



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Análise da diversidade genética de genes  
responsáveis pela infecção *per os* (*pif*) e de fatores  
associados à virulência de *Anticarsia gemmatalis*  
*multiple nucleopolyhedrovirus***

**Briana Cardoso Ferreira**

Brasília - DF

2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Análise da diversidade genética de genes  
responsáveis pela infecção *per os* (*pif*) e de fatores  
associados à virulência de *Anticarsia gemmatalis*  
*multiple nucleopolyhedrovirus***

**Briana Cardoso Ferreira**

**Orientador: Prof. Dr. Bergmann M. Ribeiro**

**Co-Orientadora: Dra. Marlinda Lobo de Souza**

Brasília - DF

2013

Trabalho realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília (UnB) e no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sob orientação do Dr. Bergmann Morais Ribeiro e co-orientação da Dra. Marlinda Lobo de Souza. Suporte financeiro: CNPq.

Brasília – DF, Dezembro de 2013.

**Banca Examinadora:**

- **Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez** – Embrapa Soja.
- **Dra. Érica Soares Martins Queiroz** – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- **Dr. Júlio Carlyle Macedo Rodrigues** - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- **Dr. Renato de Oliveira Resende** – Universidade de Brasília.
- **Suplente: Dr. Tatsuya Nagata** - Universidade de Brasília.

*Aos meus pais, Walter e Inês,  
com todo o meu amor e  
carinho.*

## Agradecimentos

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e à Universidade de Brasília pelo suporte técnico e financeiro

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular pela oportunidade de realização do curso.

A Deus por ter sido todo esse tempo minha fortaleza e meu refúgio, por me proteger e me guiar todos os dias da minha vida e por permitir que eu concluísse mais essa meta.

Aos meus pais pelo carinho, atenção, apoio e incentivo durante todos esses anos. Vocês são muito importantes na minha vida, obrigada, amo muito vocês!

Ao Fábio por ter me apoiado durante todos esses anos e me dado força nas horas boas e ruins. Obrigada, te amo muito!

À minha família em geral que eu amo, e que tem me acompanhado sempre e me dado muita força para concluir mais essa etapa.

Ao Prof. Dr. Bergmann por ter me dado à oportunidade de ser sua aluna, por ter enriquecido meus conhecimentos sempre me motivando a buscar por mais informações e por sugerir novas estratégias para o trabalho. Obrigada pela confiança.

À Dra. Marlinda por acreditar no meu potencial, depositar confiança em mim, na minha capacidade de realizar esse trabalho e por contribuir com novas ideias.

Ao Dr. Fernando por me ensinar e ajudar nas análises das sequências dos genes *pif*, principalmente na montagem dos genomas e sempre contribuir com sugestões pertinentes para enriquecer o trabalho. Obrigada!

À Dra. Rosana Falcão por conceder o laboratório de BioImagem e também por ajudar com as fotos de microscopia eletrônica e na preparação das amostras.

À Dra. Elita por sempre se mostrar disposta a me ajudar e colaborar com o meu trabalho.

Aos técnicos e amigos do LVI, Zildinha e William. Obrigada pelo carinho, pelas inúmeras garrafinhas com células e ajuda com os experimentos; e à Raimundinha por seu carinho comigo e pela ajuda no laboratório.

À minha amiga Saluana por ter me ajudado com meus resultados, me dado muita força e principalmente pelos momentos divertidos juntas.

Às minhas amigas da UnB, Bele, Lóris e Mari por toda a ajuda, incentivo, força, momentos e mais momentos de descontração e principalmente pelos bolos maravilhosos de chocolate feitos pela Anabele. Enfim, obrigada por tudo.

Ao Daniel por me ajudar na construção dos plasmídeos e na elaboração da segunda estratégia de deleção dos genes *pif*.

E a todos que de um modo geral me apoiaram e me ajudaram a seguir em frente, vencer e realizar essa etapa tão importante da minha vida.

**Muito obrigada!!!**

## SUMÁRIO

Lista de Ilustrações .....	x
Lista de Tabelas .....	xii
Abreviaturas e Símbolos.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract .....	xvii
Introdução Geral .....	1
1. Baculovírus: características gerais e taxonomia.....	1
2. Fenótipos Virais.....	4
3. Ciclo de infecção.....	7
4. Expressão gênica em Baculovírus.....	10
Capítulo I:.....	15
Introdução .....	16
1. Diversidade genética em baculovírus .....	16
2. Infecção <i>per os</i> : Fatores de infectividade oral .....	19
3. <i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV: inseticida biológico .....	24
Objetivos .....	26
Objetivos Específicos.....	26
Material e Métodos.....	27
1. Análise dos genes <i>pif</i> dos isolados de AgMNPV.....	27
1.1. Vírus.....	27
1.2. Extração de DNA viral a partir de poliedros parcialmente purificados.....	30
1.3. Amplificação dos genes <i>pif</i> por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	30
1.4. Sequenciamento dos genes <i>pif</i> .....	32
2. Expressão das proteínas PIF-2 e PIF-4 e construção de anticorpo policlonal.....	33
2.1. Vírus.....	33
2.2. Amplificação de partículas BV de Ag-2D <i>in vitro</i> .....	33

2.3. Extração de DNA a partir de partículas BV .....	34
2.4. Bactérias.....	35
2.5. Sistema Gateway.....	35
2.6. Plasmídeos .....	36
2.7. Amplificação dos genes <i>pif</i> de AgMNPV contendo sítios <i>attB</i> .....	37
2.8. Reações de recombinação BP e LR.....	38
2.9. Ensaios de Indução e Repressão das proteínas PIF recombinantes .....	39
2.10. Análise e detecção das proteínas PIF.....	40
2.11. Purificação das proteínas PIF .....	42
2.12. Imunização de camundongos.....	42
3. Construção de plasmídeos para deleção dos genes <i>pif</i> .....	43
3.1. Primeira estratégia para inativação dos genes <i>pif</i> .....	43
3.2 Purificação do Vírus vAgApif-1 por Diluição Seriada.....	50
3.3. Detecção do gene <i>egfp</i> no genoma de vAgApif-1 .....	51
3.4. Segunda estratégia para inativação dos genes <i>pif</i> .....	53
Resultados e Discussão .....	59
1. Sequências dos genes <i>pif</i> dos isolados de AgMNPV .....	59
3.2. Expressão e purificação das Proteínas PIF de AgMNPV .....	69
3.3. Construção de plasmídeos para deleção dos genes <i>pif</i> .....	76
Capítulo II:.....	80
Introdução .....	81
1. Genoma de Baculovírus .....	81
2. Genoma de AgMNPV: conteúdo gênico e função .....	83
2.1. Genes que codificam proteínas estruturais .....	83
2.2. Genes envolvidos na replicação e transcrição viral .....	84
2.3. Genes <i>bro</i> ( <i>Baculovirus Repeated ORF</i> ).....	85
2.4. Regiões <i>hr</i> .....	85
2.5. Genes auxiliares .....	86

3. Clones virais de AgMNPV .....	87
Objetivos .....	88
Objetivos Específicos.....	88
Material e Métodos .....	89
1. Vírus utilizados e extração de DNA.....	89
2. Sequenciamento, montagem e análise dos genomas.....	89
3. Análise por microscopia ótica e eletrônica.....	91
Resultados e Discussão .....	93
1. Análise dos genomas dos clones Ag-01 e Ag-16.....	93
2. Particularidades dos genomas Ag-01 e Ag-16 .....	94
2.1. Gene <i>pe-38</i> .....	96
2.2. Gene <i>ie-2</i> .....	97
2.3. Gene <i>he-65</i> .....	100
2.4. Genes <i>bro</i> .....	101
2.5. Gene <i>pif</i> .....	101
2.6. Gene <i>odv-e56</i> .....	102
2.7. Regiões <i>hr</i> .....	103
3. Análise morfológica e estrutural dos clones Ag-01 e Ag-16.....	104
Considerações Finais.....	108
Referências Bibliográficas .....	112
Anexo .....	126
Anexo I – Artigo submetido à revista <i>Journal of Invertebrate Pathology</i> .....	126

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão de corpos de oclusão viral. ....	2
Figura 2: Micrografia eletrônica de transmissão de OB derivados de Nucleopolyhedrovirus. ....	3
Figura 3: Desenho esquemático da partícula BV ( <i>Budded Virus</i> ) e seu modo de saída da célula infectada e entrada na célula vizinha. ....	5
Figura 4: Figura ilustrativa da partícula ODV. ....	6
Figura 5: Ilustração do processo de infecção viral no intestino médio de uma larva infectada por baculovírus. ....	8
Figura 6: Larva de <i>Anticarsia gemmatalis</i> infectadas com baculovírus. ....	10
Figura 7: Processo temporal de produção de nucleocapsídeos e formação das partículas virais. ....	12
Figura 8: Desenho esquemático da partícula ODV onde é ilustrado as proteínas ancoradas à membrana. ....	20
Figura 9: Larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , um dos principais insetos desfolhadores da cultura da soja. ....	25
Figura 10: Desenho esquemático das reações de recombinação do sistema Gateway utilizando as enzimas BP e LR Clonase II. ....	36
Figura 11: Desenho esquemático dos vetores de doação (pDONR) e de destino (pDEST) utilizados no kit Gateway (Invitrogen). ....	37
Figura 12: Estrutura dos oligonucleotídeos <i>attB</i> . ....	38
Figura 13: Ilustração da estratégia utilizada para amplificação das regiões flaqueadoras aos genes <i>pif-3</i> e <i>pif-4</i> . ....	44
Figura 14: Esquema da construção do fragmento contendo as regiões homólogas de <i>pif</i> contendo um sítio para clivagem com a enzima <i>Bam</i> HI. ....	47
Figura 15: Esquema ilustrativo da reação de recombinação homóloga utilizando o vetor para interrupção dos genes <i>pif</i> . ....	53
Figura 16: Ilustração da estratégia utilizada para amplificação do fragmento de deleção dos genes <i>pif</i> . ....	57
Figura 17: Alinhamento das sequências direta e reversa montadas no programa ChromasPro. ....	60
Figura 18: Número de substituições do tipo transição e transversão encontradas nas sequências dos genes <i>pif</i> analisados. ....	61

Figura 19: Porcentagem de sítios polimórficos encontrados nas sequências dos quatro genes <i>pif</i> em estudo dos isolados virais de AgMNPV.....	65
Figura 20: Distribuição da diversidade genética dos isolados de AgMNPV ao longo da sequência dos genes <i>pif</i> .....	66
Figura 21: Análise da diversidade nucleotídica, Pi ( $\pi$ ), dos genes <i>pif</i> dos isolados temporais e geográficos. ....	67
Figura 22: Amplificação dos genes <i>pif-2</i> e <i>pif-4</i> com sítios de recombinação <i>attB</i> utilizando a técnica de PCR. ....	69
Figura 23: Confirmação por clivagem com enzimas de restrição dos vetores de doação (pDONR) dos genes <i>pif-2</i> e <i>pif-4</i> .....	70
Figura 24: Confirmação por clivagem com enzimas de restrição dos vetores de destino (pDEST) dos genes <i>pif</i> .....	71
Figura 25: Análise e detecção das proteínas PIF-2 e PIF-4 de AgMNPV por <i>Western blotting</i> com anti-HIS, após ensaios de indução com L-arabinose (0,2%) e repressão com Glicose (0,2%) em células BL-21AI.....	73
Figura 26: Detecção da proteína PIF-2 de AgMNPV por SDS-PAGE (A) e <i>Western blotting</i> (B) após purificação por cromatografia de afinidade, sob condições desnaturantes. ....	74
Figura 27: Análise por SDS-PAGE (A) e <i>Western blotting</i> (B) do antissoro anti-PIF2 de AgMNPV.....	75
Figura 28: Detecção do gene <i>egfp</i> no locus de <i>pif-1</i> utilizando a técnica de PCR.....	77
Figura 29: Clivagem com enzimas de restrição dos fragmentos para deleção dos genes <i>pif</i> . Eletroforese em gel de agarose 0,8%. ....	79
Figura 30: Ilustração do processo de pirosequenciamento 454.....	90
Figura 31: Alterações encontradas no gene <i>pe-38</i> dos clones Ag-01, Ag-16 e Ag-2D.....	97
Figura 32: Alinhamento do gene <i>ie-2</i> dos clones virais Ag2D, Ag01 e A16, respectivamente...	99
Figura 33: Alinhamento da região do gene <i>he65</i> dos clones Ag-2D, Ag-01 e Ag-16.....	100
Figura 34: Inserção de seis pares de base (AGC.GTT) no gene <i>adv-e56</i> do clone Ag-16.....	103
Figura 35: Células Tn5B1-4 infectadas com os clones virais Ag-2D, Ag-01 e Ag-16, 48h p.i. ....	105
Figura 36: Microscopia eletrônica de transmissão de células Tn5B1-4.....	106
Figura 37: Micrografia eletrônica de transmissão dos clones Ag-01 (A) e Ag-16 (B) após 48h de infecção em células Tn5B1-4. ....	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos isolados virais de AgMNPV.....	28
Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos <i>att</i> .....	31
Tabela 3: Programa utilizado para amplificação dos fragmentos <i>pif – attB</i> .....	32
Tabela 4: Relação dos oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene <i>egfp</i> .....	52
Tabela 5: Programas de PCR para detecção de <i>egfp</i> no locus do gene <i>pif-1</i> do recombinante <i>vAgΔpif-1</i> .....	52
Tabela 6: Relação dos plasmídeos utilizados para construção dos vírus recombinantes.....	48
Tabela 7: Relação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes <i>pif-2</i> , <i>pif-3</i> e <i>pif-4</i> e suas regiões a montante e a jusante. A localização dos genes no genoma de AgMNPV-2D bem como o número da fase aberta de leitura (ORF) também é mostrada na tabela .....	52
Tabela 8: Programas de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA dos genes <i>pif</i> de AgMNPV .....	52
Tabela 9: Lista dos oligonucleotídeos para amplificação dos cassetes gênicos de <i>pif-1</i> , <i>pif-2</i> , <i>pif-3</i> e <i>pif-4</i> .....	54
Tabela 10: Programa de PCR utilizado para amplificação dos cassetes gênicos.....	55
Tabela 11: Relação dos oligonucleotídeos para deleção dos genes <i>pif</i> .....	58
Tabela 12: Relação dos polimorfismos encontrados em todos os isolados de AgMNPV.....	62
Tabela 13: Relação dos <i>core genes</i> dos baculovírus <i>Autographa californica</i> MNPV e <i>Anticarsia gemmatilis</i> MNPV. Tabela adaptada de Miele <i>et al</i> , 2011.....	82

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcMNPV - *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*

AgMNPV - *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus*

Amp<sup>+</sup> - Adição de ampicilina

BSA - Albumina sérica bovina

BV - *Budded Virus*

CfDefNPV - *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus*

CL<sub>50</sub> - Concentração letal média

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatos

dpi - Dias pós-infecção

*dw* - Fragmento *downstream*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

g - Grama

GFP - *Green Fluorescent Protein*

GV - *Granulovirus*

h - Hora(s)

h p.i. - Horas pós-infecção

IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Kb - Kilobase = 1000 pares de base

kDa - Kilodalton

LB - Meio de cultura Luria-Bertani

M - Molar

min. - Minuto(s)

mM - Milimolar

MNPV - *Multiple nucleopolyhedrovirus*

NPV - *Nucleopolyhedrovirus*

nt. - Nucleotídeos

OB - *Occlusion Body*

°C - Graus Celsius

ODV - Vírus derivados do poliedro ou vírus oclusos (*Occluded Derived Virus*)

ORF - Fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

pb – Pares de base

PCR – Reação de Polimerização em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

pH – Potencial de hidrogênio

PIB - *Polyhedral Inclusion Body*

*pif* – *per os infectivity factor*

RNA – Ácido ribonucléico

RNase - Ribonuclease

s – Segundo(s)

SNPV – *Single nucleopolyhedrovirus*

Taq polimerase – Polimerase de *Thermus aquaticus*

TE – Tampão Tris-EDTA

TL<sub>50</sub> - Tempo letal médio

TM - Tempo médio de morte

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

U – Unidade enzimática

*up* – Fragmento *upstream*

UV - Ultravioleta

vAgGFPΔ*pif*-1 – Vírus recombinante AgMNPV com inserção do gene *gfp* no locus do gene *pif-1*

x-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

μL – Microlitro = 10<sup>-6</sup> litro

ng – Nano grama = 10<sup>-9</sup> gramas

~ - Aproximadamente

## RESUMO

Os baculovírus são patogênicos a insetos e têm sido efetivos no controle de pragas em áreas agrícolas e florestais. No Brasil, o baculovírus anticarsia (AgMNPV) tem sido empregado como inseticida biológico desde o início da década de oitenta para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*, uma das principais pragas dessa cultura. A principal rota de infecção do vírus se dá através da ingestão dos corpos de oclusão (OB) que, uma vez no intestino médio altamente alcalino, libera as partículas ODV (*Occluded Derived Virus*). A ligação, fusão e entrada dessas partículas nas células intestinais são mediadas por proteínas virais localizadas na membrana do ODV. Essas proteínas são codificadas por genes denominados *pif* (*per os infectivity factors*) os quais são fatores essenciais para infectividade oral, com consequente desenvolvimento da doença no corpo do inseto. Esse trabalho teve como objetivos: avaliar a estabilidade dos genes *pif* de isolados temporais e geográficos de AgMNPV; construir antissoros policlonais das proteínas PIF; construir vírus recombinantes com deleção de genes *pif* e analisar as sequências genômicas de dois clones de AgMNPV com grande diferença na virulência. Entre os genes *pif* dos isolados analisados, o gene *pif2* apresentou ser o mais variável, possuindo maior número de sítios polimórficos entre os genes *pif* analisados. No entanto, a quantidade de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) encontrada não indica alta variabilidade deste gene quando comparado a estudos semelhantes realizados com outros baculovírus. Este estudo revelou que apesar do vírus AgMNPV ter sido submetido a passagens subsequentes no inseto ao longo de 20 anos e da distância geográfica, os genes essenciais para a infectividade oral permaneceram estáveis. No estudo das proteínas PIF, somente a proteína PIF2 foi expressa, porém o anticorpo obtido não foi específico. Embora plasmídeos para deleção de genes *pif* tenham sido construídos, não foi possível a obtenção de vírus recombinantes. Os genomas dos clones virais analisados mostraram, entre outras características, a presença de uma única cópia dos genes *pe38* e *he65*, que estão em duplicata no genoma do vírus AgMNPV-2D. Foi observado também que um dos clones virais (AgMNPV-16), com baixa virulência, possui muitas variações na região codificante do gene *ie-2* e do gene *pe-38*. Esses genes são responsáveis pela transativação dos genes *early* que iniciam a replicação viral. Além disso, outros genes apresentaram alterações como *odv-e56*, que tem um papel essencial na maturação e envelopamento dos ODV, e os genes *bro-a* e *bro-b* que se encontram fundidos em uma única ORF. O número regiões *hr* também foi diferente entre os clones

(Ag2D com nove, Ag-01 com oito e Ag-16 com sete *hr*). Os estudos de genes de infectividade oral e de fatores associados à virulência no hospedeiro são importantes para compreensão da dinâmica populacional do vírus em condições naturais e poder ser úteis no desenvolvimento de programas de controle biológico.

## ABSTRACT

Baculoviruses are pathogenic to insects and have been effective in controlling pests in agricultural and forestry areas. In Brazil, the baculovirus anticarsia (AgMNPV) has been used as a biological insecticide since the early eighties to control the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, a major pest of this crop. The main route of virus infection occurs through ingestion of occlusion bodies (OB) which once in the highly alkaline midgut, release ODV (Occluded Derived Virus) particles. The binding, fusion and entry of such particles into the intestinal cells are mediated by viral proteins located in the membrane of the ODV. These proteins are encoded by genes called *pif* (*per os* infectivity factors) which are essential for oral infectivity, with consequent development of the disease in the body of the insect. This study aimed to evaluate the stability of the *pif* genes of seasonal and geographic field isolates of AgMNPV; to express PIF proteins for construction of polyclonal antibodies; to construct recombinant viruses with deleted *pif* genes, and to analyze the genomic sequence of two AgMNPV clones with high difference on their virulence. Among the *pif* genes of the analyzed isolates the *pif2* gene was the most variable among the genes studied, showing a higher number of polymorphic sites. However, the amount of SNP (Single Nucleotide Polymorphism) found does not indicate a high variability of this gene when compared to similar studies performed with other baculovirus. This study revealed that although the AgMNPV virus has been subjected to subsequent passages in insect for over 20 years and the geographic distance, the essential genes for oral infectivity remained stable. In the study of PIF proteins, only the PIF2 protein was expressed, but the obtained antibody was not specific. Although plasmids for *pif* gene deletion were constructed, the recombinant viruses with *pif* genes deletion have not been completed. The genomes of the viral clones analyzed showed the presence of a single copy of the *pe38* and *he65* genes which are in duplicate in the genome of the Ag-2D clone. Was observed that one of the viral clones (Ag-16), with lower virulence, has many variations in the *ie-2* and *pe-38* gene regions, which are responsible to transactivate early genes to start viral replication. Furthermore, other genes presented alterations like the *odv-e56*, and which have a essential role in the maturation and envelopment of the OD, and *bro-a* and *bro-b* genes that are in fused in only one ORF. The *hr* region number was also different among clones (Ag-2D with nine, Ag-01 with eight and Ag-16 with seven *hrs*). Studies on the *per os* infectivity factors genes and factors associated with virulence of the host are

important to the understanding of the viral population dynamics in natural conditions and can be valuable in the development of biological control programs.

# INTRODUÇÃO GERAL

## 1. BACULOVÍRUS: CARACTERÍSTICAS GERAIS E TAXONOMIA

Os baculovírus compõem o maior grupo de vírus patogênicos a insetos, abrangendo as ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera (Federici, 1997). São vírus de DNA fita dupla, possuem um genoma circular de 80 a 180kb, podendo codificar de 100 a 200 proteínas (Theilmann *et al*, 2005). O DNA é circundado por uma proteína básica que neutraliza sua carga negativa. Além disso, essa estrutura está envolta por proteínas que protegem o DNA formando o nucleocapsídeo, a unidade infectiva do vírus (Arif, 1986; Jehle *et al.*, 2006). Os nucleocapsídeos estão envoltos por uma membrana e ocluídos em uma matriz proteica denominada corpo de oclusão (OB - *occlusion body*). A maioria dos estudos feitos em baculovírus tem sido realizada com o vírus *Autographa californica* MNPV (AcMNPV), frequentemente utilizado como referência. Esse baculovírus foi descrito pela primeira vez em 1970 (Vail, 1971) e desde então tem sido utilizado para caracterização e função de genes devido a sua fácil propagação em cultura de células e seu amplo espectro de hospedeiros (Rhormann, 2011).

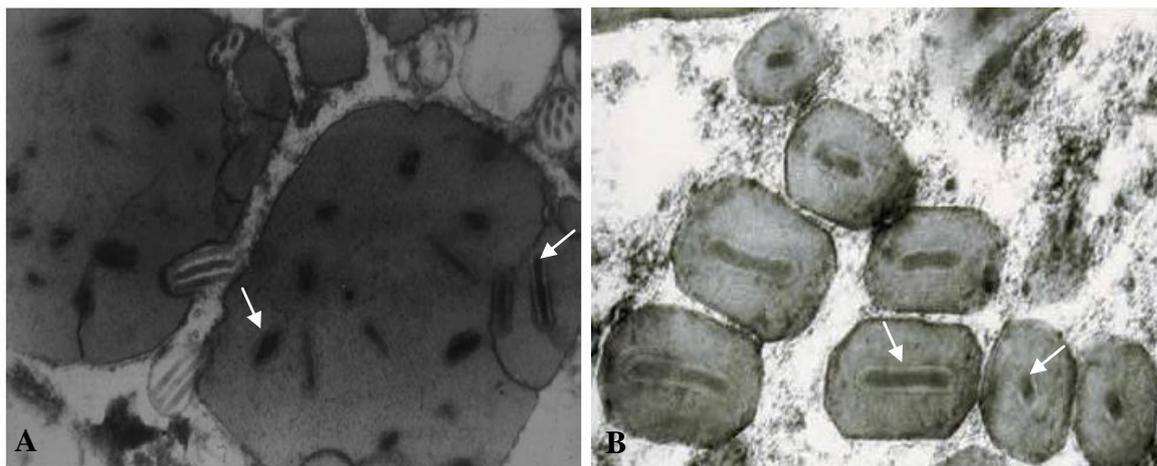


Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão de corpos de oclusão viral. (A) Poliedro do baculovírus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV). As setas apontam para partículas ODV com múltiplos nucleocapsídeos (Fonte: Szewczyk, 2006). (B) Grânulo do baculovírus *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV). As setas apontam os nucleocapsídeos. Foto: Dr. A. M. Huger, BBA Darmstadt, disponível em [www.apfelwickler.de](http://www.apfelwickler.de).

A família *Baculoviridae* foi dividida em dois gêneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (Blissard *et al.*, 2000). O primeiro gênero é composto por baculovírus que produzem OB usualmente na forma poliédrica (Figura 1A) podendo variar o tamanho dessa estrutura de 0,15 a 15 $\mu$ m. A principal proteína desses corpos de oclusão é chamada poliedrina e a formação dos OB ocorre no núcleo da célula infectada. Já o gênero *Granulovirus* inclui os baculovírus com OB de tamanho variando entre 0,3 a 0,5 $\mu$ m, de formato ovoide (Figura 1B) cuja principal proteína é chamada granulina. Os OB dos granulovírus são produzidos tanto no núcleo quanto no citoplasma celular (Funk *et al.*, 1997; Daimon *et al.*; 2007). Os NPV podem ainda apresentar corpos de oclusão contendo vírions com somente um nucleocapsídeo por envelope, denominado *single* (SNPV), Figura 2A, ou vários nucleocapsídeos, denominado *multiple* (MNPV), Figura 2B. Os GV costumam apresentar somente um vírion por envelope, ou raramente dois no interior do corpo de oclusão (Federici, 1997).

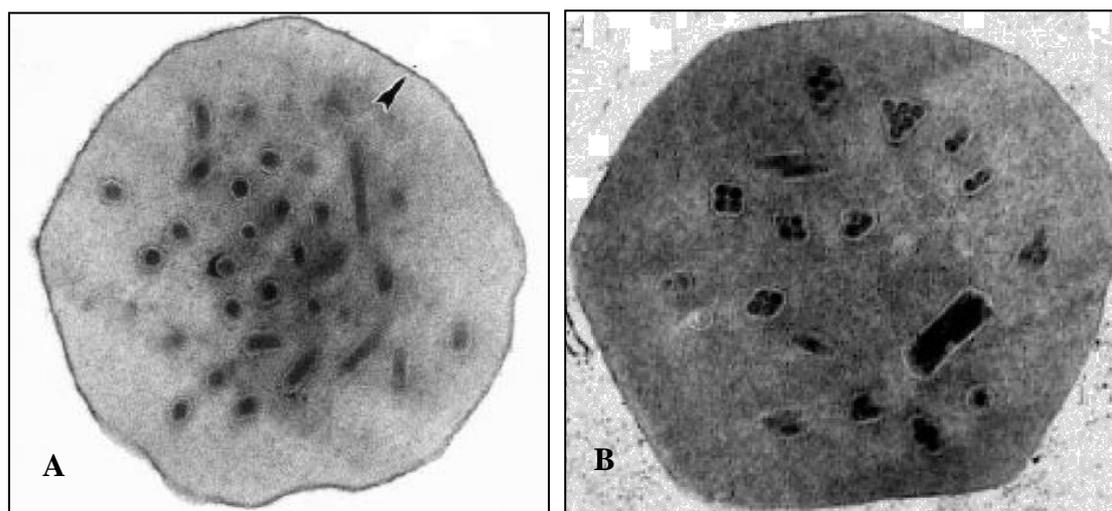


Figura 2: Micrografia eletrônica de transmissão de OB derivados de Nucleopolyhedrovirus. (A) Poliedro de *Helicoverpa armigera single nucleopolyhedrovirus* – HaSNPV; (B) Poliedro de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*– AcMNPV. Fonte: (A) Lua e Reid, 2000; (B) Yu *et al.*, 2009.

O gênero *Nucleopolyhedrovirus*, segundo Zanoto (1993) e colaboradores, pode ser dividido em dois grupos: NPV do Grupo I e NPV do Grupo II. Essa divisão foi sugerida com base em comparações realizadas entre as sequências dos genes *polh* e *DNA polimerase* (Bulach *et al.*, 1999).

Entretanto, trabalhos posteriores baseados nas sequências dos genomas dos baculovírus (Afonso *et al.*, 2001; Garcia-Maruniak *et al.*, 2004; Herniou *et al.*, 2004; Lauzon *et al.*, 2005) indicaram que os NPV que infectam insetos da ordem Diptera e Himenoptera formam um grupo ancestral (polifilético), sendo assim separados dos grupos formados por NPV e GV (monofiléticos) específicos de Lepidoptera. Com base nesses estudos, Jehle (2006) e colaboradores apresentaram uma nova classificação para a família *Baculoviridae* baseando-se principalmente na sequência genômica e especificidade do vírus ao inseto hospedeiro.

Foi sugerido que a família *Baculoviridae* fosse dividida em quatro gêneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* e *Deltabaculovirus*. O primeiro

---

e segundo gêneros incluem os NPV e GV específicos de lepidópteros, respectivamente. O gênero *Gammabaculovirus* engloba os NPV específicos de himenópteros e pertencente ao último gênero está o baculovírus específico do díptero *Culex nigripalpus*, CuniNPV (Afonso *et al.*, 2001).

## 2. FENÓTIPOS VIRAIS

Diferente da maioria dos vírus, os baculovírus produzem dois fenótipos virais durante seu ciclo de infecção. Tanto dentro do hospedeiro quanto em cultura de células há a formação de duas partículas geneticamente idênticas e estruturalmente distintas (Rhormann, 2011). A partícula ODV (*Occlusion Derived Virus*) possui nucleocapsídeos em forma de bastão e está presente no corpo de oclusão (OB). A partícula BV (*Budded Virus* ou vírus extracelular) não é ocluída e é gerada por brotamento do nucleocapsídeo da membrana plasmática celular (Granados e Williams, 1986; Theilmann *et al.*, 2005).

Pearson e Rhormann (2002) sugerem que a persistência dos fenótipos BV e ODV na natureza está relacionada a proteínas do envelope de cada partícula viral. O BV (Figura 3) possui no seu envelope, projeções denominadas peplômeros, que tem como componente principal uma glicoproteína de 64 kDa denominada de GP64 nos NPV do grupo I ou de proteína F nos NPV do Grupo II. Essa proteína, também chamada de proteína de fusão, está envolvida na entrada do vírus na célula e é de fundamental importância para a infectividade dos BV. Além disso, não está presente na partícula ODV (Volkman e Goldsmith, 1985; Hefferon *et al.*, 1999; Long *et al.*, 2006). A entrada da partícula BV na célula ocorre por meio de endocitose adsortiva onde ocorre fusão do envelope viral ao lisossomo celular liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (Figura 3). Esse fenótipo é produzido em estágios iniciais da infecção e ainda possui a

capacidade de infectar células de tecidos distintos do inseto, dispersando a infecção. O fenótipo BV é mais infeccioso na hemolinfa em relação aos ODV, que por sua vez são muito mais infectivos dentro do intestino da larva (Blissard e Rhormann, 1990; Kikhno *et al.*, 2002; Haas-Stapleton *et al.*, 2004).

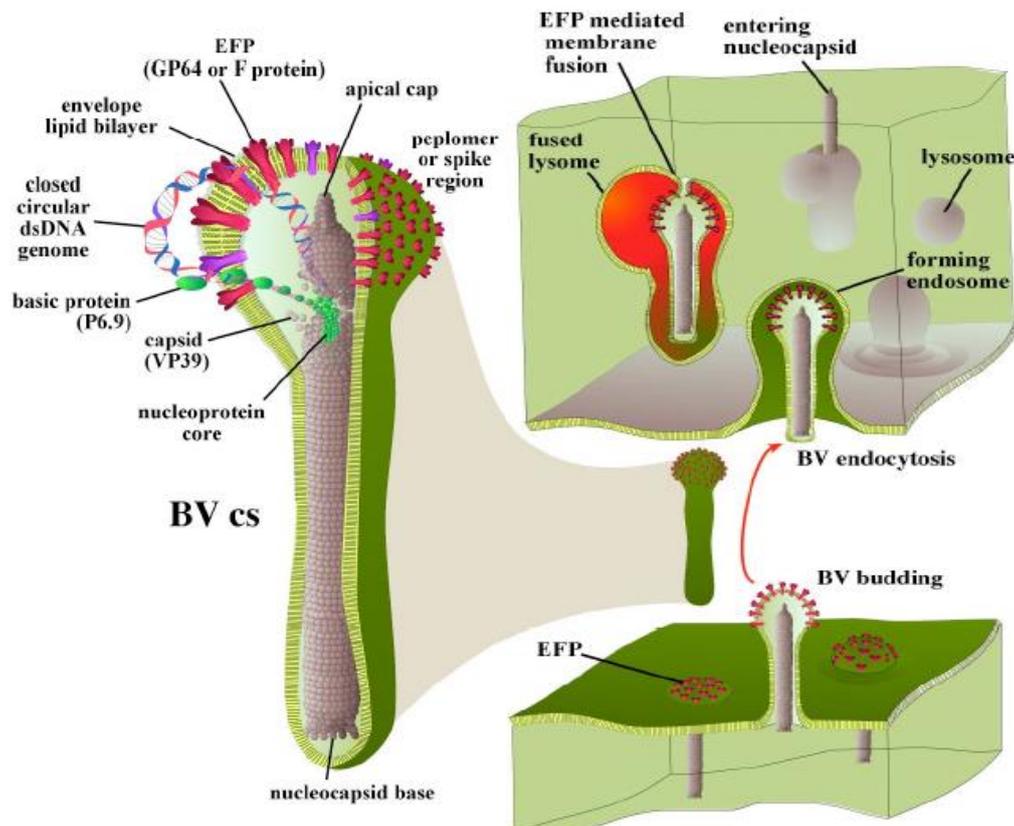


Figura 3: Desenho esquemático da partícula BV (*Budded Virus*) e seu modo de saída da célula infectada e entrada na célula vizinha. Nucleocapsídeos migram para regiões na membrana onde se encontram uma grande concentração da proteína de fusão, a GP64. A partícula sai da célula infectada por brotamento e se funde com a membrana da célula vizinha por endocitose adsorptiva liberando o DNA viral que irá migrar para o núcleo da célula hospedeira. Em destaque a partícula BV onde pode ser observada a localização da proteína GP64. Fonte: Slack e Arif, 2007.

O fenótipo ODV (Figura 4) possui um envelope que se liga e funde-se de forma apical à microvilosidade da célula intestinal do hospedeiro. Para isso, esse envelope possui várias proteínas integrais e associadas que, em sua grande parte, auxiliam no processo de ligação e fusão da membrana da partícula viral às membranas das células do

intestino. Esse mecanismo ainda não está bem esclarecido, porém algumas proteínas de envelope do ODV que estão envolvidas nesse processo têm sido amplamente estudadas. Os fatores de infectividade oral (*per os infectivity factors – pif*) estão associados à habilidade do vírus em infectar o inseto utilizando essa via (Kikhno *et al.*, 2002; Pijlman *et al.*, 2003; Ohkawa *et al.*, 2005).

A forma ODV é produzida na fase tardia da infecção e possui vários vírions envelopados e ocluídos em uma matriz proteica, permitindo maior estabilidade no ambiente externo. Essa estratégia garante ao vírus sua persistência fora do hospedeiro (Funk *et al.*, 1997; Lu e Miller, 1997).

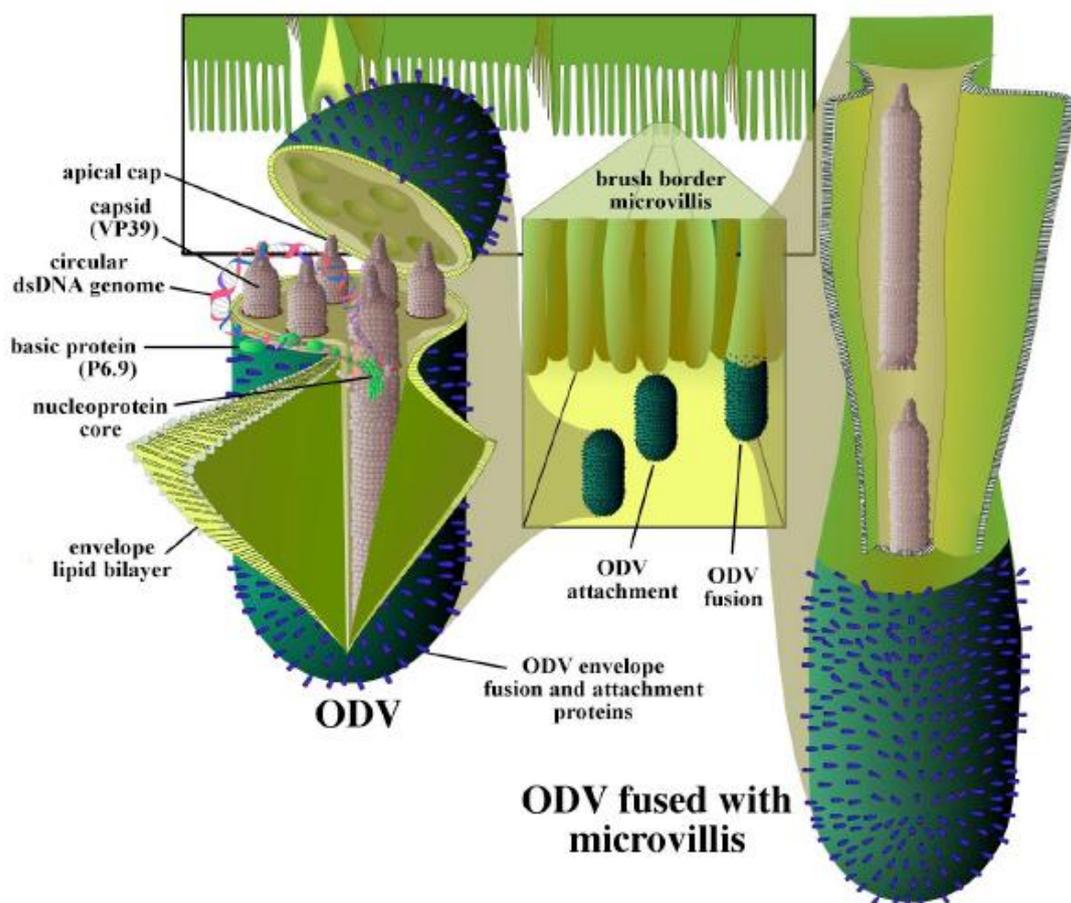


Figura 4: Figura ilustrativa da partícula ODV. Entrada na célula do intestino médio por meio de fusão apical com as microvilosidades, liberação e passagem dos nucleocapsídeos para o interior celular. Em destaque, modo de empacotamento dos nucleocapsídeos e envelope da partícula ODV. Fonte: Slack e Arif, 2007.

