

BC/27022
IB/80474



UNICAMP

T/UNICAMP

G165_e

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO
VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE**
Anticarsia gemmatalis

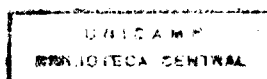
ALEJANDRA MARIA GLADYS GARCIA-CANEDO

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA

ORIENTADOR: PROFESSOR DR. OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA PAVAN

CAMPINAS - SÃO PAULO

1995





CM-00084608-0

UNIDADE	SB
Nº CHAMADA:	
V.	
TCM	27022
PROJ.	60796
P.	
P.	11,50
P.	13/3/96
P.	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G165e Garcia-Canedo, Alejandra Maria Gladys
Estudo da variabilidade genética do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia Gemmatalis* / Alejandra Maria Gladys Garcia-Canedo. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Octavio Henrique de Oliveira Pavan.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Baculovirus. 2. Variação (Biologia). 3. Genética.
I. Pavan, Octavio Henrique de Oliveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 13 de Dezembro de 1995

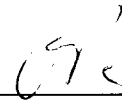
Este exemplar entregue à redação final
da tese de doutorado do candidato a)
*Alexandra Maria Gladys Gar-
cia - Camelo.*
e aprovada pela Comissão Julgadora.

13/12/95

BANCA EXAMINADORA

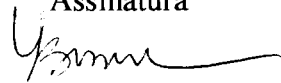
TITULARES:

Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan (Orientador)



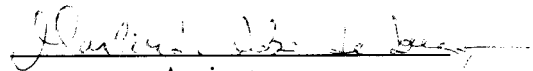
Assinatura

Dra. Yoko Bomura Rosato



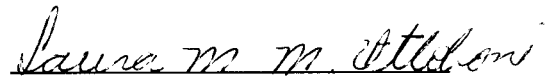
Assinatura

Dra. Marlinda de Lobo Souza



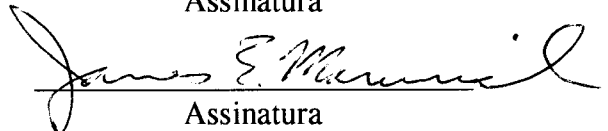
Assinatura

Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni



Assinatura

Dr. James Edward Maruniak



Assinatura

SUPLENTES:

Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin

Assinatura

APROVADA

"Cuando la vida se te muestre esquiva,
y todos los caminos cuesta arriba.

Cuando al reir te brote el llanto,
y cuando ya no puedas llevar carga.

Descansa en el camino, mas no cedas!"

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan pela ajuda incondicional prestada ao longo destes anos através da distância e pela confiança depositada na minha capacidade profissional.

To Dr. James Edward Maruniak for his tremendous help, his patience, for sharing his knowledge and his laboratory with me and specially for his precious friendship.

Às Professoras Dra. Yoko Bomura Rosato, Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni e Dra. Anete de Souza Pereira pelo tempo dedicado no exame prévio desta tese contribuindo com valiosas críticas e sugestões.

À Dra. Marlinda Lobo de Souza, e Dra. Ana Maria de Azeredo-Espin por sua disposição e gentileza na participação do julgamento deste trabalho de tese.

Aos amigos da Universidade da Flórida: Liu, Rejane, Bettina, Raquel, Margaret e Owain pelo coleguismo sincero que permitiram que o ambiente de trabalho fosse de total camaradagem formando uma grande família internacional. Thank you very much, my friends!!!

Aos meus queridos amigos de sempre, Cris, Guerreiro e Helena pela força e todo o apoio que me deram desde a minha volta a Campinas.

Ao tio Hugo pela correção gramatical da tese e por ser, junto com a tia Ondina, o centro da minha "família Brasileira".

Aos meus pais e irmãos que estão sempre tão perto de mim mesmo existindo milhares de quilômetros entre nós.

Aos professores Dr. Glenn Hall, Dr. Drion Boucias e Dr. Jerry Stimac, pela utilização dos seus equipamentos e laboratórios quando necessário.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

ABREVIACÕES UTILIZADAS

AcMNPV	=	<i>Autographa californica</i> MNPV
AgMNPV	=	<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV
ARV	=	"alkali-released virus" = virions liberados por alcalinidade
BmNPV	=	<i>Bombyx mori</i> NPV
BV	=	"budded viruses" = vírus brotado
CfMNPV	=	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV
Da	=	Daltons
DNA Pol	=	DNA polimerase
<i>dnapol</i>	=	gene da DNA polimerase
ECV	=	"extracellular virus" = vrus extracelulares
<i>egt</i>	=	gene da ecdisteride UDP-glicosiltransferase
FP	=	"few polyhedra" = mutante "poucos poliedros"
<i>fp25</i>	=	gene relacionado com o fentipo FP. Proteína de 25kDa
GV	=	"granulosis virus" = vrus de granulose
<i>gp41</i>	=	gene da glicoproteína de 41 kDa
<i>gp64</i>	=	gene da glicoproteína de 64 kDa
h.a.i.	=	horas após infecção
<i>hel</i>	=	gene da helicase
hr	=	"homologous regions" = regiões homólogas
<i>IE-0</i>	=	"immediate early 0 gene" = gene precoce imediato 0

