterization of late gene expression factors lef-9 and lef-8 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 83, n. 8, p. 2015-2023, 2002.

AFONSO, C. L.; TULMAN, E. R.; LU, Z.; BALINSKY, C. A.; MOSER, B. A.; BECNEL, J. J.; ROCK, D. L.; KUTISH, G. F. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. J. Virol., p. 11157–11165, 2001.

AHRENS, C. H.; RUSSELL, R. L.; FUNK, C. J.; EVANS, J. T.; HARWOOD, S. H.; ROHRMANN, G. F. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. **Virology**, v. 229, p. 381-399, 1997.

AIRENNE, K. J.; HILTUNEN, M. O.; TURUNEN, M. P.; TURUNEN, A. M.; LAITINEN, O. H.; KULOMAA, M. S.; YLÄ-HERTTUALA, S. Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery. **Gene Ther.**, v. 7, n. 17, p. 1499-1504, 2000.

ALAOUI-ISMAILI, M. H.; RICHARDSON, C. D. Insect virus proteins (FALPE and p10) self-associate to form filaments in infected cells. **J. Virol.**, v. 72, n. 3, p. 2213–2223, 1998.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the cell**. 4th ed. Garland Publishing. New York. p. 1661. 2002.

ALLEN, G. E.; KNELL, J. D. A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis*. I. Ultrastructure, replication and pathogenicity. **Florida Entomologist**, v. 60, p. 223-240, 1977.

ALMEIDA, L. C. **Pragas em cana crua**: monitoramento e controle. 2009. Disponível em: http://www.assocana.com.br/restrito/AlmeidaPragasCanaCrua-9Outubro2009-Orplana.pdf>. Acesso em 6 set. 2013.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol., v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, S.B.; BOTELHO, P. S. M.; SALOMÃO, R.; STIMAC, J. L. Influência de diferentes tipos de alimentos na suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* (Fabri, 1794) aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 19, p. 383-391, 1990.

ANDRADE, F. G.; NEGREIRO, M. C. C.; FALLEIROS, A. M. F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (hübner, 1818) relacionados ao controle biológico por baculovirus *Anticarsia* (AGMNPV). **Arquivos do Instituto Biológico** (Arq. Inst. Biol.), v. 71, n. 3, p. 391-398, jul./set. 2004.

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

ANTONY, B.; SINU, P. A.; DAS, S. New record of nucleopolyhedroviruses in tea looper caterpillars in India. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 63-67, 2011.

ARIF, B.; ESCASA, S.; PAVLIK, L. Biology and genomics of viruses within the genus gammabaculovirus. **Viruses**, v. 3, p. 2214-2222, 2011.

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, p. 586-605, 1994.

BAILLIE, V. L.; BOUWER, G. High levels of genetic variation within core *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus genes. **Virus Genes**, v. 44, p. 149–162, 2012.

BARRETO, M. R.; GUIMARÃES, C. T.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F. H. Effect of baculovirus *Spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 67-75, 2005.

BATEMAN, A.; COIN, L.; DURBIN, R.; FINN, R.D.; HOLLICH, V.; GRIFFITHS-JONES, S.; KHANNA, A.; MOXON, M. M.; SONNHAMMER, E. L.; STUDHOLME, D. J.; YEATS, C.; EDDY, S. R. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. D138–D141, 2004.

BELYAVSKYI, M.; BRAUNAGEL, S. C.; SUMMERS, M. D. The structural protein ODVEC27 of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus is a multifunctional viral cyclin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (U S A), v. 95, p. 11205-11210, 1998.

BERRETTA, M.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus homologous regions (hrs): pleiotropic functional cis elements in viral genomes and insect and mammalian cells. **Current Topics in Virology**, v. 7, p. 47–56, 2008.

BERRETTA, M. F.; PASSARELLI, A. L. Function of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus late gene expression factors in the insect cell line SF-21. **Virology**, v. 355, p. 82–93, 2006.

BLISSARD, G. W. Baculovirus-insect cell interactions. **Cytotechnology**, v. 20, p. 73-93, 1996.

BLISSARD, G.W.; WENZ, J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **J. Virol.**, v. 66, p. 6829-6835, 1992.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, 2003.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis.* Em: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.;

BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil**: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 409-425.

BRAUNAGEL, S. C.; RUSSELL, W. K.; ROSAS-ACOSTA, G.; RUSSELL, D. H.; SUMMERS, M. D. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** (U S A), v. 100, p. 9797-9802, 2003.

BRANAUGEL, S. C.; SUMMERS, M. D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipids and fatty acid profiles. **Virology**, v. 202, p. 315-328, 1994.

BRAUNAGEL, S. C.; HE, H.; RAMAMURTHY, P.; SUMMERS, M. D. Transcription, translation, and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27. **Virology**, v. 222, n. 1, p. 100–114, 1996.

BROOKES, A. J. The essence of SNP. Gene, v. 234, p. 177-186, 1999.

BULACH, D. M.; KUMAR, C. A.; ZAIA, A.; LIANG, B.; TRIBE, D. E. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 1, p. 59-73, 1999.

BURDEN, J. P.; HAILS, R. S.; WINDASS, J. D.; SUNER, M. M.; CORY, J. S. Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the itch mite toxin txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, n. 3, p. 226-236, 2000.

BURMESTER, T.; MASSEY, H. C. JR.; ZAKHARKIN, S. O.; BENES, H. The evolution of hexamerins and the phylogeny of insects. **J. Mol. Evol.**, v. 47, n. 1, p. 93-108, 1998.

CAMPOS, M. B. S.; MACEDO, N. Cana-de-açúcar – ampliando campo de ataque. **Cultivar; Grandes Culturas**, Pelotas, v. 6, n. 68, p. 23-26, 2004.

CARSTENS, E. B.; CHAN, H.; YU, H.; WILLIAMS, G. V.; CASSELMAN, R. Genetic analyses of temperature-sensitive mutations in baculovirus late expression factors. **Virology**, v. 204, p. 323–337, 1994.

CARSTENS, E. B.; LU, A. L; CHAN, H. L. B. Sequence, transcriptional mapping, and overexpression of p47, a baculovirus gene regulating late gene expression. J. Virol., v. 67, p. 2513-2520, 1993.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L. Baculovirus: Agentes de Controle Biológico. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Org.). Fundamentos para a

regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. 1ª ed. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, v. 1, p. 175-194, 2006.

CASTRO, M. E. B.; RIBEIRO, Z. M. A.; SOUZA, M. L. Infectivity of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus to different insect cell lines: morphology, viral production and protein synthesis. **Biological Control**, v. 36, p. 299-304, 2006.

CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; SIHLER, W.; RODRIGUES, J. C. M.; RIBEIRO, B. M. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1733-1761, 1999.

CHANG, J. H.; CHOI, J. K.; JIN, B. R.; ROH, J. Y.; OLSZEWSKI, J. A.; SEO, S. J.; O'REILLY, D. R.; JE, Y. H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **Jounal of Invertebrate Pathology**, v. 84, n. 1, p. 30-37, 2003.

CHARLTON, C. A.; VOLKMAN, L. E. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf21 cells induces action cable formation. **Virology**, v. 197, p. 245-254, 1993.

CHEN, H. Q.; CHEN, K. P.; YAO, Q.; GUO, Z. J.; WANG, L. L. Characterization of a late gene, ORF67 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **EBS Lett.**, v. 581, n. 30, p. 5836-5842, 2007.

CHEN, X.; IJKEL, W. F.; DOMINY, C.; ZANOTTO, P. M. A.; HASHIMOTO, Y.; FAKTOR, O.; HAYAKAWA, T.; WANG, C. H.; PREKUMAR, A.; MATHAVAN, S.; KRELL, P. J.; HU, Z.; VLAK, J. M. Identification, sequence analysis and phylogeny of the lef-2 gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus. **Virus Research**, v. 65, n. 1, p. 21–32, 1999.

CHEN, X.; ZHANG, W. J.; WONG, J.; CHUN, G.; LU, A.; MCCUTCHEN, B.F.; PRESNAIL, J. K.; HERRMANN, R.; DOLAN, M.; TINGEY, S.; HU, Z. H.; VLAK, J. M. Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* singlenucleocapsid nucleopolyhedroviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 673-684, 2002.

CHEN, X. W.; HU, Z. H.; JEHLE, J. A.; ZHANG, Y. Q.; VLAK, J. M. Analysis of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Heliothis armigera* single-nucleocapsid baculovirus. **Virus Genes**, v. 15, p. 219-225, 1997.

CHEN, Y. R.; WU, C. Y.; LEE, S. T.; WU, Y. J.; LO, C. F.; TSAI, M. F.; WANG, C. H. Genomic and host range studies of *Maruca vitrata* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 89, p. 2315-2330, 2008.

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. 4548-51, 1995.

CLEM, R. J. Baculoviruses and Apoptosis: the good, the bad and the ugly. **Cell Death and Differentiation**, London, UK, v. 8, p. 137-143, 2001.

CONAB. **Cana-de-açúcar**: safra 2013/2014. Segundo levantamento, Agosto/2013. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_abril_2013_10_lev.pdf>. Acesso em 11 jun. 2013.

CONDREAY, J. P.; KOST, T. A. Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells. **Curr. Drug Targets**, v. 8, p. 1126–1131, 2007.

CORY, J. S.; GREEN, B. M.; PAUL, R. K.; HUNTER-FUJITA, F. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 89, p. 101-111, 2005.

COSTA, N. R.; CASTRO, M. E. B; SIHLER, W.; PEGORARO, R. A.; SOUZA, M. L. **Análise da estabilidade genética do** *Erinnyis ello* **granulovírus aplicado em Santa Catarina como bioinseticida no período de 1986 a 2000**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. 21 p. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento).

CROUCH, E. A.; COX, L. T.; MORALES, K. G.; PASSARELLI, A. L. Inter-subunit interactions of the *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus RNA polymerase. **Virology**, v. 367, n. 2, p. 265-274, 2007.