Foram identificadas 31 proteínas relacionadas ao envelope ODV do vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV), entre essas proteínas algumas estão associadas à replicação do DNA viral (DNA polimerase, IE-1, Helicase e LEF-1) e outras são específicas ao envelope como proteínas hidrofóbicas que direcionam a fusão da membrana viral com a membrana celular (Hong *et al.*, 1997).

Apesar dos nucleocapsídeos dos BV e ODV apresentarem o mesmo genótipo e similaridade em suas estruturas, as duas formas virais apresentam diferenças na composição de seus envelopes e essas diferenças refletem as distintas funções exercidas por cada fenótipo viral (Funk *et al.*, 1997; Theilmann *et al.*, 2005).

### **3. CICLO DE INFECCÃO**

A principal rota de infecção dos baculovírus é pela ingestão dos corpos de oclusão pelo inseto hospedeiro (Figura 5) que se alimenta de folhas contendo corpos de oclusão em sua superfície que irão desencadear a infecção, iniciando-a ao alcançar o intestino médio do inseto. Os lepidópteros possuem intestinos alcalinos (pH 10 a 11) (Terra e Ferreira, 1994) e nesse ambiente, os corpos de oclusão viral são solubilizados, liberando as partículas ODV. Essas partículas são liberadas dos OB cerca de 12 minutos após a ingestão do vírus pelo inseto (Adam e McClintock, 1991).

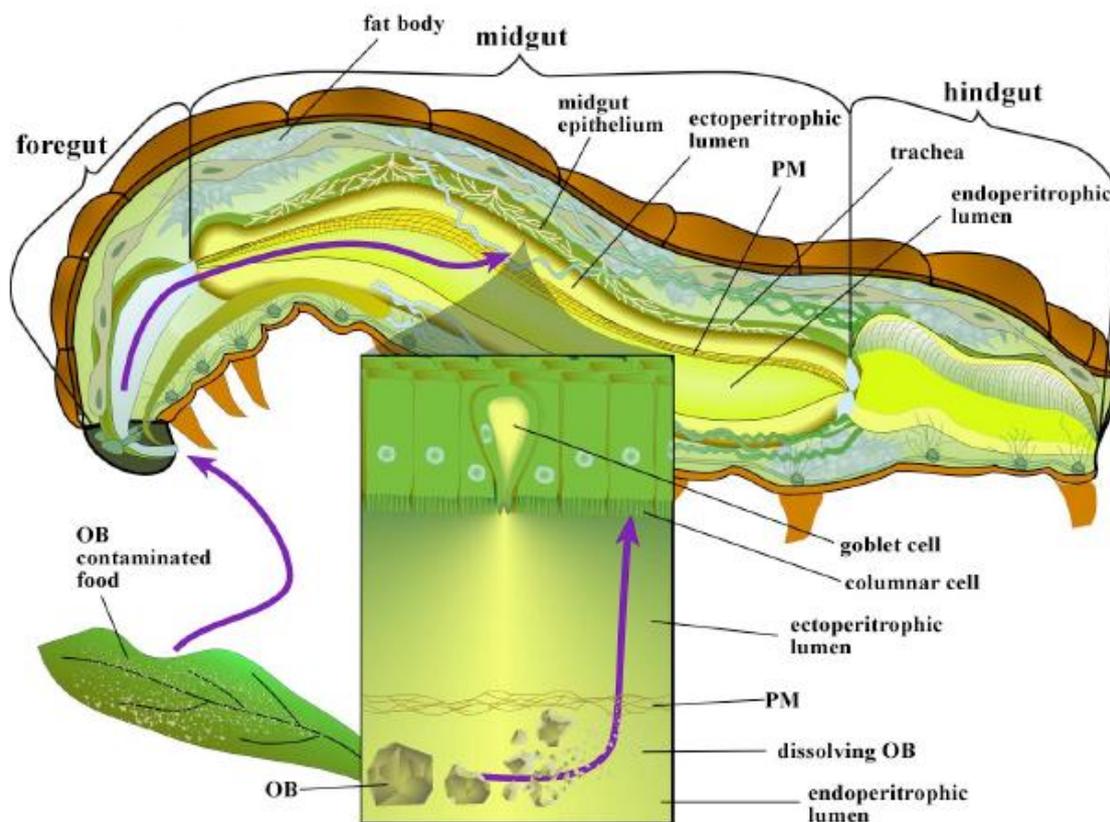


Figura 5: Ilustração do processo de infecção viral no intestino médio de uma larva infectada por baculovírus. Ingestão e entrada dos poliedros na lagarta. No detalhe, liberação das partículas ODV pela solubilização no ambiente alcalino do intestino, passagem pela membrana peritrófica e entrada dos nucleocapsídeos nas células colunares do intestino médio. Fonte: Slack e Arif, 2007.

Para alcançar as células colunares do intestino médio, os ODV precisam atravessar a membrana peritrófica que reveste todo o epitélio intestinal. Essa membrana acelular é rica em quitina e proteínas e serve tanto para proteção do epitélio evitando o contato direto com as partículas de comida, quanto atua como uma barreira de defesa contra infecções por vírus, fungos e bactérias (Federici, 1997; Levy *et al.*, 2004; Slack e Arif, 2007; Levy *et al.*, 2007). Ela possui poros de cerca de 21 a 36nm em diâmetro que permitem a passagem de enzimas que atuarão na digestão dos alimentos (Barbehenn e Martin, 1995). O processo de entrada do vírus através desta membrana ainda não foi bem elucidado, porém proteínas chamadas enhancinas, que estão presentes nos corpos de oclusão de algumas espécies de baculovírus, auxiliam nessa passagem (Wang *et al.*,

---

1994; Slavicek e Popham, 2005). As enhancinas são metaloproteases que degradam proteínas do tipo mucinas as quais estão em abundância na membrana peritrófica (Wang e Granados, 1997).

Atravessando a membrana peritrófica, as partículas ODV têm acesso às células colunares do intestino médio que são as mais abundantes do epitélio e estão envolvidas na secreção e absorção de nutrientes. A entrada dessas partículas que possuem um envelope lipídico dá-se através da ligação a receptores específicos na superfície celular e fusão direta com a membrana celular (Horton e Burand, 1993; Haas-Stapleton *et al.*, 2004) liberando os nucleocapsídeos dentro da célula. Essa interação célula-membrana ODV é mediada por produtos dos genes *pif* presentes no genoma da maioria dos baculovírus já sequenciados. Uma vez no interior celular, os nucleocapsídeos migram para o núcleo onde seus DNA são desnudados e dá-se início a transcrição de genes essenciais para a replicação do DNA viral, montagem e liberação das partículas BV. Ao longo da infecção, vírions são produzidos e ocluídos em corpos de oclusão, sendo essa a forma viral responsável pela dispersão horizontal da doença de inseto para inseto (Federici, 1997).

Mudanças morfológicas e comportamentais são desencadeadas no inseto após a infecção por baculovírus. Devido à capacidade de multiplicação viral em diversos tecidos do hospedeiro, por volta do terceiro ou quarto dia de ingestão dos poliedros, o inseto reduz sua alimentação, há um retardo no crescimento, o tecido torna-se flácido (Figura 6B), há descoloração da epiderme e diminuição da mobilidade aumentando assim, sua exposição a predadores. Outra característica da infecção é a migração das larvas para o topo da planta hospedeira, ficando presas pelas patas traseiras (geotropismo negativo) e morrendo após o quinto dia de infecção, Figura 6A (Granados e Williams, 1986; Moscardi, 1999; Castro e Souza; 2006).



Figura 6: Larva de *Anticarsia gemmatalis* infectadas com baculovírus. Comportamento de geotropismo negativo e descoloração do tegumento. Foto: Dr. Daniel Sosa-Gómez, disponível em [www.agencia.cnptia.embrapa.br](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br).

Após a morte da larva, ocorre liquefação dos seus tecidos devido principalmente à ação de enzimas virais denominadas catepsina (V-CATH) e quitinase (CHIA), secretadas na fase tardia da infecção. Essas enzimas auxiliam na ruptura da cutícula do inseto, liberando grande quantidade de corpos de oclusão no ambiente que serão ingeridos por outros hospedeiros (Jarvis, 1997; Miller, 1997; Daimon, 2007).

#### **4. EXPRESSÃO GÊNICA EM BACULOVÍRUS**

A expressão gênica em baculovírus é regulada temporalmente, onde os genes que são expressos em uma determinada fase serão dependentes dos produtos dos genes expressos na fase anterior. O ciclo de replicação inclui uma fase de produção de BV, não lítica, seguida pela produção de ODV e terminando com a ruptura celular para

liberação dos corpos de oclusão (Friesen e Miller; Blissard e Rhormann, 1990; Slack e Arif, 2007).

Após a entrada do DNA viral no núcleo da célula hospedeira (0h) dá-se início à fase precoce (*early phase*). Essa fase ocorre durante as seis primeiras horas pós-infecção e pode ser dividida em duas etapas, precoce imediata (*immediate early*) e precoce (*early*). A expressão dos genes da fase precoce imediata ocorre 30 minutos após a infecção e seus produtos, em conjunto com proteínas associadas ao nucleocapsídeo, começam a manipular a célula hospedeira para realização da replicação do DNA viral (Chisholm e Henner, 1988; Ramachandran *et al.*, 2001).

Já a fase precoce (*early phase*) caracteriza-se pela transcrição de genes codificadores de proteínas responsáveis pela replicação do DNA viral. A transcrição dos genes virais é mediada pela RNA polimerase da célula e a expressão de boa parte dos genes da fase precoce não são dependentes da síntese de outros produtos gênicos virais. (Lu e Carstens, 1993; Ribeiro *et al.*, 1994; Lin e Blissard, 2002). A expressão de genes da fase precoce como o *ie-1*, *ie-0* e *ie-2* irá realizar a transativação dos promotores de outros genes virais (Friesen, 1997; Ramachandram *et al.*, 2001; Lin e Blissard, 2002). Recentemente, Chen *et al.* (2013) mostrou que os transcritos da maioria dos genes precoces do baculovirus AcMNPV *in vitro* não possuem motivos conservados associados ao sítio de início da transcrição. Nesta fase também são transcritos genes codificadores de proteínas envolvidas na ativação da transcrição de genes da fase seguinte, a fase tardia (*late phase*) (Lu e Miller, 1997).

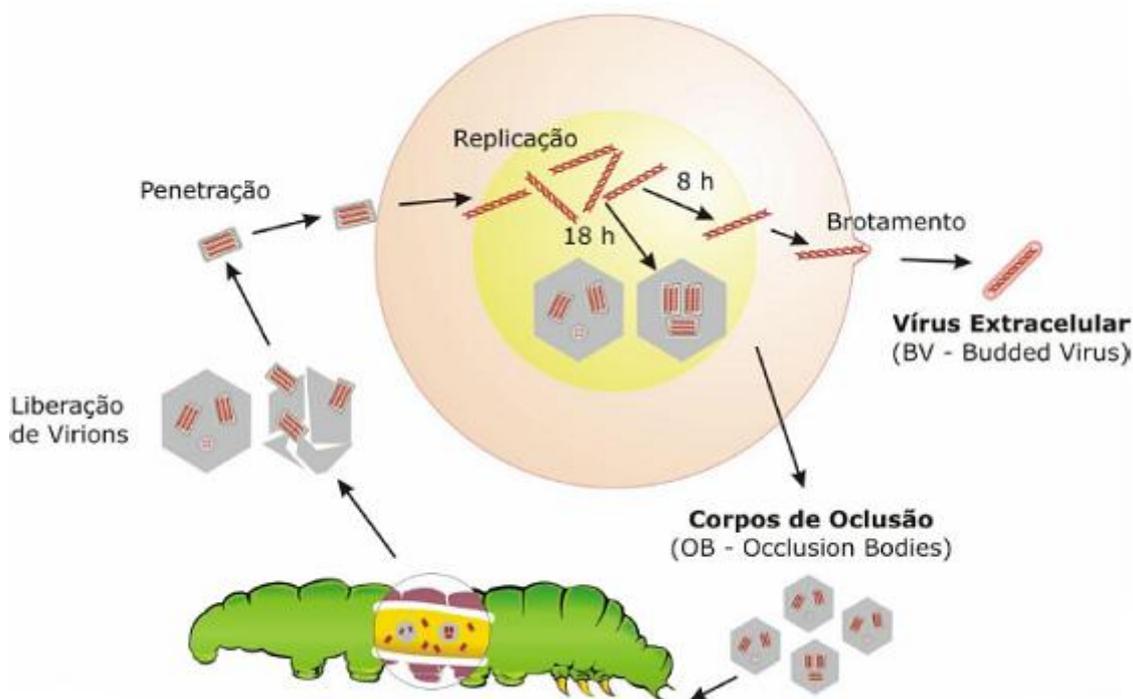


Figura 7: Processo temporal de produção de nucleocapsídeos e formação das partículas virais. Após ingestão dos poliedros, liberação dos ODV e entrada dos nucleocapsídeos na célula, entre 6h - 8h pós infecção, há formação de novos viriões que irão brotar da célula infectada formando as partículas BV e migrando para células vizinhas para dispersar a infecção no corpo do inseto. A partir de 18h p.i. há uma retenção desses nucleocapsídeos no núcleo da célula para montagem dos corpos de oclusão. Fonte: Castro e Souza, 2006.

A fase tardia inicia-se após seis horas de infecção estendendo-se até 20h p.i. Nessa fase ocorre a replicação do DNA viral, o encerramento da transcrição dos genes do hospedeiro e a produção das partículas BV (Beniya *et al.*, 1998; Braunagel, 2001). Nesta fase há o início da transcrição de genes dependentes da RNA polimerase viral que reconhece motivos (A/G/T) TAAG em seus promotores (Rhormann, 1986, Guarino *et al.*, 1998; Lu e Miller, 1997; Ramachandram *et al.*, 2001).

As partículas BV são produzidas entre 12 – 20h p.i. onde os nucleocapsídeos produzidos migram para a membrana celular realizando o brotamento e infectando células adjacentes (Braunagel *et al.*, 2001). Nesta fase da infecção ocorre hipertrofia nuclear devido ao acúmulo de DNA viral e proteínas estruturais do vírus, além do rearranjo do citoesqueleto celular. A infecção viral ocasiona a divisão do núcleo em

---

duas regiões: o estroma virogênico e o espaço peristromal ou zona em anel que são cavidades ou lacunas dentro do núcleo onde os nucleocapsídeos, recém-formados, são acumulados (Young *et al.*, 1993; Williams e Faulkner, 1997).

A fase muito tardia da infecção (*very late phase*) inicia-se após 20h p.i., onde níveis de mRNA de genes tardios começam a diminuir a partir de 18h p.i. dando início a expressão de genes muito tardios. Nessa fase ocorre uma condensação do estroma virogênico e os nucleocapsídeos, que deverão ser envelopados, vão sendo maturados, acomodados e acumulados na zona em anel. Os vírions nessa região recebem um envelope bilipídico formando as partículas ODV (Braunagel e Summers, 1994, Rhormann, 2011). Proteínas estruturais dos nucleocapsídeos são produzidas abundantemente durante a fase tardia, enquanto que produtos proteicos relacionados à formação dos corpos de oclusão são intensificados na fase muito tardia (Lu e Miller, 1997). Ainda não está bem elucidada a maneira pela qual há a distinção dos nucleocapsídeos que irão formar as partículas BV dos que irão formar as partículas ODV. Ke e colaboradores (2008) realizaram um estudo de função de uma ORF do protótipo viral AcMNPV (Ac66) e verificaram que o produto desse gene está envolvido na liberação dos nucleocapsídeos para o citoplasma (formação de BV) e na pré-occlusão desses para formação das partículas ODV. A deleção de Ac66 ocasionou uma diminuição de quase 100% da quantidade de BV assim como também houve redução na síntese dos corpos de oclusão, sugerindo que o produto desse gene estaria interagindo com uma proteína localizada no vírion (VLF-1 *very late factor-1*), também envolvida no processo de montagem dos ODV, para a liberação dessas partículas.

Após 24h p.i., os ODV formados na zona em anel são ocluídos nos OB que são liberados através da ruptura da célula a partir de 48h p.i. Os genes *p10* e *polh* estão envolvidos nesse processo de oclusão (Blissard e Rhormann, 1990; O'Reilly *et al.*,

1992; McLachlin e Miller, 1994; Lu e Miller, 1997). Por possuírem promotores muito fortes e não serem essenciais para propagação do vírus em cultura de células, esses genes tem sido escolhidos como alvo para clonagens e expressão de genes heterólogos.

## **CAPÍTULO I:**

### **Análise da diversidade nucleotídica de genes *pif* de distintos isolados do vírus *Anticarsia* *gemmatalis* MNPV**

---

# INTRODUÇÃO

## 1. DIVERSIDADE GENÉTICA EM BACULOVÍRUS

Populações de vírus são conhecidas por sua diversidade e muitos vírus adotam estratégias de infecção para garantir que parte dessa diversidade esteja presente em hospedeiros infectados individualmente. A diversidade dentro do hospedeiro pode ser garantida quando o inóculo compreende um *pool* de diversos genomas virais, quando vírus distintos genotipicamente cooperam para garantir a infecção como o observado em infecções homólogas ou heterólogas com vírus completos (*helper*), ou quando vírus são capazes de gerar diversidade *de novo* durante o processo de replicação em um hospedeiro infectado recentemente (Clavijo *et al.*, 2010).

Os baculovírus possuem em seus corpos de oclusão (OB) partículas ODV que abrigam diversos nucleocapsídeos por envelope. Essa estrutura de envelopamento das partículas virais permite ao vírus abrigar uma extensa variabilidade de genótipos em somente um corpo de oclusão. A infecção de uma célula hospedeira decorrente de genótipos distintos resulta em uma mistura de genomas característica dos baculovírus em campo.

Essa diversidade é mantida devido a vários fatores, principalmente recombinação entre diferentes genótipos e interações dentro do hospedeiro entre genomas completos (*helpers*) e defectivos. Os vírus defectivos sequestram produtos dos genótipos virais completos durante a infecção para manter-se na população (López-Ferber *et al.*, 2003).

Essa heterogeneidade pode decorrer da infecção por múltiplos genótipos ou pode ser gerada durante o ciclo de infecção através de mutações pontuais, duplicação de genes, e inserções ou deleções no DNA (Cory e Myers, 2003). Isso ocorre com

---

frequência nas populações de vírus, principalmente em baculovírus do gênero *Alphabaculovirus* e em consequência disso é comum encontrar mutantes surgidos espontaneamente. Esses genótipos individuais podem diferir entre si quanto à virulência e patogenicidade. Entretanto, esses mutantes podem sofrer deleções de parte de seu genoma ou apenas em genes essenciais para a replicação viral ou para o estabelecimento da infecção oral, impedindo sua entrada inicial na célula e a replicação individual dentro do hospedeiro por falta de proteínas específicas (López-Ferber *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2005b; Simón *et al.*, 2006).

Apesar da falta de estruturas essenciais para o estabelecimento da infecção primária, essas variantes prevalecem na população através da co-infecção de células infectadas por genótipos completos (conhecidos como *helpers*) contidos na mistura de nucleocapsídeos do envelope ODV. O mutante defeutivo então utiliza-se dos produtos transcritos do genótipo completo tais como proteínas estruturais, enzimas ou fatores de regulação, complementando a ausência desses genes. A vantagem seletiva desses variantes é uma replicação mais rápida em relação ao genótipo completo, entretanto, eles não podem se replicar sem a ajuda do genótipo *helper* (Simón *et al.*, 2006).

López-Ferber *et al.* (2003) identificaram dentro de uma população de baculovírus de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* uma mistura de genótipos na qual havia variantes defeitivos com deleção na região dos genes *pif-1* e *pif-2*. Observaram também que esses mutantes sozinhos não eram capazes de infectar a larva por via oral, entretanto quando eram injetados dentro da hemocele da lagarta ou misturados com variantes completos conseguiam estabelecer a infecção. Verificaram, portanto que na população do baculovírus SfMNPV as interações entre genótipos defeitivos misturados com genótipos completos resultam em um aumento da

---

patogenicidade da população do tipo selvagem, quando comparado ao genótipo completo sozinho.

Simón *et al.* (2005) acrescentam que os baculovírus exibem um alto grau de heterogeneidade genética e o fato da minoria dos genótipos defectivos não ser eliminada por completo da população sugere que esta heterogeneidade é importante para a sobrevivência do vírus. Essa diversidade genética, encontrada em isolados do campo confere ao vírus um melhor desempenho para o biocontrole de pragas em relação aos isolados com baixa heterogeneidade (Simón *et al.*, 2004).

Muitos trabalhos focados em analisar a diversidade genotípica através do perfil dos genótipos por enzimas de restrição (RFLP), já mostraram que populações de campo de baculovírus são heterogêneas. Esses variantes podem apresentar alterações nos sítios de restrição, inserções, deleções e também presença ou ausência de sequências repetidas em tandem. Muitos perfis de DNA de isolados de campo de baculovírus mostram evidências de heterogeneidade, indicando que esta variação potencialmente existe dentro de hospedeiros individuais (Cory *et al.*, 2005).

Os variantes genotípicos, embora muito relacionados entre si, podem ser distinguidos uns dos outros pelo polimorfismo apresentado nas diferenças de tamanho de seus fragmentos de restrição ou por alterações em suas regiões genômicas como adições, deleções ou duplicações de bases nucleotídicas. Essa alta prevalência de recombinação, comum aos baculovírus, junto com o envelopamento de múltiplos genótipos em um único vírion, podem ser consideradas estratégias evolucionárias garantindo a preservação de altos níveis de variabilidade genética em populações de NPV (Simón *et al.*, 2004).

Co-infecção por genótipos múltiplos ocorre naturalmente e parece ser uma adaptação em baculovírus para um aumento da transmissibilidade do inóculo. A

---

produção de OB com múltiplos vírions é uma característica particular dos NPV, o que chama a atenção para a questão do papel da montagem do vírion e seu processo de oclusão na manutenção da diversidade viral. A questão da diversidade genotípica existente dentro dos OB e a manutenção dessa diversidade pela seleção de OB heterogêneos genotipicamente, ou seleção contra discriminação genotípica durante o processo de seleção, ainda não estão esclarecidas (Clavijo *et al.*, 2010).

Investigar as consequências da diversidade de infecção, como a severidade da doença e da epidemiologia é crucial para entender a ecologia e evolução das interações patógeno-hospedeiro. Isso não é somente importante para controlar surtos de doenças por entomopatógenos, mas é também relevante para produção, aplicação, e para o impacto a longo prazo de agentes de controle microbiano naturais e recombinantes no campo. O primeiro passo nesse processo é identificar o grau da variação em populações naturais e estabelecer como eles variam em diferentes escalas temporais e espaciais (Cory *et al.*, 2005).

## **2. INFECÇÃO PER OS: FATORES DE INFECTIVIDADE ORAL**

Para a entrada de vírus envelopados na célula hospedeira primeiramente deve ocorrer sua ligação a receptores celulares na membrana e subsequente fusão da membrana viral. Esse mecanismo é mediado pela interação de diversas proteínas de membrana virais. Em baculovírus os genes *pif* (*per os infectivity factors*) estão associados à habilidade do vírus em infectar o inseto por via oral.

Os ODV possuem mais de 10 proteínas diferentes em seu envelope (Braunagel e Summers, 2007) (Figura 8), e seis delas são codificadas por genes *pif* que são essenciais para a infecção oral do inseto: p74 ou *pif-0* (Kuzio *et al.*, 1989), *pif-1* (Kikhno *et al.*,

2002), *pif-2* (Pijlman *et al.*, 2003), *pif-3* (Li *et al.*, 2007), *pif-4* (Fang *et al.*, 2009) e *pif-5* (Sparks *et al.*, 2011). As proteínas PIF são altamente conservadas em baculovírus e estudos recentes mostraram que essas proteínas possuem homólogas em outros vírus de DNA, patogênicos a insetos, como o vírus da hipertrofia da glândula salivar (SGHV), nudivirus e os membros da família *Nimaviridae*. Essa alta conservação sugere que essas proteínas estão associadas com um mecanismo de entrada conservado e evolutivamente ancestral aos vírus de invertebrados (Garcia-Maruniak *et al.*, 2009; Wang e Jhele, 2009).

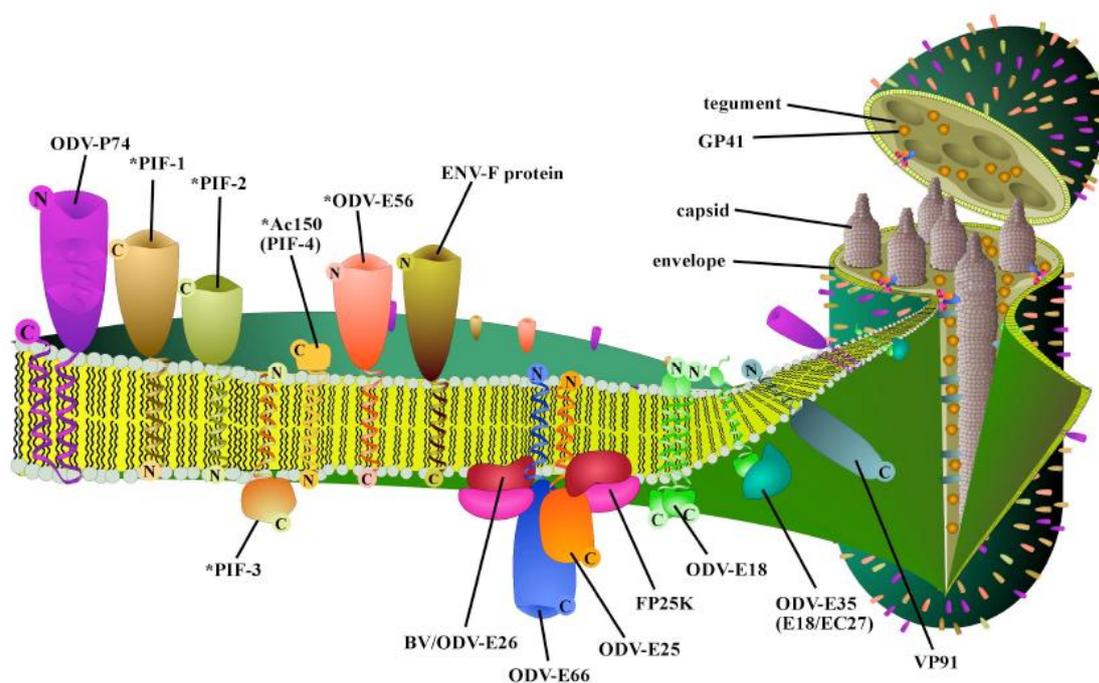


Figura 8: Desenho esquemático da partícula ODV onde é ilustrado as proteínas ancoradas à membrana. É possível observar o ancoramento da região transmembrana N-terminal das proteínas PIF. Nota-se que a proteína PIF-3 está voltada para a face interna da partícula ODV, uma vez que ela auxilia na passagem dos nucleocapsídeos durante o processo de fusão com a célula hospedeira. Fonte: Slack e Arif, 2007.

O primeiro fator de infectividade *per os* identificado foi o gene *p74* (*pif-0*) cuja proteína (P74) é componente estrutural do envelope ODV e está diretamente envolvida com a infectividade por via oral do ODV (Faulkner *et al.*, 1997). Os genes *pif* são expressos em eventos tardios da infecção e seus produtos estão presentes em

---

quantidades muito baixas. As proteínas PIF, em sua maioria, têm sido detectadas somente no envelope da partícula ODV, sendo exclusivas desse fenótipo, estão presentes em pequenas quantidades durante a infecção e são essenciais para a infecção de células epiteliais (Gutiérrez *et al.*, 2004; Kuzio *et al.*, 1989; Kikhno *et al.*, 2002).

Estudos iniciais com genes de infectividade oral demonstraram que sua remoção, ruptura ou deleção na sequência codificante dos domínios hidrofóbicos de suas proteínas, resulta na completa ausência de infectividade *per os* dos OB (Gutiérrez *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007). Porém, quando partículas BV de vírus com as características acima, são injetadas diretamente na hemocele do inseto resulta na morte do hospedeiro e produção de novas partículas ocluídas não infecciosas. Isso demonstra que os genes *pif* são essenciais para o desencadeamento da infecção oral e são extremamente necessários no processo de estabelecimento da infecção primária no inseto hospedeiro.

As proteínas PIF possuem sequências N-terminal, hidrofóbicas e ricas em valinas, isoleucinas e leucinas e serve como região de ancoramento ao envelope ODV. Outras proteínas do envelope ODV (ODV-E66 e ODV-E25) também possuem sequências similares e são muito conservadas em todos os baculovírus já sequenciados. A sequência hidrofóbica N-terminal de PIF atua como sinalizador de localização nuclear que é essencial para trafegar a proteína alvo ao núcleo. Estudos realizados com a proteína PIF-3 (Li *et al.* 2007) demonstraram que a região N-terminal é essencial para o tráfego da proteína ao núcleo. Entretanto, durante a montagem das partículas ODV no núcleo celular, PIF-3 parece requerer outras proteínas virais para sua passagem eficiente do citoplasma ao núcleo. Sugere-se que a proteína viral de transporte envolvida nesse processo possa ser a FP 25K. Rosas-Acosta *et al.* (2001) comprovaram que pequenas deleções na região do gene *25kfp*, cuja proteína está envolvida no processo de oclusão das partículas ODV dentro da matriz proteica, podem influenciar no transporte de

---

algumas proteínas do envelope ODV. Ainda não se sabe se as proteínas PIF-1 e PIF-2 também necessitam de uma proteína de transporte para trafegarem do núcleo ao citoplasma.

Peng e colaboradores (2010) demonstraram que as proteínas P74, PIF-1, PIF-2 e PIF-3 estão presentes no envelope ODV na forma de um complexo. A deleção de alguma dessas proteínas reduz a eficiência de ligação do complexo à membrana celular do hospedeiro. Em experimentos de *Western Blotting* e co-imunoprecipitação verificaram que as proteínas PIF-1, PIF-2 e PIF-3 são essenciais para a formação e estabilidade do complexo e que a P74 está apenas associada a ele. O mesmo grupo (Peng *et al.*, 2011) também relatou em experimentos *in vivo* que a P74 é submetida a duas clivagens: a primeira por uma protease endógena ao corpo de oclusão (OB) e a segunda por uma tripsina do hospedeiro. Essas clivagens liberam duas subunidades de tamanhos aproximados, mas ainda não foi esclarecido se esses dois domínios interagem em conjunto com PIF-1, PIF-2 e PIF-3. Esse processo de clivagem só foi detectado *in vivo*, em OB derivados de larvas infectadas. Nos OB derivados de células infectadas *in vitro*, os corpos de oclusão não continham essa protease. Verificaram assim que essa tripsina não é codificada pelo vírus e sim derivada do inseto hospedeiro e é inserida no corpo de oclusão no momento da montagem dos poliedros na lagarta.

A proteína PIF-3 parece não afetar o processo de ligação e fusão do ODV à célula hospedeira (Ohkawa *et al.*, 2005), porém após esses eventos, há o processo de translocação dos nucleocapsídeos pelas microvilosidades da célula intestinal. Slack e Arif (2007) sugeriram que essa proteína poderia estar envolvida nesse processo já que ela está exposta na face interna do envelope ODV onde poderiam ocorrer interações da proteína com o citoesqueleto celular, rearranjando-o para facilitar a passagem dos vírions.

---

Os genes *pif-4* – ORF 96 (Fang *et al.*, 2009) e *pif-5* – gene ODV-E56 (Sparks *et al.*, 2011) demonstraram ser essenciais para a infectividade oral quando ausentes no genoma do vírus AcMNPV e não influenciaram a infectividade dos BV que é uma característica de vírus com genes *pif* deletados. Acredita-se que a proteína PIF-4 possa ter alguma interação com o complexo de PIF, pois foi relatado que ela interfere no processo de ligação e fusão do ODV à célula hospedeira. Já a PIF-5 não tem relação com esse processo, mas pode estar envolvida no mecanismo de passagem dos nucleocapsídeos assim como a PIF-3. Diferente das demais proteínas PIF que são exclusivas da partícula ODV, a PIF-4 foi encontrada em ambas as partículas (ODV e BV) quando submetida a análises por *western blotting* dos envelopes de ambos os fenótipos (Fang *et al.*, 2009).

Outro trabalho (Simón *et al.*, 2011) relatou um novo fator de infectividade *per os* presente no vírus *Spodoptera frugiperda* MNPV (*Sf58*). Foi observado que ele é essencial para a infectividade oral, porém esse gene é exclusivo somente dos baculovírus patogênicos a lepidópteros (*Alpha* e *Betabaculovirus*). Uma vez que os genes *pif* são altamente conservados e são encontrados em todos os gêneros (Perera *et al.*, 2007) o mecanismo de entrada da partícula ODV também é conservado nos baculovírus. Com a descoberta desse novo gene *pif*, pode ser que os genes homólogos a ele desempenhem um papel específico durante a infecção de lepidópteros.

Há um vasto interesse a respeito desses fatores de infectividade, visto que muitos já foram descobertos e trabalhos têm sido realizados com essas proteínas. Porém, há muitas lacunas a serem preenchidas a respeito da interação entre essas proteínas (Jiang *et al.*, 2008), a forma como realizam o processo de ligação e fusão à célula hospedeira e se há outros mecanismos anteriores ou posteriores a esses que possam envolver outras proteínas PIF como a PIF-3 e PIF-5 com funções ainda desconhecidas.

### 3. *ANTICARSIA GEMMATALIS* MNPV: INSETICIDA BIOLÓGICO

Os baculovírus desempenham um papel ecológico importante na regulação do tamanho das populações de inseto (Evans, 1986). Por muitas décadas os baculovírus vêm sendo aplicados como agentes de controle biológico contra pragas florestais e agrícolas. Moscardi (1999) relatou que o uso do baculovírus anticarsia (AgMNPV) como pesticida é vantajoso por permitir sua produção em larga escala no campo e pelo seu baixo custo quando comparado a inseticidas químicos.

Bioinseticidas têm sido efetivos contra insetos praga como a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Figura 9), uma das principais pragas dessa cultura (Moscardi, 1999). Controle de pragas com aplicação de baculovírus tem sido restrito a lepidópteros, visto que baculovírus específicos de Diptera e Himenoptera foram caracterizados há poucos anos (Andreadis *et al.*, 2003).

No Brasil, o *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), conhecido como baculovírus anticarsia, têm sido empregado como inseticida biológico desde o início da década de 80. Sua produção tem sido feita *in vivo*, principalmente pela infecção de lagartas em campo, sendo comercializado como uma formulação de pó molhável. O baculovírus anticarsia chegou a ser aplicado anualmente em uma área de 2.000.000 de hectares de soja, safra 2003/2004, sendo considerado o maior programa do mundo de controle de pragas por vírus. O uso incorreto de inseticidas químicos, fungicidas e herbicidas, desencadeou um desequilíbrio na população de insetos/organismos existentes na cultura da soja. Como resultado, pragas consideradas secundárias como as lagartas *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera* spp, insetos como mosca branca e também ácaros se tornaram pragas mais importantes a serem combatidas. (Moscardi *et al.*, 2011).



Figura 9: Larvas de *Anticarsia gemmatalis*, um dos principais insetos desfolhadores da cultura da soja. Durante a sua fase larval, o inseto pode apresentar duas colorações, verde e marrom-escuro. Fonte: Barbara, 2000.

## OBJETIVOS

O vírus AgMNPV tem sido usado como biopesticida para controle de uma das principais pragas da soja, a lagarta *Anticarsia gemmatalis*. Estudos com populações de baculovírus no campo mostraram o surgimento de genótipos virais com grandes deleções em seus genomas e muitas vezes esses são incapazes de realizar infecção por via oral no inseto por perderem algum dos genes *pif*. Com base nesses relatos, o trabalho descrito nesse capítulo teve como objetivo estudar a diversidade e estabilidade genética dos fatores de infectividade oral (genes *pif*) dos isolados de AgMNPV coletados em diferentes regiões da América do Sul, como também dos isolados temporais coletados durante vinte anos de aplicação no campo. Este trabalho também visou a realização de um estudo de função dos genes *pif1*, *pif2*, *pif3* e *pif4* de AgMNPV devido ao limitado conhecimento a respeito desses genes e levando-se em conta a grande amplitude nos programas desenvolvidos com o uso do baculovírus anticarsia como biopesticida.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a sequência dos quatro genes *pif* de isolados temporais e geográficos do baculovírus AgMNPV e analisar a diversidade nucleotídica entre esses isolados.
- Expressar proteínas PIF de AgMNPV-2D para obtenção de anticorpos específicos e realização de ensaios de imunolocalização celular e na partícula viral.
- Construir vírus recombinantes de AgMNPV-2D com os genes *pif-1*, *pif-2*, *pif-3* e *pif-4* deletados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. ANÁLISE DOS GENES *PIF* DOS ISOLADOS DE AGMNPV

#### 1.1. VÍRUS

Vinte e oito isolados de campo de AgMNPV originários da América do Sul foram utilizados. Vinte deles são vírus derivados de sucessivas aplicações/coletas anuais no campo do primeiro baculovírus de AgMNPV que foi coletado no campo a partir de larvas de *A. gemmatalis* infectadas no ano de 1979 (AgMNPV-79), na região de Londrina – PR. No ano de 1984, esse vírus foi aplicado em uma área delimitada de cultura de soja e após um ano no campo larvas mortas de *A. gemmatalis* com sintomatologia viral eram coletadas, o vírus purificado e armazenado. Esse processo foi realizado assim sucessivamente durante vinte anos (1984 – 2003). Esses vírus foram denominados Isolados Temporais e essas amostras foram gentilmente cedidas pelo Dr. Flávio Moscardi (Embrapa Soja).