<i>IE-1</i>	=	"immediate early 1 gene" = gene precoce imediato 1
kDa	=	1000 Da
Kpb	=	1000 pb
LdMNPV	=	<i>Lymantria dispar</i> MNPV
MNPV	=	"multiple nuclear polyhedrosis virus" = vírus de poliedrose nuclear do tipo múltiplo
mRNA	=	"messenger RNA" = RNA mensageiro
NOV	=	"non-occluded virus" = vírus não oclusos
NPV	=	"nuclear polyhedrosis virus" = vírus de poliedrose nuclear
OpMNPV	=	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV
ORF	=	"open reading frame" = quadro de leitura
ORI	=	origem de replicação do DNA
OV	=	"occluded virus" = vírus oclusos
pb	=	pares de bases
<i>pcna</i>	=	"proliferating-cell nuclear antigen" = antígeno nuclear de células em proliferação
PDV	=	"polyhedrosis-verived virus" = vírus derivado do poliedro
PI	=	fase precoce imediata de transcrição viral
<i>polh</i>	=	gene da poliedrina
PT	=	fase precoce tardia de transcrição viral
<i>p10</i>	=	gene da proteína de 10 kDa
<i>p35</i>	=	gene da proteína de 35 kDa

<i>p74</i>	=	gene da proteína de 74 kDa
RNA Pol	=	RNA polimerase
SDS-PAGE	=	"sodium duodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis" = gel de electroforese SDS-poliacrilamida
SfMNPV	=	<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV
SNPV	=	"single nuclear polyhedrosis virus" = vírus de poliedrose nuclear do tipo simples
T	=	fase tardia de transcrição
TH	=	fase tardia hiperexpressa de transcrição
TnMNPV	=	<i>Trichoplusia ni</i> MNPV
tRNA	=	"transport RNA" = RNA transportador
vp39	=	"viral protein 39" = proteína viral de 39kDa

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
ABREVIATÖES UTILIZADAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Baculovírus	3
3.1.1 Morfologia e classificação	4
3.1.2 Ciclo de infecção viral	7
3.1.3 Organização gênica dos baculovírus	9
3.1.3.1 Genes não essenciais	10
3.1.3.2 Genes relacionados com oclusão viral	11
3.1.3.3 Genes codificadores de proteínas estruturais	12
3.1.3.4 Genes envolvidos na replicação do DNA viral ..	12
3.1.3.5 Genes relacionados com função celular	13
3.1.3.6 Genes reguladores	13
3.1.4 Expressão gênica nos baculovírus	13
3.1.4.1 Transcrição dos genes precoce imediatos	14
3.1.4.2 Transcrição dos genes precoce tardios	15
3.1.4.3 Transcrição dos genes tardios	15
3.1.4.4 Transcrição dos genes tardios hiperexpressos ...	16
3.1.4.5 Regiões homólogas (hrs)	17
3.1.5 Variantes genômicos	21
3.2 Vírus de poliedrose nuclear de <i>Anticarsia gemmatalis</i> (AgMNPV)	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Vírus	27

4.2	Insetos	27
4.3	Células de inseto	28
4.4	Bactérias	28
4.5	Plasmídeos	28
4.6	Infecção viral de larvas e células de inseto	28
4.7	Purificação de poliedros a partir de larvas infectadas	29
4.8	Extração do DNA viral a partir de poliedros	33
4.9	Purificação de vírus extracelular (ECV) a partir de culturas infectadas	33
4.10	Titulação viral através do método da diluição final	35
4.11	Extração do DNA viral a partir de células infectada (microextração)	35
4.12	Construção da biblioteca genômica do AgMNPV	36
4.13	Marcação radioativa do DNA viral	39
4.14	Construção do mapa físico do genoma do AgMNPV com PstI e SmaI	39
4.15	Southern blots	41
4.16	Mapeamento das regiões variáveis do genoma do AgMNPV	41
4.17	Análise da divergência genômica dos variantes genéticos do AgMNPV	42
4.18	Avaliação da capacidade de replicação dos isolados genéticos <i>In Vitro</i>	43
4.19	Clonagem de uma região variável do AgMNPV-2D e AgMNPV-D7	44
4.20	Sequenciamento de uma região variável do genoma do AgMNPV	44
4.21	Análise das sequências de DNA	45
5.	RESULTADOS	47
5.1	Construção da biblioteca genômica do AgMNPV-2D	47
5.2	Construção do mapa físico do genoma do AgMNPV-2D com as enzimas PstI e SmaI	47
5.3	Comparação dos perfis de restrição dos variantes genéticos obtidos dos isolados AgMNPV-'79, AgMNPV-'85 e AgMNPV-D7	52
5.4	Mapeamento das regiões variáveis do genoma do AgMNPV	61
5.5	Análise da divergência dos variantes genômicos do AgMNPV	66
5.6	Replicação dos variantes genômicos do AgMNPV	66
5.7	Análise de uma região altamente variável no genoma do AgMNPV	71
5.8	Sequenciamento de uma região altamente variável no genoma do AgMNPV	74
5.9	Sequências repetitivas numa região altamente variável do genoma do AgMNPV	77