DARLING, A. C. E.; MAU, B.; BLATTNER, F.R.; PERNA, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. **Genome Research**, v. 14, n. 7, p. 1394-1403, 2004.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 27, p. 1164-1165, 2011.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DE JONG, J. G.; LAUZON, H. A.; DOMINY, C.; POLOUMIENKO, A.; CARSTENS, E. B.; ARIF, B. M.; KRELL, P.J. Analysis of the *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 86, p. 929-943, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. DE; LANDELL, M. G. DE A. **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 349-404

DINARDO-MIRANDA, L. L.; FRACASSO, J. V.; DOS ANJOS, I. A.; GARCIA, J.; DA COSTA, V. P. Influência da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) sobre parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 71, n. 3, p. 342-345, 2012.

DU, E. Q.; YAN, F.; JIN, W. X.; LU, N.; XIAO, H. Z.; LU, S. Y.; QI, Y. P. P13 of *Leucania separata* multiple nuclear polyhedrosis virus affected the polyhedra and budded virions yields of AcMNPV. **Virus Res.**, v. 124, n. 1-2, p. 160-167, 2007.

DU, Q.; LEHAVI, D.; FAKTOR, O.; QI, Y.; CHEJANOVSKY, N. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. J. Virol., v. 73, p. 1278–1285, 1999.

DUFFY, S. P.; YOUNG, A. M.; MORIN, B.; LUCAROTTI, C. J.; KOOP, B. F.; LEVIN, D. B. Sequence analysis and organization of the *Neodiprion abietis* nucleopolyhedrovirus genome. **J. Virol.**, v. 80, n. 14, p. 6952-6963, 2006.

ERLANDSON, M. Insect pest control by viruses. **Encyclopedia of Virology**, 3 ed., v. 3, p. 125-133, 2008.

ESCASA, S. R.; LAUZON, H. A. M.; MATHUR, A. C.; KRELL, P. J.; ARIF, B. M. Sequence analysis of the Choristoneura occidentalis granulovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 1917-1933, 2006.

ESTEBAN, D. J.; DA SILVA, M.; UPTON, C. New bioinformatics tools for viral genome analyses at Viral Bioinformatics - Canada. **Pharmacogenomics**, v. 6, p. 271–280, 2005.

EVANS, J. T.; LEISY, D. J.; ROHRMANN, G. F. Characterization of the interaction between the baculovirus replication factors, LEF-1 and LEF-2. **J. Virol.**, v. 71, p. 3114–3119, 1997.

FAN, L.; HU, Y.; LI, L. L. Functional analysis of the late expression factor genes of *Plutella xylostella* granulovirus. **Bing Du Xue Bao**, v. 28, n. 5, p. 560-566, 2012.

FAN, Q.; LI, S.; WANG, L.; ZHANG, B.; YE, B.; ZHAO, Z.; CUI, L. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. **Virology**, v. 366, n. 2, p. 304-315, 2007.

FANG, M.; NIE, Y.; HARRIS, S.; ERLANDSON, M. A.; THEILMANN, D. A. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene ac96 encodes a per os infectivity factor (pif-4). **J. Virol.**, v. 83, n. 23, p. 12569–12578, 2009.

FANG, M.; WANG, H.; WANG, H.; YUAN, L.; CHEN, X.; VLAK, J. M.; HU, Z. Open reading frame 94 of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus encodes a novel conserved occlusion-derived virion protein, ODV-EC43. **J. Gen. Virol.**, v. 84, (Pt 11), p. 3021-3027, 2003.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J. L. V.; FILHO, M. D. C.; SANTIAGO, A. C. C.; FROTA, F. S. **Sete passos para controlar o mandarová-da-mandioca**. Acre: EMBRAPA Acre, 2007. 18 p. (Documentos, n. 108).

FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press; 1997. p. 33-59.

FENG, G.; THUMBI, D. K.; DE JONG, J.; HODGSON, J. J.; ARIF, B. M.; DOUCET, D.; KRELL, P. J. Selection and characterization of *Autographa californica* multiple

nucleopolyhedrovirus DNA polymerase mutations. J. Virol., v. 86, n. 24, p. 13576-13588, 2012.

FERRELLI, M. L.; SALVADOR, R.; BIEDMA, M E.; BERRETTA, M. F.; HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; GHIRINGHELLI, P. D.; ROMANOWSKI, V. Genome of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV), a polyorganotropic fast killing betabaculovirus with a novel thymidylate kinase gene. **BMC Genomics**, v. 13, n. 548, p. 1-14, 2012.

FRIESEN, P. D. Regulation of baculovirus early gene expression. In: MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press; 1997. p. 141–170.

FROY, O.; ZILBERBERG, N.; CHEJANOVSKY, N.; ANGLISTER, J.; LORET, E.; SHAANAN, B.; GORDON, D.; GUREVITZ, M. Scorpion neurotoxins: structure/function relationships and application in agriculture. **Pest Management science**, v. 56, p. 472-474, 2000.

FUNK, C. J.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus structure. In: MILLER, L. K. **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 7-27.

GALLO, D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2002. 920 p.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S. E OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. FEALQ, Piracicaba, v. 10, 920 p., 2002.

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.; MARUNIAK, J.E.; ZANOTTO, P. M.; DOUMBOUYA, A. E.; LIU, J. C.; MERRITT, T. M.; LANOIE, J. S. Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. **J. Virol.**, v. 78, p. 7036-7051, 2004.

GARRITY, D. B.; CHANG, M. J.; BLISSARD, G. W. Late promoter selection in the baculovirus gp64 envelope fusion protein gene. **Virology**, v. 231, n. 2, p. 167-181, 1997.

GHARIZADEH, B.; OGGIONNI, M.; ZHENG, B.; AKOM, E.; POURMAND, N.; AHMADIAN, A.; WALLIN, K. L.; NYRÉN, P. Type-specific multiple sequencing primers: a novel strategy for reliable and rapid genotyping of human papillomaviruses by pyrosequencing technology. **J. Mol. Diagn.**, v. 7, p. 198-205, 2005.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 78 p.

GHOSH, S.; PARVEZ, M. K..; BANERJEE, K.; SARIN, S. K.; HASNAIN, S. E. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. **Molecular Therapy**, v. 6, n. 1, Jul. 2002.

GITAHY, P. DE M.; GLAVÃO, P. G.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, J. I. **Perspectivas biotecnológicas de** *Bacillus thuringiensis* **no controle biológico da broca da cana-de-açúcar** *Diatraea saccharalis.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 44 p. (Embrapa Agrobiologia Documentos, n. 214).

GOMI, S.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 1323-1337, 1999.

GOMI, S.; ZHOU, C. E.; YIH, W.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. **Virology**, v. 230, n. 1, p. 35–47, 1997.

GOULSON, D. Can host susceptibility to baculovirus infection be predicted from host taxonomy or life history? **Environmental Entomology**, v. 32, p. 61-70, 2003.

GRABHERR, R.; ERNST, W. Baculovirus for eukaryotic protein display. **Current** gene therapy, v. 10, n. 3, p. 195-200, 2010.

GUARINO, L. **Baculoviruses**. Texas, 2011. Disponível em: onlinelibrary.wiley.com. Acesso em: 15 abr. 2013.

GUARINO, L. A.; DONG, W.; XU, B.; BROUSSARD, D. R.; DAVIS, R. W.; JARVIS, D. L. Baculovirus phosphoprotein pp31 is associated with virogenic stroma. **J. Virol.**, v. 66, n. 12, p. 7113-7120, 1992.

GUARINO, L. A.; DONG, W.; JIN, J. In vitro activity of the baculovirus late expression factor LEF-5. **J. Virol.**, v. 76, p. 12663–12675, 2002.

GUARINO, L. A.; MISTRETTA, T. A.; DONG, W. Baculovirus lef-12 is not required for viral replication. **J. Virol.**, v. 76, n. 23, p. 12032-12043, 2002.

GUARINO, L. A.; SUMMERS, M. D. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. **J. Virol.**, v. 57, n. 2, p. 563-571, 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.

GUIMARÃES, E. P. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: Sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 26, p. 24-27, 2002.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696-704, 2003.

HAAS, A. L.; KATZUNG, D. J.; REBACK, P. M.; GUARINO, L. A. Functional characterization of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica*. **Biochemistry**, v. 35, n. 17, p. 5385-5394, 1996.

HAAS-STAPLETON, E. J.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. J. Virol., v. 78, p. 6786–6791, 2004.

HANG, X.; DONG, W.; GUARINO, L. A. The lef-3 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encodes a single-stranded DNA-binding protein. **J. Virol.**, v. 69, p. 3924-3928, 1995.

HANG, X.; GUARINO, L. A. Purification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus DNA polymerase from infected insect cells. **J. Gen. Virol.**, v. 80, n. 9, p. 2519–2526, 1999.

HARRISON, R. L. Genomic sequence analysis of the Illinois strain of the *Agrotis ipsilon* multiple nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes**, v. 38, p. 155-170, 2009.

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

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Comparative analysis of the genomes of *Rachiplusia ou* and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedroviruses. J. Gen. Virol., v. 84, p. 1827-1842, 2003.

HARRISON, R. L.; LYNN, D. E. Genomic sequence analysis of a nucleopolyhedrovirus isolated from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Virus Genes**, v. 35, n. 3, p. 857-873, 2007.

HARRISON, R. L.; POPHAM, H. J. R. Genomic sequence analysis of a granulovirus isolated from the Old World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Virus Genes**, v. 36, n. 3, p. 565–581, 2008.

HARRISON, R. L.; SPARKS, W. O.; BONNING, B. C. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 envelope protein is required for oral infectivity and can be substituted functionally by *Rachiplusia ou* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56. **J. Gen. Virol.**, v. 91, p. 1173-1182, 2010.

HASHIMOTO, Y.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; FUJITA, T.; SANO, Y.; MATSUMOTO, T. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. **Virology**, v. 275, n. 2, p. 358-372, 2000.