Os outros vírus são isolados geográficos das regiões, Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, um isolado coletado na Argentina e outro no Uruguai, conforme descrito na Tabela 1. Todos esses isolados estão armazenados na Coleção de Vírus Entomopatogênicos (CVI), no Laboratório de Virologia de Insetos (LVI) da Embrapa Cenargen.

Tabela 1: Relação dos nomes, ano de coleta e localidade dos isolados temporais e geográficos de AgMNPV. As sequências nucleotídicas obtidas dos genes *pif-1*, *pif-2*, *pif-3* e *pif-4* de cada isolado foram depositadas no GenBank.

Isolados	Ano de coleta	Localidade	Genes	Número de acesso no Genbank
AgMNPV-Arg	1982	Argentina	<i>pif1</i>	KF765827
			<i>pif2</i>	KF765855
			<i>pif3</i>	KF765883
			<i>pif4</i>	KF765911
AgMNPV-CM	1982	Campo Mourão (PR)	<i>pif1</i>	KF765828
			<i>pif2</i>	KF765856
			<i>pif3</i>	KF765884
			<i>pif4</i>	KF765912
AgMNPV-Dour	1984	Dourados (MS)	<i>pif1</i>	KF765829
			<i>pif2</i>	KF765857
			<i>pif3</i>	KF765885
			<i>pif4</i>	KF765913
AgMNPV-Ibip	1983	Ibiporã (PR)	<i>pif1</i>	KF765830
			<i>pif2</i>	KF765858
			<i>pif3</i>	KF765886
			<i>pif4</i>	KF765914
AgMNPV-Lond	1984	Londrina (PR)	<i>pif1</i>	KF765831
			<i>pif2</i>	KF765859
			<i>pif3</i>	KF765887
			<i>pif4</i>	KF765915
AgMNPV-Pelot	1984	Pelotas (RS)	<i>pif1</i>	KF765833
			<i>pif2</i>	KF765860
			<i>pif3</i>	KF765888
			<i>pif4</i>	KF765916
AgMNPV-PF	1994	Passo Fundo (RS)	<i>pif1</i>	KF765832
			<i>pif2</i>	KF765861
			<i>pif3</i>	KF765889
			<i>pif4</i>	KF765917
AgMNPV-Urug	1984	Uruguai	<i>pif1</i>	KF765834
			<i>pif2</i>	KF765862
			<i>pif3</i>	KF765890
			<i>pif4</i>	KF765918
AgMNPV-79	1979	Londrina (PR)	<i>pif1</i>	KF765810
			<i>pif2</i>	KF765838
			<i>pif3</i>	KF765866
			<i>pif4</i>	KF765894
AgMNPV-84/85	1984/1985	Londrina (PR)	<i>pif1</i>	KF765811
			<i>pif2</i>	KF765839
			<i>pif3</i>	KF765867
			<i>pif4</i>	KF765895
AgMNPV-85/86	1985/1986	Londrina (PR)	<i>pif1</i>	KF765812
			<i>pif2</i>	KF765840
			<i>pif3</i>	KF765868
			<i>pif4</i>	KF765896
AgMNPV-86/87	1986/1987	Londrina (PR)	<i>pif1</i>	KF765813
			<i>pif2</i>	KF765841
			<i>pif3</i>	KF765869
			<i>pif4</i>	KF765897
AgMNPV-87/88	1987/1988	Londrina (PR)	<i>pif1</i>	KF765814
			<i>pif2</i>	KF765842
			<i>pif3</i>	KF765870
			<i>pif4</i>	KF765898
AgMNPV-88/89	1988/1989	Londrina (PR)	<i>pif1</i>	KF765815
			<i>pif2</i>	KF765843
			<i>pif3</i>	KF765871

			<i>pif4</i>	KF765899
			<i>pif1</i>	KF765816
<b>AgMNPV-89/90</b>	1989/1990	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765844
			<i>pif3</i>	KF765872
			<i>pif4</i>	KF765900
			<i>pif1</i>	KF765817
<b>AgMNPV-90/91</b>	1990/1991	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765845
			<i>pif3</i>	KF765873
			<i>pif4</i>	KF765901
			<i>pif1</i>	KF765818
<b>AgMNPV-91/92</b>	1991/1992	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765846
			<i>pif3</i>	KF765874
			<i>pif4</i>	KF765902
			<i>pif1</i>	KF765819
<b>AgMNPV-92/93</b>	1992/1993	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765847
			<i>pif3</i>	KF765875
			<i>pif4</i>	KF765903
			<i>pif1</i>	KF765820
<b>AgMNPV-93/94</b>	1993/1994	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765848
			<i>pif3</i>	KF765876
			<i>pif4</i>	KF765904
			<i>pif1</i>	KF765821
<b>AgMNPV-94/95</b>	1994/1995	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765849
			<i>pif3</i>	KF765877
			<i>pif4</i>	KF765905
			<i>pif1</i>	KF765822
<b>AgMNPV-95/96</b>	1995/1996	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765850
			<i>pif3</i>	KF765878
			<i>pif4</i>	KF765906
			<i>pif1</i>	KF765823
<b>AgMNPV-96/97</b>	1996/1997	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765851
			<i>pif3</i>	KF765879
			<i>pif4</i>	KF765907
			<i>pif1</i>	KF765824
<b>AgMNPV-97/98</b>	1997/1998	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765852
			<i>pif3</i>	KF765880
			<i>pif4</i>	KF765908
			<i>pif1</i>	KF765825
<b>AgMNPV-98/99</b>	1998/1999	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765853
			<i>pif3</i>	KF765881
			<i>pif4</i>	KF765909
			<i>pif1</i>	KF765826
<b>AgMNPV-99/00</b>	1999/2000	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765854
			<i>pif3</i>	KF765882
			<i>pif4</i>	KF765910
			<i>pif1</i>	KF765807
<b>AgMNPV-00/01</b>	2000/2001	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765835
			<i>pif3</i>	KF765863
			<i>pif4</i>	KF765891
			<i>pif1</i>	KF765808
<b>AgMNPV-01/02</b>	2001/2002	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765836
			<i>pif3</i>	KF765864
			<i>pif4</i>	KF765892
			<i>pif1</i>	KF765809
<b>AgMNPV-02/03</b>	2002/2003	Londrina (PR)	<i>pif2</i>	KF765837
			<i>pif3</i>	KF765865
			<i>pif4</i>	KF765893

---

## **1.2. EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL A PARTIR DE POLIEDROS PARCIALMENTE PURIFICADOS**

Os isolados utilizados nesse estudo encontram-se armazenados a -20°C na Coleção de Vírus de Insetos, Laboratório de Virologia de Insetos, Embrapa Cenargen. Cerca de 3g de larvas infectadas com cada isolado foram maceradas com tampão de homogeneização (Ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris-HCl 0,01M, pH 7,8; EDTA 0,001M) de acordo com o protocolo descrito por Maruniak, 1986. Em seguida, o macerado foi filtrado em gaze e o extrato obtido, contendo poliedros foi submetido a duas lavagens com NaCl 1M e SDS 0,1%, seguido de centrifugações (8000g) e o sobrenadante obtido em cada etapa foi descartado e o precipitado ressuspense em 5ml de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0). Ao final, os poliedros semi-purificados foram ressuspensos em água deionizada (H<sub>2</sub>O milliQ).

Para liberação dos nucleocapsídeos e purificação do DNA, foi feita a lise dos OB com solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub> 1M, pH 10 seguido por tratamento com Proteinase K (100µg/mL) por 16 h. Para extração do DNA viral, três ciclos de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) foram realizados, seguidos de precipitação com etanol 100% e Acetato de Sódio 3M. O DNA foi ressuspense em H<sub>2</sub>O milliQ e armazenado a 4°C.

## **1.3. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *PIF* POR *POLYMERASE CHAIN REACTION* (PCR)**

Os genes *pif1*, *pif2*, *pif3* e *pif4* dos 28 isolados virais foram amplificados por PCR. Os oligonucleotídeos utilizados (Tabela 2) foram desenhados com base na sequência genômica de AgMNPV-2D disponível no GenBank (NC\_008520) e foram sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Os mesmos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos genes *pif* dos isolados virais, também foram utilizados para gerar fragmentos

para as reações de recombinação do sistema Gateway (Invitrogen) que abordado melhor no item 2.3.

Tabela 2: Lista dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *pif* dos isolados virais. Os oligonucleotídeos possuem uma sequência *att*, que está em destaque, para utilização também no sistema de clonagem Gateway.

Gene	Nome do primer	Sequência (5' – 3')
<i>pif-1</i>	AttB1 pif1 F	<u>GGG.GAC.AAG.TTT.GTA.CAA.AAA.AGC.AGG.CTT.CAT.GTA.TTT.G</u> CT.GGC.TTT.AAT.TCT.CA
	AttB2 pif1 R	<u>GGG.GAC.CAC.TTT.GTA.CAA.GAA.AGC.TGG.GTC.CTA.TAC.TGA.G</u> TA.GTT.GGG.GTA.AGT.T
<i>pif-2</i>	AttB1 pif2 F	<u>GGG.GAC.AAG.TTT.GTA.CAA.AAA.AGC.AGG.CTT.CAT.GTA.TCG.A</u> AT.ACT.AAT.TGT.GCT.TT
	AttB2 pif2 R	<u>GGG.GAC.AAG.TTT.GTA.CAA.GAA.AGC.TGG.GTC.CTA.GTT.GAT.T</u> AG.TCC.GCG.CAC.GTC.A
<i>pif-3</i>	AttB1 pif3 F	<u>GGG.GAC.AAG.TTT.GTA.CAA.AAA.AGC.AGG.CTT.CAT.GCC.GAC.</u> CAT.ATG.GCA.GTT.ATT.AA
	AttB2 pif3 R	<u>GGG.GAC.AAG.TTT.GTA.CAA.GAA.AGC.TGG.GTC.TTA.CAT.GTT.T</u> AA.ATG.TAT.ACG.CGC.C
<i>pif-4</i>	AttB1 pif4 F	<u>GGG.GAC.AAG.TTT.GTA.CAA.AAA.AGC.AGG.CTT.CAT.GCT.TTC.C</u> AT.TAT.GGT.GGT.AAT.TG
	AttB2 pif4 R	<u>GGG.GAC.AAG.TTT.GTA.CAA.GAA.AGC.TGG.GTC.TTA.TTT.TAA.T</u> GC.AAC.GCC.CAA.ATC.C

As reações de PCR continuam as concentrações finais de: 20ng de DNA molde dos clones virais, 0,4µM de cada oligonucleotídeo, 0,1 mM de cada dNTP, 0,02mM de MgSO<sub>4</sub>, 2,5U da enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Invitrogen) e 1X do tampão correspondente à enzima em um volume final de 50µL em H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Os programas para amplificação dos fragmentos de DNA estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Programa utilizado para amplificação dos fragmentos relativos aos genes *pif* de cada isolado de AgMNPV estudado.

Programa*	Desnaturação 2min. (°C)	Anelamento 1min. (°C)	Polimerização 1 min. (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
PIF1 attB					1662
PIF2 attB					1216
PIF3 attB	94°	68°	72°	30	678
PIF4 attB					591

Após amplificação, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 0,8%, previamente corado com Brometo de Etídeo (0,3 µg/mL). A quantificação dos fragmentos foi realizada através do espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000. Após quantificação, os fragmentos foram tratados com a enzima ExoSAP-IT (USB) de acordo com as especificações do fabricante, para remoção de oligonucleotídeos, dNTPs e DNA molde restantes da reação de PCR.

#### **1.4. SEQUENCIAMENTO DOS GENES PIF**

Os fragmentos de PCR foram enviados a empresa MacroGen-Inc, e o sequenciamento foi feito por Sanger ABI 3730XLs. O alinhamento das sequências foi feito utilizando o programa MUSCLE e a qualidade das sequências foi testada pelo programa Phred. Os eletroferogramas e montagem dos *contigs* foram feitos utilizando o programa ChromasPro v1.7.5 e os polimorfismos encontrados nas sequências dos isolados analisados foram obtidos através do programa Geneious R6 (v 1.6.1). A análise da diversidade nucleotídica foi obtida utilizando o programa DnaSP 5.10 - *DNA Sequence Polymorphism* (Librado e Rozas, 2009). Nesse programa foram obtidos

---

valores para cada alinhamento dos genes *pif* analisados dos isolados temporais e geográficos. O valor da diversidade nucleotídica (valor de  $\pi$ ) é referente à média do número de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências e de sua Variância amostral.  $\pi$  ( $\pi$ ) é obtido utilizando a correção de Jukes e Cantor (1969) usada em cada par de comparação, obtendo-se uma média dos valores de todas as comparações realizadas para um determinado gene.

## **2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PIF-2 E PIF-4 E CONSTRUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL**

### **2.1. VÍRUS**

O vírus utilizado foi o clone viral AgMNPV-2D fornecido pelo Dr. James Maruniak, University of Florida-USA. Esse vírus é utilizado como modelo e já possui seu genoma totalmente sequenciado.

### **2.2. AMPLIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS BV DE AG-2D IN VITRO**

Os *Budded Virus* (BV) de Ag-2D foram amplificados utilizando células Tn-5BI-4 (*High five*) seguindo protocolo de O'Reilly *et al.* (1992). Frascos T-25 (Corning) foram usados para crescimento das células mantidas em meio TNMFH contendo soro bovino fetal estéril (GIBCO BRL), livre de micoplasma e inativado a 60°C/30min. a uma concentração final de 10% e adicionado de antibiótico e antimicótico (GIBCO BRL). Células ( $1 \times 10^6$ ) foram inoculadas com 1mL de um estoque viral não titulado e incubadas durante uma hora sob leve agitação de 10 em 10min. O inoculo então foi retirado após adsorção viral e meio TNMFH completo foi adicionado às células que foram incubadas a 27°C em estufa (Stabil-Therm \_ Blue M). Após 72h de infecção, as

---

células foram coletadas por centrifugação a 3000rpm/4°C/5min. (centrífuga IEC Centra<sup>®</sup> MP4R). O armazenamento do sedimento celular foi feito a -20°C e o sobrenadante contendo os BV a 4°C.

### **2.3. EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE PARTÍCULAS BV**

Partículas BV de Ag-2D foram submetidas à extração de DNA de acordo com O'Reilly *et al.* (1992). Foram colocados 30 mL do sobrenadante de células infectadas (estoque viral) em tubos de centrífuga (Polyallomer 25 x 82 mm - Beckman) e no fundo de cada tubo foram aplicados 3 mL de solução de sacarose 25% (Sacarose 25g; NaCl 5mM; EDTA 10mM). Os tubos foram submetidos à ultracentrifugação (Beckman, rotor SW28) a 24000rpm/4°C/75min. Ao sedimento foram acrescentados 200µL de tampão de ruptura (Tris-HCl 10mM, pH 7,6; EDTA 10mM, pH 8,0; SDS 0,25%) e 25µL de proteinase K (20mg/mL), incubando a amostra a 37°C/16h. A amostra foi então submetida a ciclos de extração com o mesmo volume da amostra com fenol, fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado utilizando etanol absoluto (2,5x o volume inicial da amostra) com adição de NaAc 10% (3M; pH 5,2) e incubada a -20°C/16h. A amostra foi submetida à centrifugação por 12000g/30 min., lavada com a adição de 500µL de etanol 70% e novamente centrifugada como descrito acima. O sedimento resultante contendo o DNA, foi ressuspenso em 20µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) e armazenado a 4°C.

---

## **2.4. BACTÉRIAS**

Foi utilizada a linhagem bacteriana de *E. coli*, DH5- $\alpha$ , para realização de transformação e amplificação de plasmídeos utilizados neste trabalho. Para propagação dos vetores do kit Gateway (Invitrogen) que possuem em seu genoma o gene *ccdB*, o qual interfere no DNA de linhagens de *E. coli*, inibindo seu crescimento, foi utilizada a linhagem One Shot<sup>®</sup> *ccdB* Survival T1<sup>R</sup> que contém resistência aos efeitos letais desse gene.

Nos ensaios de indução para expressão das proteínas PIF foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21-AI<sup>TM</sup> One Shot<sup>®</sup> (Invitrogen) a qual não possui proteases de membrana reduzindo a possível degradação de proteínas heterólogas expressas. Essa linhagem possui a inserção do cassete contendo o gene T7 RNA polimerase (T7 RNAP) no locus do gene *araB*, permitindo a regulação da expressão de T7 RNAP pelo promotor *araBAD*. Devido a essa inserção, a expressão de T7 RNAP pode ser regulada por açúcares como a L-arabinose, que induz a expressão do promotor *araBAD*; e a Glicose, a qual reprime a expressão do mesmo.

## **2.5. SISTEMA GATEWAY**

Para realizar um estudo de localização dos produtos dos genes *pif*, foi realizada a expressão das proteínas PIF utilizando o sistema de clonagem Gateway<sup>®</sup> Technology with Clonase<sup>TM</sup> II (Invitrogen), o qual promove uma maneira eficiente de mover sequências de DNA para múltiplos vetores permitindo análises funcionais e expressão de proteínas de interesse. Esse sistema é baseado nas propriedades de recombinação do bacteriófago  $\lambda$  visando facilitar a integração deste no cromossomo da bactéria *E. coli*. A recombinação ocorre em sítios específicos (*att*) que devem ser inseridos nas

extremidades do fragmento de PCR com oligonucleotídeos contendo sequências específicas de cerca de 15pb. Esses oligos também adicionam uma cauda de histidina que irá ser utilizada na purificação da proteína heteróloga.

O fragmento de PCR *att* é transferido entre dois vetores: de doação (pDONR) e de destino (pDEST); e as reações serão mediadas pelas enzimas de recombinação BP Clonase<sup>TM</sup> II e LR Clonase<sup>TM</sup> II. Essas enzimas ligam-se aos sítios *att* aproximando e depois clivando-os, então a recombinação ocorrerá seguindo a troca dos dois pares de fita e ligação dos DNA de uma nova forma. As enzimas BP e LR Clonase são fatores de integração da bactéria *E.coli* e facilitam a recombinação entre um produto de PCR (*attB*) e o vetor doador (substrato *attP*), e depois do vetor doador (substrato *attL*) com o vetor de destino (*attR*) como exemplificado na Figura 10. O vetor final estará pronto para expressão da proteína de interesse.

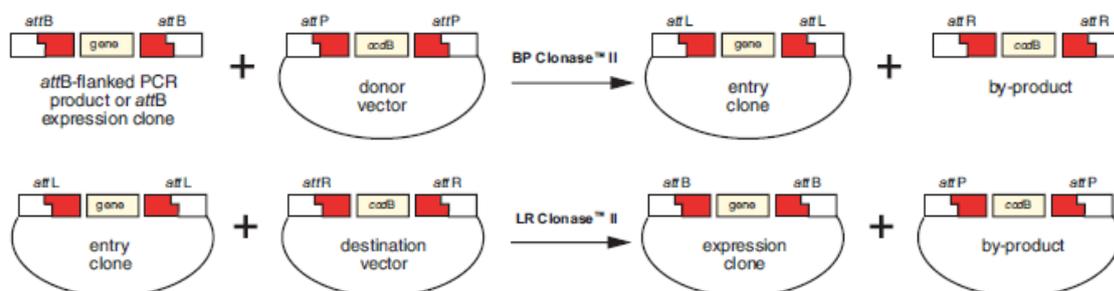


Figura 10: Desenho esquemático das reações de recombinação do sistema Gateway utilizando as enzimas BP e LR Clonase II. O fragmento *att* é recombinado com o vetor doador utilizando a enzima BP Clonase II, depois o vetor doador contendo a sequência do gene de interesse é recombinado novamente com o vetor de destino utilizando a enzima LR Clonase II. O vetor final está pronto para ser utilizado nos ensaios de expressão (Fonte: Manual kit Gateway – Invitrogen).

## 2.6. PLASMÍDEOS

Para realização das reações de recombinação utilizadas no kit Gateway, foram usados os vetores pDONR207 e pDEST17 (Figura 11). Os vetores possuem o gene de resistência ao antibiótico cloramfenicol e também o gene *ccdB* que é substituído pelo

gene de interesse quando ocorre a recombinação. A proteína CcdB interfere com o DNA da bactéria transformada inibindo seu crescimento conferindo uma seleção negativa aos vetores de doação e destino do sistema Gateway.

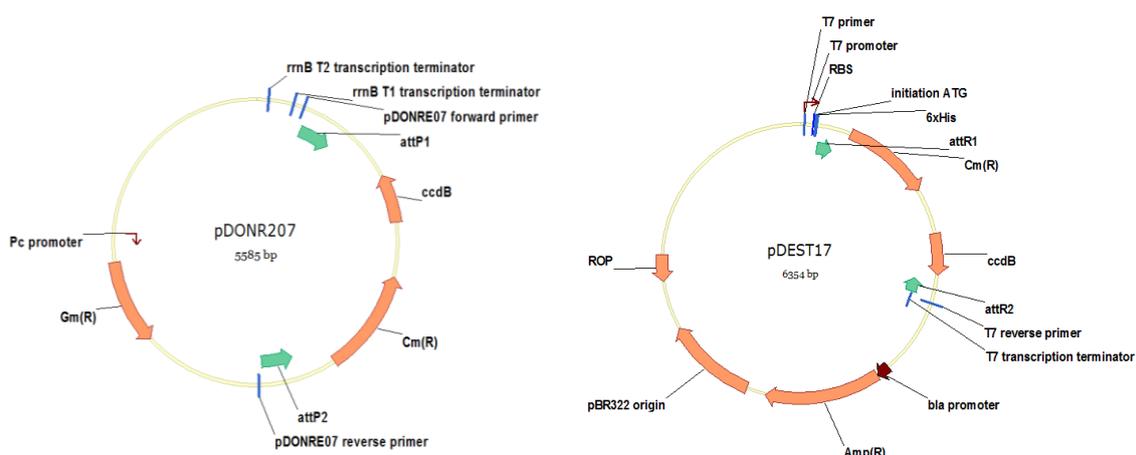


Figura 11: Desenho esquemático dos vetores de doação (pDONR) e de destino (pDEST) utilizados no kit Gateway (Invitrogen). O primeiro vetor (pDONR) possui um gene de resistência a Cloramfenicol e o segundo (pDEST) possui resistência a ampicilina. Os sítios de recombinação, *attP* e *attR*, são ilustrados pelas setas verdes em ambos os clones, respectivamente.

## **2.7. AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *PIF* DE AGMNPV CONTENDO SÍTIOS *ATTB***

Para gerar fragmentos de DNA para uso na reação de recombinação no sistema Gateway, foi preciso desenhar oligonucleotídeos que adicionassem sítios *attB* nos produtos de PCR (Tabela 2). De acordo com as especificações do fabricante, os oligonucleotídeos seguiram a estrutura exemplificada na Figura 12. As amplificações foram feitas como já descrito no item 1.3 e o programa utilizado está especificado na Tabela 3.

*attB1* Forward Primer:

5' -GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-TNN-- (template-specific sequence) -3'  
*attB1*

*attB2* Reverse Primer:

5' -GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GTN-- (template-specific sequence) -3'  
*attB2*

Figura 12: Estrutura dos oligonucleotídeos *attB*. Em destaque, a sequência inserida nos oligonucleotídeos para realização das posteriores recombinações (Fonte: Manual Kit Gateway – Invitrogen).

## **2.8. REACÕES DE RECOMBINAÇÃO BP E LR**

Os fragmentos *attB-pifs* foram submetidos a reações de recombinação com o vetor doador – pDONR. A reação consistiu de 200ng de cada fragmento, 150ng/μL do vetor pDONR, 1μL da enzima BP Clonase II<sup>TM</sup>, 1μL do tampão correspondente à enzima. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 16h e após esse período a enzima foi inativada com Proteinase K (2μg/μL) por 10min/37°C. A reação foi utilizada para transformação de células de *E.coli* TOP-10 termocompetentes. A seleção dos clones foi feita em meio LB-ágar seletivo (gentamicina–50μg/mL). Os plasmídeos obtidos foram confirmados por clivagem com enzimas de restrição: *PstI/BamHI* para confirmação dos clones de *pif-1*; *NsiI* para os clones de *pif-2*; *NdeI/BglII* para confirmação dos clones de *pif-3*; e *EcoRI/BglII* para os clones de *pif-4*.

Os clones obtidos foram utilizados em reações de recombinação LR utilizando o vetor de destino pDEST. A reação foi feita utilizando 150ng do vetor doador contendo cada gene *pif*, 150ng do vetor pDEST, 1μL do mix da enzima LR Clonase<sup>TM</sup> II e incubada a temperatura ambiente por 16h. A inativação da enzima foi feita adicionando

---

Proteinase K (2µg/µL) e incubando por 10min/37°C. A transformação foi feita em células DH5α termocompetentes utilizando meio LB-ágar seletivo (ampicilina–100µg/mL) para seleção dos clones. Os vetores obtidos foram confirmados por clivagem com enzimas de restrição: para os plasmídeos contendo o gene *pif-1* foram utilizadas as enzimas *Bam*HI/*Hind*III, para o gene *pif-2* *Hind*III, gene *pif-3* foi utilizada a enzima *Nde*I e o gene *pif-4* foi utilizada a enzima *Eco*RI. Os plasmídeos também foram confirmados por determinação da sequência. O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa Macrogen.

## **2.9. ENSAIOS DE INDUÇÃO E REPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PIF RECOMBINANTES**

Para verificar a expressão das proteínas PIF, foi realizado um ensaio de indução. Os vetores de destino (pDEST) obtidos contendo os respectivos genes *pif* foram transformados na linhagem bacteriana termocompetente BL21-AI. De acordo com Miroux e Walker (1996) a super-expressão de proteínas de membrana em linhagens de *E. coli* costumam ser tóxicas às células devido a sua natureza hidrofóbica e desencadeiam morte celular. Para prevenção desses efeitos, as células transformadas foram inoculadas em 10mL de meio LB líquido contendo 100µg/mL de ampicilina e 0,1% de Glicose incubadas a 37°C/16h/200rpm. A presença da glicose reprime a expressão basal da T7 RNA polimerase que permite o crescimento celular até o momento da indução. Após crescimento, 0,5mL desse pré-inóculo foi incubado em 10mL de meio LB (100µg/mL de ampicilina) e foi deixado sob agitação (200rpm/37°C) até que a OD<sub>600</sub> atingisse 0,5 células/mL. Após cerca de 2h de crescimento, foi retirada uma alíquota de 0,5mL (0h) que serviu como controle. O inóculo foi dividido em duas culturas de 5ml: à primeira (Induzida) foi adicionado a solução indutora de L-arabinose

---

em uma concentração final de 0,2% e Glicose em uma concentração final de 0,1%; à segunda (Reprimida) adicionou-se a solução repressora de Glicose também na concentração final de 0,2%. Os inóculos permaneceram sob agitação durante 2h recolhendo-se alíquotas de 0,5mL a cada 15min. As amostras coletadas foram centrifugadas (5418 Rotor FA-45-18-11, Eppendorf) a 5000rpm/5min e o sedimento foi armazenado a -20°C. O restante da amostra induzida também foi centrifugado (5000rpm/15min) e o sedimento mantido a -20°C.

## **2.10. ANÁLISE E DETECCÃO DAS PROTEÍNAS PIF**

Para visualização da expressão das proteínas PIF, foi realizada uma eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) com os extratos celulares. O gel separador foi feito seguindo o protocolo descrito em Sambrook *et al.*, 1989, concentrações finais: Bis-Acrilamida 12%; 0,3M Tris-HCl, pH 8.8; SDS 0,1%; Persulfato de Amônio 0,05%; TEMED 0,1% ajustando o volume para 10mL com H<sub>2</sub>O destilada. O gel concentrador foi feito nas concentrações finais de: Bis-Acrilamida 5%; 0,1M Tris-HCl, pH 6.8; SDS 0,1%; Persulfato de Amônio 0,05%; TEMED 0,1% ajustando o volume para 10mL com H<sub>2</sub>O destilada.

As alíquotas coletadas durante o ensaio de indução (Induzida: controle, 15 min. – 120 min.) foram utilizadas como amostras para a eletroforese do gel. O sedimento foi ressuspendido em 80µL de tampão amostra (0,5M Tris-HCl, pH6.8; 8% Glicerol; SDS 10%; 2-β-mercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol) e as amostras fervidas por 5 min. O gel foi submetido à corrida eletroforética (cuba Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra Cell – BioRad) em tampão Tris-Glicina (Tris base 15g/l; Glicina 72g/l; SDS 5g/l) a uma voltagem de 120V. Após corrida, o gel foi corado por 1h com solução corante (Azul de Comassie

---

0,1%; Metanol 40%; Ácido Acético 10%) e descorado em solução descorante (Metanol 40%; Ácido Acético 10%).

Para identificação parcial das proteínas PIF foi realizado um *Western blotting* utilizando o anticorpo primário policlonal de camundongo - anti-HIS (GE Healthcare) que se liga a cauda de histidina adicionada a cada proteína PIF recombinante. Para realização desse procedimento, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida e das amostras observadas, foram escolhidas as que apresentaram crescimento visualmente maior na expressão da proteína em relação ao respectivo controle (células reprimidas). O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (GIBCO BRL – Life Technologies), a qual foi equilibrada com tampão de transferência (48mM Tris; 39mM Glicina; 20% Metanol; 10% SDS; pH 9,2) por 15min. A transferência foi feita com o aparelho Trans-blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) nas condições de 15V/ 125mA/ 1h 30min. A membrana foi bloqueada por cerca de 18h com uma solução contendo PBS 1X + leite em pó 3%. A membrana foi lavada (3 vezes) com solução PBS-Tween 20 (PBS 1X; Tween 0,05%) com intervalos de 5min. e incubada com o anticorpo primário anti-HIS (1: 5000) diluído na solução PBS 1X + leite em pó 0,5% por 1h. A membrana foi lavada novamente com solução PBS-Tween (1X-0,05%) e incubada com o anticorpo secundário de camundongo anti-IgG (SIGMA) conjugado com fosfatase alcalina diluído 1:10.000 em solução de PBS 1X + leite em pó 0,5% por 1h. Após lavagem com solução PBS-Tween, a membrana foi incubada com tampão da Fosfatase Alcalina (100mM Tris-HCl; 100mM NaCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9.5) por 5 min. e em seguida foram adicionados os substratos NBT/BCIP (Zymed – Invitrogen) para revelação da membrana conforme especificações do fabricante. Após alguns minutos, a reação foi interrompida com sucessivas lavagens da membrana com H<sub>2</sub>O destilada.

## **2.11. PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PIF**

Para purificação das proteínas foi utilizada a técnica de cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni-NTA, Quiagen). Para isso, foi realizado um ensaio de indução como descrito no item 2.9. O precipitado celular foi solubilizado com Tampão de Lise ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M; Tris-HCl 0,01M; Ureia 8M, pH 8,0), incubado por 30 min/37°C e as células foram submetidas a disrupção em sonificador. O extrato celular foi misturado à resina de níquel (HIS-Select<sup>®</sup> Nickel Affinity Gel, SIGMA), centrifugado por 5000 x g/30s e o sobrenadante (lisado) reservado. A resina foi lavada com Tampão de Lavagem ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M; Tris-HCl 0,01M; Ureia 8M, pH 6,3) e então as proteínas foram eluídas com Tampão de Eluição ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M; Tris-HCl 0,01M; Ureia 8M, pH 4,5), coletadas e armazenadas a -80°C.

Para retirar o excesso de ureia utilizada na purificação, a proteína foi dessalinizada em membrana de celulose (Nadir<sup>®</sup>-Dyalisis Tubing). A membrana contendo a solução com a proteína purificada foi submersa em 1L de Tampão de diálise (Tris-HCl 10mM; Triton X-100 1%) e guardada por 16h em câmara fria sob agitação. Após esse período, foram realizadas duas trocas do tampão a cada 2h e então o volume da amostra foi reduzido em concentrador de amostras (Thermo Savant Speedvac DNA 110/DNA 120) e depois quantificado em Nanodrop.

## **2.12. IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS**

Para obtenção de antissoro anti-PIF foram imunizados quatro camundongos da linhagem Balb/c de acordo com o Manual de Utilização de Animais/Fiocruz (Conceição-Silva e Presgrave, 2008). Foram feitas três aplicações subcutâneas

---

(100 $\mu$ L/camundongo) da proteína (10 $\mu$ g/mL), sendo que a primeira contendo adjuvante completo de Freund (1:1), na segunda com adjuvante incompleto de Freund (1:1) e na terceira foi aplicada a proteína pura. Os intervalos entre cada imunização foram 30 e 15 dias respectivamente.

A sangria dos camundongos foi realizada 60 dias após a primeira imunização. Os camundongos foram anestesiados e em seguida foi coletado o sangue pela via retro orbital. Os tubos ficaram em repouso a 37°C/1h para separação do soro. O antissoro foi armazenado a -20°C e testado em ensaios de *Western blotting* com extrato de células BL-21 induzidas e células de inseto infectadas com o vírus AgMNPV.

### **3. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA DELEÇÃO DOS GENES *PIF***

#### **3.1. PRIMEIRA ESTRATÉGIA PARA INATIVAÇÃO DOS GENES *PIF***

Durante a dissertação de mestrado (Ferreira, 2008) foi obtido um recombinante, o vAgGFP $\Delta$ *pif-1*, o qual teve o gene *pif-1* interrompido por um cassete gênico contendo o gene *egfp* sob o comando do promotor *hsp70*. Para obtenção de recombinantes com os genes *pif-2*, *pif-3* e *pif-4* também interrompidos, esses genes tiveram suas regiões a jusante e a montante amplificadas por PCR com oligonucleotídeos específicos desenhados para amplificar fragmentos de 1,3 – 2,0Kpb (Figura 13).

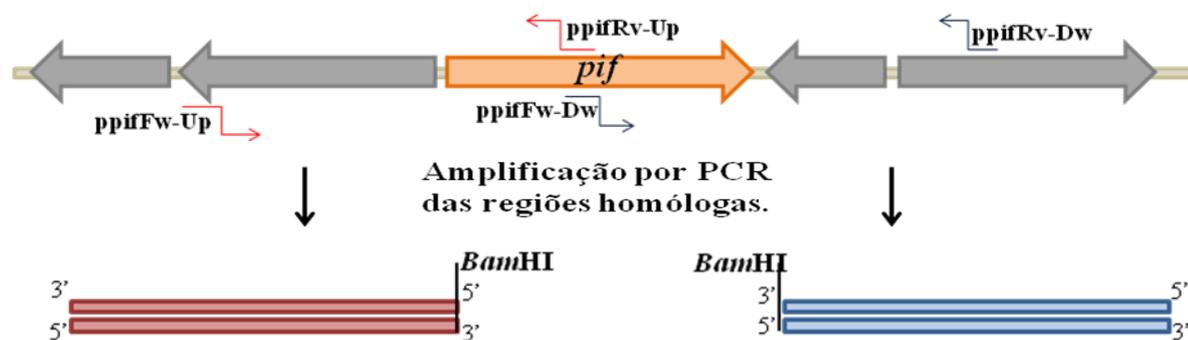


Figura 13: Ilustração da estratégia utilizada para amplificação das regiões flangeadoras aos genes *pif-3* e *pif-4*. As regiões homólogas aos genes *pif* foram amplificadas separadamente

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência genômica de Ag-2D e sintetizados pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies). Nos oligonucleotídeos diretos (*forward*) da região a jusante e nos reversos (*reverse*), da região a montante aos genes, foram inseridos sítios de restrição nas extremidades 5' e 3', respectivamente, referentes à enzima *Bam*HI. Essa estratégia foi realizada para posterior inserção do cassete gênico *hsp70egfp* na sequência codante dos genes de interesse. As sequências dos oligonucleotídeos estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4: Relação dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *pif-2*, *pif-3* e *pif-4* e suas regiões a montante e a jusante. A localização dos genes no genoma de AgMNPV-2D bem como o número da fase aberta de leitura (ORF) também é mostrada na tabela .

Gene	Região para amplificação	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')
<i>pif-2</i> Ag 12: 8381<9529	A montante	pPIF2 F	CAT.CAA.AAC.TGT.AAC.GGG.CAA.CA T.GGT.TAC
		pif2_BamHI R	CAA.ACA.TTC.TAA.TGG.GTT.TAG.TG G.ATC.CAC*
	A jusante	pif2_BamHI F	GTG.GAT.CCA.CTA.AAC.CCA.TTA.GA A.TGT.TTG*
		pif2_1115 R	TCC.AAA.TCT.GCC.ATC.CAA.GGA.G
<i>pif-3</i> Ag 114: 97975<98586	A montante	pif3_1052 F	CAT.GGT.GCA.CAT.CAA.TCA.AGC.G
		pif3_BamHI R	CGC.AAC.AGC.CCC.AGC.GCC.GGA.TC C.CAA.TCG.ATC.AC*
	A jusante	pif3_BamHI F	GTG.ATC.GAT.TGG.GAT.CCG.GCG.CT G.GGG.CTG.TTG.CG*
		pif3_1091 R	TCT.TGG.TAG.CCT.TTG.TAA.CTG.C
<i>pif-4</i> Ag 93: 79039>79563	A montante	pif4_1228 F	TGC.TGC.CGT.CAA.CAC.ATC.CTT.GT C.GTC.ACC
		pif4_BamHI R	TCA.ATC.AGC.GTC.AAG.GAT.CCG.AC G.GAA.GTG.CAC.GC*
	A jusante	pif4_BamHI F	GCG.TGC.ACT.TCC.GTC.GGA.TCC.TT G.ACG.CTG.ATT.GA*
		pif4_1226 R	GAT.GGG.TGT.GTT.TGC.GGT.TGC.AC G.ACG.CTT

\*Oligonucleotídeos que contêm sítios de restrição para a enzima *Bam*HI

As reações de PCR continham as concentrações finais de: 20 ng de DNA molde dos clones virais, 0,4µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 0,02mM de MgSO<sub>4</sub>, 2,5U da enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Invitrogen) e 1X do tampão correspondente à enzima em um volume final de 50µL em H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Os programas para amplificação dos fragmentos de DNA estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Programas de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA dos genes *pif* de AgMNPV.