HATWIN, R. E.; ARNOLD, L.; AYRES, M. D.; ZANOTTO, P. M.; HOWARD, S. C.; GOODAY, G. W.; CHAPPELL, L. H.; KITTS, P. A.; KING, L. A.; POSSEE, R. D. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. **Virology**, v. 212, p. 673–685, 1995.

HAWTIN, R. E.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C. J.; GOODAY, G. W.; KING, L. A.; KUZIO, J. A.; POSSEE, R. D. Liquefacion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insets is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, v. 238, p. 243-253, 1997.

HAYAKAWA, T.; KO, R.; OKANO, K.; SEONG, S. I.; GOTO, C.; MAEDA, S. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. **Virology**, v. 262, n. 2, p. 277-297, 1999.

HERNIOU, E. A.; JEHLE, J. A. Baculovirus phylogeny and evolution. **Curr. Drug Targets**, v. 8, n. 10, p. 1043–1050, 2007.

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.

HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; O'REILLY, D. R.; CORY, J. S. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. **J. Virol.**, v. 78, n. 7, p. 3244-3251, 2004.

HILTON, S.; WINSTANLEY, D. Genomic sequence and biological characterization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the summer fruit tortrix, *Adoxophyes orana*. J. **Gen. Virol.**, v. 89, p. 2898-2908, 2008a.

HILTON, S.; WINSTANLEY, D. The origins of replication of granuloviruses. **Archives** of Virology, v. 153 (8 Ed.), p. 1527-1535, 2008.

HITCHMAN, R.; HODGSON, D.; KING, L. A.; CORY, J. S.; HAILS, R.; POSSEE, R. D. Host mediated selection of pathogen genotypes as a mechanism for the maintenance of baculovirus diversity in the field. **J. Invert. Pathol.**, v. 94, p. 153-162, 2007.

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. **Int. J. Evol. Biol.**, v. 17, p. 1018-1025, 2004.

HU, Y. C. Baculovirus vectors for gene therapy**. Advances in Virus Research**, v. 68, p. 287-320, 2006.

HU, Y. C. Baculoviral vectors for gene delivery: a review. **Curr. Gene Ther.**, v. 8, p. 54–65, 2008.

HU, Z. H.; ARIF, B. M.; JIN, F.; MARTENS, J. W. M.; CHEN, X. W.; SUN, J. S.; ZUIDEMA, D. G.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Distinct gen arrangement in the

Buzurra suppressaria single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. J. Gen. Virol., v. 79, p. 2841-2851, 1998.

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

HUGHES, A. L.; FRIEDMAN, R. Genome-wide survey for genes horizontally transferred from cellular organisms to baculovirus. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, p. 979-987, 2003.

HUIJSKENS, I.; LI, L.; WILLIS, L. G.; THEILMANN, D. A. Role of AcMNPV IE0 in baculovirus very late gene activation. **Virology**, v. 323, n. 1, p. 120-130, 2004.

HWANG, Y. T.; ZUCCOLA, H. J.; LU, Q.; HWANG, C. B. A point mutation within conserved region VI of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase confers altered drug sensitivity and enhances replication fidelity. **J. Virol.**, v. 78, p. 650–657, 2004.

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, p. 957-971, 2002.

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

IJKEL, W. F.; WESTENBERG, M.; GOLDBACH, R. W.; BLISSARD, G. W.; VLAK, J. M.; ZUIDEMA, D. A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. **Virology**, v. 275, n. 1, p. 30-41, 2000.

IKEDA, M.; SHIKATA, M.; SHIRATA, N.; CHAEYCHOMSRI, S.; KOBAYASHI, M. Gene organization and complete sequence of the *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v. 87, p. 2549-2562, 2006.

IKEDA, M.; YANAGIMOTO, K.; KOBAYASHI, M. Identification and functional analysis of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus iap genes. **Virology**, v. 321, p. 359–371, 2004.

IYER, L. M.; BALAJI, S.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. **Virus Res.**, v. 117, n. 1, p. 156-184, 2006.

JAKUBOWSKA, A.; VAN OERS, M. M.; ZIEMNICKA, J.; LIPA, J. J.; VLAK, J. M. Molecular characterization of *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus from Poland. J. Inv. Pathology, v. 90, p. 64-68, 2005.

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, p. 537-551, 2006.

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.

JEHLE, J. A.; LANGE, M.; WANG, H.; HU, Z.; WANG, Y.; HAUSCHILD, R. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. **Virology**, v. 346, n. 1, p.180–193, 2006.

JIANG, Y.; DENG, F.; RAYNER, S.; WANG, H.; HU, Z. Evidence of a major role of GP64 in group I alphabaculovirus evolution. **Virus Res.**, v. 142, n. 1-2, p. 85-91, 2009.

KABA, S. A.; MUSOKE, A. J.; SCHAAP, D.; VLAK, J. M. Development of novel and effective subunit vaccines against east coast fever based on insect cell-derived **T. parva sporozoite surface protein P67**. In: Book of Abstracts, SIP 2004, Helsinki, 1-6, ago. 2004. p. 87-88.

KADLEC, J.; LOUREIRO, S.; ABRESCIA, N. G.; STUART, D. I.; JONES, I. M. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 15, n. 10, p. 1024-1030, 2008.

KE, J.; WANG, J.; DENG, R.; WANG, X. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac66 is required for the efficient egress of nucleocapsids from the nucleus, general synthesis of preoccluded virions and occlusion body formation. **Virology**, 2008.

KELLY, B. J.; KING, L. A.; POSSEE, R. D. Introduction to baculovirus molecular biology. **Methods Mol. Biol.**, v. 388, p. 25-54, 2007.

KHAN, S.; SNEDDON, K.; FIELDING, B.; WARD, V.; DAVISON, S. Functional characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene of *Helicoverpa armigera* single-enveloped nucleopolyhedrovirus isolated in South Africa. **Virus Genes**, v. 27, n. 1, p. 17-27, 2003.

KIKHNO, I.; GUTIÉRREZ, S.; CROIZIER, L.; CROIZIER,G.; ANDFERBER, M. L. Characterization of pif, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen.Virol.**, v. 83, p. 3013–3022, 2002.

KIM, W. Y.; LEE, S. Y.; JUNG, Y. J.; CHAE, H. B.; NAWKAR, G. M.; SHIN, M. R.; KIM, S. Y.; PARK, J. H.; KANG, C. H.; CHI, Y. H.; AHN, I. P.; YUN, D. J.; LEE, K. O.; KIM, Y. M.; KIM, M. G.; LEE, S. Y. Inhibitor of apoptosis (IAP)-like protein lacks a baculovirus IAP repeat (BIR) domain and attenuates cell death in plant and animal systems. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 49, p. 42670-42678, 2011.

KIMCHI-SARFATY, C.; OH, J. M.; KIM, I.; SAUNA, Z. E.; CALCAGNO, A. M.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M. A "Silent" Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity. **Science**, v. 315, p. 525-528, 2007.

KING, L. A.; POSSEE, R. D. **The baculovirus expression system**: a laboratory guide. London; New York: Chapman and Hall, 1992. 229 p.

KNEBEL-MORSDORF, D.; QUADT, I.; LI, Y.; MONTIER, L.; GUARINO, L. A. Expression of baculovirus late and very late genes depends on lef-4, a component of the viral RNA polymerase whose guanyltransferase function is essential. **J. Virol.**, v. 80, n. 8, p. 4168-73, 2006.

KOOL, M.; AHRENS, C. H.; VLAK, J. M.; ROHRMANN, G. F. Replication of baculovirus DNA. J. Gen. Virol., v. 76, p. 2103-2118, 1995.

KOST, T. A. Application of recombinant baculovirus in biopharmaceutical research. In: AL-RUBEAI, M. (Ed.). **Cell Engineering.** Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 2000. v. 2. p. 1-28.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n. 5, p. 567-575, 2005.

KRAPPA, R.; RONCARATI, R.; KNEBEL-MORSDORF, D. Expression of PE38 and IE2, viral members of the C_3HC_4 finger family, during baculovirus infection: PE38 and IE2 localize to distinct nuclear regions. **J. Virol.**, v. 69, p. 5287-5293, 1995.

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, p. 17–34, 1999.

LANGE, M.; JEHLE, J. A. The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus. **Virology**, v. 317, p. 220-236, 2003.

LANGE, M.; WANG, H.; ZHIHONG, H.; JEHLE, J. A. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. **Virology**, v. 325, p. 36-47, 2004.

LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J. AND HIGGINS D.G. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LAUZON, H. A.; LUCAROTTI, C. J.; KRELL, P. J.; FENG, Q.; RETNAKARAN, A.; ARIF, B. M. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. **J. Virol.**, v. 78, n. 13, p. 7023-7035, 2004.

LAUZON, H. A. M.; 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, p. 945–961, 2005.

LE, S. Q.; GASCUEL, O. LG: An improved, general amino-acid replacement matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1307-1320, 2008.

LECUONA, R. E.; ALVES, S. B. Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch. and granulose virus on *Diatraea saccharalis* (F., 1794) at different temperatures. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 105, p. 223-228, 1988.

LEE, H. H.; MILLER, L. K. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol.**, v. 27, p. 754–767, 1978.

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, p. 226-244, 2002a.

LI, L.; LI, Q.; WILLIS, L. G.; ERLANDSON, M.; THEILMANN, D. A.; DONLY, C. Complete comparative genomic analysis of two field isolates of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus-A. **J. Gen. Virol.**, v. 86, p. 91-105, 2005.

LI, Q.; DONLY, C.; LI, L.; WILLIS, L. G.; THEILMANN, D. A.; ERLANDSON, M. Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. **Virology**, v. 294, n. 1, p. 106-121, 2002b.

LI, X.; SONG, J.; JIANG, T.; LIANG, C.; CHEN, X. The N-terminal hydrophobic sequence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection. **Arch. Virol.**, v. 152, n. 10, p. 1851-1858, 2007.

LI, G.; WANG, J.; DENG, R.; WANG, X. Characterization of AcMNPV with a deletion of ac68 gene. **Virus Genes**, v. 37, n. 1, p. 119-127, 2008.

LIANG, C.; SONG, J.; CHEN, X. The GP64 protein of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus rescues *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus transduction in mammalian cells. **J. Gen. Virol.**, v. 86, n. 6, p. 1629-1635, 2005.

LIANG, Z.; ZHANG, X.; YIN, X.; CAO, S.; XU, F. Genomic sequencing and analysis of *Clostera anachoreta* granulovirus. **Arch. Virol.**, v. 156, n. 7, p. 1185-1198, 2011.

LIMA FILHO, M.; LIMA, J. O. G. Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma* spp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições naturais. **Neotrop. Entomol.**, v. 30, n. 3, 2001.

LIN, G.; BLISSARD, G. W. Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus *lef-6*-null virus: LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene transcription. **J. Virol.**, v. 76, p. 5503–5514, 2002.

LIN, G.; BLISSARD, G. W. Analysis of an *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus lef-11 knockout: LEF-11 is essential for viral DNA replication. **J. Virol.**, v. 76, n. 6, p. 2770-2779, 2002.

LIN, G.; SLACK, J. M.; BLISSARD, G. W. Expression and localization of LEF-11 in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected Sf9 cells. **J. Gen. Virol.**, v. 82, n. 9, p. 2289-2294, 2001.

LIN, X.; CHEN, Y.; YI, Y.; ZHANG, Z. Baculovirus immediately early 1, a mediator for homologous regions enhancer function *in trans*. **J. Virol.**, v. 7, n. 32, p. 1-12, 2010.

LIU, C.; LI, Z.; WU, W.; LI, L.; YUAN, M.; PAN, L.; YANG, K.; PANG, Y. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac53 plays a role in nucleocapsid assembly. **Virology**, v. 382, n. 1, p. 59-68, 2008.

LIU, C. Y.; WANG, C. H.; HSIAO, W. K.; LO, H. R.; WU, C. P.; CHAO, Y. C. RING and coiled-coil domains of baculovirus ie2 are critical in strong activation of the cytomegalovirus major immediate-early promoter in mammalian cells. **J. Virol.**, v. 83, n. 8, p. 3604-3616, 2009.

LIU, X.; ZHAO, H.; FANG, Z.; YUAN, M.; YANG, K.; PANG, Y. Distribution and phosphorylation of the basic protein P6.9 of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **J. Virol.**, v. 86, n. 22, p. 12217-12227, 2012.

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, p. 6710–6718, 1994.

LU, A.; MILLER, L. K. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. **J. Virol.**, v. 69, n. 2, p. 975-982, 1995.

LU, A.; MILLER, L. K. Regulation of baculoviruses late and very late expression. P. 193-216. In: MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 447.

LU, A.; MILLER, L. K.; KRELL, P.; VLAK, J. M.; ROHRMANN, G. Baculovirus DNA replication. In: MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. New York and London: Plenum Press, 1997.

LU, A.; SESHAGIRI, S.; MILLER, L. K. Signal sequence and promoter effects on the efficacy of toxin-expressing as biopesticides. **Biological Control**, v. 7, p. 320-332, 1996.

LU, N.; DU, E.; LIU, Y.; QIAO, H.; YAO, L.; PAN, Z.; LU, S.; QI, Y. P13 from group II baculoviruses is a killing-associated gene. **BMB Rep.**, v. 45, n. 12, p. 730-735, 2012.

LUCKOW, V.A., LEE, S.C., BARRY, G.F., OLINS, P.O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J. Virol.**, v. 67, p. 4566–4579, 1993.

LUNG, O.; WESTENBERG, M.; VLAK, J. M.; ZUIDEMA, D.; BLISSARD, G. W. Pseudotyping *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV): F

proteins from group II NPVs are functionally analogous to AcMNPV GP64. J. Virol., v. 76, n. 11, p. 5729-5736, 2002.

LUNG, O. Y.; CRUZ-ALVAREZ, M.; BLISSARD, G. W. Ac23, an envelope fusion protein homolog in the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, is a viral pathogenicity factor. **J. Virol.**, v. 77, n. 1, p. 328-339, 2003.

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, p. 2531-2547, 2001.

LURIA, N.; LU, L.; CHEJANOVSKY, N. Conserved structural motifs at the c-terminus of baculovirus protein ie0 are important for its functions in transactivation and supporting hr5-mediated DNA replication. **Viruses**, v. 4, n. 5, p. 761-776, 2012.

MA, X.C.; SHANG, J. Y.; YANG, Z. N.; BAO, Y. Y.; XIAO, Q.; ZHANG, C. X. Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus that infects the tea looper caterpillar, *Ectropis obliqua*. **Virology**, v. 360, p. 235-246, 2007.

MAEDA, S. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. **Biochemical Biophysical and Research Communication**, v. 165, n. 3, p. 1177-1183, 1989.

MAPA. Intercâmbio comercial do agronegócio: principais mercados de destino. 2011. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/MAIS%20DESTAQUES/Agronegocio_2011.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2013.

MARTIGNONI, M.E.; IWAI, P.J. **A catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks**. 4th ed. Portland, OR: USDA-Forest Service, 1986. 51 p. (USDA.PNW-195).

MARUNIAK, J. E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS R. R.; FEDERICI, B. A. **The Biology of Baculoviruses.** Boca Raton: CRC, 1986. v. 1, p. 129-146.

MCCARTHY, C. B.; DAÍ, X.; DONLY, C.; THEILMANN, D. A. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac142, a core gene that is essential for BV production and ODV envelopment. **Virology**, v. 372, n. 2, p. 325-339, 2008.

MCCARTHY, C. B.; THEILMANN, D. A. AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. **Virology**, v. 375, n. 1, p. 277-291, 2008.

MIELE, S. A.; GARAVAGLIA, M. J.; BELAICH, M. N.; GHIRINGHELLI, P. D. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. **Int. J. Evol. Biol.**, ID 379424, 15p., 2011.

MIKHAILOV, V. S. Replication of the baculovirus genome. **Mol. Biol. (Mosk)**, v. 37, n. 2, p. 288-299, 2003.

MIKHAILOV, V. S.; OKANO, K.; ROHRMANN, G. F. Baculovirus alkaline nuclease possesses a 5' – 3' exonuclease activity ans associates with the DNA-binding protein lef-3. **J. Virol.**, v. 77, n. 4, p. 2436-2444, 2003.

MIKHAILOV, V. S.; OKANO, K.; ROHRMANN, G. F. Specificity of the endonuclease activity of the baculovirus alkaline nuclease for single-stranded DNA. J. Biol. Chem., v. 279, p. 14734-14745, 2004.

MIKHAILOV, V. S.; ROHRMANN. G. F. Baculovirus replication factor LEF-1 is a DNA primase. **J. Virol.**, v. 76, p. 2287-2297, 2002.

MILKS, M. L.; WASHBURN, J. O.; WILLIS, L. G.; VOLKMAN, L. E.; THEILMANN, D. A. Deletion of pe38 attenuates AcMNPV genome replication, budded virus production, and virulence in heliothis virescens. **Virology**, v. 310, n. 2, p. 224-234, 2003.

MILLER, D. W.; SAFER, P.; MILLER, L. K. An insect baculovirus host-vector for highlevel expression of foreign genes. In: SETLOW, J. K.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Genetic engineering**. New York: Plenum, 1986. p. 277-298.

MISHRA, G.; GAUTAM, H. K.; DAS, R. H. Serine/Threonine kinase dependent transcription from the polyhedrin promoter of SpltNPV-I. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 358, n. 3, p. 942-947, 2007.

MISHRA, G.; CHADHA, P.; CHAUDHURY, I.; DAS, R. H. Inhibition of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (*AcNPV*) polyhedrin gene expression by DNAzyme knockout of its serine/threonine kinase (pk1) gene. **Virus Res.**, v. 135, n. 1, p.197-201, 2008.

MISTRETTA, T. A.; GUARINO, L. A. Transcriptional activity of baculovirus very late factor 1. **J. Virol.**, v. 79, n. 3, p. 1958-1960, 2005.

MONTOR, W. R; SOGAYAR, M. C. Insetos como biofábrica de proteínas humanas. **Ciência hoje**, v. 33, p. 16-23, 2003.

MORSE, M. A.; MARRIOTT, A. C.; NUTTALL, P. A. The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. **Virology**, n. 186, p. 640–646, 1992.

MOSCARDI, F. **Utilização de baculovirus** *Anticarsia* para o controle da lagartada-soja, *Anticarsia gemmatalis*. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1983. p. 13. (Comunicado Técnico, n. 23).

MOSCARDI, F. The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 51-56, 1989.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.

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

MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B. S. Biological control of soybean caterpillars. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 3, 1984, Ames. Proceedings. **Anais...** Boulder: Westview, 1985. p. 703-711.

MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D. R. Utilización de virus a campo. In: LECUONA, R. E. **Microganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga.** Buenos Aires: Taller Mariano Mass, 1996. p. 261-276.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. Baculovírus para o controle de pragas: panacéia ou realidade? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 24, p. 22-29, 2002.

NAI, Y. S.; WU, C. Y.; WANG, T. C.; CHEN, Y. R.; LAU, W. H.; LO, C. F.; TSAI, M. F.; WANG, C. H. Genomic sequencing and analyses of *Lymantria xylina* multiple nucleopolyhedrovirus. **BMC Genomics**, v. 11, n. 116, 2010.

NAKAI, M.; GOTO, C.; KANG, W.; SHIKATA, M.; LUQUE, T.; KUNIMI, Y. Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai*. **Virology**, v. 316 p. 171-183, 2003.

NEGREIRO, M. C. C.; ANDRADE, F. G.; FALLEIROS, A. M. F. Immunology defense system in insects: an approach in velvetbean catterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), AgMNPV-resistant. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 293-308, out./dez. 2004.