Programa*	Desnaturação 2min. (°C)	Anelamento 1min. (°C)	Polimerização 1 min. (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
PIF-2 Up		57°			2012
PIF-2 Dw		57°			1547
PIF-3 Up		60°			1395
PIF-3 Dw	94°	60°	72°	30	1407
PIF-3 UpDw		56°			2765
PIF-4 Up		67°			1611
PIF-4 Dw		68°			1403

\* Todos os programas de PCR iniciaram com uma temperatura de 94°C/3min e terminaram a 72°C/10min.

Os fragmentos amplificados foram isolados em gel de baixo ponto de fusão 0,8% (*Low Melting Point* - Seakem) e purificados com o kit GFX<sup>TM</sup> (GE Healthcare) de acordo com as especificações do fabricante. Após purificação, foram submetidos ao tratamento com a enzima T4 DNA Polimerase I a qual possui atividade de exonuclease na orientação 3'-5' (Figura 14).

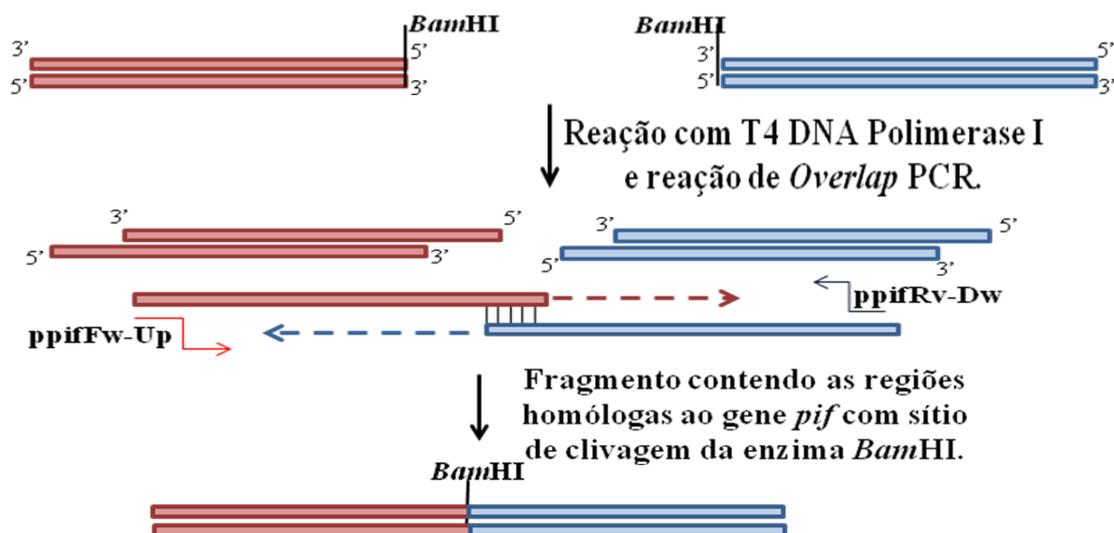


Figura 14: Esquema da construção do fragmento contendo as regiões homólogas de *pif* contendo um sítio para clivagem com a enzima *Bam*HI. Os fragmentos das regiões a montante e a jusante após purificação foram tratados com a enzima T4 DNA PolI para posterior reação de *overlap* PCR. O fragmento obtido após amplificação por PCR contém as regiões para recombinação homóloga com um sítio para clivagem com a enzima de restrição *Bam*HI.

A reação foi feita em H<sub>2</sub>O milliQ estéril contendo as concentrações finais: 180ng/μL de cada fragmento de DNA (Up e Dw); 0,5mM de dNTP; 500U da enzima T4 DNA Polimerase I (Promega) e 2,5X do tampão correspondente a enzima em um volume final de 25μL. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 30min e depois submetida a 75°C/10min para inativação da enzima. Foi adicionado igual volume de etanol absoluto à reação utilizando o sal da própria reação para precipitação do DNA. Após 12h o DNA foi centrifugado e lavado com etanol 70% e ressuspensão em H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Esse produto referente aos fragmentos das regiões a montante e a jusante ao genes *pif* foi utilizado como DNA molde para reação da *overlap* PCR (Figura 14). Durante a reação de *overlap* PCR, foram utilizados oligonucleotídeos para amplificação de um fragmento contendo o gene de interesse e suas regiões a montante e a jusante com um sítio de *Bam*HI no meio do gene.

O fragmento resultante da reação de *overlap* PCR foi purificado e clonado no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector, seguindo as instruções do fabricante (Promega). A relação dos plasmídeos utilizados está listada na Tabela 6.

Tabela 6: Relação dos plasmídeos utilizados para construção dos vírus recombinantes.

Plasmídeos	Plasmídeos (abreviaturas)	Tamanho (pb)	Construção plasmidial
pGEM-T Easy	pGEM	3015	Plasmídeo da Promega <sup>®</sup> .
p2100egfp	p2100	5115	Plasmídeo (Hallwass, 2005) contendo a sequência do gene <i>egfp</i> e com o promotor constitutivo <i>hsp70</i> de <i>D. melanogaster</i> .
pGpif3	pGpif3	5780	pGEM + fragmentos relativos às regiões a montante e a jusante do gene <i>pif-3</i> de AgMNPV-2D.
pGpif3egfp	pGpif3egfp	7580	pGEM + região a montante ao gene <i>pif-3</i> de Ag-2D + cassete gênico <i>hsp70</i> e gene <i>gfp</i> + região a jusante de <i>pif-3</i> .
pGUppif-4	pGUppif4	4626	pGEM + região a montante ao gene <i>pif-4</i> de Ag-2D.
pGDwpif-4	pGDwpif4	4418	pGEM + região a jusante ao gene <i>pif-4</i> de Ag-2D.

A reação de ligação foi feita em uma proporção de 3:1 do fragmento para o plasmídeo, a uma concentração de DNA do inserto de 200ng em um volume final de 20 µL. A incubação foi feita com 150U/µL da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) a 4°C por 12h. Foram utilizados 5µL do sistema final de ligação para transformação em células termocompetentes de *E. coli* DH5α (Sambrook *et al.*, 1989). As células foram plaqueadas em meio LB-ágar (0,05% Extrato de Levedura; 0,1% NaCl; 0,1% Triptona Bacteriológica; 0,15% de Ágar) seletivo (ampicilina–100µg/mL; x-gal–25µg/mL e IPTG–20µg/mL) onde várias colônias brancas foram obtidas e crescidas em meio LB líquido (0,05% Extrato de Levedura; 0,1% NaCl; 0,1% Triptona Bacteriológica) com ampicilina. A extração de DNA plasmidial foi feita pelo método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) onde o sedimento de 1,5mL de células possivelmente

---

recombinantes foram tratados com 100 $\mu$ L de Solução I (Tris-HCl 50mM; EDTA 10mM; pH 8,0), 200 $\mu$ L de Solução II (NaOH 0,2M; SDS 1%) e 150 $\mu$ L de Solução III (Acetato de potássio 5M; Ácido acético glacial 11,5mL). Ao sobrenadante foi adicionado isopropanol para precipitação do DNA plasmideal, que após secagem foi ressuspenso em 200 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milliQ e 110 $\mu$ L acetato de amônio 7,5M. Ao sobrenadante foi adicionado etanol absoluto para nova precipitação do DNA o qual foi lavado com etanol 70%, como descrito anteriormente. Após secagem, o DNA das colônias foi ressuspenso em 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milliQ.

O plasmídeo obtido foi confirmado através de clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI (Invitrogen) e *Eco*RI (Promega). A reação de digestão foi feita com 10U da enzima *Bam*HI, 1 $\mu$ g do DNA plasmideal com inserto Up-Dw*pif*-3, 1X do tampão *one-phor-all* (Phamacia) em um volume final de 20 $\mu$ L, incubada a 37°C/2h. Uma alíquota de 10 $\mu$ L dessa digestão foi coletada após clivagem para visualização em gel de agarose e ao restante foi acrescentado 10U da enzima *Eco*RI permanecendo a 37°C/2h e depois visualizado em eletroforese em gel de agarose.

Para interrupção dos genes *pif* foi utilizado um cassete gênico contendo o gene *egfp* sob o comando do promotor constitutivo *hsp70* de *Drosophila melanogaster*. Esse cassete foi liberado do plasmídeo p2100egfp por clivagem com 10U da enzima *Bam*HI. A reação de digestão consistiu de 1 $\mu$ g do DNA plasmideal, tampão da enzima React3 10X (Invitrogen) para um volume final de 25 $\mu$ L, e incubação a 37°C/2h. A reação foi aplicada em gel de baixo ponto de fusão e o fragmento correspondente ao *hsp70+egfp* foi eluído e purificado como já descrito. A reação de ligação do cassete ao plasmídeo, a transformação em células de *E. coli* DH5 $\alpha$  e a extração do DNA plasmidial foram feitos como descrito acima.

---

Para interrupção dos genes *pif* de Ag-2D, o vetor para deleção foi co-transfectado com o DNA viral em células de inseto. Células Tn-5B1-4 foram sedimentadas em placa de 60 mm em uma concentração final de  $2 \times 10^5$  células/placa, em um volume final de 2mL de meio TNMFH completo e incubadas a 27°C/4h. As soluções com DNA foram preparadas com meio TNMFH sem soro, 1µg de DNA viral de Ag-2D e 2µg de DNA do plasmídeo pG*pif-3egfp*. A essas soluções foram acrescentados 10µL de *Cellfectin* (Invitrogen) diluída e 90µL de meio TNMFH sem soro e incubados por 30min a temperatura ambiente. Em seguida, essas soluções com 800µL de meio sem soro foram adicionadas às células. Após 5h de incubação, a solução foi retirada, foi acrescentado meio TNMFH completo e novamente as células foram incubadas a 27°C. A partir do terceiro dia após a transfecção, as células foram observadas quanto à fluorescência em microscópio óptico Axiovert 135M (Zeiss), utilizando a luz UV como fonte e filtro 1 (FT 395).

### **3.2 PURIFICAÇÃO DO VÍRUS VAGΔPIF-1 POR DILUIÇÃO SERIADA**

Células infectadas com esse vírus, sob luz UV, emitem fluorescência verde o que facilita sua purificação. Para isso, o recombinante vAgΔ*pif-1* foi submetido a técnica de diluição seriada de acordo com O'Reilly *et al* (1992). Inicialmente, o vírus foi amplificado em uma placa de cultura de 6 poços (TPP) e 5 dias p.i., o sobrenadante foi coletado e submetido a uma série de diluições ( $10^{-1}$  –  $10^{-8}$ ) em uma placa de cultura (24 poços). Em cada poço foram colocados 150µL de meio TNMFH completo e 16,6µL do inóculo viral que foi passado de um poço para outro obtendo assim as diluições seriadas. As células foram contadas com ajuda de um hemacitômetro e diluídas ( $1 \times 10^5$  células/mL) em meio TNMFH completo. Aos poços com as diluições virais

---

foram acrescentados 1.350µL da suspensão de células e após homogeneização foram transferidas para placas de cultura com 96 poços. Os poços foram analisados quanto a fluorescência após quatro dias de infecção em microscópio óptico de fluorescência Axiovert 100 (Zeiss), utilizando a luz UV (HXP 120) como fonte e filtro 1 (FT 395). Os poços que apresentaram fluorescência foram coletados e foram submetidos a novas diluições. Após a quarta purificação em série, a infecção de células foi visualizada somente em poços com concentração viral mais alta ( $10^{-1}$ – $10^{-5}$ ). Então, a partir desse ponto as purificações foram realizadas utilizando somente essas diluições para finalizar o processo de purificação do recombinante vAgΔ*pif-1*.

### **3.3. DETECÇÃO DO GENE *EGFP* NO GENOMA DE VAGΔPIF-1**

Após a terceira etapa de purificação de vAgΔ*pif-1*, o sobrenadante foi coletado e amplificado conforme o item 2.2. Os BV foram submetidos a extração de DNA conforme o item 2.3, porém sem a realização da ultracentrifugação. O protocolo foi adaptado para uma quantidade de 1mL de inóculo viral (livre de células), o qual foi centrifugado a 1.2000g/30min (5415R – Eppendorf), seguido de extração do DNA viral por ciclos de fenol e clorofórmio:álcool isoamílico. As amostras de DNA foram amplificadas por PCR para detecção da correta recombinação do gene *egfp* no locus do gene *pif-1*. Para isso foram feitas reações com dois pares de oligonucleotídeos: um par específico a *pif-1* e que anela na região externa ao gene; e um par específico a *egfp* que anela na região interna a esse gene. Os oligonucleotídeos estão listados na Tabela 7.

Tabela 7: Relação dos oligonucleotídeos utilizados para detecção do gene *egfp*

Gene	Nome	Sequencia (5'>3')
<i>pif-1</i> (ORF Ag 117)	AgMNPV-pif1-3'F	<b>TCA.AGA.ATG.TAC.CCT.GAA.G</b>
	AgMNPV-pif1-5'R	<b>CTC.CAC.TAC.TTG.AGC.CAC</b>
<i>egfp</i>	egfpFNcoI	<b>CCA.TGG.TGA.GCA.AGG.GCG.A</b>
	egfpRNcoI	<b>CCA.TGG.GAA.TAC.TTG.TAC.AGC.TCG.TCC .ATG</b>

As reações foram feitas com H<sub>2</sub>O milliQ estéril nas concentrações finais de: 20 ng de DNA molde, 0,4µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 0,02mM de MgCl<sub>2</sub>, 5U da enzima *Taq* Polimerase (PHT) e 1X do tampão correspondente à enzima em um volume final de 50µL. Os programas para amplificação dos fragmentos de DNA foram realizados de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8: Programas de PCR para detecção de *egfp* no locus do gene *pif-1* do recombinante vAgΔ*pif-1*.

Programa*	Desnaturação 1min. (°C)	Anelamento 1min. (°C)	Polimerização 1min. (°C)	Ciclos
EGFP	94°	59°	72°	30

\* Todos os programas de PCR iniciaram com uma temperatura de 94°C/3min e terminaram a 72°C/10min.

Os fragmentos gerados pela PCR foram visualizados em géis de agarose 0,8% preparados em tampão de corrida TBE 0,5X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM) de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Os DNA foram preparados com tampão amostra 5X (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 15%), colocados nos poços e submetidos à eletroforese com voltagem constante de 80V. Os géis foram posteriormente corados com brometo de etídeo (5·µg/mL), visualizados sob luz UV e fotografados no fotodocumentador AlphaImager<sup>®</sup> Mini (Alpha Innotech).

### **3.4. SEGUNDA ESTRATÉGIA PARA INATIVAÇÃO DOS GENES *PIF***

A primeira estratégia consiste em inserir o gene *egfp* no meio dos genes *pif* interrompendo-o (Figura 15), porém a sequência dos genes e seus respectivos promotores ainda irão permanecer no genoma viral.

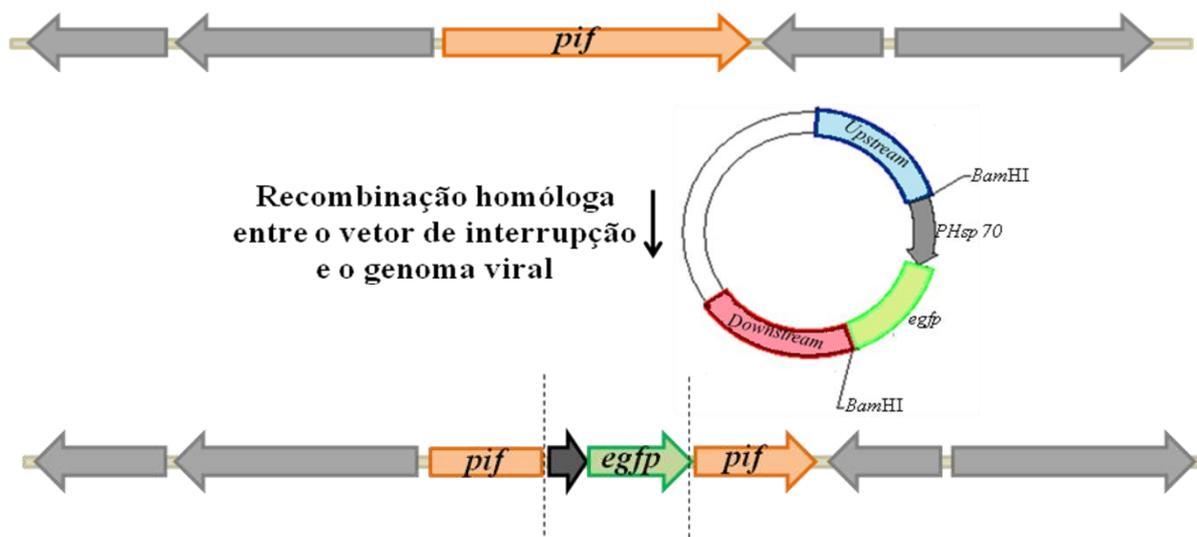


Figura 15: Esquema ilustrativo da reação de recombinação homóloga utilizando o vetor para interrupção dos genes *pif*. Nota-se que a utilização dessa estratégia permite que a região codificante ao gene interrompido permaneça no genoma.

Dessa maneira não se sabe se poderá haver alguma influência de um possível produto gênico funcional, o qual poderá interferir nos resultados posteriores. Sendo assim, uma segunda estratégia de inativação dos genes *pif* foi desenvolvida visando a deleção total dos genes *pif* (Figura 16).

#### **3.4.1. Amplificação dos genes *pif* e clonagem no vetor pGEM-T Easy**

Essa estratégia visa primeiramente amplificar o gene *pif* de interesse contendo cerca de 1000 pb a montante e a jusante ao gene. Então, para amplificação dos genes *pif-1*, *pif-2*, *pif-3* e *pif-4* foram inicialmente realizadas reações de PCR. Os

oligonucleotídeos utilizados foram desenhados com base na sequência de AgMNPV-2D e sintetizados pela empresa Macrogen. A sequência dos oligonucleotídeos e o tamanho dos fragmentos esperados estão listados na Tabela 9.

Tabela 9: Lista dos oligonucleotídeos para amplificação dos cassetes gênicos de *pif-1*, *pif-2*, *pif-3* e *pif-4*.

<b>Cassete gênico</b>	<b>Nome do primer</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Fragmento (pb)</b>
<i>pif-1</i> cassete 1	Pif1-Up F	<b>ATT.GCA.CCT.AGC.ATG.TCG.TCT.GAG. GAA.ACT.CC</b>	3640
	Pif1-Dw R	<b>TGT.CGC.GTC.TTA.TAT.TGG.GCG.CGG .TAC.CG</b>	
<i>pif-2</i> cassete 2	Pif2-UP F	<b>CGC.ATG.TTA.AGC.CTA.GCA.ATC.TGA</b>	3933
	Pif2-DW R	<b>GGT.TTT.ATT.TGG.TAT.GGG.TTA.CAT. ATT.GC</b>	
<i>pif-3</i> cassete 3	Pif3-UP F	<b>CAT.GGT.GCA.CAT.CAA.TCA.AGC.G</b>	2763
	Pif3-DW R	<b>TCT.TGG.TAG.CCT.TTG.TAA.CTG.C</b>	
<i>pif-4</i> cassete 4	Pif4-UP F	<b>TGC.TGC.CGT.CAA.CAC.ATC.CTT.GTC. GTC.ACC</b>	2935
	Pif4-DW R	<b>GAT.GGG.TGT.GTT.TGC.GGT.TGC.ACG .ACG.CTT</b>	

Os oligonucleotídeos que amplificam o cassete referente ao gene *pif-1* abrangem as seguintes regiões: toda a ORF116 e um pedaço do gene *bro-g* a montante; e a jusante todas as ORFs 118, 119 e 120 e também contêm a região *hr3a*. O cassete gênico de *pif-2* contêm as regiões flanqueadoras: *hr1* e o gene *bro-c* a montante e a jusante, o gene *arif-1*. Já o cassete do gene *pif-3* possui como flancos: um pedaço da ORF 113 a montante e o gene *bro-g* e a ORF 116 a jusante ao gene. Por fim, o cassete referente ao gene *pif-4* possui um pedaço do gene da helicase à montante e a região *hr2c* e um pedaço da ORF 94 à jusante.

As ampliações dos cassetes gênicos foram feitas nas concentrações finais: 20 ng de DNA molde dos clones virais, 0,4µM de cada *primer*, 300µM do mix de dNTP,

2,5U da enzima de alta fidelidade LongAmp *Taq* DNA Polymerase (NEB) e 1X do tampão correspondente à enzima em um volume final de 25µL em H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Os programas para amplificação dos fragmentos de DNA estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Programa de PCR utilizado para amplificação dos cassetes gênicos.

Cassete	Desnaturação 20s. (°C)	Anelamento 20s. (°C)	Polimerização (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
<i>pif-1</i>		65°			3640
<i>pif-2</i>	94°	64°	65°/3min 17s.	35	3935
<i>pif-3</i>		65°			2765
<i>pif-4</i>		65°			2981

\* Todos os programas de PCR iniciaram com uma temperatura de 94°C/3min e terminaram a 72°C/10min.

Para purificação dos cassetes foi utilizada a técnica de eluição de fragmentos de gel de agarose corado com Violeta Cristal. Segundo Rand 1996, o processo de purificação de longos fragmentos de PCR utilizando brometo de etídio com exposição à luz UV pode danificar o DNA levando a uma diminuição significativa na eficiência da clonagem. Sendo assim, os fragmentos gerados foram purificados em gel de agarose 0,8% corado previamente com Violeta Cristal em uma concentração final de 1,6µg/mL. Foi adicionado às amostras tampão de corrida (Glicerol 30%; EDTA 20mM; Violeta Cristal 100µg/mL) na concentração final 1X. A corrida foi realizada em tampão TBE 0,5X a uma voltagem de 80V. Os fragmentos foram visualizados em um transiluminador de luz branca e cortados do gel. A purificação foi realizada com o kit GFX<sup>TM</sup> (GE Healthcare) de acordo com especificações do fabricante e os cassetes foram ligados ao vetor pGEM-T Easy como previamente relatado no item 3.1.

A transformação foi realizada em células de *E. coli* (DH5α) eletrocompetentes seguindo protocolo de Sambrook *et al.*, 1989. Foram utilizados 2µL da reação de ligação para realização da eletroporação das células que foram crescidas durante 1h em

---

meio SOC (Tryptona 2%; Extrato de Levedura 0,5%; NaCl 10mM; KCl 2,5mM; MgCl<sub>2</sub>10mM; MgSO<sub>4</sub> 10mM; Glicose 20mM) e depois plaqueadas em meio LB-ágar seletivo (ampicilina–100µg/mL; x-gal–25µg/mL e IPTG–20µg/mL). O DNA plasmideal foi extraído utilizando o método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989) descrito no item 3.3.3. Para confirmação da clonagem, os possíveis clones foram submetidos a clivagem com enzimas de restrição. Os plasmídeos contendo os cassetes dos genes *pif-1*, *pif-2* e *pif-3* foram clivados com a enzima *PstI* (Sigma) e os plasmídeos referentes ao gene *pif-4* foram clivados com a enzima *SalI* (Promega). O resultado das clivagens foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### **3.4.2. Deleção dos genes *pif***

Para realização da deleção dos genes *pif*, foram desenhados oligonucleotídeos específicos às regiões externas a cada gene de interesse. O produto final esperado é a amplificação do plasmídeo pGEM-T Easy com as regiões homólogas referentes a cada gene excluindo os genes *pif* (Figura 16).

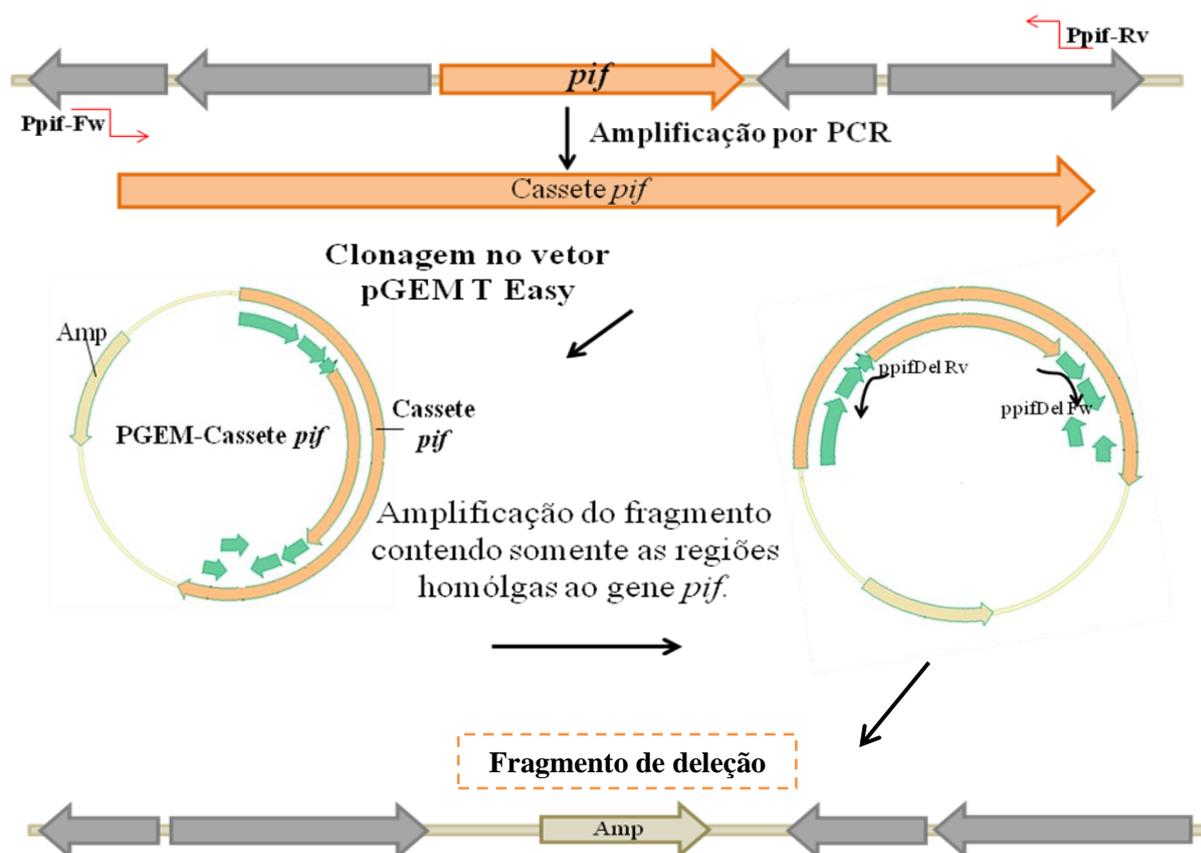


Figura 16: Ilustração da estratégia utilizada para amplificação do fragmento de deleção dos genes *pif*.

As reações de PCR foram realizadas com o vetor contendo o cassete gênico referente a cada gene *pif* como DNA molde. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão listadas na Tabela 11.

Tabela 11: Relação dos oligonucleotídeos para deleção dos genes *pif*.

<b>Gene deletado</b>	<b>Nome do primer</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>	<b>Fragmento (pb)</b>
<i>pif-1</i>	Pif1 Del F	GTAAACTTGTTTTTTGCGGATCCCCGT TTCCG	4932
	Pif1 Del R	GCCCTTTTCATTAAGGATCCTCAAACG GCAACAC	
<i>pif-2</i>	Pif2 Del F	TGTGCTGATAAGCTGGATCCAAGGGC CAAACC	5878
	Pif2 Del R	GACGTGCGCGGATCCATCAACTAGCT TTTC	
<i>pif-3</i>	Pif3 Del F	GTGCATAAACGGATCCACAAACTCAA ACGCGG	5269
	Pif3 Del R	CGAACACATGTCGGGATCCTACAGGC GCGTATAC	
<i>pif-4</i>	Pif4 Del F	TGGGTATGTGGATCCGGGCGTTGCAT T	5631
	Pif4 Del R	ACGTAGGATCCGTACAGCAACGTGTT GTC	

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. SEQUÊNCIAS DOS GENES *PIF* DOS ISOLADOS DE AGMNPV

As populações de baculovírus no campo são geneticamente heterogêneas (Simón *et al.*, 2006), conferindo uma alta variabilidade genética. É conhecido que dentro dessas populações, são gerados genótipos mutantes a cada ciclo de replicação viral. Alguns desses mutantes apresentam deleções em regiões essenciais do genoma (em genes estruturais ou regulatórios) responsáveis pela persistência do vírus na natureza e por sua capacidade de transmissão por via oral (López-Ferber *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2004; Simón *et al.*, 2005).

O primeiro estudo realizado nesse capítulo, analisou a diversidade genética de diferentes isolados de campo de AgMNPV, baseado em genes que codificam proteínas essenciais para a infecção oral do inseto. As sequências obtidas dos vinte e oito isolados foram confirmadas por BLAST e então alinhadas com as sequências dos genes *pif* do vírus Ag-2D que serviu de base para a análise e distinção dos polimorfismos. As sequências, direta e reversa, foram alinhadas para formação dos consensos. Os eletroferogramas foram analisados em busca de inserções e deleções, presença de sítios polimórficos que expressam a presença de genótipos distintos dentro da mesma população. O padrão encontrado nas análises é mostrado na Figura 17.

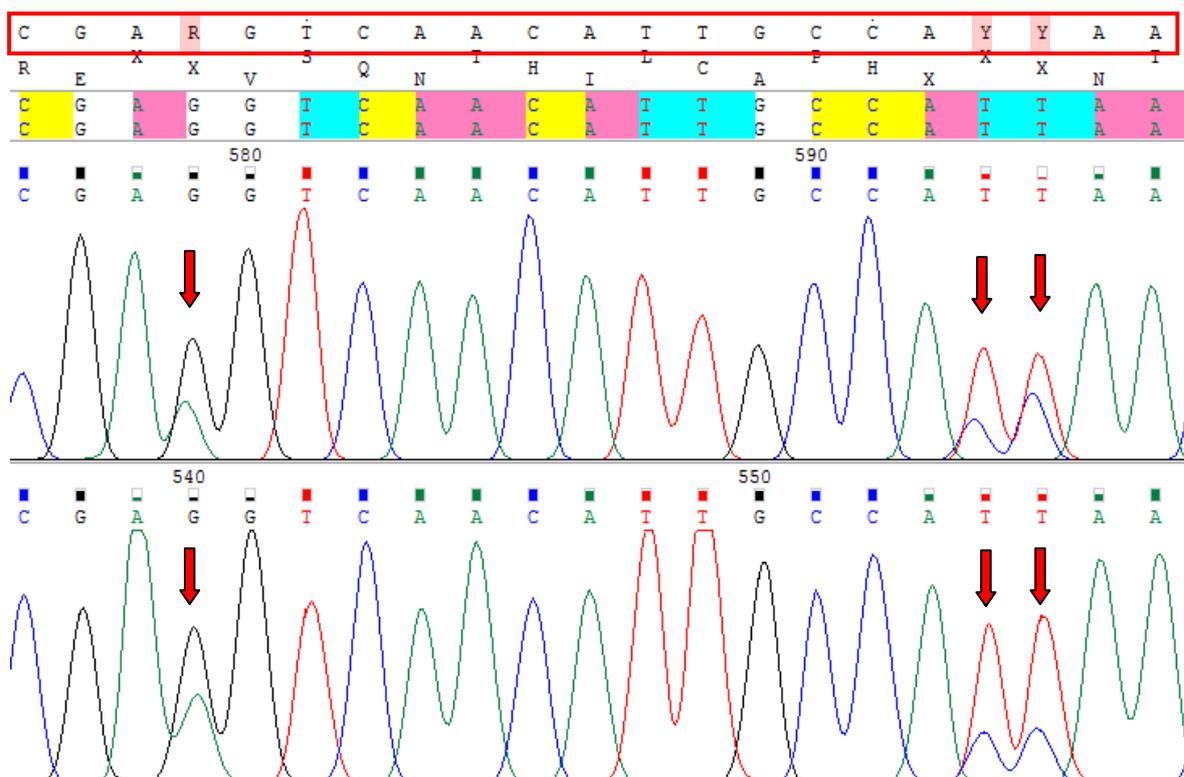


Figura 17: Alinhamento das seqüências direta e reversa montadas no programa ChromasPro. A figura mostra uma região do alinhamento do isolado geográfico de Ag-PF onde podem ser observados os polimorfismos encontrados em ambas as seqüências, direta e reversa, e que estão indicados pelas setas vermelhas. A seqüência consenso está mostrada acima, na caixa vermelha, e em destaque códigos de ambiguidade utilizados.

O estudo da diversidade utilizando a técnica de PCR para amplificação parcial de genes de baculovírus tem sido amplamente utilizado. Rowley e colaboradores (2011) identificaram variações genéticas e relações mantidas entre NPV encontrados em 90 amostras de larvas de *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* e *Heliiothis virescens*, baseando-se em análises parciais dos genes *lef-8*, *lef-9* e *polh*. No trabalho citado, foram identificadas 67 amostras contendo isolados de *H. zea* SNPV e *H. armigera* SNPV, 18 contendo isolados de NPV de *H. armigera* e cinco amostras contendo isolados de *Autographa californica* MNPV, mostrando o quanto a população estudada é variável.

Neste trabalho, após obtenção das seqüências consenso de cada isolado, essas foram alinhadas para detecção de substituições do tipo transição ( $A \rightarrow G$  ou  $C \rightarrow T$ ) ou transversão ( $A \rightarrow C$ ,  $C \rightarrow G$ ,  $A \rightarrow T$ ). Os isolados foram analisados em dois grupos,

Temporais (onde foram incluídos todos os 20 isolados temporais e o vírus de referência Ag2D) e Geográficos (todos os oito isolados geográficos e o Ag2D como referência). Foram encontrados polimorfismos em todos os genes estudados. Para os isolados temporais no gene *pif1*: 16 substituições (4 sinônimas e 12 não sinônimas); gene *pif2*: 19 substituições (14 sinônimas e 5 não sinônimas); gene *pif3*: cinco substituições (três sinônimas e duas não sinônimas); e gene *pif4*: quatro substituições (duas sinônimas e duas não sinônimas). Nos isolados geográficos, o gene *pif1* apresentou: quatro substituições (duas sinônimas e duas não sinônimas); *pif2*: 17 substituições (12 sinônimas e 5 não sinônimas); *pif3*: duas substituições (uma sinônimas e uma não sinônima); e *pif4*: somente duas substituições não sinônimas (Figura 18). Na tabela 12 é possível também visualizar todos os SNP encontrados ao longo das sequências dos isolados estudados.

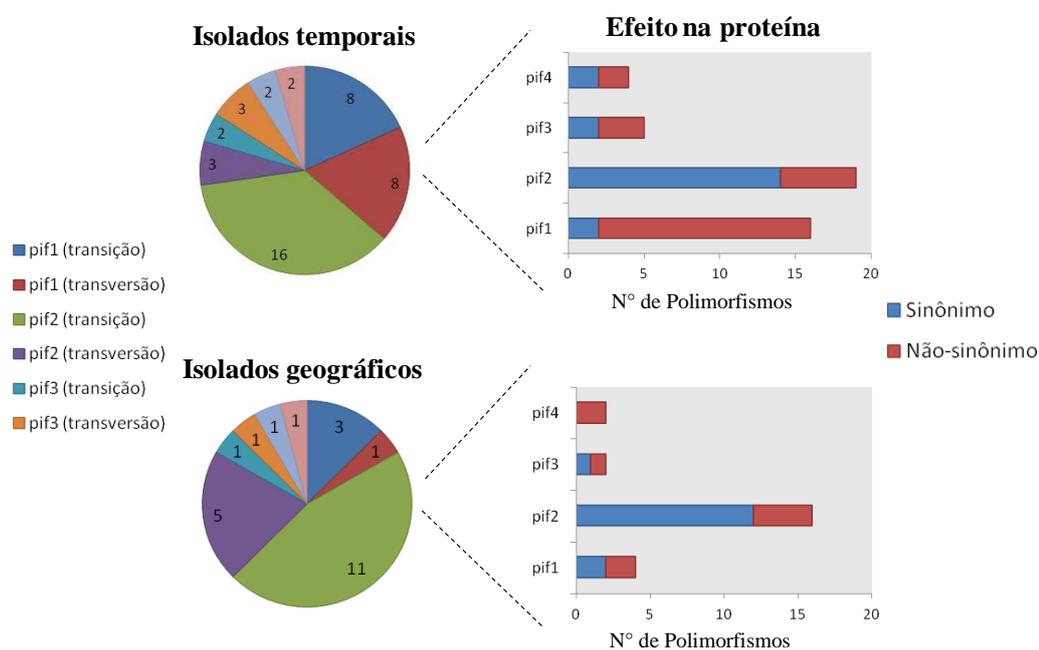


Figura 18: Número de substituições do tipo transição e transversão encontradas nas sequências dos genes *pif* analisados. O gráfico indica a quantidade de transições e transversões nos genes *pif* e as barras indicam o efeito dessas mutações na sequência proteica.





---

No gene *pif1*, os isolados que apresentaram polimorfismos foram os temporais 84/85, 92/93, 94/95, 95/96, 97/98 e 98/99, sendo que os isolados 92/93 (cinco SNP) e 98/99 (seis SNP) apresentaram uma quantidade maior ao longo da sequência. Em um total de 16 SNP encontrados, 12 foram não sinônimos, porém seis deles alteraram os grupos de aminoácidos, como observado no isolado 98/99 onde houve uma transição de C para T (818nt) mudando o aminoácido Treonina (polar) para uma Metionina (não polar). No isolado geográfico da Argentina, foi encontrada uma transversão de C para A que causou uma mudança de aminoácido (Ácido aspártico para ácido Glutâmico). Já no isolado do Uruguai, houve três transições sendo uma não sinônima (Valina para Metionina). Ambas as mudanças não influenciaram na propriedade dos aminoácidos.