NIE, Z. M.; ZHANG, Z. F.; WANG, D.; HE, P. A.; JIANG, C. Y.; SONG, L.; CHEN, F.; XU, J.; YANG, L.; YU, L. L.; CHEN, J.; LV, Z. B.; LU, J. J.; WU, X. F.; ZHANG, Y. Z. Complete sequence and organization of *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus, a dr-rich baculovirus. **BMC Genomics**, v. 8, p. 248-261, 2007.

NIE, Y.; FANG, M.; ERLANDSON, M. A.; THEILMANN, D. A. Analysis of the *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus overlapping gene pair lef3 and ac68 reveals that AC68 is a per os infectivity factor and that LEF3 is critical, but not essential, for virus replication. **J. Virol.**, v. 86, n. 7, p. 3985-3994, 2012.

OGEMBO, J.G.; CAOILI, B. L.; SHIKATA, M.; CHAEYCHOMSRI, S.; KOBAYASHI, M.; IKEDA, M. Comparative genomic sequence analysis of novel *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (NPV) isolated from Kenya and three other previously sequenced *Helicoverpa* spp. NPVs. **Virus Genes**, v. 39, p. 261-272, 2009.

OKANO, K.; VANARSDALL, A. L.; MIKHAILOV, V. S.; ROHRMANN, G. F. Conserved molecular systems of the Baculoviridae. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 77-87, 2006.

OLIVEIRA, J. V. DE C.; WOLFF, J. L. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; DE CASTRO, M. E. B.; DE SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. DE A. Genome of the most widely used viral biopesticide:

Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus. J. Gen. Virol., v. 87, p. 3233–3250, 2006.

OLSZEWSKI, J.; MILLER, L. K. A role for baculovirus GP41 in budded virus production. **Virology**, v. 233, p. 292–301, 1997.

O'REILLY, D. R. Auxiliary genes of baculoviruses. In: MILLER, L. K. **The Baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p. 267–340.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. **Science**, v. 245, p. 1110-1112, 1989.

O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene. **Bio. Technology**, v. 9, p. 1086–1089, 1991.

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

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMIREZ, O. T. Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system. In: OZTURK, S.; HU, W. S. (Ed.). Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies. New York: Marcel Dekker, 2003.

PALOMARES, L. A.; RAMIREZ, O. T. Complex N-glycosylation of recombinant proteins by insect cells. **Bioprocessing**, v. 1, p. 70-73, 2002.

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, p. 391-404, 2001.

PARNELL, M.; GRZYWACZ, D.; JONES, K. A.; BROWN, M.; ODUOR, G.; ONG'ARO, J. The strain variation and virulence of granulovirus of diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus, Lep., Yponomeutidae) isolated in Kenya. J. Invert. **Pathol.**, v. 79, p. 192–196, 2002.

PAROLA, A.D.; SCIOCCO-CAP, A.; GLIKMANN, G.; ROMANOWSKI, V. An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV). J. Virol. Methods, v. 112 (1-2), p. 13-21, 2003.

PARTINGTON, S.; YU, H.; LU, A.; CARSTENS, E. B. Isolation of temperature sensitive mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: phenotype characterization of baculovirus mutants defective in very late gene expression. **Virology**, v. 175, n. 1, p. 91-102, 1990.

PASSARELLI, A. L.; GUARINO, L. A. Baculovirus late and very late gene regulation. **Curr. DrugTargets**, v. 8, p. 1103–1115, 2007.

PASSARELLI, A. L.; MILLER, L. K. Identification of genes encoding late expression factors located between 56.0 and 65.4 map units of the *Autographa*

californica nuclear polyhedrosis virus genome. **Virology**, v. 197, n. 2, p. 704-714, 1993.

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, p. 2149–2158, 1993.

PASSARELLI, A. L.; MILLER, L. K. Identification and characterization of lef-1, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. **J. Virol.**, v. 67, n. 6, p. 3481-3488, 1993.

PASSARELLI, A. L.; TODD, J. W.; MILLER, L. K. A baculovirus gene involved in late gene expression predicts a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerases. **J. Virol.**, v. 68, p. 4673–4678, 1994.

PAYNE, C.C. Insect pathogenic viruses as pest control agents. Fortschritte der Zoologie, v. 32, p. 183-200, 1986.

PEARSON, M. N.; GROTEN, C.; ROHRMANN, G. F. Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the Baculoviridae. **J. Virol.**, v. 74, p. 6126–6131, 2000.

PEARSON, M. N.; ROHRMANN, G. F. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the *Baculoviridae*, *Orthomyxoviridae* and *Metaviridae* (insect retrovirus) families. **J. Virol.**, v. 76, p. 5301–5304, 2002.

PENG, K.; VAN LENT, J. W.; BOEREN, S.; FANG, M.; THEILMANN, D. A.; ERLANDSON, M. A.; VLAK, J. M.; VAN OERS, M. M. Characterization of novel components of the baculovirus per os infectivity factor complex. **J. Virol.**, v. 86, n. 9, p. 4981-4988, 2012.

PENG K.; WU, M.; DENG, F.; SONG, J.; DONG, C.; WANG, H.; HU, Z. Identification of proteinprotein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 91, p. 659–670, 2010.

PENNOCK, G. D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L. K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. **Molecular and Celular Biology**, v. 4, p. 399-406, 1984.

PERECMANIS, S. **Construção de um baculovirus recombinante com o gene de serino protease fúngica**. Tese de doutorado – Departamento de Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

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

POLANCZYK, R. A.; ALMEIDA, L. C.; PADULLA, L.; ALVES, S. B. Pragas de canade-açúcar x métodos alternativos de controle. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento,** n. 33, jul/dez 2004. POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis:* uma breve revisão **Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

POSSEE, R. D. Baculoviruses as expression vectors. **Current Opinion Biotechnology**, v. 8, p. 569-572, 1997.

POYNER, D. R.; HAY, D. L. Secretin family (Class B) G protein-coupled receptors - from molecular to clinical perspectives. **Br. J. Pharmacol.**, v. 166, n. 1, p. 1-3, 2012.

PRIKHOD'KO, G. G.; POPHAM, H. J. R.; FELCETTO, T. J.; OSTLIND, D. A.; WARREN, V. A.; SMITH, M. M.; GARSKY, V. M.; WARMKE, J. W.; COHEN, C. J.; MILLER, L. K. Effects of simultaneous expression of two sodium channel toxin genes on the properties of baculoviruses as biopesticides. **Biological Control**, v. 12, p. 66-78, 1998.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Curr. Op. Plant Biol.**, v. 5, p. 94-100, 2002.

RAPP, J. C.; WILSON, J. A.; MILLER, L. K. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. **J. Virol.**, v. 72, n. 12, p. 10197-10206, 1998.

RIBEIRO, B. M.; CROOK, N. E. Expression of full-lenght and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki in a baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n. 2, p. 121-130, 1993.

RIBEIRO, B. M.; PINEDO, F. J. R. Baculovírus recombinante para controle de praga: construção de um baculovírus *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) geneticamente modificado para o controle da lagarta da soja, *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 22, p. 50-58, 2001.

RIBEIRO, B. M.; SOUZA, M. L.; KITAJIMA, E. W. Taxonomia, caracterização molecular e bioquímica de vírus. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** 2. ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ, 1998. p. 481-507.

RODRIGUES, J. C. M.; SOUZA, M. L.; REILLR, D. O.; VELLOSO, L. M.; PINEDO, F. J. R.; RAZUCK, F. B.; RIBEIRO, B.; RIBEIRO, B. M. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes**, v. 22, n. 1, p. 103-112, 2001.

ROHEL, D. Z.; COCHRAN, M. A.; FAULKNER, P. Characterization of two abundant mRNAs of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus present late in infection. **Virology**, v. 124, p. 357-365, 1983.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus molecular biology**. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2008. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1736/. Acesso em: 5 ago. 2013.

ROHRMANN, G. F. **Baculovirus molecular biology**: Second Edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2011. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>. Acesso em: 5 ago. 2013.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. **Pragas**. 2007. Disponível em: < http://www.agencia.cnptiabrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_53_711200516718.html>. Acesso em 10 jun. 2013.

RUSSELL, R. L. Q.; ROHRMANN, G. F. Characterization of P91, a protein associated with virions of an *Orgyia pseudotsugata* baculovirus. **Virology**, v. 233, n. 1, p. 210-223, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, S. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: CSH, 1989.

SANGER, D. L.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings National Academy Science**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHULTZ, P.; CÉLIA, H.; RIVA, M.; SENTENAC, A.; OUDET, P. Three-dimensional model of yeast RNA polymerase I determined by electron microscopy of two-dimensional crystals. **EMBO J.**, v. 12, p. 2601–2607, 1993.

SEUFI, A. M. Characterization of an Egyptian *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus and a possible use of a highly conserved region from polyhedrin gene for nucleopolyhedrovirus detection. **Virol. J.**, v. 5, n.13, p. 1-11, 2008.

SHORT, A. D.; KENNEDY, L. J.; FORMAN, O.; BARNES, A.; FRETWELL, N.; WIGGALL, R.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E. R. Canine DNA subjected to whole genome amplification is suitable for a wide range of molecular applications. **Journal of Heredity**, 2005.

SIMÓN, O.; PALMAA, L.; WILLIAMS, T.; LÓPEZ-FERBER, M.; CABALLEROA, P. 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**, v. 109, p. 117–126, 2012.

SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; LÓPEZ-FERBER, M.; TAULEMESSE, J. M.; CABALLERO, P. Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. **Biol. Control.**, v. 44, p. 321-330, 2008.

SLACK, J.; ARIF, B. M. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. **Advances in Virus Research**, v. 69, p. 99-165, 2007.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol., v. 3, p. 2156–2165, 1983.

SMITH, I.; GOODALE, C. Sequence and *in vivo* transcription of *Lacanobia oleracea* granulovirus *egt*. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 405-413, 1998.

SMITH, G. E.; VLAK, J. M.; SUMMERS, M. D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000 molecular weight protein. **J. Virol.**, v. 45, n. 1, p. 215-225, 1983.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. **Texas Agricultural Experiment Station Bulletin**, n. 1555, 1987.

SUMMERS, M. D.; SMITH, G. E.; KNELL, J. D.; BURAND, J. P. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedrosis virus recombinants. **J. Virol.**, v. 34, n. 3, p. 693-703, 1980.

SUN, X.; PENG, H. Recent advances in biological control of pest insects by using viruses in China. **Virolog. Sinica.**, v. 22, p. 158–162, 2007

SOUZA, A. L. F.; BRUSAMARELLO, L. C. C. Sequenciamento de DNA: decifrando o manual de instruções dos seres vivos. **Sociedade Brasileira de Genética**, v. 3, n. 3, p. 45-52, 2009.

SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; SILHER, W.; RIBEIRO, Z. M. A.; MOSCARDI, F. Caracterização de baculovírus utilizados no controle de pragas: técnicas de caracterização de vírus de insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 24, p. 18-20, 2002.

SYVÄNEN, A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 12, p. 930-942, 2001.

SZEWCZYK, B.; HOYOS-CARVAJAL, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; LOBO DE SOUZA, M. Baculoviruses - re-emerging biopesticides. **Biotechnol. Adv.**, v. 24, p. 143–160, 2006.

TAGGART, D. J.; MITCHELL, J. K.; FRIESEN, P. D. A conserved N-terminal domain mediates required DNA replication activities and phosphorylation of the transcriptional activator IE1 of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **J. Virol.**, v. 86, n. 12, p. 6575-6585, 2012.

TANG, X. D.; XIAO, Q.; MA, X. C.; ZHU, Z. R.; ZHANG, C. X. Morphology and genome of *Euproctis pseudoconspersa* nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes**, v. 38, p. 495-506, 2009.

TANI, H.; LIMN, C. K.; YAP, C. C.; ONISHI, M.; NOZAKI, M.; NISHIMUNE, Y.; OKAHASHI, N.; KITAGAWA, Y.; WATANABE, R.; MOCHIZUKI, R.; MORIISHI, K.; MATSUURA, Y. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses. **J. Virol.**, v. 77, n. 18, p. 9799-9808, 2003.

TAVARÉ, S. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. Lectures on Mathematics in the Life Sciences (American Mathematical Society), v. 17, p. 57–86, 1986.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W. Baculoviruses: molecular biology of nucleopolyhedroviruses. **Encyclopedia of virology**. Oxford: Academic Press, 2008. p. 434-443.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D. R.; ROHRMANN, G. F.; THIEM, S., VLAK, J. M. Family Baculoviridae. Em: **Virus taxonomy:** eight report of international committee on taxonomy of viruses. FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. p. 177-185, 2005.

THIEM, S. M. Baculovirus genes affecting host function. In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., v. 45, n. 3-4, p. 111-126, 2009.

THUMBI, D. K.; EVELEIGH, R. J. M.; LUCAROTTI, C. J.; LAPOINTE, R.; GRAHAM, R. I.; PAVLIK, L.; LAUZON, H. A. M.; ARIF, B. M. Complete sequence, analysis and organization of the *Orgyia leucostigma* nucleopolyhedrovirus genome. **Viruses**, v. 3, n. 11, p. 2301-2327, 2011.

TITTERINGTON, J. S.; NUN, T. K.; PASSARELLI, A. L. Functional dissection of the baculovirus late expression factor-8 gene: sequence requirements for late gene promoter activation. **J. Gen. Virol.**, v. 84, n 7, p. 1817-1826, 2003.

TWEETEN, K. A.; BULLA, L. A.; CONSIGLI, R. A. Characterization of an extremely basic protein derived from granulosis virus nucleocapsids. **J. Virol.**, v. 33, p. 866–876, 1980.

VAIL, P. V.; SUTTER, G.; JAY, D. L.; GOUGH, D. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfafa looper. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 17, p. 383-888, 1971.

VALICENTE, F. H. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 119-127, 1989.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, R. B. Levantamento dos inimigos naturais da lagartado-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 333-337, 1999. VALICENTE, F. H.; CRUZ, I. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Embrapa-CNPMS, 1991. (Circular Técnica, n. 15).

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com baculovírus. **Circular técnica**, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, n. 114, p. 1-14, 2009.

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S.; BARROS, E. C. **Processo de formulação do baculovírus** *Spodoptera* em pó molhável. Sete Lagoas (MG): EMBRAPA, 2010. 5 p. (Circular Técnica, n. 156).

VANARSDALL, A. L.; OKANO, K.; ROHRMANN, G. F. Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. **J. Virol.**, v. 80, n. 4, p.1724-1733, 2006.

VANARSDALL, A. L.; PEARSON, M. N.; ROHRMANN, G. F. Characterization of baculovirus constructs lacking either the Ac 101, Ac 142, or the Ac 144 open reading frame. **Virology**, v. 367, p. 187–195, 2007.

VAN LENT, J. W. M.; GROENEN, J. T. M.; KLINGE-ROODE, E. C.; ROHRMANN, G. F., ZUIDEMA, D.; VLAK, J. M. Localization of the 34kDa polyhedron envelope protein in *Spodoptera frugiperda* cells infected with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Arch. Virol.**, v. 111, p. 103–114, 1990.

VAN OERS, M. M. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. S3-15, 2011.

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, p. 2069-2680, 2005.

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

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. (Ed.). **Virus taxonomy.** Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press. 2000.

VENDRAMIM, J. D. Técnicas para avaliação da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera- Pyralidae) em cultivares de cana-deaçúcar, com base no complexo broca - podridões. 1987. 156 f. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1987.

VIGDOROVICH, V.; MILLER, A. D.; STRONG, R. K. Ability of hyaluronidase 2 to degrade extracellular hyaluronan is not required for its function as a receptor for jaagsiekte sheep retrovirus. **J. Virol**, v. 81, p. 3124–3129, 2007.

VOLKMAN, L. E., BLISSARD, G. W., FRIESEN, P., KEDDIE, B. A., POSSEE, R.; THEILMANN, D. A. Family Baculoviridae. Em: MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A.; SUMMERS, M. D (Eds). **Virus Taxonomy.** Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Vienna e New York: Springer-Verlag, 1995. p. 104-113.

VOLKMAN, L. E.; GOLDSMITH, P. A. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. **Virology**, v. 143, p. 185-195, 1985.

WANG, D.; NA, S. H.; GUO, Z. J.; XU, H. J.; ZHANG, C. X. Characterization of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus orf33 that encodes a novel budded virion derived protein, BV-e31. **Arch. Virol.**, v. 150, n. 8, p. 1505-1515, 2005.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, p. 6977-6982, 1997.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. **Journal of Invertebrate Pathology,** v. 72, p. 57-62, 1998.

WANG, Y.; ABD-ALLA, A. M.; BOSSIN, H.; LI, Y.; BERGOIN, M. Analysis of the transcription strategy of the *Junonia coenia* densovirus (JcDNV) genome. **Virus Res.**, v. 174, n. 1-2, p. 101-107, 2013.

WANG, Y.; CHOI, J. Y.; ROH, J. Y.; LIU, Q.; TAO, X. Y.; PARK, J. B.; KIM, J. S.; JE, Y. H. Genomic sequence analysis of granulovirus isolated from the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 1-20, 2011.

WANG, Y.; CHOI, J. Y.; ROH, J. Y.; WOO, S. D.; JIN, B. R.; JE, Y. H. Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura* granulovirus. J. Microbiol., v. 46, n. 6, p. 704-708, 2008.

WANG, Y. S.; HUANG, G. H.; CHENG, X. H.; WANG, X.; GARRETSON, T. A.; DAI, L. Y.; ZHANG, C. X.; CHENG, X. W. Genome of *Thysanoplusia orichalcea* multiple nucleopolyhedrovirus lacks the superoxide dismutase gene. **J. Virol.**, v. 86, p. 11948-11949, 2012.

WASHBURN, J. O.; KIRKPATRICK, B. A.; VOLKMAN, L. E.; Comparative pathogenesis of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis-virus in larvae of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens*. **Virology**, v. 209, n. 2, p. 561-568, 1995.

WELLEHAN, J. R. JR.; YU, F.; VENN-WATSON, S. K.; JENSEN, E. D.; SMITH, C.R.; FARMERIE, W. G.; NOLLENS, H. H. Characterization of San Miguel sea lion virus populations using pyrosequencing-based methods. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 254-260, 2010.

WHITFORD, M; FAULKNER, P. A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked N-acetylglucosamine. **J. Virol.**, v. 66, n. 6, p. 3324–3329, 1992.

WILLIAMS, H. L.; MONGE-MONGE, K. S.; OTVOS, I. S.; REARDON, R.; RAGENOVICH, I. Genotypic variation among Douglas-fir tussock moth nucleopolyhedrovirus (OpNPV) isolates in the United States. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 108, p. 13-21, 2011.

WILLIAMS, T. The iridoviruses. **Advances in Virus Research**, v. 46, p. 347-412, 1996.

WILLIS, L. G.; SIEPP, 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.

WILSON, M. E.; MAINPRIZE, T.H.; FRIESEN, P.D.; MILLER, L. K. Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. **J. Virol.**, v. 61, p. 661–666, 1987.

WOLFF, J. L. C.; VALICENTE, F. H.; MARTINS, R.; OLIVEIRA, J. V. C.; ZANOTTO, P. M. A. Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 89, p. 1202–1211, 2008.

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

WU, C. P.; HUANG, Y. J.; WANG, J. Y.; WU, Y. L.; LO, H. R.; WANG, J. C.; CHAO, Y. C. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus LEF-2 is a capsid protein required for amplification but not initiation of viral DNA replication. **J. Virol.**, v. 84, n. 10, p. 5015-5024, 2010.