Nos resultados obtidos para o gene *pif2*, observou-se que há uma flutuação da predominância dos polimorfismos encontrados nos isolados temporais. Alguns polimorfismos predominam em um ano (safra) e no ano seguinte já não se observa o mesmo. Porém, após três safras, volta a ser predominante. Foram detectados 19 SNP nos isolados temporais e 16 nos isolados geográficos, sendo 11 sítios polimórficos em comum para os dois grupos. Dos cinco SNP não sinônimos, três causam mudanças na propriedade dos aminoácidos, como na posição 575 onde houve uma transição de T para C, no isolado 94/95, mudando uma Leucina (apolar) para uma Fenilalanina (aromático). No grupo dos isolados geográficos, quatro dos 16 SNP encontrados são não sinônimos. Todos eles causam mudanças na natureza do aminoácido. O isolado Passo Fundo foi o que apresentou maior quantidade de SNP, 11 dos 16 observados para os isolados geográficos. Esse isolado foi relacionado à baixa eficiência no controle da lagarta *Anticarsia gemmatalis* durante a safra de 1993/94, porém ensaios de virulência foram realizados e concluiu-se que os parâmetros testados tais como CL<sub>50</sub>, TL<sub>50</sub> e Tempo médio de Morte estavam dentro do padrão para aplicação no campo (Berino, 1995).

No gene *pif3*, foram observados cinco SNP para os isolados temporais, sendo que três deles não sinônimos. Nos isolados geográficos, somente dois SNP foram encontrados, sendo que no isolado da Argentina notou-se uma transversão de G para C na posição 591, mudando uma Leucina (apolar) para uma Fenilalanina (aromático). Já o gene *pif4* teve quatro SNP nos isolados temporais e dois nos geográficos, sendo que os isolados 93/94 e Ibiporã tiveram uma mudança de um Ácido Aspártico para uma Asparagina na posição 328 devido a uma transição de G para A. O isolado Ibiporã também teve uma substituição do tipo transversão (A para C) na posição 173 ocasionando uma mudança de Ácido Glutâmico para Alanina.

A quantidade de sítios polimórficos também foi analisada para os dois grupos de isolados (Figura 19) onde se observa que o gene *pif2* possui uma quantidade maior de sítios em relação aos outros genes, tanto nos isolados temporais quanto nos isolados geográficos.

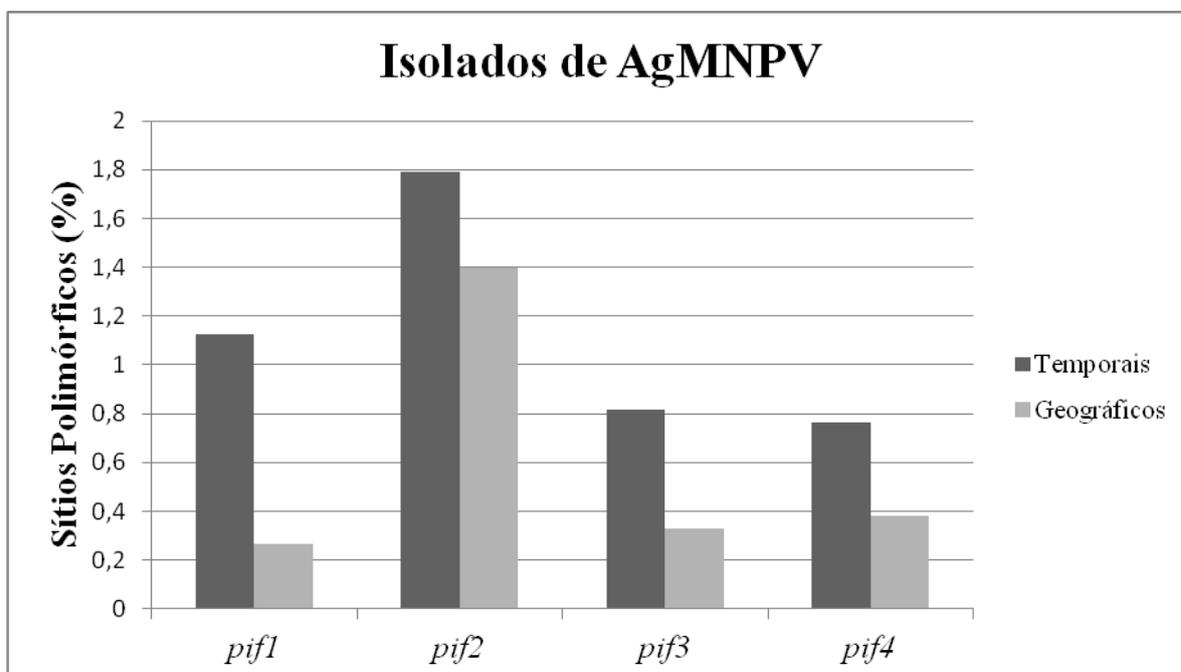


Figura 19: Porcentagem de sítios polimórficos encontrados nas sequências dos quatro genes *pif* em estudo dos isolados virais de AgMNPV.

Esses SNP encontrados estão ilustrados na Figura 20 onde pode-se observar a distribuição da diversidade ao longo das sequências de cada gene *pif*. Cada quadrinho mostra um polimorfismo e os que estão em cinza são aqueles que não alteraram aminoácidos e os em vermelho são SNP não sinônimos, ou seja, alteraram aminoácido modificando a estrutura da proteína.

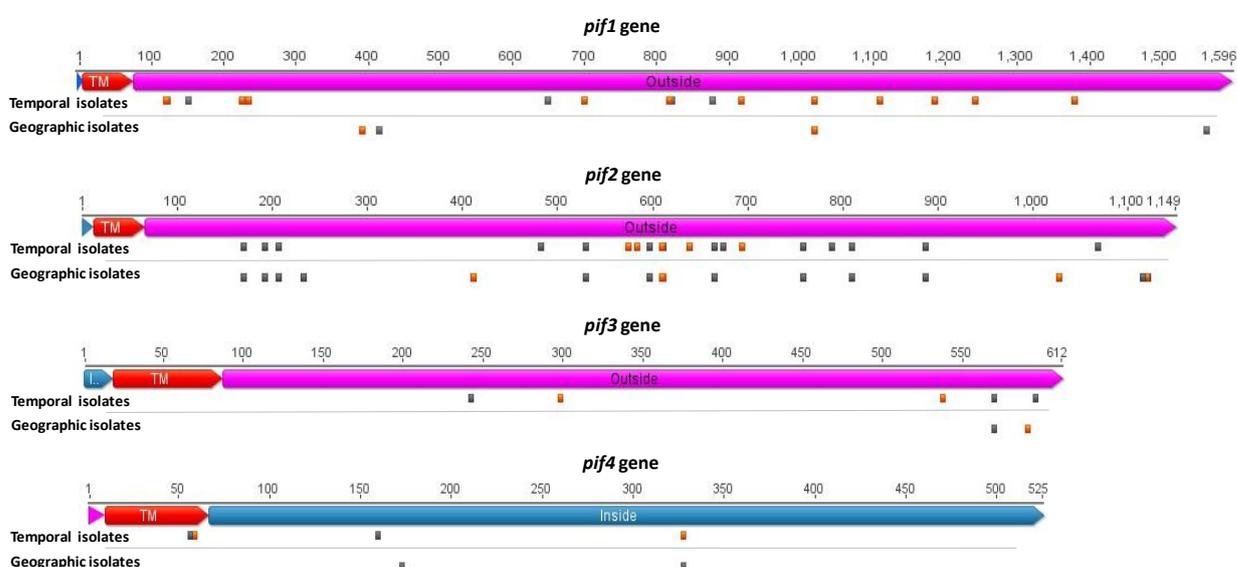


Figura 20: Distribuição da diversidade genética dos isolados de AgMNPV ao longo da sequência dos genes *pif*. Em cinza SNPs sinônimos e em laranja SNPs não sinônimos. Os domínios transmembrana de cada proteína PIF estão ilustrados pela seta vermelha. As regiões que se localizam para fora (setas rosa) e para dentro (setas azuis) da membrana ODV também estão ilustradas. A predição desses domínios foi realizada utilizando o programa TMHMM (v 2.0).

Observou-se que embora o gene *pif2* tenha uma maior quantidade de polimorfismos, a maioria não causou alterações na natureza dos aminoácidos. A diversidade nucleotídica,  $Pi$  ( $\pi$ ), também foi avaliada através do programa DnaSP. O valor de  $Pi$  refere-se ao número de substituições nucleotídicas por sítio. Para essa análise, o conjunto de sequências consenso referentes a cada gene *pif* foi avaliada. A

Figura 21 mostra que o gene *pif2* foi o que obteve uma diversidade nucleotídica maior em relação aos outros genes.

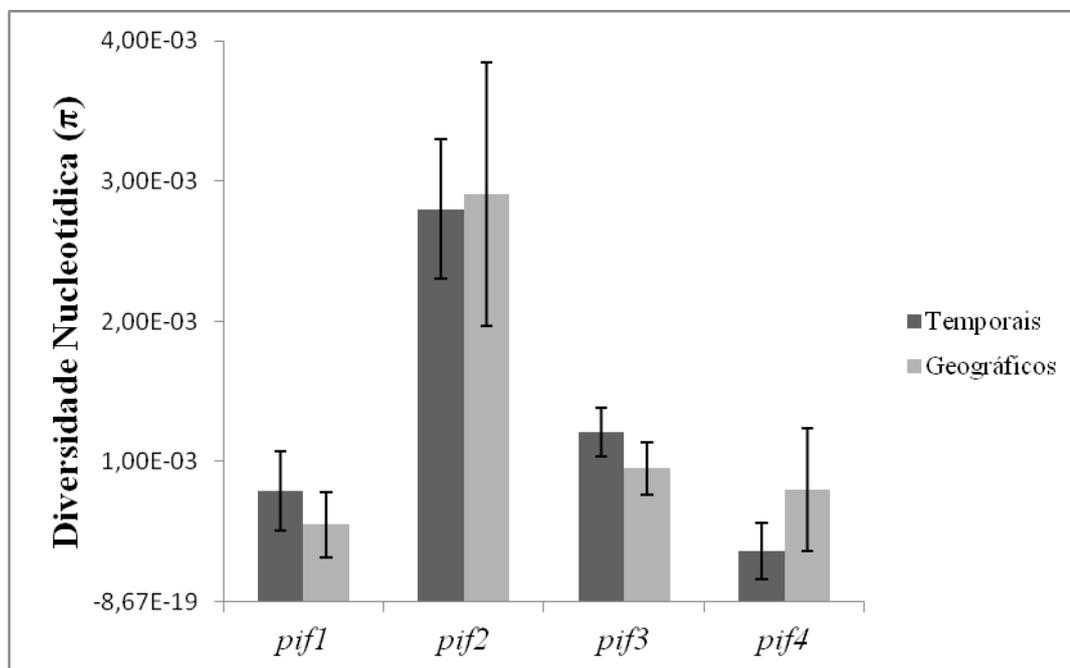


Figura 21: Análise da diversidade nucleotídica,  $\pi$ , dos genes *pif* dos isolados temporais e geográficos.  $\pi$  é a média do número de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências (representada pelas barras grossas cinza-escura para os temporais e claras para os geográficos) e sua Variância amostral. A Variância por sítio nucleotídico é calculada através da razão entre a variância por sequência de DNA/ $m^2$ , onde  $m$  é o número total de nucleotídeos total da sequência de DNA estudada. As barras pretas indicam o Desvio Padrão (ou Erro Padrão) que é obtido através da raiz quadrada da Variância. Esses cálculos e valores foram obtidos utilizando o programa DnaSP 5.10 (Librado e Rozas, 2009)

Embora o gene *pif2* tenha se destacado por apresentar maior variação, essas não representam nem mais de 2% da sequência como foi avaliado no estudo de diversidade nucleotídica e é pequena quando compara-se a quantidade de sítios polimórficos encontrados no gene *pif2* de outras espécies de baculovírus. Um estudo recente feito com *Pseudoplusia includens* SNPV (Craveiro *et al.*, 2013) encontrou 158 polimorfismos no gene *pif2* de sete isolados geográficos de diferentes localidades no Brasil e na Guatemala. Simón *et al* (2011) mostrou que o gene *pif3* e *odv-e66a* estão em seleção positiva em populações de campo de *Spodoptera frugiperda* MNPV.

Yang (2001) relata que as substituições nucleotídicas não sinônimas em genes de NPV podem levar a mudanças na atividade proteica facilitando a adaptação a novas espécies hospedeiras, ou serem responsáveis por superar as defesas do hospedeiro. Como as mutações não sinônimas podem ou não conferir uma vantagem evolutiva, espera-se uma taxa de fixação maior na população em relação às sinônimas que geralmente são invisíveis para a seleção natural. Esses SNP encontrados nas sequências dos genes *pif* analisados mostram a distribuição da diversidade ao longo de cada gene, sendo que os genes *pif2* e *pif4* são claramente mais e menos variáveis, respectivamente.

Baseando-se em outros estudos onde foi encontrado uma alta diversidade em populações de campo (Graham *et al.*, 2004; Cory *et al.*, 2005; Eberle *et al.*, 2009; Espinel-Correal *et al.*, 2010; Clavijo *et al.*, 2010; Baillie e Bower, 2011; Rowley *et al.*, 2011), esperava-se encontrar resultados semelhantes. Porém a população de AgMNPV estudada revelou uma alta estabilidade genética mantida nos seus genes *pif*, os quais são significantes para a preservação do vírus no campo, durante 20 anos de aplicação do vírus. Tendo em vista que o baculovírus anticarsia é usado para o controle de pragas no campo, a manutenção de sua estabilidade em relação à conservação de características funcionais como a virulência é extremamente importante para sua consolidação como agente de controle biológico.

### 3.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PIF DE AGMNPV

Dada a importância desses fatores de infectividade, visou-se expressar as proteínas PIF-2 e PIF-4, bem como purificá-las para construção de anticorpos policlonais. Para expressão das proteínas, os genes *pif-2* e *pif-4* foram amplificados com os oligos contendo os sítios de recombinação *attB* como mostra a Figura 22.

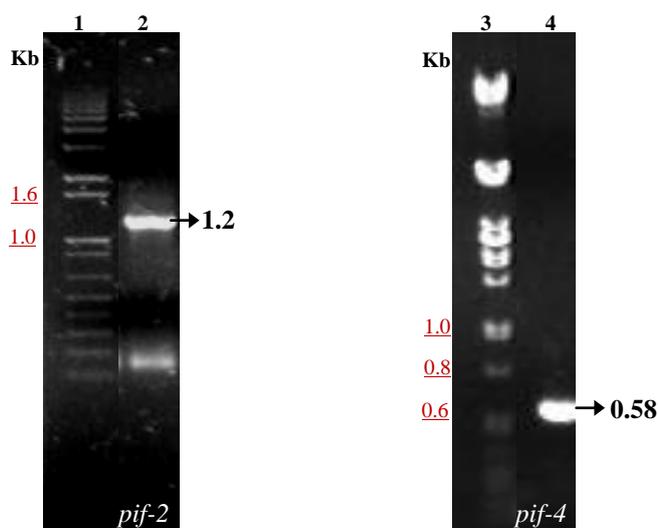


Figura 22: Amplificação dos genes *pif-2* e *pif-4* com sítios de recombinação *attB* utilizando a técnica de PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) Marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); (2) fragmento *attB*-*pif2*; (3) fragmento *attB*-*pif4* (4) Marcador DNA fago  $\lambda$ /PstI.

Foram amplificados fragmentos de tamanho esperado (1.2Kb para *pif-2* e 0,58Kb para *pif-4*) e estes, após serem purificados do gel, foram utilizados na reação de recombinação BP com o vetor doador pDONR e a enzima BP clonase. Após obtenção dos clones, esses foram submetidos a extração de DNA e a confirmação foi realizada por clivagem com as enzimas de restrição *NsiI* para *pif-2* e *EcoRI* e *BglIII* para *pif-4*, como mostra a Figura 23.

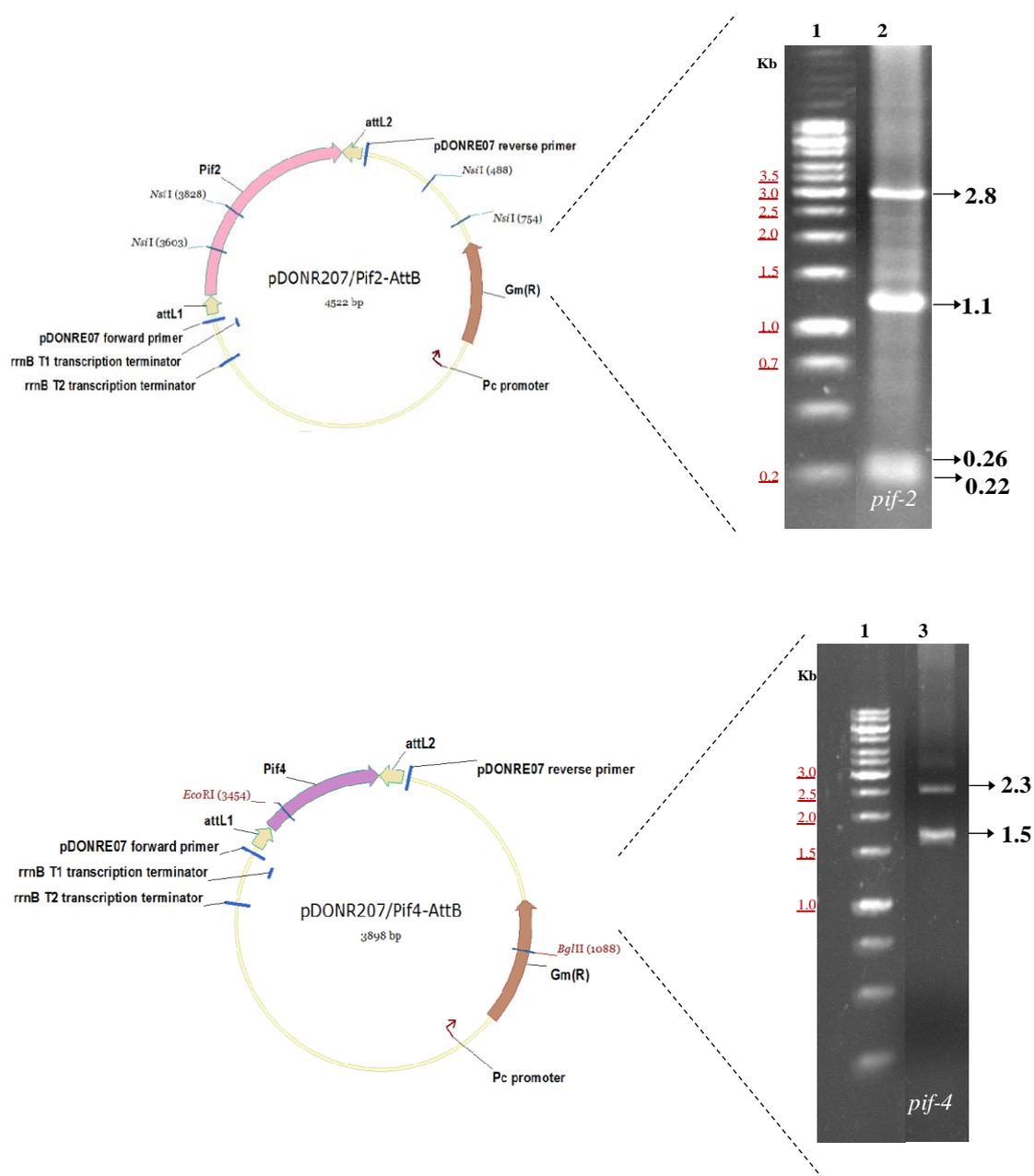


Figura 23: Confirmação por clivagem com enzimas de restrição dos vetores de doação (pDONR) dos genes *pif-2* e *pif-4*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) Marcador GeneRuler 1Kb DNA ladder (Fermentas); (2) DNA do vetor pDOPif2 digerido com a enzima *NsiI*; (3) DNA do vetor pDOPif4 digerido com as enzimas *EcoRI* e *BglIII*.

Após confirmação dos vetores de doação, foi realizada a reação de recombinação LR com o vetor de destino pDEST e a enzima LR clonase. Clones foram obtidos e a confirmação foi feita por clivagem com as enzimas de restrição *HindIII* (*pif-*

2) e *EcoRI* (*pif-4*) como observado na Figura 24. Os vetores pDEST também foram confirmados por sequenciamento.

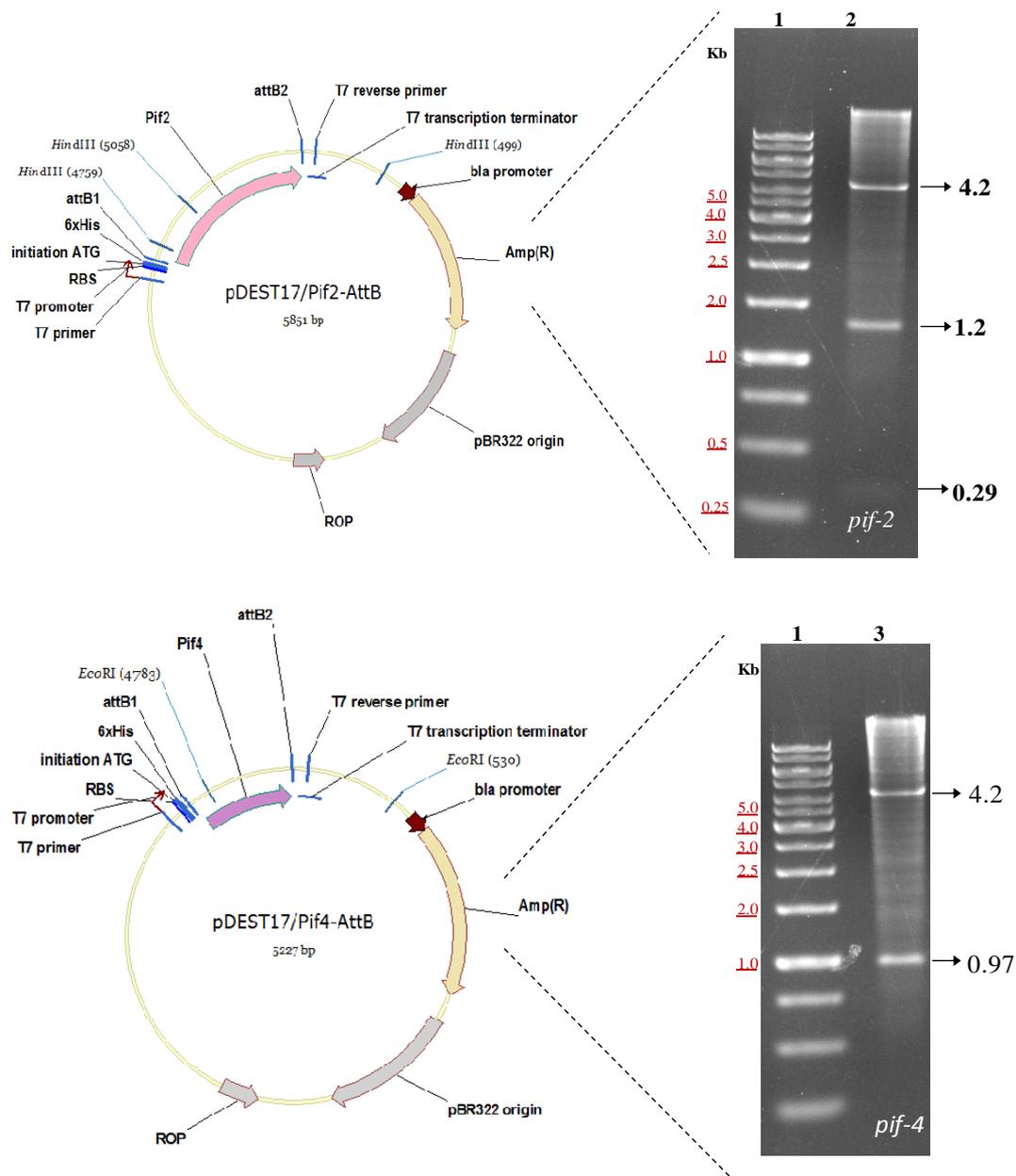


Figura 24: Confirmação por clivagem com enzimas de restrição dos vetores de destino (pDEST) dos genes *pif*. Eletroforese em gel 0,8%. Amostras: (1) Marcador GeneRuler 1Kb DNA ladder (Fermentas); (2) DNA do vetor pDEpif2 digerido com a enzima *HindIII*; (3) DNA do vetor pDEpif4 digerido com a enzima *EcoRI*.

Após confirmação, esses plasmídeos foram utilizados para os ensaios de indução utilizando a linhagem celular bacteriana BL-21AI. As proteínas PIF estão localizadas no

---

envelope da partícula ODV e estão envolvidas no processo de fusão e entrada do vírus na célula hospedeira (Haas-Stapleton *et al.*, 2004; Ohkawa *et al.*, 2005). Como a maioria das proteínas de membrana, as PIF possuem regiões transmembrana para ancoramento. A superexpressão de proteínas de membrana resulta em baixa produção devido a sua natureza insolúvel, com formação de corpos de inclusão (agregados insolúveis de proteínas sem atividade biológica). Além disso, essas inclusões costumam ser tóxicas para as células bacterianas e por esses motivos, cada proteína necessita de ajustes no protocolo para obter sucesso durante a expressão (GE Healthcare Handbook). A indução da expressão de PIF-2 e PIF-4 foi feita durante duas horas para que não houvesse uma possível degradação das proteínas. Foi adicionado um agente repressor em baixa concentração (Glicose 0,1%) para diminuir a expressão basal do promotor T7 RNA polimerase como especificado pelo fabricante.

As proteínas induzidas foram submetidas a análise por *Western Blotting* utilizando anticorpo contra cauda de histidina (anti-HIS) como mostra a Figura 25. As proteínas PIF-2 e PIF4 foram observadas quando analisadas mediante indução e repressão do promotor T7, por um aparecimento de uma banda de tamanho esperado (46 kDa e 22 kDa, respectivamente) na amostra induzida e ausência destas bandas na amostra reprimida. A detecção por *Western blotting* confirmou que o perfil observado corresponde a expressão dessas proteínas.

Devido a insolubilidade das proteínas, foram realizadas purificações sob condições desnaturantes. Somente a proteína PIF2 foi purificada (Figura 26), uma vez que utilizando o mesmo procedimento não foi identificada a banda correspondente à proteína PIF4.

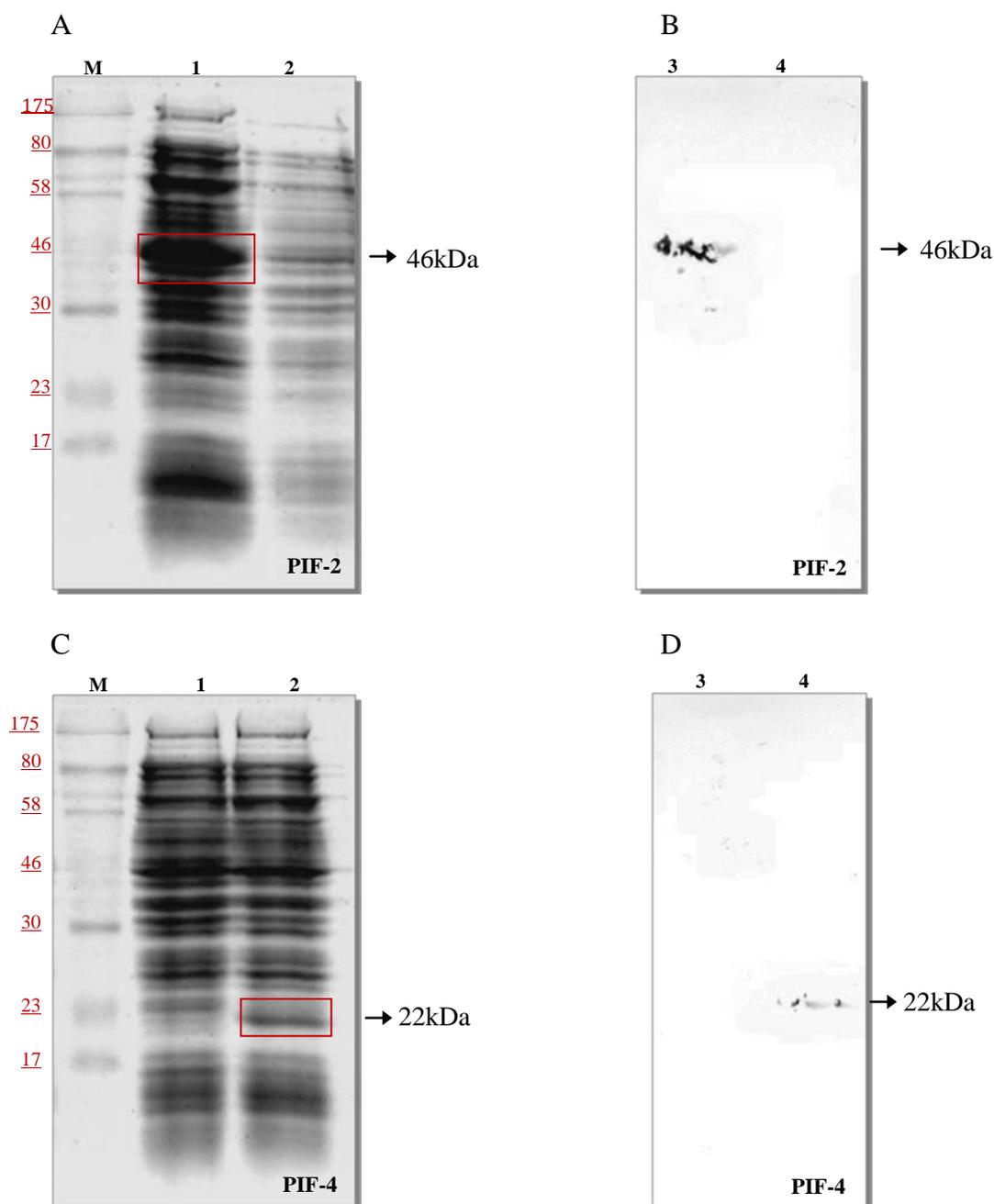


Figura 25: Análise e detecção das proteínas PIF-2 e PIF-4 de AgMNPV por *Western blotting* com anti-HIS, após ensaios de indução com L-arabinose (0,2%) e repressão com Glicose (0,2%) em células BL-21AI. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12% (A e C) e *Western-blotting* (B e D). As fotos A e B mostram as amostras da expressão e purificação da proteína PIF-2, respectivamente: (M) Marcador Color Prestained Protein Marker (NEB); (1) Células induzidas; (2) Células reprimidas. Detecção da proteína PIF-2 nas amostras induzida (3) e reprimida (4) usando antissoro anti cauda de histidina. As fotos C e D mostram as amostras da expressão e purificação da proteína PIF-4, respectivamente: (M) Marcador Color Prestained Protein Marker (NEB); (1) Células reprimidas; (2) Células induzidas. Detecção da proteína PIF-4 na amostra reprimida (3) e induzida (4) usando antissoro anti cauda de histidina.

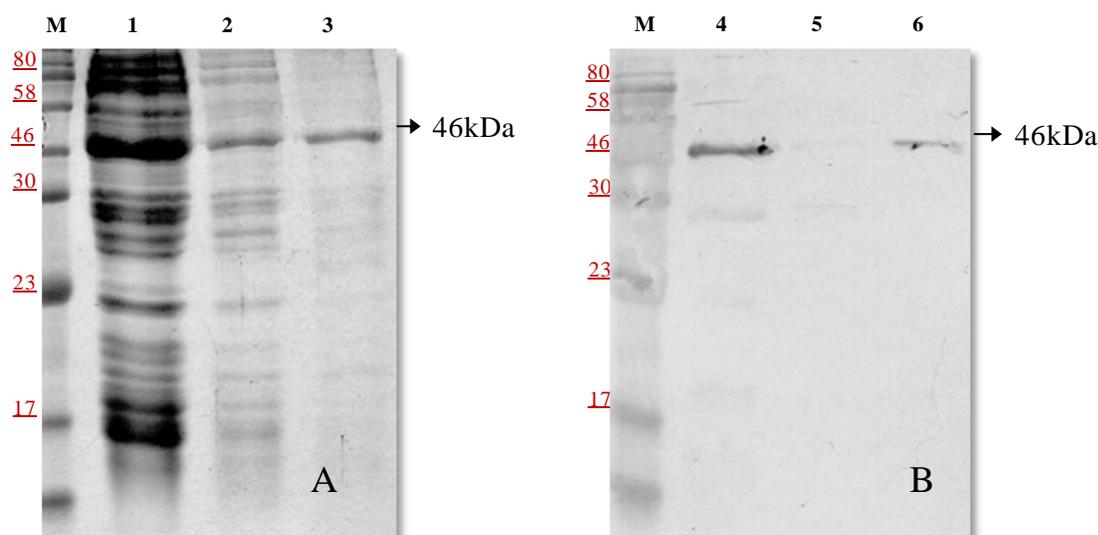


Figura 26: Detecção da proteína PIF-2 de AgMNPV por SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) após purificação por cromatografia de afinidade, sob condições desnaturantes. Células BL-21AI foram induzidas e submetidas às etapas de lise (1 e 4); lavagem da coluna (2 e 5) e eluição da proteína (3 e 6). (M) Marcador Color Prestained Protein Marker (NEB). Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%.

Após a purificação, foram realizados os ensaios de imunização nos camundongos. O antissoro coletado foi testado através da técnica de *Western blotting* utilizando extratos celulares de BL-21AI induzidas e reprimidas, e células de inseto Tn5B1-4 infectadas e não infectadas com o vírus Ag-2D. Na Figura 27 nota-se que não houve marcação da proteína PIF2 além de ter muita marcação inespecífica.

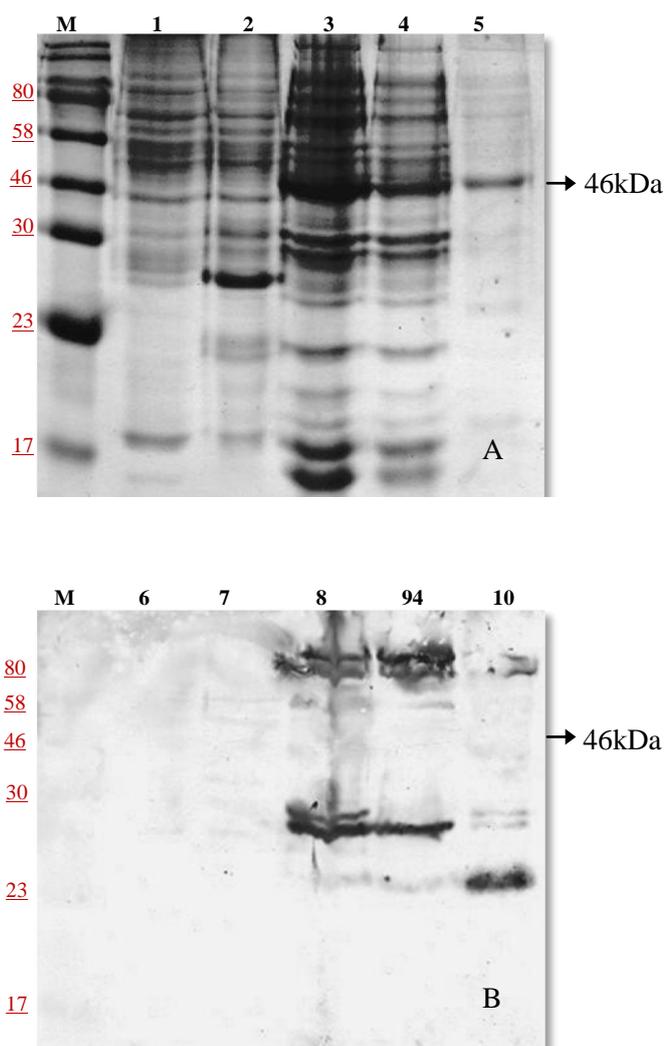


Figura 27: Análise por SDS-PAGE (A) e *Western blotting* (B) do antissoro anti-PIF2 de AgMNPV. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12%. Amostras: (M) Marcador Color Prestained Protein Marker (NEB); (1 e 6) Extrato de células Tn5B1-4; (2 e 7) Células Tn5B1-4 infectadas 48 hp.i. com Ag-2D; (3 e 8) Extrato de células BL-21AI induzidas; (4 e 9) Extrato de células BL-21AI reprimidas; (5 e 10) Proteínas PIF2 purificada.

Não se sabe a razão do antissoro anti-PIF2 não ter sido específico para a proteína (Figura 27). Pode-se inferir talvez que essa proteína tenha apresentado uma baixa antigenicidade em relação às outras proteínas contaminantes da bactéria que foram purificadas juntas, mas em baixa concentração. Outra possibilidade é que pode ter havido falhas durante o processo de diálise da proteína PIF2 levando a degradação da mesma e sua ineficácia durante a imunização dos camundongos.

---

### 3.3. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS PARA DELEÇÃO DOS GENES *PIF*

Além da expressão das proteínas PIF visou-se também a construção de vetores para obtenção de vírus de AgMNPV com os genes *pif* interrompidos/deletados para análises funcionais de cada gene. A estratégia de construção de baculovírus recombinantes com deleção de genes de interesse é amplamente utilizada nos estudos de função e caracterização de genes. Foram utilizadas duas estratégias, sendo a primeira visando somente a interrupção dos genes *pif* e a segunda a deleção total dos mesmos.

Os genes *pif* têm sido cada vez mais caracterizados e estudos de função têm sido feitos através da deleção desses genes. Song e colaboradores (2011) realizaram recentemente estudos com o gene *pif-3* do vírus *Helicoverpa armigera* NPV (HearNPV). Relataram que na região C-terminal há cisteínas conservadas envolvidas na formação de pontes de sulfeto e deleções nessa região ocasiona uma diminuição na infectividade oral do vírus. Ainda com esse mesmo vírus, Huang e colaboradores (2012) identificaram a ORF 85 como codificadora do gene *pif-4* através da construção de um vírus recombinante deletado com esse gene. Estudos com os genes *pif* são importantes para o melhor entendimento do processo de infecção oral essencial para o vírus.

Primeiramente foi empregada uma estratégia para interrupção dos gene *pif* que consistiu em inserir o cassete gênico *hsp70/egfp* no meio do gene. Essa estratégia foi usada com sucesso no trabalho de dissertação de mestrado (Ferreira, 2008) para construção do recombinante vAg $\Delta$ *pif-1*, o qual que possui o gene *pif-1* inativado. No presente trabalho a mesma metodologia foi utilizada para interrupção dos genes *pif-2*, *pif-3* e *pif-4*.