WU, D.; DENG, F.; SUN, X.; WANG, H.; YUAN, L.; VLAK, J. M.; HU, Z. Functional analysis of FP25K of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **J. Gen. Virol.**, v. 86, p. 2439–2444, 2005.

WU, W.; LIN, T.; PAN, L.; YU, M.; LI, Z.; PANG, Y.; YANG, K. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid assembly is interrupted upon deletion of the *38K* gene. **J. Virol.**, v. 80, p. 11475–11485, 2006.

WU, W.; PASSARELLI, A. L. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus Ac92 (ORF92, P33) is required for budded virus production and multiply enveloped occlusion-derived virus formation. **J. Virol.**,v. 84, n. 23, p. 12351-12361, 2010.

WU, X.; GUARINO, L. A. *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus orf69 encodes an RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase. **J. Virol.**, v. 77, n. 6, p. 3430-3440, 2003.
WU, Y.; CARSTENS E. B. A baculovirus single-stranded DNA binding protein, LEF-3, mediates the nuclear localization of the putative helicase P143. **Virology**, v. 247, p. 32-40, 1998.

WU, Y.; LIU, G.; CARSTENS, E. B. Replication, integration, and packaging of plasmid DNA following cotransfection with baculovirus viral DNA. **J. Virol.**, v. 73, n. 7, p. 5473-5480, 1999.

XIAO, H.; QI, Y. Genome sequence of Leucania seperata nucleopolyhedrovirus. **Virus Genes**, v. 35, p. 845-856, 2007.

XU, Y. P.; YE, Z. P.; NIU, C. Y.; BAO, Y. Y.; WANG, W. B.; SHEN, W. D.; ZHANG, C. X. Comparative Analysis of the Genomes of *Bombyx mandarina* and *Bombyx mori* Nucleopolyhedroviruses. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 102-110, 2010.

YAMAGISHI, J.; BURNETT, E. D. HARWOOD, S. H.; BLISSARD, G. W. The AcMNPV pp31 gene is not essential for productive AcMNPV replication or late gene transcription but appears to increase levels of most viral transcripts. **Virology**, v. 365, p. 34–47, 2007.

YAMADA T. Giant viruses in the environment: their origins and evolution. **Curr. Opin Virol.**, v. 1, n. 1, p. 58-62, 2011.

YANG, S.; MILLER, L. K. Control of baculovirus polyhedrin gene expression by very late factor 1. **Virology**, v. 248, p. 131-138, 1998.

YANG, Z.; ZHANG, C. Advances on BmNPV functional genomics. **Biotechnol. Biomaterial**, 2012, S9.

YIN, F.; WANG, M.; TAN, Y.; DENG, F.; VLAK, J. M.; HU, Z.; WANG, H. Betabaculovirus F proteins showed different efficiencies when rescuing the infectivity of gp64-null *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Virology**, v. 436, n. 1, p. 59-66, 2013.

YIN, H.; YAO, Q.; GUO, Z.; BAO, F.; YU, W.; LI, J.; CHEN, K. Expression of nonstructural protein NS3 gene of *Bombyx mori* densovirus (China isolate). J. Genet. Genomics, v. 35, n. 4, p. 239-244, 2008.

YIP, P. Y.; CHAU, C. F.; MAK, C. Y.; KWAN, H. S. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. **Chin. Med.**, v. 2, p. 1-19, 2007.

YU, W.; DU, C. Y.; QUAN, Y. P.; NIE, Z. M.; CHEN, J.; LV, Z. B.; ZHANG, Y. Z. Characterization of late gene expression factor LEF-10 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Virus Res.**, v. 175, n. 1, p. 45-51, 2013.

YUAN, M.; HUANG, Z.; WEI, D.; HU, Z.; YANG, K.; PANG, Y. Identification of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus ac93 as a core gene and its requirement for intranuclear microvesicle formation and nuclear egress of nucleocapsids. **J. Virol.**, v. 85, n. 22, p. 11664-11674, 2011.

YUAN, M.; WU, W.; LIU, C.; WANG, Y.; HU, Z.; YANG, K.; PANG, Y. A highly conserved baculovirus gene p48 (ac103) is essential for BV production and ODV envelopment. **Virology**, v. 379, n. 1, p. 87-96, 2008.

ZANOTTO, P. M.; KESSING, B. D.; MARUNIAK, J. E. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rate and host associations. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n. 2, p. 147-164, 1993.

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, p. 6784–6789, 2000.

ZHANG, C. X.; MA, X. C.; GUO, Z. J. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Virology**, v. 333, p. 190-199, 2005.

ZHANG, M. J.; TIAN, C. H.; FAN, X. Y.; LOU, Y. H.; CHENG, R. L.; ZHANG, C. X. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF54, a viral desmoplakin gene, is associated with the infectivity of budded virions. **Arch. Virol.**, v. 157, n. 7, p. 1241-1251, 2012.

ZHAO, G.; DROIT, L.; TESH, R. B.; POPOV, V. L.; LITTLE. N. S.; UPTON, C.; VIRGIN, H. W.; WANG, D. The genome of Yoka poxvirus. **J. Virol.**, v. 85, n. 19, p. 10230-10238, 2011.

ZHOU, W.; YAO, L.; XU, H.; YAN, F.; QI, Y. The function of envelope protein P74 from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in primary infection to host. **Virus Genes**, v. 30, p. 139-150, 2005.

ZHU, S.; WANG, W.; WANG, Y.; YUAN, M.; YANG, K. The baculovirus core gene ac83 is required for nucleocapsid assembly and per os infectivity of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **J. Virol.**, v. 87 (18 Ed.), 2013.

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.

APÊNDICE

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

(continua)

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
1	granulina	1 > 747	747	248	E, L	8 (55)	1 (93)	1 (91)	1 (81)	1 (91)
2		1084 < 728	357	118	E, L	-	2 (58)	2 (59)	2 (51)	2 (39)
3	pk-1	1065 > 1877	813	270	E, L	10 (38)	3 (54)	3 (58)	3 (61)	3 (61)
hr-1										
4		2700 < 2131	570	189	E	-	4 (51)	4 (51)	4 (56)	5 (49)
5	ie-1	4217 < 2931	1287	428	E	147 (29)	7 (45)	6 (44)	6 (47)	7 (41)
6		4248 > 4817	570	189	-	146 (28)	8 (46)	7 (47)	7 (55)	8 (55)
7		5133 < 4837	297	98	E, L	145 (38)	9 (60)	8 (61)	8 (65)	9 (61)
8	odv-e18	5405 < 5139	267	88	L	143 (29)	14 (76)	13 (72)	14 (66)	12 (73)
9	p49	6789 < 5392	1398	465	E, L	142 (31)	15 (58)	14 (59)	15 (64)	13 (60)
10		7940 < 7362	579	192	E	-	16 (52)	15 (53)	-	-

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
11	odv-e56	9064 < 7937	1128	375	E	148 (46)	18 (70)	17 (68)	16 (68)	14 (72)
12		9090 > 9302	213	70	E	-	-	-	-	-
13	pep1	9750 < 9253	498	165	E, L	-	20 (57)	20 (66)	20 (53)	17 (70)
14		9830 > 10399	570	189	E, L	-	-	-	-	-
15	pep/p10	10446 > 11420	975	324	E, L	-	22 (64)	23 (63)	22 (60)	18 (64)
16	pep2	11432 > 11866	435	144	E, L	-	23 (71)	24 (70)	22 (70)	19 (66)
17		12827 < 11877	951	316	E	-	29 (36)	28 (-)	24 (45)	22 (30)
18		13517 > 14014	498	165	E, L	-	-	-	-	-
19	gp41	14893 < 14036	858	285	E, L	80 (32)	104 (67)	95 (69)	88 (71)	83 (66)
20		15434 < 14838	597	198	E, L	81 (47)	103 (73)	94 (71)	87 (71)	82 (70)
21	tlp20	15729 < 15418	312	103	E	82 (26)	102 (47)	93 (43)	86 (47)	81 (45)
22	vp91	15707 > 17344	1638	545	E, L	83 (26)	101 (55)	92 (55)	89 (53)	80 (53)

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
23	efp/proteína F	17407 > 18897	1491	496	E, L	23 (22)	31 (38)	30 (40)	27 (40)	23 (40)
24		19133 > 19618	486	161	E, L	-	-	-	-	-
25		19817 < 19575	243	80	E	-	-	-	-	-
26		20597 < 19995	603	200	E, L	-	33 (38)	32 (41)	28 (42)	24 (38)
27	pif-3	20625 > 21182	558	185	E, L	115 (39)	35 (53)	34 (48)	30 (52)	26 (50)
28	odv-e66	23458 < 21173	2286	761	L	46 (58)	37 (65)	35 (67)	45 (56)	27 (60)
29		23497 > 23858	362	102	L	-	39 (66)	36 (68)	31 (64)	28 (55)
30		24128 < 23844	285	94	E, L	-	-	-	-	-
31		25130 < 24198	933	310	E	-	-	-	-	-
32	lef-2	25266 > 25784	519	172	E	6 (27)	41 (48)	38 (49)	33 (54)	29 (51)
33		25771 > 26016	246	81	-	-	42 (33)	39 (37)	34 (48)	30 (41)
34		26006 > 26173	168	55	E, L	-	-	-	-	-

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
35		26142 > 27281	1140	379	E	-	-	-	-	-
36		27619 < 27278	342	113	E	-	-	-	-	-
37	metaloproteinase	28727 < 27621	1107	368	E, L	-	46 (36)	43 (40)	37 (40)	33 (38)
38	p13	28737 > 29537	801	266	E, L	-	47 (59)	44 (61)	38 (54)	34 (60)
hr-2										
39	pif-2	30006 > 31127	1122	373	E, L	22 (52)	48 (70)	45 (71)	40 (70)	35 (66)
40		31190 > 31573	384	127	E	-	-	-	-	-
41		31774 < 31619	156	51	E	-	49 (39)	46 (29)	41 (35)	-
42		31794 > 33647	1854	617	E, L	-	50 (46)	47 (51)	42 (31)	-
43		34251 < 33652	600	199	E, L	106 (39)	52 (68)	50 (71)	43 (72)	37 (72)
44		34263 > 34412	150	50	-	110 (24)	53 (67)	51 (63)	44 (76)	38 (81)
45	Ubq	34755 < 34399	357	118	-	35 (79)	54 (82)	52 (84)	45 (82)	39 (85)

 Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
46	odv-ec43	34759 > 35796	1038	345	L	109 (32)	55 (56)	53 (58)	46 (69)	40 (65)
47		35802 > 35996	195	64	E, L	-	56 (47)	54 (56)	47 (45)	41 (58)
48	39k	36735 < 35998	738	245	E, L	36 (35)	57 (46)	52 (44)	48 (51)	55 (41)
49	lef-11	37006 < 36725	282	93	E, L	37 (27)	58 (66)	53 (64)	49 (59)	56 (56)
50	p74	38984 < 36930	2055	684	E, L	138 (42)	60 (60)	58 (61)	51 (60)	46 (58)
51		39477 < 39037	441	146	E, L	-	-	-	-	-
52	acetiltransferase	40061 < 39477	585	194	E, L	-	-	-	56 (66)	48 (58)
hr-3										
53		40493 < 40074	420	139	E, L	-	62 (70)	60 (58)	55 (47)	49 (86)
54	p47	40537 > 41691	1155	384	E, L	40 (42)	68 (65)	61 (65)	56 (66)	50 (66)
55	bv-e31	41726 > 42373	648	215	E, L	38 (42)	69 (75)	62 (75)	57 (76)	51 (72)
hr-4										

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
56	p24	43109 > 43600	492	163	E, L	129 (32)	71 (61)	63 (64)	58 (56)	52 (63)
57	38.8kDa	44046 < 43621	426	141	-	13 (30)	73 (35)	65 (40)	62 (45)	54 (37)
58	lef-1	44734 < 44027	708	235	E	14 (31)	74 (59)	66 (59)	60 (63)	55 (59)
59	pif-1	44744 > 46297	1554	517	E, L	119 (36)	75 (60)	67 (60)	61 (58)	56 (59)
60		46302 > 46664	363	120	E, L	-	70 (34)	-	-	-
61	iap-3	46764 > 47558	795	264	L	27 (32)	17 (54)	16 (48)	-	84 (50)
62		47604 > 47756	153	51	E, L	-	-	-	-	-
63		47774 > 47977	204	67	E, L	150 (22)	79 (35)	70 (35)	-	59 (38)
64	lef-6	48202 < 47959	244	74	E	28 (31)	80 (39)	71 (39)	65 (56)	60 (46)
65	Dbp	49058 < 48261	798	265	E, L	25 (22)	81 (46)	72 (44)	66 (50)	61 (48)
66		49295 < 49077	219	72	E, L	-	82 (51)	73 (46)	70 (60)	62 (48)
67		49821 < 49237	585	194	L	-	82 (27)	73 (27)	67 (41)	63 (34)

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
68	p48	49843 > 51015	1173	390	E, L	103 (33)	83 (70)	74 (68)	68 (73)	64 (69)
69		51042 > 51329	288	95	E, L	102 (26)	84 (50)	75 (49)	69 (50)	65 (40)
70		52145 < 51369	777	258	E	-	-	-	-	-
71	p40	52377 > 53537	1161	386	E, L	101 (22)	85 (59)	76 (58)	70 (57)	66 (55)
72	p6.9	53545 > 53730	186	61	L	-	-	-	-	-
73	lef-5	54467 < 53766	702	233	E, L	99 (42)	87 (68)	78 (68)	72 (71)	68 (66)
74	38 k	54417 > 55328	912	303	L	98 (39)	88 (60)	79 (59)	73 (73)	69 (66)
75	dutpase	55312 > 55782	471	156	E, L	-	-	-	-	-
76		55779 > 56153	375	124	-	-	-	-	-	-
77	odv-e28/pif-4	56657 < 56172	486	161	E, L	96 (35)	89 (62)	80 (64)	74 (61)	70 (55)
78	helicase-1	56641 > 60024	3384	1127	E, L	95 (26)	90 (52)	81 (52)	75 (57)	71 (54)
79	odv-e25	60680 < 60042	639	212	E, L	94 (37)	91 (69)	82 (69)	76 (68)	72 (70)

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
80	p18	61182 < 60700	483	160	E, L	93 (33)	92 (44)	83 (40)	77 (49)	73 (46)
81	p33	61197 > 61952	756	251	E, L	92 (36)	93 (66)	84 (64)	78 (67)	74 (66)
82	lef-4	63268 < 61949	1320	439	E, L	90 (32)	95 (54)	86 (52)	80 (57)	75 (55)
83	vp39	63282 > 64136	855	284	E, L	89 (33)	96 (60)	87 (62)	81 (63)	76 (61)
84	odv-e27	64187 > 64999	813	270	L	144 (31)	97 (61)	88 (61)	82 (64)	77 (55)
hr-5										
85		66469 < 65435	1035	344	E, L	-	99 (35)	90 (35)	83 (36)	78 (37)
86		66497 > 66691	195	64	E, L	-	100 (50)	91 (51)	84 (50)	79 (60)
87		66698 > 66911	214	48	E, L	78 (42)	105 (63)	96 (60)	89 (73)	85 (44)
88	∨lf-1	66908 > 68023	1116	371	E, L	77 (34)	106 (73)	97 (74)	90 (77)	86 (67)
89		68046 > 68297	252	83	E, L	76 (26)	107 (67)	98 (65)	91 (70)	88 (68)
90		68312 > 68767	456	151	E, L	75 (28)	108 (57)	99 (58)	92 (63)	89 (63)

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
91		69141 < 68797	345	114	E	-	110 (26)	100 (23)	-	-
92	dna pol	72247 < 69170	3078	1025	E	65 (33)	111(65)	101(66)	93 (68)	90 (66)
93	desmoplakin	72222 > 73862	1641	546	E, L	66 (27)	112 (31)	102 (32)	98 (32)	91 (33)
hr-6										
94	lef-3	75283 < 74216	1068	355	E, L	67 (24)	113 (35)	103 (38)	95 (45)	92 (43)
95	pif-6	75249 > 75635	387	128	E	68 (34)	114 (65)	104 (57)	96 (65)	93 (62)
96		75733 > 76215	483	160	E	-	115 (38)	105 (33)	97 (39)	94 (33)
97	iap-5	76274 > 77068	795	264	E	-	116 (62)	106 (59)	98 (57)	95 (57)
98	lef-9	77073 > 78551	1479	492	L	62 (53)	117 (73)	107 (72)	99 (75)	96 (73)
99	fp25k	78557 > 78997	441	146	E, L	61 (36)	118 (68)	108 (66)	100 (72)	97 (67)
100		80157 < 79024	1134	377	E	-	-	-	-	-
101		80411 < 80160	252	83	E	-	-	-	-	-

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
102		82033 < 80522	1512	503	E	-	-	-	-	-
103	dna ligase	83710 < 82073	1638	545	E	-	120 (58)	110 (59)	102 (59)	99 (57)
104		83993 > 84307	315	104	L	-	124 (55)	114 (56)	106 (49)	103 (55)
105	alk-exo	84380 > 85576	1197	398	E, L	133 (33)	125 (53)	115(53)	107 (64)	104 (56)
106	helicase-2	85479 > 86771	1293	430	E, L	-	126 (59)	116 (54)	108 (59)	105 (52)
107	rr1	88632 < 86815	1818	605	E	-	127 (54)	-	-	-
108	rr2a	88731 > 89967	1237	348	L	-	128 (57)	-	-	-
109	gp64	90027 > 91544	1518	505	E	128 (74)	-	-	-	-
110	lef-8	94048 < 91547	2502	833	E, L	50 (48)	131 (69)	119 (67)	110 (70)	107 (68)
111		94072 > 94476	405	134	E, L	53 (36)	134 (67)	121 (69)	113 (68)	109 (63)
hr-7										
112		95844 < 95035	810	269	E, L	-	135 (41)	122 (29)	114 (38)	110 (31)

Tabela A.1 – Características gerais do genoma de DsGV.

(conclusão)

ORFs	Nome	Posição e Direção	Tamanho (pb)	Tamanho (aa)	Promotor (E e/ou L)	AcMNPV ORF (% id aa)	CpGV ORF (% id aa)	CrleGV ORF (% id aa)	PiraGV ORF (% id aa)	ChocGV ORF (% id aa)
113		96211 < 96014	198	65	E, L	-	136 (41)	123 (39)	115 (50)	111 (44)
114	lef-10	96192 > 96425	234	77	E, L	53a (38)	137 (52)	124 (56)	120 (61)	112 (55)
115	vp1054	96286 > 97269	984	327	E, L	54 (30)	138 (59)	125 (58)	116 (66)	113 (59)
116	me53	97493 > 98437	945	314	E	139 (27)	143 (52)	129 (47)	125 (52)	116 (46)

Nota: Posição, orientação transcricional e tamanho (em pares de base (pb) e aminoácidos (aa)) das 116 prováveis ORFs do genoma de DsGV. As ORFs foram comparadas com seus possíveis homólogos no protótipo AcMNPV e em quatro GVs (CpGV, CrleGV, PiraGV e ChocGV) em termos do número da ORF correspondente e porcentagem de identidade de aminoácidos (% id aa). ORFs únicas de DsGV estão em vermelho; ORFs específicas de GVs, em verde; ORFs comuns a todos baculovírus ("core genes"), em azul. Os motivos conservados do promotor precoce (E, "early") e tardio (L, "late") localizados dentro de 200 pb "upstream" do códon de início ATG estão indicados na coluna 'Promotor'. 'E' indica a presença dos motivos TATAW, TATAWTW e/ou TATAWAW e 'L', o motivo DTAAG (D = A, T ou G).