Para confirmação da inserção do gene *egfp* no locus do gene *pif-1* do vírus recombinante, foram feitas PCR para amplificação de ambos os genes com diferentes combinações com os oligonucleotídeos de *pif-1* e *egfp*. Como esperado, houve

amplificação apenas nas amostras contendo DNA molde do vírus recombinante vAg $\Delta$ pif-1 (Figura 28) indicando que o cassete *hsp70egfp* foi recombinado no locus do gene *pif-1* do vírus AgMNPV-2D.

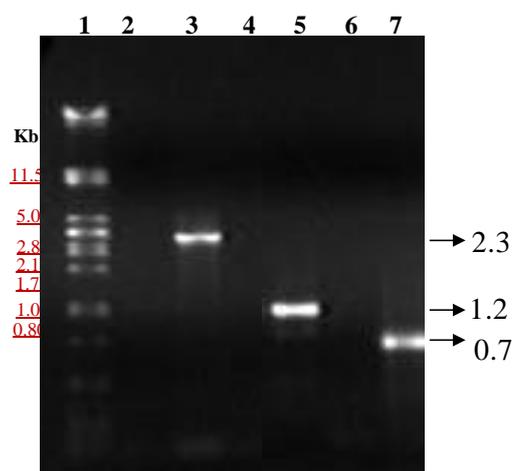


Figura 28: Detecção do gene *egfp* no locus de *pif-1* utilizando a técnica de PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. (1) marcador DNA fago  $\lambda$ /*Pst*I. Reações utilizando (2) DNA Ag-2D e (3) DNA de vAg $\Delta$ pif-1 com os oligonucleotídeos pif-1 F e egfpR; (4) DNA de Ag2D e (5) DNA de vAg $\Delta$ pif-1 com egfp F e pif-1 R; (6) DNA de Ag2D e (7) DNA de vAg $\Delta$ pif-1 com egfp F e egfpR.

Na Figura 28 pode-se notar que há amplificação somente nos poços 3, 5 e 7 cujo DNA é o do recombinante, tendo sido utilizados oligonucleotídeos específicos para o cassete *hsp70/egfp*. No poço 3 (reação com os oligonucleotídeos pif-1F e egfpRv) foi amplificado um fragmento de 2.3kb que abrange a região a montante do gene *pif-1* com o promotor *hsp70* e início do gene *egfp*. Na segunda reação (poço 5) o fragmento amplificado foi de cerca de 1.2kb onde os oligonucleotídeos abrangem o final do gene *egfp* a região a jusante do gene *pif-1*. Já na última reação (poço 7) foi amplificado um fragmento de cerca de 0.7kb correspondente ao tamanho esperado para o gene *egfp*.

Visando a purificação do recombinante vAg $\Delta$ pif-1, para obtenção de uma população totalmente homogênea desse vírus, novos ciclos de diluições seriadas em cultura de células foram realizados. No entanto pode-se notar, por visualização por

---

microscopia de fluorescência, que algumas células infectadas apresentaram poliedros sem a presença da proteína EGFP (dado não apresentado). Esse resultado é um indicativo de que o recombinante ainda precisa passar por mais etapas de diluição para ser considerado puro.

Durante as etapas de construção dos plasmídeos com os genes *pif-2*, *pif-3* e *pif-4* foram surgindo vários fatores limitantes. Para o gene *pif-2* não houve amplificação do fragmento relativo a região à montante desse gene. Várias amplificações por PCR foram feitas modificando a temperatura de anelamento para otimização da ligação do oligonucleotídeo, porém não houve amplificação dessa região. Outro oligonucleotídeo então foi desenhado para tentar amplificar essa região, e foram realizadas várias reações de PCR com gradiente de temperatura, porém não houve nenhuma amplificação.

No caso do gene *pif-3*, foi construído com sucesso o vetor para interrupção desse gene, denominado pGegfp<sub>pif3</sub>. Este vetor foi utilizado para realização dos ensaios de co-transfecção com DNA genômico de AgMNPV-2D em células de inseto Tn-5B14. As células apresentaram sinais de infecção e formação de poliedros após 5 dias de infecção, porém não houve visualização de fluorescência correspondente a expressão do gene *egfp*. Em relação ao gene *pif-4*, não foi obtido sucesso na amplificação das regiões homólogas por *overlap* PCR, portanto foram realizados vários passos de clonagem para construção do vetor para recombinação homóloga.

Diante a esses fatores que travaram a continuidade do trabalho, esse processo foi abandonado dando lugar a uma segunda estratégia que consistiu na deleção total dos genes *pif* e que apresentava um número menor de etapas de clonagem. Esse procedimento foi realizado para todos os genes incluindo o *pif-1*, uma vez que o vírus recombinante desse gene havia sido construído utilizando-se a estratégia anterior.

Dessa forma, foram construídos vetores contendo somente as regiões flangeadoras aos genes *pif* e a sequência referente ao plasmídeo pGEM (*pif-1Del*: 4951pb; *pif-2Del*: 5894pb; *pif-3Del*: 5281pb; *pif-4Del*: 5642pb). Esses vetores foram confirmados por clivagem com enzimas de restrição como mostra a Figura 29. Eles apresentam os fragmentos de DNA com tamanho esperado: *pif-1Del*: 1.090pb, 2.997pb, 880pb; *pif-2Del*: 4.837pb, 1.070pb; *pif-3Del*: 4.130pb, 764pb, 410pb; *pif-2Del*: 4.360pb, 1.290pb.

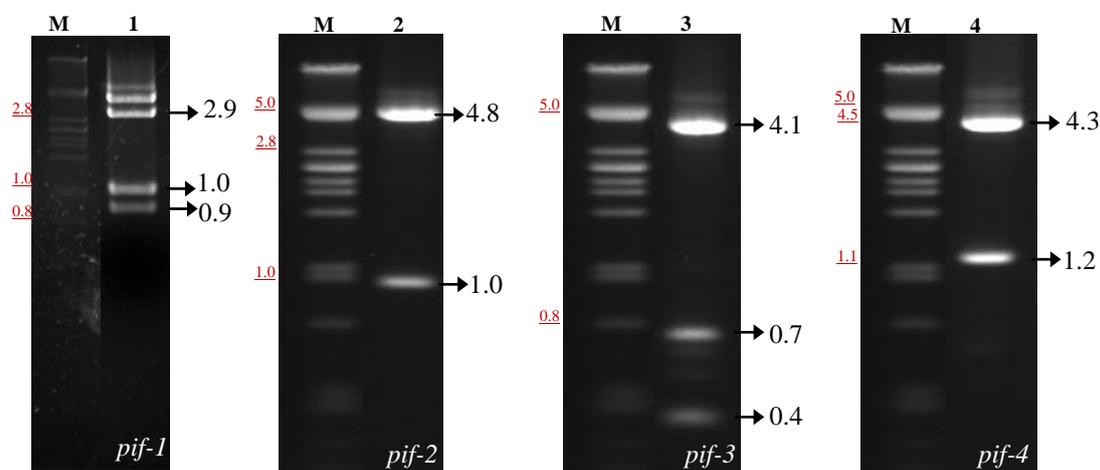


Figura 29: Clivagem com enzimas de restrição dos fragmentos para deleção dos genes *pif*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (M) Marcador DNA fago  $\lambda/PstI$ ; (1) DNA do fragmento *pif-1Del* digerido com a enzima EcoRI; (2) DNA do fragmento *pif-2Del* digerido com a enzima HindIII; (3) DNA do fragmento *pif-3Del* digerido com a enzima *SalI*; (4) DNA do fragmento *pif-4Del* digerido com a enzima *PstI*. Os fragmentos resultantes da digestão estão indicados por uma seta seguido do seu tamanho em pkb.

Essa estratégia permitiu a construção de vetores contendo as regiões homólogas a cada um dos genes *pif* estudados. Estes plasmídeos encontram-se disponíveis no laboratório de Microscopia Eletrônica (UnB).

## **CAPÍTULO II:**

### **Análise das sequências genômicas de dois clones de *Anticarsia gemmatalis* MNPV**

---

# INTRODUÇÃO

## 1. GENOMA DE BACULOVÍRUS

Análises das sequências genômicas de diferentes baculovírus têm revelado a grande diversidade gênica intra- e interespecífica (Chen *et al.*, 2002). Cerca de 600 baculovírus pertencentes às ordens Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera já foram descritos, sendo que 90% foram descritos de 34 famílias diferentes de insetos da ordem Lepidoptera. Considerando a diversidade de espécies de lepidópteros (só no Brasil, estima-se que existam mais de 80 mil espécies), pode-se sugerir que há milhares de espécies distintas de baculovírus na natureza (Lange *et al.*, 2004; Rafael *et al.*, 2012).

Atualmente 59 genomas completos de baculovírus já foram depositados no Genbank, sendo 41 sequências pertencentes ao gênero *Alphabaculovirus*, 14 ao *Betabaculovirus*, três ao *Gammabaculovirus* e um ao *Deltabaculovirus*. O maior genoma até agora relatado é o de *Xestia c-nigrum Granulovirus* (178.733pb) e o menor é o de *Neodiprion lecontei Nucleopolyhedrovirus* (86462pb). Entre os *Alphabaculovirus*, o maior genoma pertence a *Leucania separata* NPV (168.041pb) e *Adoxophyes orana* NPV (111.724pb) foi o menor genoma até agora sequenciado.

A comparação entre sequências genômicas de todos os baculovírus tem sido fonte de identificação de um conjunto comum de genes, os *core* genes (Tabela 13). Esses genes virais parecem ser fatores chaves para funções biológicas essenciais como replicação, transcrição de genes tardios, produção de proteínas estruturais, entrada do vírus na célula e estabelecimento da infecção no hospedeiro (Hayakawa *et al.*, 2000; van Oers e Vlack, 2007; McCarthy e Theilmann, 2008; Miele *et al.*, 2011).

Tabela 13: Relação dos *core genes* dos baculovírus *Autographa californica* MNPV e *Anticarsia gemmatalis* MNPV. Tabela adaptada de Miele *et al*, 2011.

<b>Genes envolvidos na:</b>	<b>Número da ORF de AcMNPV</b>	<b>Número da ORF de AgMNPV</b>
<b>Replicação</b>		
<i>lef-1</i>	14	19
<i>lef-2</i>	6	3
<i>DNA pol</i>	65	65
<i>helicase</i>	95	92
<b>Transcrição</b>		
<i>lef-4</i>	90	87
<i>lef-8</i>	50	51
<i>lef-9</i>	62	62
<i>p47</i>	40	44
<i>lef-5</i>	99	95
<b>Empacotamento, montagem e liberação</b>		
<i>p6.9</i>	100	96
<i>vp39</i>	89	86
<i>vlf-1</i>	77	76
<i>alk-exo</i>	133	129
<i>vp1054</i>	54	55
<i>vp91/p95</i>	83	82
<i>gp41</i>	80	79
<i>38k</i>	98	94
<i>p33</i>	92	89
<i>odv-ec43</i>	109	107
<i>p49</i>	142	138
<i>odv-nc42</i>	68	68
<i>odv-e18</i>	143	139
<i>desmoplakin</i>	66	66
<b>Interação com proteínas do hospedeiro</b>		
<i>odv-e27</i>	144	140
<i>ac81</i>	81	80
<b>Infectividade oral</b>		
<i>pif0/p74</i>	138	134
<i>pif1</i>	119	117
<i>pif2</i>	22	12
<i>pif3</i>	115	114
<i>pif4</i>	96	93
<i>pif5/odv-e56</i>	148	144

A caracterização do padrão e organização do conteúdo gênico pode ser útil para estabelecer relações evolutivas entre os membros da família *Baculoviridae*. A alta variabilidade observada no número de sequências codificantes torna-se um fator chave

---

de vírus de grandes genomas de DNA que infectam células eucarióticas (Herniou *et al.*, 2001).

## **2. GENOMA DE AGMNPV: CONTEÚDO GÊNICO E FUNÇÃO**

Oliveira *et al.* (2006) relataram a sequência completa do baculovírus AgMNPV baseando-se no DNA do clone viral AgMNPV-2D (número de acesso no Genbank NC\_008520). O genoma possui um total de 132.239 Kpb contendo 152 ORF ( $\geq 50$  aminoácidos). Cerca de 53% dessas ORF (81 delas) estão no sentido horário e 47% no sentido anti-horário. O genoma de AgMNPV possui uma alta identidade ao do baculovírus defeutivo *Choristoneura fumiferana* DEF NPV, embora esse último possua os genes auxiliares quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*) que atuam no processo de melanização e liquefação dos tecidos do inseto hospedeiro e que estão ausentes no genoma de AgMNPV.

### **2.1. GENES QUE CODIFICAM PROTEÍNAS ESTRUTURAIS**

O genoma dos baculovírus possuem muitos genes que codificam proteínas responsáveis pela estrutura dos nucleocapsídeos e dos corpos de oclusão (OB) (Braunagel *et al.*, 2003; Perera *et al.* 2007; Deng *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010), como também codificam produtos responsáveis pela montagem das novas partículas virais embora não façam parte delas (Funk *et al.*, 1997). Entre esses genes destacam-se o gene *p6.9* cujo produto interage com o DNA para realizar sua condensação (Kelly *et al.*, 1983), o gene *gp64* responsável pela produção da principal proteína da partícula BV que auxilia a entrada na célula hospedeira, e genes associados aos nucleocapsídeos e encontrados em ambas as partículas BV e ODV como o *gp41*, *38k*, *p49* e *odv-ec27*.

No baculovírus anticarsia, 24 ORF codificam proteínas estruturais dentre elas destaca-se a proteína básica P6.9, cujo gene é o mais conservado, mesmo quando comparado ao da poliedrina, cerca de 90% de similaridade entre os NPV do grupo I. Em contraste, o gene 1629 foi, entre os genes estruturais, o menos conservado (Oliveira *et al.*, 2006).

## **2.2. GENES ENVOLVIDOS NA REPLICAÇÃO E TRANSCRIÇÃO VIRAL**

Muitos fatores virais são responsáveis ou estão envolvidos na ativação dos processos de replicação e transcrição virais. O gene *ie-1* é um exemplo de transativador de promotores precoces e tardios (*early*, *late* e *very late*) e participa também da regulação negativa de alguns genes (Guarino e Summers, 1986; Leisy, 1997). Outro transativador é o gene *ie-2*, cujo produto é responsável por aumentar a expressão de alguns desses promotores (Carson *et al.*, 1991; Passareli *et al.*, 1993; Yoo *et al.*, 1994). A proteína IE-2 está envolvida com a replicação do DNA viral, uma vez que foi localizada em sítios funcionais de replicação de DNA no núcleo celular (Mainz *et al.*, 2002). Com função semelhante ao gene *ie-2*, o gene *pe38* também é responsável por aumentar a expressão de alguns promotores virais durante o processo de replicação (Ahrens e Rohrmann, 1997).

Alguns genes que também foram relatados participando da replicação são: *DNA pol*, *helicase*, *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *p35*, *pe38*, *me53*, *lef-7* e *lef-11* (Mikhailov *et al.*, 1998; Rhormann, 2011). No genoma do AgMNPV-2D, esses genes estão todos presentes, porém o gene *pe38* encontra-se dividido em duas ORF.

---

### **2.3. GENES BRO (BACULOVIRUS REPEATED ORF)**

Esses genes possuem uma ampla distribuição nos *Alpha-* e *Betabaculovirus*, mas estão ausentes nos genomas de *Gammabaculovirus* (Rhormann, 2011). Constituem uma família multigênica dispersa ao longo do genoma podendo influenciar na diversidade genômica por apresentarem estrutura propensa a recombinação entre genomas e causar heterogeneidade entre genótipos (Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). A quantidade desses genes varia de acordo com a espécie viral. Estão ausentes nos vírus *Plutella xylostella* GV (Hashimoto *et al.*, 2000), *Anagrapha falcifera* MNPV (Federici e Hice, 1997) e *Rachiplusia ou* MNPV (Harrison e Bonning, 1999). Em AcMNPV há somente um gene *bro* (*ac2*), enquanto que em AgMNPV foram relatados oito genes *bro* (*bro-a – bro-h*) e em LdMNPV possui 16 desses genes (Kuzio *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2006).

Estudos feitos em BmNPV (Kang *et al.*, 1999) identificaram que a expressão desses genes ocorre entre 2 - 4h após o início da replicação viral (expressão precoce) e outros estudos com esse mesmo vírus (Zemskov *et al.*, 2000, Iyer *et al.*, 2002) constataram que as proteínas BRO-a, BRO-c e BRO-d possuem cerca de 80 resíduos de aminoácidos na porção N-terminal que se ligam não especificamente a ácido nucleico. Foi proposto então que as proteínas BRO-a e BRO-c influenciam na replicação do DNA da célula hospedeira e/ou a transcrição dele, ligando-se à molécula e regulando a estrutura da cromatina no cromossomo hospedeiro.

### **2.4. REGIÕES HR**

Regiões homólogas (*hr*) são sequências repetidas presentes ao longo do genoma da maioria dos baculovírus variando em tamanho, sequência e número de cópias entre

---

espécies (o AgMNPV, por exemplo, possui nove). São encontradas nos quatro gêneros da família *Baculoviridae*, apresentam-se como palíndromos imperfeitos e podem funcionar como origem de replicação e como *enhancers* transcricionais. As *hr* são regiões ricas em A e T quando comparadas com o restante do genoma e costumam representar por volta de 10% dele, podendo variar de espécie para espécie (Posse e Rhormann, 1997; Willis *et al.*, 2005; Berretta e Romanowski, 2008).

## **2.5. GENES AUXILIARES**

Esses genes não são essenciais para a replicação viral, porém são capazes de modular a infecção conferindo uma vantagem seletiva (O'Reilly, 1997). Como mencionado anteriormente, o AgMNPV não possui os genes auxiliares quitinase (*chiA*) e catepsina (*v-cath*), que estão presentes na maioria dos genomas de NPV de lepidópteros. O genoma de AgMNPV não possui a região referente a esses dois genes (cerca de 3000pb), comparado ao vírus CfDefMNPV, a qual estaria situada a montante ao gene *gp64* (Slack *et al.*, 2004). A ausência dos genes *chiA* e *v-cath* está associada a não liquefação da larva *Anticarsia gemmatalis* após sua morte pela infecção com esse vírus.

Outro gene auxiliar que pode ser mencionado como exemplo é o gene *gp37*, o qual codifica uma glicoproteína que se associa a quitina e está ligada à disrupção da membrana peritrófica permitindo aos ODV alcançarem as células do intestino médio (Li *et al.*, 2003; Mitsuhashi *et al.*, 2007)

### 3. CLONES VIRAIS DE AGMNPV

Em um estudo anterior, visando a prospecção de genes *pif* em população de AgMNPV, foi feita a seleção de clones (Ferreira, 2008) a partir do isolado natural obtido no campo em 1979 (Ag-79), cedido pelo Dr. Flávio Moscardi (Embrapa Soja, Londrina – PR). Ao todo doze genótipos virais foram obtidos pela técnica de diluição seriada. Além destes, foram analisados quatro clones virais, também derivados do isolado Ag-79 que foram purificados pela técnica de *plaque assay* (Maruniak *et al*, 1999) Desses dezesseis genótipos, oito foram escolhidos aleatoriamente para realização de testes de virulência com larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Nos bioensaios foi também utilizado o vírus Ag-2D como vírus de referência. Dois clones (Ag-01, isolado por diluição seriada e Ag16, isolado por *plaque assay*) se distinguiram por apresentarem grande variação nos parametros de virulência. Enquanto o Ag01 foi altamente virulento (CL<sub>50</sub> de 75OB/mL), o Ag16 apresentou baixa virulência (CL<sub>50</sub> de 1301OB/mL), sendo que o vírus protótipo (Ag-2D) apresentou valor intermediário (CL<sub>50</sub> de 616OB/mL).

## OBJETIVOS

A diversidade de isolados virais de campo tem sido discutida ao longo do trabalho. No capítulo I foi analisada a variabilidade de genes *pif* do vírus AgMNPV. Esses genes se apresentam geneticamente estáveis e são essenciais para a infectividade oral do inseto. Neste trabalho foram desenvolvidos estudos para avaliar fatores que poderiam estar relacionados a virulência do patógeno. Foram utilizados dois clones derivados do isolado Ag-79 e que apresentaram variação no seu grau de virulência ao inseto hospedeiro. Esse trabalho teve como principal objetivo sequenciar o genoma completo destes clones para elucidar os possíveis fatores responsáveis pela diferença na patogenicidade desses genótipos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar o genoma de dois clones virais de AgMNPV com diferentes graus de virulência ao inseto hospedeiro.
- Fazer análise comparativa dos genomas dos dois clones virais com o protótipo AgMNPV-2D.
- Com base nas sequências obtidas, analisar os possíveis fatores relacionados à diferença de virulência observada nos clones.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. VÍRUS UTILIZADOS E EXTRAÇÃO DE DNA**

Foram utilizados os clones virais AgMNPV-01 e AgMNPV-16, derivados do vírus natural isolado em 1979 na região de Londrina (Ag-79). Para realização do sequenciamento do genoma completo desses vírus, o DNA genômico dos poliedros foi extraído como já relatado no capítulo 1 (item 1.2). A quantificação foi feita através do espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 (220nm – 750nm).

### **2. SEQUENCIAMENTO, MONTAGEM E ANÁLISE DOS GENOMAS**

Os DNA genômicos dos vírus Ag-01 e Ag-16 foram enviados para a empresa MacroGen-Inc para realização de pirosequenciamento no equipamento 454 GS-FLX/Plus (Roche) o qual possui capacidade de sequenciar até 500 milhões de pares de base podendo gerar fragmentos entre 400 e 450pb.

Essa técnica consiste na fragmentação do DNA genômico seguida da ligação de sequências adaptadoras (A e B) às extremidades dos fragmentos gerados (Figura 30). Esses adaptadores servem para anelamento dos oligonucleotídeos (A) e ligação dos fragmentos de DNA à microesferas adaptadoras (B) que são capturadas individualmente em uma mistura de água e óleo para realização da PCR em emulsão (emPCR) (Margulies *et al.*, 2005).

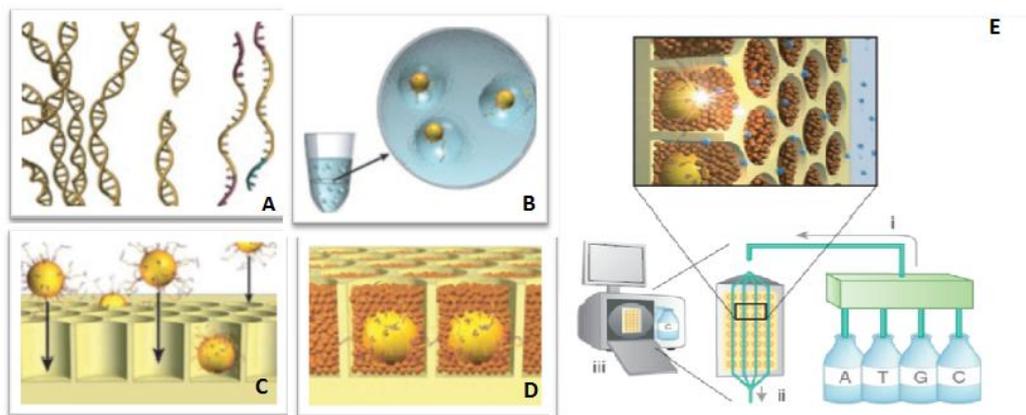


Figura 30: Ilustração do processo de pirosequenciamento 454. (A) Fragmentação do DNA genômico e ligação de sequências adaptadoras nas extremidades dos fragmentos gerados; (B) ligação dos fragmentos à microesferas magnéticas por meio de pequenas sequências complementares às adaptadoras; (C e D) captura individual das microesferas para realização da PCR em emulsão; (E) captura do sinal quimioluminescente gerado pela incorporação de nucleotídeos complementares aos da sequência alvo. (Figura adaptada de GS FLX Titanium Series Reagents, Roche Applied Science, 2008)

Na PCR em emulsão (emPCR), o óleo em solução aquosa forma micelas que capturam as microesferas e funcionam como microrreatores para produção de muitas cópias de um mesmo fragmento isoladamente (Dressman *et al.*, 2003). As reações ocorrem em poços distintos de uma placa de sílica, que alojam somente uma esfera cada. A amplificação dos fragmentos ocorre através de reações incluindo as enzimas ATP sulfúrilase e Luciferase, e os substratos Adenosina-5'-fosfossulfato e Luciferina. Durante a adição de um nucleotídeo, um grupo pirofosfato é liberado resultando na detecção de luz. Então, toda vez que há incorporação de um nucleotídeo na cadeia crescente de DNA, um pirofosfato é gerado resultando na produção de ATP levando a conversão enzimática da luciferina com emissão de fótons.

As sequências obtidas após o pirosequenciamento foram tratadas utilizando o software Geneious R6 (v. 1.6.1). O mesmo programa foi também utilizado para fazer a montagem e alinhamento dos genomas obtidos. Os genomas foram montados com base no genoma já sequenciado do clone Ag-2D e todas as ORF foram confirmadas através do alinhamento e por BLAST.

---

### 3. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA

Partículas virais (*budded virus* - BV) dos clones Ag-01, Ag-16 e Ag-2D foram utilizadas para infecção de células Tn-5BI-4 (*High five*) em cultura de acordo com O'Reilly *et al*, 1992. Para análise morfológica dos vírus, inicialmente células foram crescidas em frascos T-25 (Corning) com meio TNMFH completo a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/frasco. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e a solução viral (*Multiplicity of Infection* = 10), com o volume ajustado para 1ml para cada vírus foi adicionada. O inóculo ficou em contato com as células por uma hora com agitação leve de 10 em 10 min. Após o período de adsorção, o inóculo foi retirado e foi acrescentado meio TNMFH completo. As células foram incubadas em estufa (Stabil-Therm\_Blue M) a 27°C e fotografadas às 48h pós-infecção em microscópio ótico de inversão (Axiovert 135M – Zeiss).

Para caracterização ultraestrutural dos vírus, análise por microscopia eletrônica de transmissão foi realizada. Da mesma forma, células Tn5B1-4 infectadas com Ag-2D, Ag-01 e Ag-16 (MOI 10) foram coletadas às 48h pós-infecção. Elas foram centrifugadas a 3.000g/3min, o sobrenadante descartado e ao pellet celular foi adicionado tampão PBS, pH6,2. As amostras foram então ressuspensas em solução fixadora de cacodilato de sódio 0,1M e gluteraldeído 2,5%, transferidas em tubos de microcentrífuga e incubadas a 4°C. As amostras fixadas foram tratadas com tampão de cacodilato de sódio 0,05M, seguido pela adição de tetróxido de ósmio 1%. Após nova lavagem em tampão cacodilato de sódio, as amostras foram desidratadas sucessivamente em etanol 30%, 70%, 90% e 100%, e submetidas a uma sequência de etanol : resina de *Spurr* nas proporções 3:1, 2:1, 1:1, e por último 5ml de *Spurr* puro. Os blocos foram montados em *Spurr* contendo acelerador e mantidos a 37°C, por 72h, cortados em ultramicrotomo com navalha de diamante e montados sobre telinhas de

cobre. Finalmente, as telinhas foram contrastadas com acetato de uranila 2% por 20 minutos e fotografadas ao microscópio eletrônico de transmissão ZEISS TEM 109.

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. ANÁLISE DOS GENOMAS DOS CLONES AG-01 E AG-16

A análise do genoma de baculovírus tem se tornado uma ferramenta importante para o entendimento de sua biologia molecular e trabalhos de comparação entre genomas têm sido amplamente realizados (Qian *et al.*, 2013; Thumbi *et al.*, 2013; Yi-Peng *et al.*, 2013). Neste trabalho foi realizado o sequenciamento dos genomas completos de dois clones virais derivados do primeiro isolado do vírus AgMNPV, o Ag-79. Esses clones se distinguiram devido a grande variação de virulência observada em ensaios *in vivo* e a análise de seus genomas pôde dar uma orientação das possíveis causas para ocorrência desses fenótipos.

O resultado do pirosequenciamento gerou para o Ag-01 e Ag-16, 11.492 *reads* (tamanho variando de 25 a 871 nucleotídeos) e 13.305 *reads* (tamanho variando de 26 a 984 nucleotídeos), respectivamente. Esse número de *reads* foi gerado após a eliminação de regiões que apresentavam baixa qualidade de sequência (erro por base superior a 1%). Esses *reads* foram usados para a montagem dos genomas. Do total de *reads* gerados, 110 (Ag-01) e 106 (Ag-16) não foram alinhados com o genoma de AgMNPV. O conteúdo de A+T e G+C encontrado nos dois genomas foi de 55,5% e 44,5%, respectivamente, onde pôde ser observada uma predominância de A+T característica dos membros da família *Baculoviridae*.

---

## 2. PARTICULARIDADES DOS GENOMAS AG-01 E AG-16

Algumas particularidades foram encontradas quando os genomas dos dois clones com distintos graus de virulência foram alinhados separadamente com o genoma do protótipo Ag-2D (Oliveira *et al*, 2006). O genoma de AgMNPV-2D possui 132.239 pb composto por 152 ORFs. O clone Ag-01 possui um genoma de 131.897 pb com 150 ORFs e o clone Ag-16 tem 130.956 pb com 149 ORFs. Essa diferença no tamanho e quantidade de genes é devido a deleções encontradas ao longo dos genomas e deleções de regiões homólogas (*hr*), principalmente do clone Ag-16. A relação das deleções/inserções observadas ao longo dos genomas de Ag-01 e Ag-16 está listada na Tabela 14 onde só foram considerados os genes cujas sequências deletadas/inseridas estão acima de três pares de base.

A análise dos polimorfismos foi realizada considerando somente os SNP encontrados em regiões intragênicas e o gene *pe38* foi analisado separadamente devido ao seu alto grau de distinção entre os clones. Foram encontrados, 336 SNP no alinhamento Ag-2D x Ag-01, 900 em Ag-2D x Ag-16 e 777 em Ag-01 x Ag-16. Quando foram eliminados os polimorfismos compartilhados entre eles pôde-se observar 108 SNPs ocorridos somente no clone Ag-01 e 655 SNP em Ag-16. Dos polimorfismos exclusivos encontrados em Ag-01, 46 foram não sinônimos (alterando a sequência proteica) e 62 sinônimos e em Ag-16, 226 SNP foram não sinônimos e 429 sinônimos. A análise quantitativa desses polimorfismos está relatada na Tabela 15. As mutações pontuais encontradas em ambos os clones foi do tipo transição (79,6% para o Ag-01 e 70,7% para o Ag-16), transversão (13% para Ag-01 e 22,6% Ag-16) e substituição (7,4% para Ag-01 e 6,7% para Ag-16).

Tabela 14: Relação das deleções e inserções encontradas ao longo dos genomas dos clones virais.

Clone	Gene	ORF	Variação	Número de pares de bases
Ag01	<i>1629cap</i>	152	deleção	15
	ag 88*	88	inserção	156
	ag 64*	64	deleção	32
	<i>nuclear matrix</i>	25	deleção	3
	ag 21	21	deleção	10
	<i>pe-38</i>	148	deleção	276
Ag16			inserção	27
	<i>1629cap</i>	152	inserção	12
			inserção	3
			deleção	3
	ag 150	150	deleção	3
			inserção	3
	<i>ie-2</i>	145	inserção	3
			deleção	21
	<i>odv-e56</i>	144	inserção	6
			inserção	6
	ag 88*	88	inserção	156
			inserção	96
	ag 64*	64	deleção	32
	<i>chaB-like</i>	59	deleção	9
	<i>nuclear matrix</i>	25	deleção	3
	ag-21	21	deleção	10
	<i>arif-1</i>	13	deleção	3
			inserção	21
	<i>bro-b</i>	6	inserção	21
			deleção	21
<i>bro-a</i>	5	deleção	743	
		inserção	16	
		deleção	6	
		deleção	3	
		inserção	4	
<i>pe-38</i>	148	deleção	12	
		inserção	42	
		inserção	24	
		inserção	99	

\*: ORFs exclusivas do clone viral Ag-2D..

Tabela 15: Relação quantitativa dos polimorfismos encontrados nos genomas dos vírus Ag-01 e Ag-16.

<b>Quantidade</b>	<b>Ag-01</b>	<b>Ag-16</b>
SNP não sinônimos	46	226
SNP do tipo transição	86	463
SNP do tipo transversão	14	148
SNP do tipo substituição	8	44
Deleções	5	13
Inserções	1	16

## **2.1. GENE *PE-38***

Grandes alterações foram observadas no locus do gene *pe38*. Esse gene codifica um transativador para transcrição de genes precoces e está envolvido na replicação do DNA viral (Kool *et al*, 1994). Esse gene encontra-se em duplicata no vírus Ag-2D, com tamanho de 369pb (ORF ag148) e 630pb (ORF ag149). Já nos clones analisados, esse gene encontra-se em uma cópia única em ambos os genomas, com tamanhos de 807pb (Ag-01) e o de 1038pb (Ag-16). Essas diferenças de tamanho devem-se a ocorrência de uma deleção de 276pb no clone Ag-01 bem como pequenas deleções e inserções no clone Ag-16 (Figura 31). Portanto, as alterações encontradas nesse gene não implicam em alteração da virulência, já que os dois clones apresentaram modificações no mesmo. Devido ao alto de número de alterações encontradas neste gene o sequenciamento do mesmo, nos dois genomas virais, será repetido.

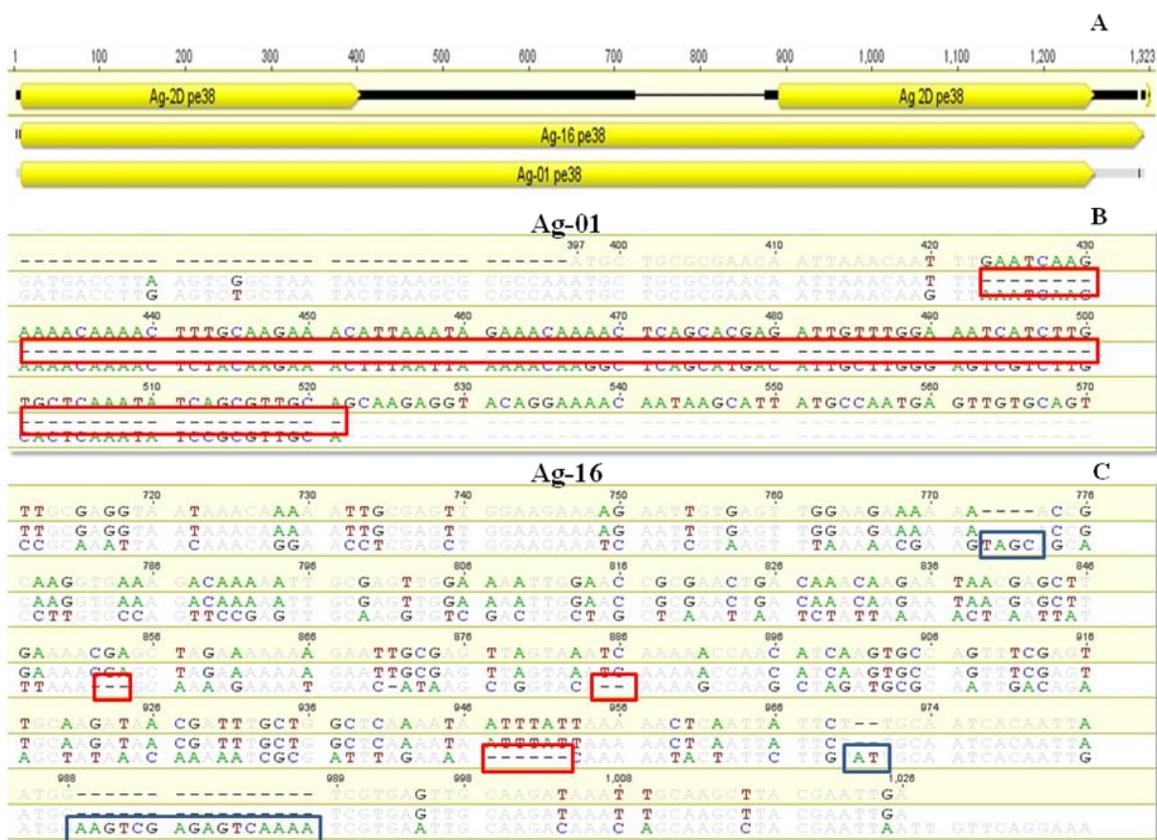


Figura 31: Alterações encontradas no gene *pe-38* dos clones Ag-01, Ag-16 e Ag-2D. (A) alinhamento das sequências nucleotídicas dos genes *pe38* dos três clones, mostrando que esse gene possui duas cópias no genoma de Ag-2D; (B) deleção de 276pb (em destaque na caixa vermelha) encontrada no *pe-38* de Ag-01; (C) pequenas deleções e inserções encontradas no *pe-38* de Ag-16. As caixas vermelhas indicam as deleções encontradas e as caixas em azul as inserções.

## 2.2. GENE *IE-2*

Outro gene de Ag-16 o qual apresentou uma grande quantidade de polimorfismos foi *ie-2* (Figura 32). Sabe-se que esse gene é um transativador de genes precoce e está ligado a replicação do DNA viral (Carson *et al.*, 1991). Ao todo foram encontrados 123 SNP (56 sinônimos e 67 não sinônimos), representando cerca de 19% dos polimorfismos exclusivos encontrados nesse clone. Além disso, foram também encontradas duas inserções de três pares de base e uma deleção de 18pb como já relatado na Tabela 14.

Considerando que o gene *ie-2*, assim como o *pe38*, estejam ausentes em muitos genomas de baculovírus (Kuzio *et al.*, 1999, Ijkel *et al.*, 1999, Hayakawa *et al.*, 1999), estudos realizados em AcMNPV e BmNPV relataram que *ie-2* está envolvido na transativação de genes precoce e expressão de genes late, enquanto que *pe38* estimula a replicação do DNA viral. Ambos os produtos desses genes estão envolvidos na replicação, podendo relacionar a redução da virulência observada em Ag-16 com o número de polimorfismos encontrados no gene *ie-2* e às alterações encontradas no gene *pe38* desse vírus. Yoo e Guarino (1994) identificaram quatro domínios ao longo da sequência proteica de IE-2 de AcMNPV, os quais são essenciais para o funcionamento dela como transativadora gênica. Posteriormente, Carstens *et al.* (2002) realizaram um estudo de identificação e caracterização molecular dos genes *ie-1*, *ie-2* e *pe38* de CfMNPV. Eles observaram que esses domínios podem variar de espécie para espécie, em número e localização ao longo da sequência de IE-2 e PE38, enquanto que em IE-1 não se observou essa variação.

Análises poderão ser realizadas para estudar o efeito das mutações encontradas e se essas afetam esses domínios de IE-2. Também poderão ser realizados experimentos para melhor esclarecer a atividade dessa proteína durante o ciclo de replicação desse clone e se ela está envolvida na redução de sua virulência. Bem como, a ação da PE38 em conjunto com IE-2 durante a replicação do DNA de Ag-16.



### 2.3. GENE *HE-65*

O gene *he65* (ORF ag101 e ag102) encontra-se dividido em duas ORFs no genoma de Ag-2D, e os clones virais estudados possuem somente uma cópia única desse gene. Não houve deleção/inserção e o tamanho dos genes foi o mesmo para ambos os clones (1647pb) enquanto as ORFs de Ag-2D possuem 759 pb e 888 pb, respectivamente. Porém houve uma substituição não sinônima do tipo transição (T → C, posição: 45.742nt) que mudou um códon de terminação para um resíduo de Glutamina (TAG → CAG) como mostra a Figura 33.

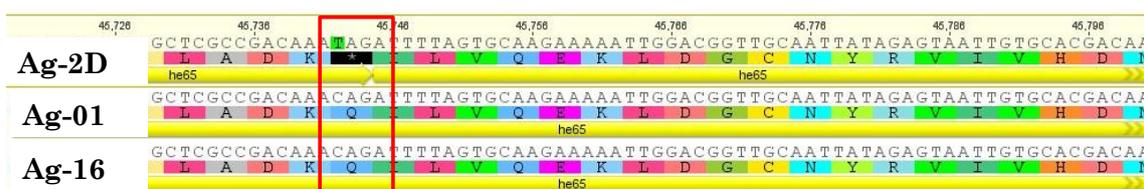


Figura 33: Alinhamento da região do gene *he65* dos clones Ag-2D, Ag-01 e Ag-16. O quadro em vermelho destaca a substituição não sinônima do tipo transição (T → C) que mudou o códon de terminação (TAG) no vírus Ag-2D para um resíduo de Glutamina (CAG) nos clones Ag-01 e Ag-16.

Esse mesmo gene encontra-se dividido em dois no genoma de CfDefMNPV (Lauzon *et al.*, 2005) e foi relatado que a perda de um nucleotídeo na sequência desse gene causou a inserção de um códon de terminação. Portanto, parece que a duplicidade desse gene em Ag-2D pode ter ocorrido devido a esse polimorfismo único encontrado que gerou a interrupção do gene *he65*, embora ainda não tenham sido realizados experimentos nesse vírus para testar a funcionalidade desses genes.

---

## **2.4. GENES BRO**

No genoma de Ag-16, uma deleção de 743pb na região dos genes *bro-a* e *bro-b* causou uma fusão desses dois genes em uma única ORF (104 pb do início do gene *bro-b*, 11pb da região intergênica e 628 pb do final do gene *bro-a*). O gene foi nomeado *bro-a/bro-b fusion* o qual possui o final do gene *bro-b* e início do gene *bro-a* totalizando 1011 pb, enquanto os mesmo genes nos vírus Ag-2D e Ag-01 possuem 732pb (*bro-a*) e 990 pb (*bro-b*). Além da fusão desses *bro*, o gene *bro-c* de Ag-16 apresentou 107 SNP ao longo de sua sequência, sendo que 21 desses foram não sinônimos.

Bideshi *et al.* (2003) relataram que mutantes de AcMNPV com o seu único gene *bro* deletado tiveram uma redução no número de poliedros produzidos após 7 dias de infecção em células Tn5B1-4. Embora a deleção de *bro* tenha sido crítica para o AcMNPV, para outros vírus como *Plutella xylostella* GV ele não é essencial (Hashimoto *et al.*, 2000) uma vez que não há cópias dele no genoma desse vírus. Experimentos de deleção dessas regiões podem ser feitos com os vírus Ag-16 para avaliar se essa fusão pode estar sendo um dos fatores responsáveis para a redução de virulência que foi observada.

## **2.5. GENES PIF**

Não foram observadas alterações significantes nos genes *pif* dos clones virais. Embora tenham sido detectados polimorfismos, variações como deleção/inserção não estão presentes nestes genes. No clone Ag-01 foram observados somente três SNP no gene *pif-3*, sendo um não sinônimo. No clone Ag-16 foram detectados polimorfismos nos genes *p74* ou *pif-0* (4 sinônimos e 2 não sinônimos), *pif-1* (2 não sinônimos) e *pif-2* (15 sinônimos e 2 não sinônimos). Esses genes estão envolvidos no estabelecimento da

---

infecção *per os* no inseto e ambos os clones são capazes de infectar as larvas por via oral. As poucas alterações encontradas nos genes *pif* parecem não estar relacionadas à diferença de virulência (alta/baixa) dos clones.

## **2.6. GENE ODV-E56**

Recentemente, o gene *odv-e56* foi identificado como pertencente à família dos genes *pif* (Xiang *et al*, 2011). No genoma do clone Ag-16 foi observada uma inserção de seis pares de base (AGC.GTT) nesse gene que resultou na mudança da sequência de aminoácidos (Figura 34). Essa mutação inseriu um resíduo de Serina e outro de Valina a mais na sequência proteica (Ser-Asp-Ser-Asn → Ser-Asp-Ser-Val-Ser-Asn). Além disso, foram encontrados 19 polimorfismos (15 sinônimos e 4 não sinônimos) exclusivos de Ag-16. Esse gene é altamente conservado e pertence ao grupo dos *core genes* de baculovírus. Uma característica interessante da proteína E56 é que ela varia de peso molecular entre as espécies de baculovírus. Mesmo dentro da mesma espécie de baculovírus, são detectadas proteínas imunoativas com várias massas, embora cada baculovírus apresente uma forma predominante no ODV purificado. Essa proteína também tem um papel essencial na maturação do envelopamento dos ODV (Braunagel & Summers, 2007). A construção de vírus recombinantes com alterações nesse gene consistirá em um estudo importante para verificar se esta alteração observada no Ag-16 resulta na redução de virulência deste clone.

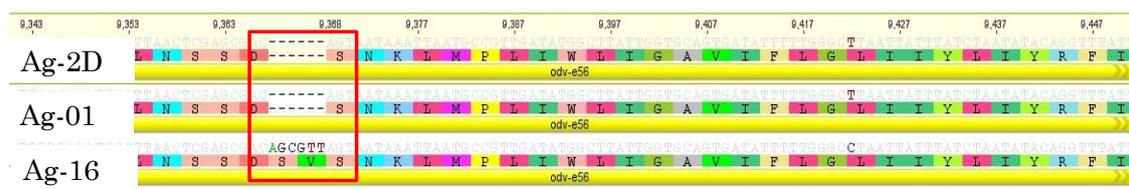


Figura 34: Inserção de seis pares de base (AGC.GTT) no gene *odv-e56* do clone Ag-16. Essa inserção gerou um acréscimo de dois resíduos de Serina e Valina, respectivamente, na sequência da proteína ODV-E56 desse clone.

## **2.7. REGIÕES HR**

A quantidade de regiões homólogas (*hr*) foi diferente entre os clones. Sabe-se que essas regiões estão intercaladas ao longo do genoma dos baculovírus e que funcionam como origem para replicação do DNA e como *enhancers* para transativação de genes (Rhormann, 2011). Na comparação entre os genomas, observou-se que, enquanto o vírus Ag-2D possui nove regiões homólogas, o clone Ag-01 possui oito (ausência de *hr4*) e clone Ag-16 possui sete (ausência de *hr1* e *hr4*). As regiões *hr* são constituídas de sequências repetitivas, tornando o alinhamento dos *reads* mais difícil, pois esses podem se alinhar em uma única região. Para descartar essa possibilidade, foram feitos alinhamentos dos *reads* (25 vezes, com alta sensibilidade, 80% de identidade) ao genoma montado utilizando a ferramenta *Map to Reference* (Geneious 1.6.1). A região *hr4* encontra-se ausente em ambos os clones e a região *hr1* encontra-se deletada no clone Ag-16. Tem sido relatada que a deleção de *hr* individuais ou combinadas não parecem afetar a replicação do vírus em cultura de células (Carstens & Wu, 2007). O sequenciamento revelou diferenças significativas entre os clones estudados, embora os fatores responsáveis pelas diferenças de virulência observadas entre eles ainda precisam ser melhor compreendidos.

Variações foram encontradas em ORFs de funções desconhecidas ao longo de ambos os genomas. No clone Ag-01, não foram encontradas variações significativas que

apontassem um ou mais genes responsáveis pela sua alta virulência. A elucidação do papel de novas ORFs e da regulação gênica será essencial para compreensão dos eventos que resultam no aumento ou diminuição da virulência do patógeno a seu hospedeiro.

### **3. ANÁLISE MORFOLÓGICA E ESTRUTURAL DOS CLONES AG-01 E AG-16**

Estudos de morfologia foram realizados para comparação dos clones Ag-01, Ag-16 e Ag-2D. A incubação destes vírus em cultivos de células Tn-5BI-4 (*High Five*), revelou que todas as infecções foram produtivas. As células infectadas, as 48 hp.i., apresentaram efeitos citopáticos típicos de infecção com baculovírus como arredondamento celular, hipertrofia nuclear e celular e formação de corpos de oclusão (Figura 35). Como esperado as células não infectadas (*mock infected*) não foram alteradas (Figura 36). Para análise comparativa, novas infecções poderão ser realizadas, utilizando-se diferentes MOIs e diferentes tempos pós infecção, seguida contagem do número de poliedros (produção específica do vírus).

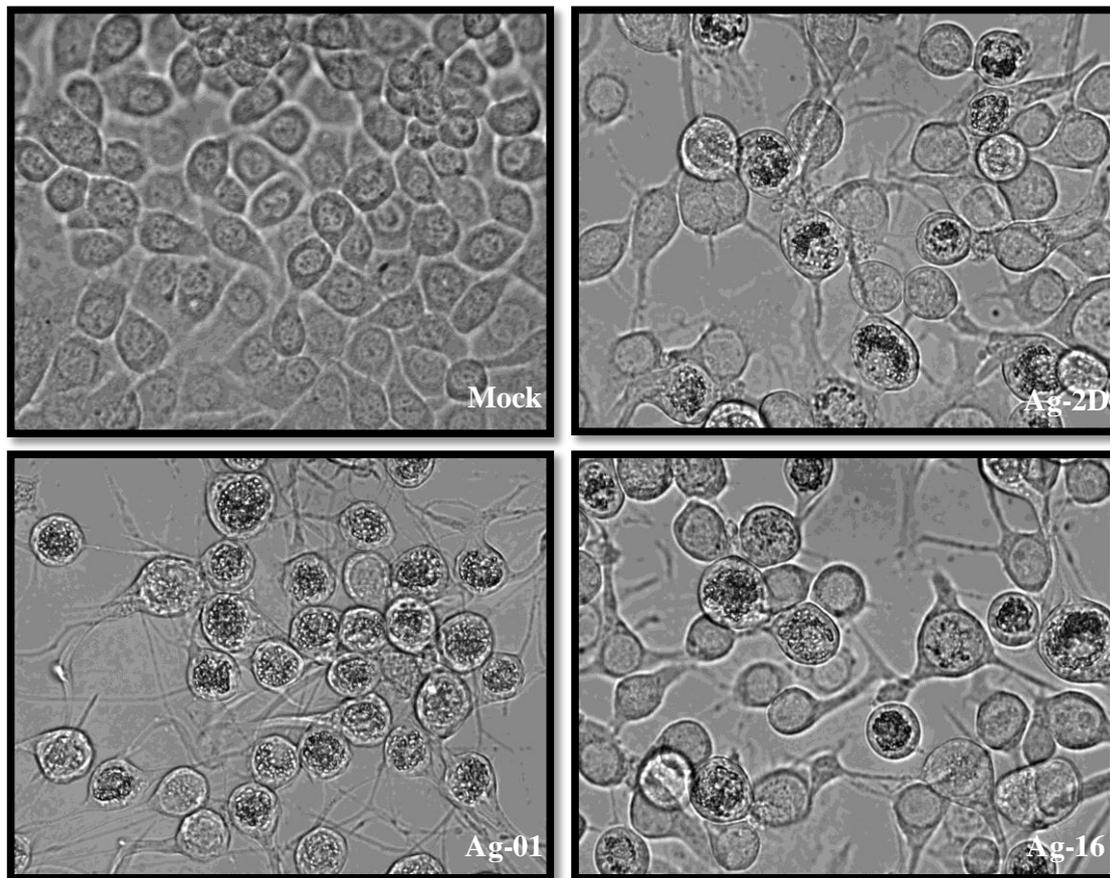


Figura 35: Células Tn5B1-4 infectadas com os clones virais Ag-2D, Ag-01 e Ag-16, 48h p.i. Microscopia óptica de inversão – aumento 40X. (Mock) células não infectadas.

A análise ultraestrutural das células infectadas com os três clones virais, às 48h p.i, revelou características típicas de infecção por baculovírus. Pode-se observar que os clones virais Ag-01 e Ag-16, tais como o vírus Ag-2D, apresentam alta formação de poliedros no núcleo das células. Os principais efeitos citopáticos foram hipertrofia nuclear, formação do estroma virogênico e produção de poliedros (Figura 34).

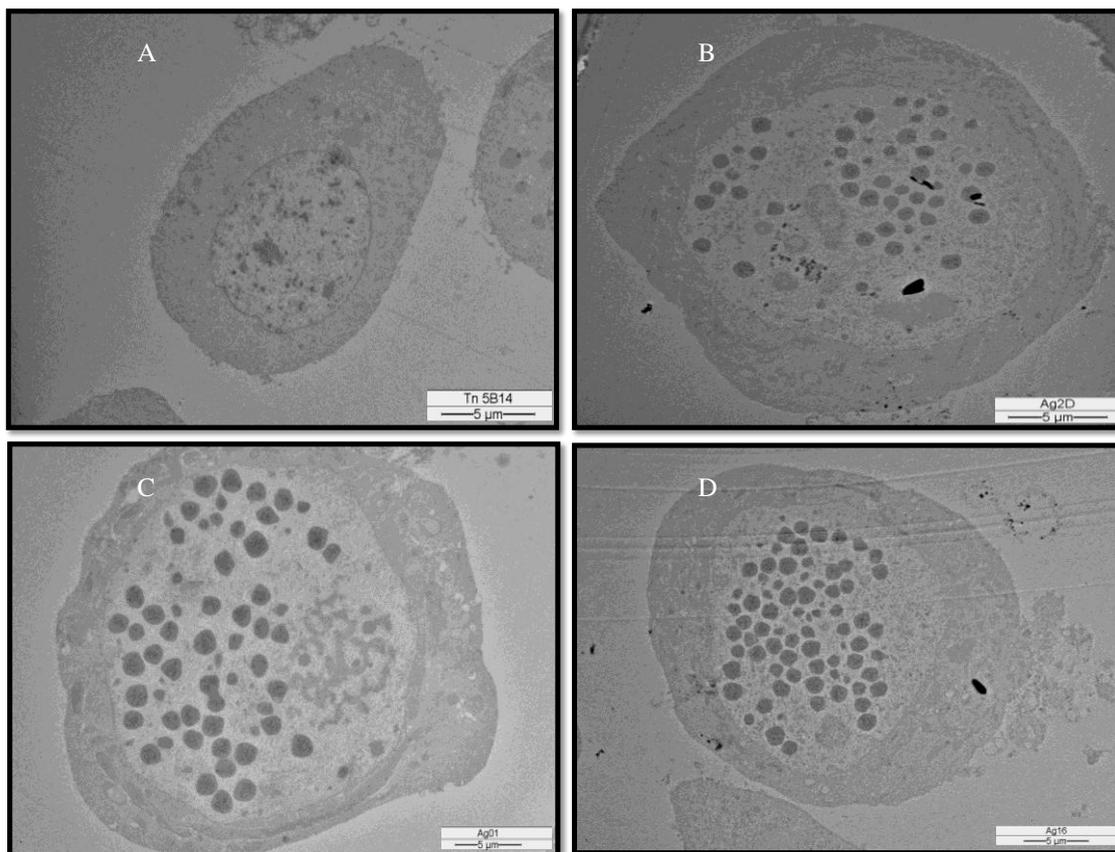


Figura 36: Microscopia eletrônica de transmissão de células Tn5B1-4. (A) Células Tn5B1-4 não infectadas, (B) células com poliedros de Ag-2D, (C) células com poliedros de Ag-01 e (D) células com poliedros de Ag-16. Células fotografadas com 48h p.i., MOI 10 e aumento de 3000X.

Com relação os corpos de oclusão, não foram encontradas diferenças entre as estruturas formadas pela infecção com o clone Ag-01 ou Ag-16 (Figuras 37A e B). Como esperado, os poliedros apresentaram aspectos normais com vários virions ocluídos na matriz cristalina. Regiões de montagem dos nucleocapsídeos foram observadas (Figura 37B).

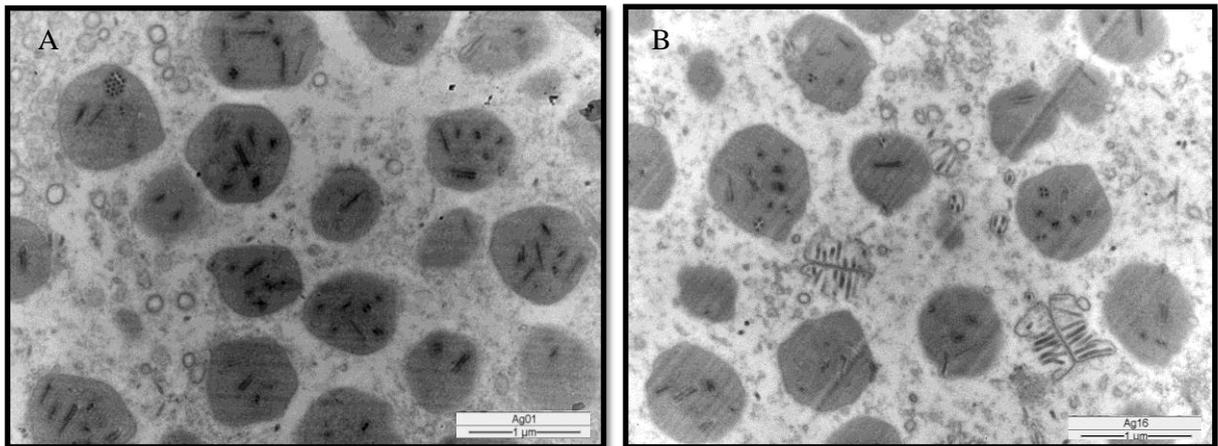


Figura 37: Micrografia eletrônica de transmissão dos clones Ag-01 (A) e Ag-16 (B) após 48h de infecção em células Tn5B1-4. Regiões de montagem das partículas ODV podem ser observadas na célula infectada com Ag-16. Aumento de 20000X

Esses resultados indicam que não houve modificações na ultraestrutura do vírus que pudessem ser correlacionadas à variação no grau de virulência descrito para os dois clones virais. Portanto, esta diferença pode estar relacionada ao desenvolvimento da patologia no inseto. Estudos de interação vírus-célula e vírus-inseto são necessários para complementação dos estudos obtidos pela análise genômica desses clones.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O baculovírus AgMNPV vem sendo utilizado no controle de uma das principais pragas da soja, a lagarta *Anticarsia gemmatalis*. Sabe-se que um dos fatores essenciais para manutenção dos vírus no campo é a capacidade de infecção do inseto hospedeiro. Os produtos responsáveis pela infectividade no inseto por via oral são as proteínas PIF (*per os infectivity factors*), presentes na superfície da partícula viral. Esse estudo demonstrou haver estabilidade dos genes codificantes dessas proteínas em vários isolados do baculovírus AgMNPV, coletados ao longo de 20 anos de aplicação em uma mesma localidade no Brasil (Londrina, PR) bem como coletados em diferentes regiões (Brasil, Argentina e Uruguai). Entre os genes *pif* dos isolados analisados, o gene *pif2* apresentou ser o mais variável, possuindo maior número de sítios polimórficos. No entanto, a quantidade de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) encontrada não indica uma alta variabilidade deste gene quando comparado a estudos semelhantes realizados com outros baculovírus.

Os resultados alcançados demonstram que, apesar de anos de aplicação no campo, os genes essenciais para a infectividade oral do vírus permanecem conservados. Com o advento das novas tecnologias de sequenciamento, isolados de AgMNPV poderão ter seus genomas totalmente sequenciados em breve, o que fornecerá informações sobre a estabilidade do genoma viral e um maior conhecimento da evolução desse vírus no campo.

As proteínas PIF possuem uma região N-terminal hidrofóbica que se ancora à membrana do ODV. A natureza insolúvel dessas proteínas tornam-nas difíceis para expressar e purificar, uma vez que tendem a formar corpos de inclusão no interior

---

celular e serem tóxicas para a célula nas quais estão sendo expressas. Com os vetores utilizados para expressão das PIF, somente as proteínas PIF2 e PIF4 foram expressas. Entretanto, o anticorpo obtido para a proteína PIF-2 não foi específico. Novas etapas de purificação poderão ser realizadas para conseguir eliminar contaminantes bacterianos, bem como novas imunizações para obtenção dos antissoros específicos para PIF2 e PIF4. Neste trabalho, apesar do emprego de diferentes estratégias, os vírus recombinantes com deleção dos genes *pif* não foram obtidos, no entanto, os plasmídeos necessários para obtenção dos mesmos encontram-se construídos e poderão ser utilizados em estudos posteriores.

A análise comparativa de dois genomas de clones do vírus AgMNPV com distintos parâmetros de virulência, revelou fatores que poderiam estar associados a virulência do patógeno ao inseto hospedeiro. No clone Ag-16, que apresenta baixa virulência *in vivo*, algumas modificações são aberrantes como: as deleções/inserções encontradas no gene *pe38* e a grande quantidade de substituições não sinônimas como no *ie-2*. Esses genes são transativadores da transcrição de genes precoces e estão envolvidos na replicação do DNA viral o que poderia estar ocasionando uma limitação ou um retardo da replicação do DNA genômico de Ag-16. Outros genes importantes que apresentaram alterações foram o *odv-e56*, que tem um papel essencial na maturação de envelopamento dos ODVs e os genes *bro-a* e *bro-b* que se encontram fusionados em uma única ORF e o *bro-c* que possui também uma grande quantidade de SNP e estão envolvidos na recombinação entre genomas de baculovírus.

O genoma do vírus AgMNPV é mais próximo filogeneticamente do vírus *Choristoneura fumiferana defective* MNPV (CfDefMNPV). Uma particularidade do genoma do vírus Ag-2D e do vírus CfDefMNPV é que o gene *he65* encontra-se dividido

em duas ORFs. No entanto, este gene encontram-se como uma única ORF nos genomas do vírus Ag-01 e Ag-16.

A quantidade de regiões homólogas (*hr*) foi diferente entre os clones. Essas regiões funcionam como origem para replicação do DNA e como *enhancers* para transativação de genes. Na comparação entre os genomas, observou-se que, enquanto o vírus Ag-2D possui nove regiões homólogas, o clone Ag-01 possui oito (ausência de *hr4*) e clone Ag-16 possui sete (ausência de *hr1* e *hr4*). As deleções encontradas nestas regiões *hr* parecem não ter relação com a virulência uma vez que elas se encontram ausentes nos dois clones com distintos graus de virulência.

Alguns dos eventos encontrados no genoma do vírus Ag-16, os quais afetam genes com funções importantes no ciclo de vida do vírus, poderiam estar relacionados à diminuição da virulência. No entanto, com base em nossas análises não foi possível identificar fatores conhecidos que pudessem ser correlacionados a alta virulência do vírus Ag-01. Estes clones possuem polimorfismos em regiões gênicas que ainda não foram descritas na literatura, o que indica a necessidade de estudos de caracterização e função de novos genes e de regiões reguladoras, as quais poderiam estar contribuindo para o aumento da virulência observada.

Não houve modificações na ultraestrutura do vírus que pudessem ser associadas à variação no grau de virulência descrito para os dois clones virais como pôde ser observado durante as análises morfológicas das células infectadas com os dois clones.

A elucidação de fatores de virulência é de grande importância, pois poderá resultar em tecnologias de engenharia genética ou de produção em cultivos celulares que permitam o avanço do uso de baculovírus como bioinseticida. Outros clones que foram purificados a partir do vírus selvagem Ag-79, os quais se encontram conservados no Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e

Biotecnologia, e deverão ser sequenciado futuramente. A análise comparativa do genoma de diferentes genótipos deverá trazer informações relevantes sobre a diversidade genética do vírus e de processos que permitam sua melhor adaptação em cultivos celulares e no inseto hospedeiro.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. R., McClintock, J. T., 1991. Chapter 6: *Baculoviridae*, nuclear polyhedrosis viruses Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In: *Atlas of Invertebrate Viruses* (J. R. Adams and J. R. Bonami, eds.), p. 87-180. CRC Press, Boca Raton.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z.; Balinsky, C. A., Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L., Kutish, G. F., 2001. Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *Journal of Virology*. 75, 11157–11165.
- Ahrens, C. H., Russell, R. L., Funk, C. J., Evans, J. T., Harwood, S. H., Rohrmann, G.F. 1997. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*. 229, 381-399.
- Andreadis, T., Becnel, J., White, S., 2003. Infectivity and pathogenicity of a novel baculovirus, CuniNPV from *Culex nigripalpus* (Diptera: Culicidae) for thirteen species and four genera of mosquitoes. *Encyclopedia of Entomology*. 40, 512-517.
- Arif, B. M., 1986. The structure of the viral genome. *Current Topics Microbiology and Immunology*, 131, 21-29.
- Baillie, V. L., Bouwer, G., 2012. High levels of genetic variation within core *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus genes. *Virus Genes*. 44, 149-162.
- Barbara, K. A., 2000. Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* (Hübner). *University of Florida - Ifas Extension*, 151: 1-5.
- Barbehenn, R. V., Martin, M. M., 1995. Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *Journal of Insect Physiology*. 41, 301-311.
- Berino, E., 1995. Determinação da atividade biológica de isolados geográficos e temporais de VPN de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae). 65p. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Beniya, H., Braunagel, S. C., Summers, M. D., 1998. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology*. 240: 64-75.
- Berretta, M., Romanowski, V., 2008. Baculovirus homologous regions (*hrs*): pleiotropic functional *cis* elements in viral genomes and insect and mammalian cells. *Current Topics in Virology*. 7, 47-56.
- Bideshi, D. K., Renault, S., Stasiak, K., Federici, B. A., Bigot, Y., 2003. Phylogenetic analysis and possible function of *bro-like* genes, a multigene family widespread among large double-stranded DNA viruses of invertebrates and bacteria. *Journal of General Virology*. 84, 2531–2544.

- 
- Blissard, G. W., Rohrmann, G. F., 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*. 35, 127-155.
- Blissard, G., Black, B., Crook, N., Keddie, B. A., Possee, R., Rohrmann, G., Theilmann, D. A., Volkman, L., 2000. Family *Baculoviridae*. In: van Regenmoertel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds) *Virus Taxonomy – Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, p 195–202.
- Braunagel, S. C., Guidry, P. A., Rosas-Acosta, G., Engelking, L., Summers, M. D. 2001. Identification of BV/ODV-C42, an *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* orf101-encoded structural protein detected in infected-cell complexes with ODV-EC27 and p78/83. *Journal of Virology*. 75, 12331-8.
- Braunagel, S. C., Russel, W. K., Rosas-Acosta, G., Russel, D. H., Summers M. D., 2003. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100, 9797–9802.
- Braunagel, S. C., Summers, M. D. 1994. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology* 202, 315-28.
- Braunagel, S. C., Summers, M. D., 2007. Molecular Biology of the Baculovirus Occlusion-Derived Virus Envelope. *Current Drug Targets*. 8, 1084-1095.
- Braunagel, S. C., Summers, M. D., 2007. Molecular Biology of the Baculovirus Occlusion-Derived Virus Envelope. *Current Drug Targets*. 8, 1084-1095.
- Bulach, D. M., Kumar, C. A., Zaia, A., Liang, B., Tribe, D. E., 1999. Group II *nucleopolyhedrovirus* subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73, 59-73.
- Carson, D. D., Summers, M. D., Guarino L. A. 1991. Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology*. 182, 279–286.
- Carson, D. D., Summers, M. D., Guarino, L. A., 1991. Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *immediate-early* gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *Journal of Virology*. 65, 945–951.
- Carstens, E. B., Liu, J. J., Dominy, C., 2002. Identification and molecular characterization of the baculovirus CfMNPV early genes: *ie-1*, *ie-2* and *pe38*. *Virus Research*. 83, 13–30.
- Carstens, E. B., Wu, Y., 2007. No single homologous repeat region is essential for DNA replication for DNA replication of the baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*. *Journal of General Virology*. 88, 114-122.

- 
- Carvalho, M. C. C. G., Silva, D. C. G., 2010. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações em genômica de plantas. *Ciência Rural*. 40, 735-744.
- Castro, M. E. B., Souza, M. L., 2006. Baculovirus: Agentes de Controle Biológico. In: *Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas* (Oliveira-Filho, E. C.; Monnerat, R. G.). 1, 175-194.
- 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., 2002. Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology*. 83, 673-684.
- Chen, Y. R., Zhong, S., Fei, Z., Hashimoto, Y., Xiang, J. Z., 2013. The transcriptome of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* cells. *Journal of Virology*. 87, 6391-6405.
- Chisholm, G. E., Henner, D. J., 1988. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *ie-1* gene. *Journal of Virology* 62, 3193-3200.
- Clavijo, G., Williams, T., Muñoz, D., Caballero, P., López-Ferber, M., 2010. Mixed genotype transmission bodies and virions contribute to the maintenance of diversity in an insect virus. *Proc. R. Soc. B*. 277, 943-951.
- Conceição-Silva, F., Presgrave, O. A. F., 2008. Manual de utilização de animais/ FioCruz, 1ª Ed, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Cory, J. S., Green, B. M., Paul, R. K., Hunter-Fujita, F., 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*. 89, 101-111.
- Cory, J. S., Myers, J. H., 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 239-72.
- Craveiro, S. R., Melo, F. L., Ribeiro, Z. M. A., Ribeiro, B. M., Bão, S. N., Inglis, P. W., Castro, M. E. B., 2013. *Pseudoplusia includens* single nucleopolyhedrovirus: genetic diversity, phylogeny and hypervariability of the *pif-2* gene. *Journal of Invertebrate Pathology*. 114, 258-267.
- Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W. K., Shimada, T., 2007. Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Archives of Virology* 152, 1655-1664.
- Deng, F., Wang, R., Fang, M., Jiang, Y., Xu, X., Wang, H., Chen, X., Arif, B.M., Guo, L., Hu, Z., 2007. Proteomics analysis of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus identified two new occlusion-derived virus-associated proteins, HA44 and HA100. *Journal of Virology*. 81, 9377-9385.

- 
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *PNAS*. 100, 8817–882.
- Eberle, K.E., Sayed, S., Rezapanah, M., Shojai-Estabragh, S., Jehle, J.A., 2009. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella granulovirus*. *Journal of General Virology*. 90, 662-671.
- Espinel-Correal, C., Léry, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddani, J. L., Cotes, A. M., López-Ferber, M., 2010. Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* Granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *App. Environ. Microbiol.* 76, 7617–7625.
- Evans, H. F., 1986. Ecology and epizootiology of baculoviruses. In: *The biology of baculoviruses* (R. R. Granados and B. A. Federici, eds.), Vol. 2, p. 89-100. CRC Press, Boca Raton.
- Fang, M., Nie, Y., Harris, S., Erlandson, M. A., Theilmann, D. A., 2009. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus core gene *ac96* encodes a *per os* infectivity factor (*pif-4*). *Journal of Virology*. 83, 12569–12578.
- Faulkner, P., Kuzio, J., Williams, G. V., Wilson, J. A., 1997. Analyses of *p74*, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus required for occlusion body infectivity *in vivo*. *Journal of General Virology* 78, 3091-3100.
- Federici, B. A., 1997. Baculovirus pathogenesis. In: *The baculoviruses*. Miller, L. K. (Ed.). New York: Plenum, 33-59.
- Federici, B. A., Hice, R. H., 1997. Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of *Anagrapha falcifera* multinucleocapsid NPV. *Archives of Virology*. 142, 333–348.
- Ferreira, B. C., 2008. Prospecção de genes *pif* (*per os infectivity factor*) em variantes genotípicos de *Anticarsia gemmatilis* MNPV e construção de recombinante com interrupção do gene *pif-1*. 112p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília 2008.
- Friesen, P.D., 1997. Regulation of baculovirus early gene expression. In: *The Baculoviruses*. (Miller, L. K. Ed), 141-170.
- Friesen, P.D.; Miller, L.K., 1986. The regulation of baculovirus gene expression. In: *The molecular biology of baculoviruses* (Derfler, W.; Boehm, P. Eds.), Berlin, Springer-Verlag, 31-50.
- Funk, C. J., Braunagel, S. C., Rohrmann, G. F., 1997. Baculovirus structure. In: *The baculoviruses*. (Miller, L. K. Ed.). New York: Plenum, 7-32.
- Garcia-Maruniak, A., A. M. Abd-Alla, T. Z. Salem, A. G. Parker, V. U. Lietze, M. M. van Oers, J. E. Maruniak, W. Kim, J. P. Burand, F. Cousserans, A. S. Robinson, J. M. Vlak, M. Bergoin, D. G. Boucias., 2009. Two viruses that cause salivary gland
-

---

hypertrophy in *Glossina pallidipes* and *Musca domestica* are related and form a distinct phylogenetic clade. *Journal General Virology*, 90, 334–346.

- Garcia-Maruniak, A., Maruniak, J. E., Zanutto, P. M., Doumbouya, A. E., Liu, J. C., Merritt, T. M., Lanoie, J. S., 2004. Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 78: 7036-7051.
- Graham, R. I., Tyne, W. I., Possee, R. D., Sait, S. M., Hails, R. S., 2004. Genetically variable nucleopolyhedroviruses isolated from spatially separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) in Orkney. *Journal of Invertebrate Pathology*. 87, 29–38.
- Granados, R. R., Williams, K. A., 1986. *In vivo* infection and replication of baculoviruses. In: *The biology of baculoviruses*. (Granados, R.R.; Federici, B.A. Ed.), 1, 89-108.
- Guarino L.A., Summers M.D. 1986. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *Journal of Virology*. 57, 563–571.
- Guarino, L. A., Xu, B., Jin, J., Dong, W., 1998. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *Journal of Virology*. 72, 7985–7991.
- Gutiérrez, S., Kikhno, I., Lopez Ferber, M., 2004. Transcription and promoter analysis of *pif*, an essential but low-expressed baculovirus gene. *Journal of General Virology* 85, 331-341.
- Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O., Volkman, L. E. 2004. P74 mediates specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to primary cellular targets in the midgut epithelia of *Heliothis virescens* larvae. *Journal of Virology*. 78,6786–6791.
- Halwass, M., 2005 Uso do bioinseticida baculovírus *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) como vetor de expressão de proteínas com interesse fitopatológico e como sistema biológico para análise da interação vírus/hospedeiro. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília.
- Harrison, R. L., Bonning, B. C., 1999. The nucleopolyhedroviruses of *Rachiplusia ou* and *Anagrapha falcifera* are isolates of the same virus. *Journal of General Virology*. 80, 2793–2798.
- Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y., Matsumoto, T., 2000. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* 275, 358–372.
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S. I., Goto, C., Maeda, S., 1999. Nucleotide sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology*. 30, 277–297.

- 
- Hayakawa, T., Rohrmann, G. F., Hashimoto, Y., 2000. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses. *Virology*. 278, 1–12.
- Hefferon, K. L., Oomens, A. G., Monsma, S. A., Finnerty, C. M., Blissard, G. W., 1999. Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology*. 258, 455-468.
- Herniou, E. A., Luque, T., Chen, X., Vlak, J. M., Winstanley, D., Cory, J.S., O'Reilly, D. R., 2001. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. *Journal of Virology*. 75, 8117-8126.
- Herniou, E. A., Olszewski, J. A., O'Reilly, D. R., Cory, J. S., 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology*. 78, 3244-3251.
- Hong, T., Summers, M. D., Braunagel, S. C., 1997. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94, 4050–4055.
- Horton, H. M., Burand, J. P., 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *Journal of Virology*. 67, 1860-1868.
- Huang, H., Wang, M., Deng, F., Wang, H., Hu, Z., 2012. ORF85 of HearNPV encodes the *per os* infectivity factor 4 (PIF4) and is essential for the formation of the PIF complex. *Virology*. 427, 217–223.
- Ijkel, W. F. J., Van Strien, E. A., Heldens, J. G. M., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R. W., Vlak, J. M., 1999. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*. 80, 3289–3304.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Aravind, L., 2002. Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origins of fungal APSES transcription factors. *Genome Biology*. 3, 1–11.
- Jarvis, D. L., 1997. Baculovirus expression vectors. In: *The Baculoviruses*. (Miller, L. K. Ed.). Plenum Press, New York, 389-419.
- 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., 2006. On classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*. 151, 1257-1266.
- Jiang, T., Li, X., Song, J., Liang, C., Chen, X., 2008. Baculovirus *per os* Infectivity Factors Are Involved in HearNPV ODVs Infection of HzAM1 Cells *in vitro*. *Virologica Sinica*. 23, 25-30.

- 
- Kang, W., Suzuki, M., Zemskov, E., Okano, K., Maeda, S., 1999. Characterization of baculovirus repeated open reading frames (*bro*) in *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*. 73, 10339–45.
- Ke, J., Wang, J., Deng, R., Wang, X., 2008. *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*. 374, 421–431.
- Kelly, D. C., Brown, D. A., Ayres, M. D., Allen, C. J., Walker, I. O., 1983. Properties of the major nucleocapsid protein of *Heliothis zea* singly enveloped nuclear polyhedrosis virus. *Journal of General Virology*. 64, 399-408.
- Kikhno, I., Gutierrez, S., Croizier, L., Croizier, G., López-Ferber, M., 2002. Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*. 83, 3013–3022.
- Kool, M., Ahrens, C. H., Goldbach, R. W., Rohrmann, G. F., Vlak, J. M., 1994. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 11212–11216.
- Kool, M., Ahrens, C. H., Vlak, J. M., Rohrmann, G. F., 1995. Replication of baculovirus DNA. *Journal of General Virology*. 76, 2103-2118.
- Kuzio, J., Jacques, R., Faulkner, P., 1989. Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*. 173, 759-763.
- Kuzio, J., Pearson, M. N., Harwood, S. H., Funk, C. J., Evans, J. T., Slavicek, J. M., Rohrmann, G. F., 1999. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*. 253, 17-34.
- Lange, M., Wang, H., Zhihong, H., Jehle, J. A., 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. *Virology*. 325, 36–47.
- Lauzon, H. A. M., Jamieson, P. B., Krell, P. J., Arif, B. M., 2005. Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*. 86, 945–961.
- Lauzon, H. A. M., Lucarotti, C. J., Krell, P. J., Feng, Q., Retnakaran, A., Arif, B. M., 2004. Sequence and organization of the Neodiprion lecontei Nucleopolyhedrovirus genome. *J. Virology*. 78, 7023-7035.
- Leisy, D. J., 1997. A mechanism for negative gene regulation in *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*. 71, 5088–5094.
- Levy, S. M., Falleiros, A. M. F., Gregório, E. A., Arrebola, N. R., Toledo, L. A., 2004. The larval midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. *Brazilian Journal of Biology*. 64, 633-638.
-

- 
- Levy, S. M., Falleiros, A. M. F., Moscardi, F., Gregório, E. A., 2007. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. *Journal of Invertebrate Pathology*. 96, 183–186.
- Li, L., Donly, C., Li, Q., Willis, L. G., Keddie, B.A., Erlandson, M. A., Theilmann, D. A., 2002. Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. *Virology*. 297, 226–244.
- Li, L., Li, Q., Willis, L. G., Erlandson, M., Theilmann, D. A., Donly, C., 2005. Complete comparative genomic analysis of two field isolates of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus-A. *Journal of General Virology*. 86, 91–105.
- Li, X., Song, J., Jiang, T., Liang, C., Chen, X., 2007. The N-terminal hydrophobic sequence of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus PIF-3 is essential for oral infection. *Archives of Virology*. 152, 1851–1858.
- Li, Z., Li, C., Yang, K., Wang, L., Yin, C., Gong, Y., Pang, Y., 2003. Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Research*. 96, 113–122.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Lin, G., Blissard, G. W., 2002. Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus *lef-6*-null virus: LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene transcription. *Journal of Virology*. 76, 5503–5514.
- Liu, X., Chen, K., Cai, K., Yao, Q., 2008. Determination of protein composition and host-derived proteins of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Intervirology*. 51, 369–376.
- Long, G., Pan, X., Kormelink, R., Vlak, J. M., 2006. Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*. 80, 8830–8833.
- López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., Caballero, P., 2003. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 270, 2249–2255.
- Lu, A., Carstens, E.B., 1993. Immediate-early baculovirus genes transactivate the p143 gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 195, 710–718.
- Lu, A., Miller, L. K., 1997. Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In: *The Baculoviruses* (Miller, L. K. Ed.), 193–216.
-

- 
- Lua, L. H. L., Reid, S., 2000. Virus morphogenesis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus in *Helicoverpa zea* serum-free suspension culture. *Journal of General Virology*. 81, 2531–2543.
- Mainz, D., Quadt, I., Knebel-Mörsdorf, D., 2002. Nuclear IE2 Structures Are Related to Viral DNA Replication Sites during Baculovirus Infection. *Journal of Virology*. 76, 5198–5207.
- Margulies, M., Egholm, M., Altam, W. E., Attiya, S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhijani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., Rothberg, J. M., 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 15, 376-80.
- Maruniak, J. E., 1986. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: *The biology of baculoviruses* (Granados, R. R.; Federici, B. A. Eds.). Boca Raton: CRC, 1: 129-146.
- McCarthy, C.B., Theilmann, D.A., 2008. AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene. *Virology*. 25, 277-91.
- McLachlin, J. R., Miller, L. K., 1994. Identification and characterization of *vlf-1*, a baculovirus gene involved in very late gene expression. *Journal of Virology*, 68, 7746.
- Miele, S. A. B., Garavaglia, M. J., Belaich, M. N., Ghiringhelli, P. D., 2011. Baculovirus: Molecular Insights on their Diversity and Conservation. *Int J Evol Biol*. 2011, 15.
- Mikhailov, V. S., Mikhailova, A. L., Iwanago, M., Gomi, S., Maeda, S., 1998. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus encodes a DNA-binding protein capable of destabilizing duplex DNA. *Journal of Virology*. 72, 3107–3116.
- Miller, L. K., 1997. Introduction to the baculoviruses. In: *The Baculoviruses* (Miller, L. K. Ed.), 1-6.
- Miroux, B., Walker, J. E., 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*. 19, 289-98.
- Mitsuhashi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K., Wada, S., 2007. Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *Journal of Virology*. 81, 4235-4243.
-

- 
- Moscardi, F., 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. 44, 257-289.
- Moscardi, F., Souza, M.L., Castro, M.E.B., Moscardi, M.L., Szewczyk, B., 2011. Baculovirus Pesticides – Present State and Future Perspectives. In *Microbes and Microbial Technology*, SpringerLink, p. 415-445.
- O'Reilly, D. R., 1997. Auxiliary genes of baculoviruses. In *The Baculoviruses*, p. 267–300. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., Luckow, V. A., 1992. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. (Freeman W. H. Ed), 347.
- Ohkawa, T., Washburn, J. O., Sitapara, R., Sid, E., Volkman, L. E. 2005. Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of *pif* genes *Ac119* and *Ac022* but not by *Ac115*. *Journal of Virology*. 79, 15258–15264.
- Oliveira, J. V. C.; Wolff, J. L. C.; Garcia-Maruniak, A.; Ribeiro, B. M.; Castro, M. E. B.; Souza, M. L.; Moscardi, F.; Maruniak, J. E.; Zanotto, P. M. A. (2006) Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 87: 3233–3250.
- Passarelli, A. L., Miller, L. K. 1993. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: *ie-1*, *ie-n*, and *lef-2*. *Journal of Virology*. 67, 2149–2158.
- Pearson, M. N., Rohrmann, G. F., 2002. Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. *Journal of Virology*. 304, 81– 88.
- Peng, K., van Oers, M. M., Hu, Z., van Lent, J. W. M., Vlak, J. M., 2010. Baculovirus *per os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion derived virus. *Journal of Virology*. 84, 9497–9504
- Peng, K., van Lent, J. W. M., Vlak, J. M., Hu, Z. van Oers, M. M., 2011. *In situ* cleavage of the baculovirus occlusion derived virus receptor binding protein P74 in the *per oral* infectivity complex. *Journal of Virology*. 85, 10710-8.
- Perera, O.; Green, T. B.; Stevens Jr., S. M.; White, S.; Becnel, J.J., 2007. Proteins associated with *Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus occluded virions. *Journal of Virology*, 81, 4585-4590.
- Pijlman, G. P., Pruijssers, A. J. P.; Vlak, J. M., 2003. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects. *Journal General Virology*. 84, 2041–2049.
- Possee, R. D., Rohrmann, G. F., 1997. Baculovirus genome organization and evolution. In *The Baculoviruses*, pp. 109–140. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum.

- 
- Qian, H., Zhang, Y., Wu, Y., Sun, P., Zhu, S., Guo, X., Gao, K., Xu, A., Wang, W. 2013. Analysis of the genomic sequence of *Philosamia cynthia* nucleopolyhedrin virus and comparison with *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrin virus. *BMC Genomics*. 14, 115.
- Rafael, J. A., Melo, G. A. R., Carvalho, C. J. B., Casari, S. A., Constantino, R., 2012. Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Holos, Editora Ltda-ME. 810p. HOLOS Environment. 10, 250.
- Ramachandran, A., Bashyam, M. D., Viswanathan, P., Ghosh, S., Senthil Kumar, M., Hasnain, S. E., 2001. The bountiful and baffling baculovirus: The story of polyhedrin transcription. *Current Science*. 81, 998.
- Rand, K. N. 1996. Crystal Violet Can Be Used to Visualize DNA Bands During Gel Electrophoresis and to Improve Cloning Efficiency. Elsevier Trends Journals Technical Tips Online.
- Ribeiro, B. M., Hutchingson, K., Miller, L. K., 1994. A mutant baculovirus with a temperature sensitive IE-1 transregulatory protein. *Journal of Virology*. 68, 1075-84.
- Rohrmann G. F., 1986. Polyhedrin structure. *Journal of General Virology*.;67:1499–1513.
- Rohrmann, G. F., 2011. The AcMNPV genome: Gene content, conservation, and function. In *Baculovirus Molecular Biology*, 2nd ed. National Library of Medicine (US), NCBI, Bethesda (MD).
- Rosas-Acosta, G., Braunagel, S. C., Summers, M. D., 2001. Effects of deletion and overexpression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *fp25k* gene on synthesis of two occlusion-derived virus envelope proteins and their transport into virus-induced intranuclear membranes. *Journal of Virology*. 75, 10829-42.
- Rowley, D.L., Popham, H.J., Harrison, R.L., 2011. Genetic variation and virulence of 606 nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa 607 armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 107, 112-126
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> ed.
- Simón, O., Palma, L., Beperet, I., Muñoz, D., López-Ferber, M., Caballero, P., Williams, T., 2011. Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates: Detecting positively selected genes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 107, 33–42.
- Simón, O., Williams, T., Caballero, P., López-Ferber, M., 2006. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. *Proc. R. Soc.* 273, 783–790.

- 
- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2005. Functional importance of deletion mutants genotypes in an insect *nucleopolyhedrovirus* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4254–4262.
- Simón, O.; Williams, T.; López-Ferber, M.; Caballero, P., 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus* population: high prevalence of deletion genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5579–5588.
- Slack, J. M., Arif, B. M., 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus; virion structure and function. *Advances in Virus Research.* 69, 99-165.
- Slack, J. M., Ribeiro, B. M., de Souza, M. L., 2004. The gp64 locus of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 39 repair exonuclease homologue and lacks *v-cath* and *chiA* genes. *Journal of General Virology.* 85, 211–219.
- Slavicek, J. M., Popham, H. J., 2005. The *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancins are components of occlusion-derived virus. *Journal of Virology.* 79, 10578-88.
- Song, J., Wang, R., Deng, F., Wang, H., Hu, Z., 2008. Functional studies of *per os* infectivity factors of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus *Journal of General Virology.* 89, 2331–2338.
- Sparks, W. O., Harrison, R. L., Bonning, B. C., 2011. *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* ODV-E56 is a *per os* infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut. *Virology.* 409, 69–76.
- Terra, W. R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 109, 1-62.
- Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Thiem, S., Vlak, J.M., 2005. Family *Baculoviridae*. In: *Virus Taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L. A. Ed). 177-185.
- Thumbi, D. K., Be'liveau, C., Cusson, M., Lapointe, R., Lucarotti, C. J., 2013. Comparative genome sequence analysis of *Choristoneura occidentalis* Freeman and *C. rosaceana* Harris (Lepidoptera: Tortricidae) *Alphabaculoviruses*. *PLoS ONE.* 8, e68968.
- Vail P., 1971. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. *Journal of Invertebrate Pathology.* 17, 383–388.
- van Oers, M. M., Vlak, J. M., 2007. Baculovirus genomics. *Curr Drug Targets.* 8, 1051-1068.

- 
- Volkman, L.E., Goldsmith, P.A., 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica nuclear* polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology*, 143, 185-195.
- Wang, P., Granados, R. R., 1997. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*. 94, 6977-82.
- Wang, P., Hammer, D. A., Granados, R. R., 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *Journal of General Virology*. 75, 1961-1967.
- Wang, R., Deng, F., Hou, D., Zhao, Y., Guo, L., Wang, H., Hu, Z., 2010. Proteomics of the *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* budded virions. *Journal of Virology* 84, 7233-42.
- Wang, Y., Jehle, J. A., 2009. Nudiviruses and other large, doublestranded circular DNA viruses of invertebrates: new insights on an old topic. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101, 187-193.
- Williams, G. V., Faulkner, P., 1997. Cytological Changes and Viral Morphogenesis during Baculovirus Infection. In *The Baculoviruses*. Ed. L. K. Miller. Plenum Press. New York, pp 61-108.
- Willis, L. G., Siepp, R., Stewart, T. M., Erlandson, M. A., Theilmann, D. A., 2005. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus* and the identification of a baculoviral photolyase gene. *Virology*. 338, 209-26.
- Xiang, X., Chen, L., Guo, A., Yu, S., Yang, R., Wu, X., 2011. The *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) ODV-E56 envelope protein is also a *per os infectivity factor*. *Virus Research*. 155, 69-75
- Yang, Z., 2001. Adaptive molecular evolution, in: Balding, D., Bishop, M., Cannings, C. 662 (Eds.), *Handbook of Statistical Genetics*. Wiley, London. p. 327-350.
- Yi-Peng, X., Cheng, R., Xi, Y., Zhang, C., 2013. Genomic diversity of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus strains. *Genomics*. 102, 63-71.
- Yoo, S., Guarino, L. A., 1994. Functional dissection of the *ie-2* gene product of the baculovirus *Autographa californica nuclear* polyhedrosis virus. *Virology*. 202, 164-172.
- Yoo, S., Guarino, L. A., 1994. The *Autographa californica nuclear* polyhedrosis virus *ie2* gene encodes a transcriptional regulator. *Virology*. 202, 746-753.
- Young, J. C., Mackinnon, E. A., Faulkner, P., 1993. The architecture of the virogenic stroma in isolated nuclei of *Spodoptera frugiperda* cells in vitro infected by *Autographa californica nuclear* polyhedrosis virus. *Journal of Structural Biology*. 110, 141-153.
-

- Yu, I., Bray, D., Lin, Y., Lung, O. (2009) *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ORF 23 null mutant produces occlusion-derived virions with fewer nucleocapsids. *Journal of General Virology*. 90: 1499–1504.
- Zanotto, P. M. A., Kessing, B. D., Maruniak, J. E., 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology*. 62, 147-1643.
- Zemskov, E. A., Kang, W., Maeda, S. 2000. Evidence for nucleic acid binding ability and nucleosome association of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus BRO proteins. *Journal of Virology*. 74, 6784–6789.
- Zhang, C.-X., Ma, X.-C., Guo, Z.-J. 2005. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*. 333, 190–199.

## ANEXO

ANEXO I – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY*

Ferreira, B. C., Melo, F. L., Souza, M. L., Moscardi, F., Bão, S. N., Ribeiro, B. M., (2013) High genetic stability of *peroral* infection factors from *Anticarsia gemmatalis* MNPV over 20 years of sampling. *Journal of Invertebrate Pathology*.

## **High genetic stability of *peroral* infection factors from *Anticarsia gemmatalis***

### **MNPV over 20 years of sampling**

Briana C. Ferreira<sup>a,b</sup>, Fernando L. Melo<sup>a</sup>, Marlinda L. Souza<sup>b</sup>, Flávio Moscardi<sup>c†</sup>, Sônia N. Bão<sup>a</sup>, Bergmann M. Ribeiro<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília (UnB), Asa Norte, 70910-900, Brasília-DF, Brazil.

<sup>b</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Parque Estação Biológica, W5 Norte Final, 70770-917 Brasília-DF, Brazil.

<sup>c</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade do Estado de Londrina (UEL), Londrina-PR, 86051-990, Brazil.

† in memoriam

\*Corresponding author:

Tel: +55 [61 31070483](tel:+556131070483)

e-mail: [bergmann@unb.br](mailto:bergmann@unb.br); (B. M. Ribeiro)

**Abstract**

The *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) has been used as a biopesticide since the early 80's in Brazil to control the major pest of soybean crops, the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. The nucleotide sequences of four *pif* genes (*pif1*, *pif2*, *pif3* and *pif4*) from *Anticarsia gemmatalis* geographic isolates collected from different regions of South America, as well as of seasonal isolates of AgMNPV, recovered during twenty years of field applications were obtained and analyzed. The *pif2* gene was more variable among the other genes although the SNP analysis did not indicate higher variability. This study reveals that *pif* genes have remained preserved along the 20 years of application in the field.

*Keywords:* Baculovirus *Anticarsia gemmatalis* MNPV, Seasonal isolates, Geographical isolates, stability, *pif* genes

## 1. Introduction

Baculoviruses play an important ecological role regulating the size of insect populations and, for decades, have been applied as biopesticides to control forest and agricultural Lepidopteran pests (Moreau and Lucarotti, 2007). The use of baculoviruses as biocontrol agents is feasible since it can be produced in a large-scale in the field or laboratory and in the case of AgMNPV, as cheap as chemical insecticides (Moscardi, 1999).

Since baculoviruses are world widely applied as insecticide, studies on their genetic stability are very important to understand their population dynamics and to ensure the quality of the Biological Control Programs. In addition, the information obtained from such studies may bring insight on the baculovirus-host co-evolution and further contribute to improve the expansion of their use on the control of economically important pests.

*Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) genome has 132,239bp coding 152 ORFs (Oliveira et al., 2006). It has been used as a biopesticide since the early 80's of last century in Brazil to control the major pest of soybean culture, the velvetbean caterpillar, *A. gemmatalis* (Moscardi, 1999). This virus has been produced *in vivo*, mainly by infection of caterpillars in field, and in the 2003/2004 season, it was applied in an area of 2 million hectares of soybean, representing approximately 10% of the soybean cultivated area in Brazil at that time. However, since then there was a strong decline in the virus usage due to the incorrect application of chemical insecticides, herbicides and fungicides promoting the disequilibrium in soybean systems. As a result there was a intense change in the population of insect/organisms such as the soybean looper (*Pseudoplusia includens*), white flies,

---

*Spodoptera* spp., and mites, which were considered as secondary pests and became highly important pests (Moscardi et al, 2011).

AgMNPV harbors several viral nucleocapsids with different genotypes present in the same occlusion body that is a characteristic of baculoviruses in the field (López-Ferber et al, 2003). This heterogeneity can result of insect infection by multiples genotypes or be generated during the infection cycle through point mutations, gene duplications, insertions and/or DNA deletions and the presence of repeated sequences in tandem (Cory and Myers, 2003; Cory et al., 2005). These individual genotypes can differ in virulence and/or pathogenicity (Simón et al., 2005; Simón et al., 2006) and some studies have related that inside these field populations may have defective viruses that co-infects insect hosts along with helper genotypes (Simón et al., 2004; Clavijo et al., 2010).

Studies carried out with a *Spodoptera frugiperda* MNPV field isolate (López-Ferber et al., 2003; Simón et al., 2004) identified at least nine distinct genotypes within the population studied. Plaque-purified genotypes were purified and eight showed deletions in much of their genomes, and two of these viral clones were non-infectious *per os*. A deletion (>16 kbp) in their genomes covering the *per os* infectivity factors *I* and *2* genes (*pif1* and *pif2*) that are essential for production of oral infection factors was detected. Other reports, even with the same field population (Clavijo et al, 2009) have shown the importance of the persistence of these deleted genotypes in viral population for the maintenance of the genetic diversity of the wild type virus.

The *pif* genes products are essential for virus binding and fusion to the host cell membrane which is mediated by a machinery composed of membrane proteins that work together for the interaction with host receptors. Until now, the following seven reported baculovirus *pif* genes have been identified: *p74* or *pif0* (Kuzio et al., 1989),

*pif1* (Kikhno et al., 2002), *pif2* (Pijlman et al., 2003), *pif-3* (Li et al., 2007), *pif4* (Fang et al., 2009), *pif5* (Sparks et al., 2011) and *pif6* (Nie et al., 2012). These genes are expressed late during the infection and are conserved among all sequenced baculovirus and nudivirus (Wang et al., 2011).

The products of *pif* genes have been detected only in the envelope of ODV particles and are essentials for the infection of midgut cells (Gutiérrez et al., 2004; Kuzio et al., 1989; Kikhno et al., 2002). These proteins have hydrophobic signal sequences for nuclear localization at their N-terminal regions that are rich in valines, isoleucines and leucines (Li et al., 2007).

The present work aimed the study of the genetic diversity and the stability of AgMNPV *pif* genes (*pif1*, *pif2*, *pif3* and *pif4*) geographical isolates, from different regions of South America, as well as of seasonal isolates, collected during twenty years of field application.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Virus Isolates*

Twenty-nine field isolates of AgMNPV originated from South America were used (Table 1). Twenty-one samples are seasonal virus isolates derived from successive annual application/collection in the same field area. The first isolate was collected in 1979 (AgMNPV-79) in Londrina – Paraná State (Brazil). In 1984, this isolate (Ag79) was applied once in a delimited area of soybean plantation in Londrina and after one year, dead larvae by viral infection were collected and stored (-20°C). This procedure was sequentially carried out during twenty years (1984/85 to 2002/03 seasons). The isolates utilized in this study are stored at -20°C in the Insect Virus Collection of the

Insect Virology Laboratory, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Brazil.

The Geographic viral isolates used in this study were originated from South, Southeast and Midwest Brazil, and two isolates from Argentina and Uruguay. These isolates were collected on Eighty and Ninety decades (Souza et al., 2001; Souza et al., 2005).

### *2.2. Purification of OBs and DNA extraction*

Infected larvae of each isolate were macerated in homogeneity buffer (ascorbic acid 1%; SDS 2%; Tris-HCl 0,01M, pH 7, 8; EDTA 0,001M) according to Maruniak, 1986. The macerate was filtered through layers of gauze and the extract containing OBs was centrifuged at 10,000 x g for 15min at 4°C. The pellet was re-suspended in 1M NaCl and centrifuged as above. The resulting pellet was then re-suspended in 0.5% SDS, centrifuged as above and the final pellet resuspended in deionized water (MilliQ H<sub>2</sub>O). To allow nucleocapsids release from OBs and for DNA purification, the OBs were treated with a solution of 1M Na<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>, pH 10 and Proteinase K (100 µg/mL), overnight. To extract the viral DNA, phenol:chlorophorm:isoamyl alcohol (25:24:1) two cycles were carried out with centrifugations at 12,000 x g for 5 min at 4°C between each cycle, according to O'Reilly et al (1992),. The DNA was precipitated in a solution containing 2.5 x the initial volume of ethanol 100% and 1/10 of the initial volume of sodium 3M acetate overnight, centrifuged as above, washed with ethanol 70%, resuspended in milliQ H<sub>2</sub>O and stored at 4°C for further analysis.

### *2.3. PCR and pif genes sequencing*

Four *pif* genes (*pif1*, *pif2*, *pif3* e *pif4*) were amplified by PCR using oligonucleotides designed based on the AgMNPV isolated 2D genome sequence (GenBank accession

---

number NC\_008520) and are listed in Table 2. The Oligonucleotide primers utilized in this study have an *attB* region because they were also used for heterologous expression in *Escherichia coli* using the Gateway system from Invitrogen (data not shown).

The PCR reactions contained viral DNA template (20 ng), two primers (0,4μM), dNTP (0,1 mM each one), MgSO<sub>4</sub> (0,02mM), 2,5U of *Taq* Platinum High Fidelity (Invitrogen) and 1X of enzyme buffer in a final volume reaction of 50μL. Amplification steps were: 94°C/2min, followed by 35 cycles at 94°C/30s, 68°C/30s, 72°C/1min and 72°C/10min for final extension (Esco Healthcare SwiftPro). PCR products were treated with ExoSAP-IT enzyme (USB) according to the manufacturer's specifications to remove dNTP, primers and DNA template. Sequencing reactions were performed at Macrogen Inc. (Seoul, Korea) by Sanger ABI 3730XLs.

#### 2.4. Computational Analysis

Sequence data were edited with ChromasPro v.1.7.5 software (Technelysium Pty Ltd) and assembled with Geneious<sup>®</sup> R6 v.6.1.6 software (Biomatters Ltd) and submitted to GenBank (Table 1). The ambiguous bases found in each isolate sequence were identified according to IUPAC (*IUB Symbols for Nucleotide Nomenclature* – Cornish-Bowden, 1985) nomenclature, where M = A/C; R = A/G; W = A/T; S = C/G; Y = C/T and K = G/T. The SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) considered were two peaks at the same base in both forward and reverse sequences and also one base in the forward sequence and another different base in reverse sequence in the same site. The consensus sequence of each isolate were aligned to detect substitutions like transition (A - G or C - T) or transversion (A - C, C - G, A - T) and if these SNP found caused changes in protein sequences (non-synonymous substitutions). The genetic variability was analyzed by DNASP version 5 (Librado and Rozas, 2009). The transmembrane domain and

---

orientation of PIFs were predicted by TMHMM server

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Analysis of *pif* genes sequences

Baculovirus populations in the field are genetically heterogeneous (Simón et al., 2006), conferring higher genetic variability. It is known that within these populations, mutant genotypes are generated during viral replication. Some of these mutants show deletions in essential genomic regions (structural or regulatory genes) responsible for viral persistence in nature and for its *peroral* transmission capacity (López-Ferber et al., 2003; Simón et al, 2004; Simón et al., 2005). The goal of the present study was to analyze the genetic diversity of different field AgMNPV isolates, based on genes that codes for proteins essential for oral infection. PCR amplification of the partial *pif* genes of all isolates resulted in DNA fragments of 1,655 bp (*pif1*), 1,205 bp (*pif2*), 681 bp (*pif3*) and 587 bp (*pif4*), respectively (Table 2). Rowley and collaborators (2011) have done a study with the goal to identify genetic variation and relationships maintained among NPVs found in 90 samples of *Helicoverpa armigera*, *H. zea* and *Heliothis virescens* larvae, based on the analysis of partial sequences of *lef-8*, *lef-9* e *polh* genes. They identified 67 samples containing isolates of the *H. zea* SNPV and *H. armigera* SNPV species group, eighteen samples containing NPV isolates from *H. armigera*, MNPV and five samples containing isolates of *Autographa californica* MNPV. Their results showed variation on the heliothine NPV populations and provides information on the distinct groups in which the NPVs occurs.

The AgMNPV *pif* sequences obtained from each isolate were aligned and a consensus sequence was obtained. AgMNPV isolates were analyzed in two groups,

---

Seasonals (including all 21 seasonal isolates and the reference virus, AgMNPV-2D) and Geographics (eight geographic isolates and AgMNPV-2D). Eletropherograms were analyzed looking for insertions and deletions, as well as polymorphic sites revealing the presence of distinct genotypes in the same isolate (Fig. S1).

Table 3 shows all SNPs found in the isolates *pif* sequences. The *pif1* gene sequences showed polymorphisms in the seasonals isolates sequences 84/85, 92/93, 94/95, 95/96, 97/98 and 98/99, being the isolates 92/93 and 98/99 with the most variable among them (five and six SNPs, respectively). A total of 16 SNPs were found, 12 are non-synonymous, but six of them modify the amino acid group as noted in 98/99 where there was a C to T transition (nucleotide position 818) changing a Thr that is a polar amino acid to Met that is non-polar. In the Argentina geographic isolate a C to A transversion was found that changed the amino acids (Asp to Glu). In the Ag-Urug isolate we found three transitions and one is non-synonymous (changes Val to Met), both changes did not change the amino acid group. The amount of substitutions found in all *pif* genes sequences and their effect on sequences proteins, can be observed in Figure S2.

The *pif2* gene sequences for the seasonal isolates showed more variable results regarding the appearance of polymorphisms. Some SNPs appeared in a specific season and in the next season were no longer observed and after some seasons the same SNPs were again detected. Were detected 19 SNPs in seasonal isolates and 16 in geographic isolates. All isolates, seasonal and geographic showed polymorphic sites in common (in a total of 11 sites). From the five non-synonymous SNPs found, three changed amino acids properties. Nucleotide at position 575 had a transition T to a C in the 94/95, changing a non-polar Leu amino acid to Phe that is aromatic. In Geographic isolates, 16 SNPs found were non-synonymous, and all of them changed amino acid properties. Ag-

---

PF showed the majority quantity of SNPs, 11 of 16 observed. This isolate was associated with the observed low virulence to *Anticarsia gemmatalis* in the 1993/94 season. Although laboratory bioassays showed no difference in virulence of this virus when compared with the wild type virus (Berino, 1995).

The *pif3* gene sequences showed five SNPs in the seasonal isolates sequences, three of which were non-synonymous. In geographical isolates, just two SNPs were found. One of them in the Ag-Arg isolate gene with a G to C transversion at nucleotide position 591, changing Leu (apolar) to Phe (aromatic). The *pif4* gene showed four SNPs in seasonal isolates and two in geographical isolates. The isolates 93/94 and Ag-Ibip showed a Asp to Asn change due G to A transition at nucleotide position 328 position. The Ag-Ibip had a substitution like transversion (A to C) at nucleotide position 173 causing a Glu to Ala change.

Yang (2001) comment that these non-synonymous nucleotide substitutions in NPV genes may lead to changes in the activity of the encoded protein that might facilitates adaptation to a new host species, or are responsible to overcome host defenses. Such mutations could confer a fitness advantage and would be expected to be fixed in the population at a higher rate than synonymous (silent) substitutions, which are generally invisible to natural selection. These SNPs found in the *pif* sequences of the different isolates analyzed in this work show the distribution of diversity along each *pif* gene. Figure 1 shows the distribution of SNPs along the four *pif* genes and clearly, the *pif2* and *pif4* genes were the most and the least variable genes, respectively.

Souza et al. (2001) had performed a genetic diversity study with seasonal isolates 1984 to 1997 of AgMNPV applied in the field using RFLP analyses. The total DNA restriction profile of twelve isolates were compared to the original inoculum applied in 1979 (Ag-79) and submolar bands indicated the presence of different

---

genotypes in each sample and changes in the isolates DNA restriction profile were observed over time..

The transmembrane domains predicted for the *pif* genes are 20 amino acids long approximately, all located at the N-terminal region that remained conserved in all isolates (Fig. 1). The nucleotide diversity was also analyzed for two viral isolate groups (Fig. 2) and as can be observed, the *pif2* gene has a greater amount of polymorphic sites than the others *pif* genes analyzed. Although *pif2* gene was found to be more variable among the four genes, the amount of SNPs observed in this gene and in the other four genes is much lower when compared to studies of genetic diversity in individual genes in other baculovirus species. In a recent study with *Pseudoplusia includens* SNPV (Craveiro et al., 2013) found 158 polymorphisms in *pif2* genes of seven geographical field isolates from different localities in Brazil and Guatemala. Simón et al. (2011) have shown that *pif3* and *odv-e66a* genes are at positive selection in *Spodoptera frugiperda* MNPV field populations.

The study of the seasonal isolates shown in this work helped us to understand the genetic stability of genes involved in AgMNPV *per os* infection during 20 years of virus application in the field. Many reports have shown high genetic diversity among genotypes within a field population of the same virus and even among isolates (Graham et al., 2004; Cory et al., 2005; Eberle et al., 2009; Espinel-Correal et al., 2010; Clavijo et al., 2010; Baillie and Bower, 2011; Rowley et al., 2011). This study, on the other hand, did not show significant variations in gene sequences of viral proteins that are essential for maintenance of the virus in field.

Since the cost of sequencing is going down significantly in the last few years, the next step in understanding the genetic variability of baculovirus after several cycles

of replication in their hosts in the field, will be the analysis of the whole genome sequence of these isolates.

### **Acknowledgments**

The authors thank Dr. Tatsuya Nagata (University of Brasília – Brazil) for sending samples to sequence in Korea. This work was supported by EMBRAPA and CNPq.

### **References**

- Baillie, V. L., Bouwer, G., 2012. High levels of genetic variation within core *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus genes. *Virus Genes*. 44, 149–162.
- Berino, E., 1995. Determinação da atividade biológica de isolados geográficos e temporais de VPN de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lep., Noctuidae). 65p. Dissertation – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
- Clavijo, G., Williams, T., Muñoz, D., Caballero, P., López-Ferber, M. 2010. Mixed genotype transmission bodies and virions contribute to the maintenance of diversity in an insect virus. *Proc. R. Soc. B*. 277, 943–951.
- Clavijo, G., Williams, T., Simón, O., Muñoz, D., Cerutti, M., López-Ferber, M., Caballero, P., 2009. Mixtures of complete and *pif1*- and *pif2* deficient genotypes are required for increased potency of an insect *Nucleopolyhedrovirus*. *J. Virol.* 83. 5127–5136.
- Cornish-Bowden, 1985. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Res.* 13, 3021–3030.

- 
- Cory, J. S. and Myers, J. H., 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34, 239–72.
- Cory, J. S., Green, B. M., Paul, R. K., Hunter-Fujita, F., 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *J. Invertbr. Pathol.* 89, 101–111.
- Craveiro, S. R., Melo, F. L., Ribeiro, Z. M. A., Ribeiro, B. M., Bao, S. N., Inglis, P. W., Castro, M. E. B., 2013. *Pseudoplusia includens* single nucleopolyhedrovirus: genetic diversity, phylogeny and hypervariability of the *pif-2* gene. *J. Invert. Pathol.* 114, 258-267.
- Eberle et al., 2009; Eberle, K.E., Sayed, S., Rezapanah, M., Shojai-Estabragh, S., Jehle, J.A., 2009. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella granulovirus*. *J. Gen. Virol.* 90, 662-671.
- Espinel-Correal, Espinel-Correal et al., 2010; C., Lery, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddami, J. L., Cotes, A. M., López-Ferber, M., 2010. Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* Granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *App. Environ. Microbiol.* 76, 7617–7625.
- Fang, M., Nie, Y., Harris, S., Erlandson, M. A., Theilmann, D. A., 2009. *Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus core gene *ac96* encodes a *per os infectivity factor* (*pif-4*). *J. Virol.* 83, 12569–12578.
- Graham, R. I., Tyne, W. I., Possee, R. D., Sait, S. M., Hails, R. S., 2004. Genetically variable nucleopolyhedroviruses isolated from spatially separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) in Orkney. *J. Invert. Pathol.* 87, 29–38.
-

- 
- Gutiérrez, S., Kikhno, I., Lopez Ferber, M., 2004. Transcription and promoter analysis of *pif*, an essential but low-expressed baculovirus gene. *J. Gen. Virol.* 85, 331-341.
- Kikhno, I.; Gutierrez, S.; Croizier, L.; Croizier, G.; López-Ferber, M., 2002. Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis nucleopolyhedrovirus*. *J. Gen. Virol.* 83, 3013–3022.
- Kuzio, J., Jacques, R., Faulkner, P., 1989. Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* 173, 759-763.
- Lauzon, H. A. M., Lucarotti, C. J., Krell, P. J., Feng, Q., Retnakaran, A., Arif, B. M., 2004. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* Nucleopolyhedrovirus genome. *J. Virology*. 78, 7023-7035.
- Li, X.; Song, J.; Jiang, T.; Liang, C.; Chen, X., 2007. The N-terminal hydrophobic sequence of *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* PIF-3 is essential for oral infection. *Arch. Virol.* 152, 1851–1858.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA 571 polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., Caballero, P., 2003. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270, 2249–2255.
- Maruniak, J. E. 1986 Baculovirus structural proteins and protein synthesis, in: Granados, R. R.; Federici, B. A. (Eds), *The biology of baculoviruses*: Boca Raton: CRC, pp. 129-146.
- Moreau, G. and Lucarotti, C. J., 2007. A brief review of the past use of baculoviruses for the management of eruptive forest defoliators and recent developments on a sawfly virus in Canada. *Forest. Chron.* 83, 105 – 112.
-

- 
- Moscardi, F., Souza, M.L., Castro, M.E.B., Moscardi, M.L., Szewczyk, B., 2011. Baculovirus Pesticides – Present State and Future Perspectives, in: Ahmad et al (Eds), *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*, Springer Science+Business Media, pp. 415-445.
- Nie, Y., Fang, M., Erlandson, M. A., Theilmann, D. A., 2012. 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.* 86, 3985-3994.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K., Luckow, V. A., 1992. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*, W. H Freeman and Company, New York.
- Oliveira, J. V. C.; Wolff, J. L. C.; Garcia-Maruniak, A.; Ribeiro, B. M.; Castro, M. E. B.; Souza, M. L.; Moscardi, F.; Maruniak, J. E.; Zanotto, P. M. A., 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 87, 3233–3250.
- Pijlman, G. P., Pruijssers, A. J. P.; Vlak, J. M., 2003. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects. *J. Gen. Virol.* 84, 2041–2049.
- Rowley, D.L., Popham, H.J., Harrison, R.L., 2011. Genetic variation and virulence of 606 nucleopolyhedroviruses isolated worldwide from the heliothine pests *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* 107, 112-126
- Simón, O., Palma, L., Beperet, I., Muñoz, D., López-Ferber, M., Caballero, P., Williams, T., 2011. Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates: Detecting positively selected genes. *J. Invert. Pathol.* 107, 33–42.
-

- 
- Simón, O., Williams, T., Caballero, P., López-Ferber, M., 2006. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. *Proc. R. Soc.* 273, 783–790.
- Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2005. Functional importance of deletion mutants genotypes in an insect *nucleopolyhedrovirus* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4254–4262.
- Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P.; López-Ferber, M., 2006. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. *Proc. R. Soc.* 273, 783–790.
- Simón, O.; Williams, T.; López-Ferber, M.; Caballero, P. (2004) Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus* population: high prevalence of deletion genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5579–5588.
- Souza. M. L., Castro, M. E. B., Barros, A. M., Sihler, W., Moscardi, F., 2001. Análise de DNA de isolados temporais do Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* utilizados no controle da lagarta da soja no Brasil. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 14 . Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 16 p.
- Souza, M.L, Moscardi, F., Sihler,W., Ribeiro, Z.M.A, Castro, M.E.B, 2005, Levantamento e Perspectivas de Uso das Coleções de Vírus de Insetos Existentes no País e no Mundo, 09 p., Circular Técnica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 44, 09 p.
- Sparks, W. O., Harrison, R. L., Bonning, B. C., 2011. *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* ODV-E56 is a *per os* infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut. *Virol.* 409, 69–76.

- Wang *et al.*, 2011 Wang, Y., Choi, J. Y., Roh, J. Y., Liu, Q., Tao, X. Y., Park, J. B., Kim, J. S., Yeon, H. J., 2011. Genomic sequence analysis of Granulovirus isolated from the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura*. PLoS One. 6, 1-10.
- Yang, Z., 2001. Adaptive molecular evolution, in: Balding, D., Bishop, M., Cannings, C. 662 (Eds.), Handbook of Statistical Genetics. Wiley, London. pp. 327-350.