6. DISCUSSÃO	81
6.1 Caracterização e mapeamento das regiões variáveis	81
6.2 Análise da divergência dos variantes genéticos	83
6.3 Replicação viral dos variantes genômicos	84
6.4 Análise de uma região altamente variável	86
7. CONCLUSÕES	89
8. RESUMO	91
9. SUMMARY	94
10. APÊNDICES	
APÊNDICE 1. Número de células semeadas para manutenção e infecção viral	97
APÊNDICE 2. Manutenção de cultura de células de inseto	99
APÊNDICE 3. Purificação de poliedros a partir de larvas infectadas	100
APÊNDICE 4. Extração de DNA a partir de poliedros	101
APÊNDICE 5. Purificação de vírus extracelulares (ECV)	102
APÊNDICE 6. Titulação viral pelo método da diluição final	103
APÊNDICE 7. Microextração de DNA viral a partir de células infectadas	104
APÊNDICE 8. Transformação de <i>Escherichia coli</i>	105
APÊNDICE 9. Mini preparação de plasmídeos a partir do método da fervura	106
APÊNDICE 10. Mini preparação de plasmídeos a partir do método alcalino	107
APÊNDICE 11. Identificação de colônias recombinantes a partir do método da hibridização <i>in situ</i>	108
APÊNDICE 12. Hibridização de sondas de DNA	109
APÊNDICE 13. Desibridização de membranas de nylon para posterior re-hibridização	110
APÊNDICE 14. Extração de fragmentos de DNA de géis de agarose	111
APÊNDICE 15. Marcação do DNA através do método "nick translation"	112
APÊNDICE 16. Marcação do DNA através do método "end-labeling"	113
APÊNDICE 17. Transferência alcalina do DNA de géis de agarose a membranas de nylon (southern blot).	114
APÊNDICE 18. Geração de clones com deleções superpostas utilizando o kit "erase-a-base"	115

APÊNDICE 19. Preparação do "template" de fita simples a partir de "phagemids" da série pGEM Zf	118
APÊNDICE 20. Sequenciamento de DNA pelo método "dideoxy chain termination"	120
APÊNDICE 21. Preparação de gel de acrilamida para sequenciamento de DNA	122
APÊNDICE 22. Análise das sequências de DNA utilizando o Pacote de Programas GCG	125
APÊNDICE 23. Obtenção de sequências homólogas provenientes do banco de dados genômico utilizando os programas BLAST e FARFETCH	128
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

ÍNDICE DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>página</u>
TABELA 1. Características estruturais dos baculovírus	6
TABELA 2. Tamanho dos fragmentos do genoma do AgMNPV-2D digerido com 7 enzimas de restrição	50
TABELA 3. Sítios de restrição, posição dos sítios em pares de bases e em porcentagem do genoma e tamanho dos fragmentos obtidos com 7 enzimas de restrição no genoma do AgMNPV-2D	53
TABELA 4. Tipo de variação encontrada nos diferentes isolados genéticos do AgMNPV em relação ao protótipo AgMNPV-2D.	65
TABELA 5. Análise da capacidade de replicação dos variantes genéticos do AgMNPV-'79 em duas linhagens celulares de inseto a partir do valor do TCID ₅₀	69
TABELA 6. Análise da capacidade de replicação dos variantes genéticos do AgMNPV-'85 em duas linhagens celulares de inseto a partir do valor do TCID ₅₀	70
TABELA 7. Análise da capacidade de replicação dos variantes genéticos do AgMNPV-D7 e AgMNPV-2D em duas linhagens celulares de inseto a partir do valor do TCID ₅₀	72
TABELA 8. Comparação da identidade de nucleotídeos entre a sequência palindrômica consenso do AgMNPV com as sequências palindrômicas das regiões homólogas (hr) de outros baculovírus	80

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>página</u>
FIGURA 1. Células de <i>Spodoptera frugiperda</i> (SF-9)	30
FIGURA 2. Células de <i>Trichoplusia ni</i> (TN-368)	31
FIGURA 3. Purificação de poliedros em gradiente de sacarose	32
FIGURA 4. Bandeamento em gradiente de sacarose dos virions contendo diferente número de nucleocapsídeos por envelope	34
FIGURA 5. Banco genômico do AgMNPV-2D	48
FIGURA 6. Representação circular do mapa genômico do AgMNPV-2D com sete enzimas de restrição	51
FIGURA 7. Perfis de restrição dos variantes genômicos do AgMNPV-'79, digeridos com HindIII ou PstI	55
FIGURA 8. Perfis de restrição dos variantes genômicos do AgMNPV-'85, digeridos com HindIII ou PstI	56
FIGURA 9. Comparação dos perfis de restrição dos variantes AgMNPV-2D (2D) e AgMNPV-D7 (D7) digeridos com HindIII, PstI, EcoRI, BamHI e SmaI	58
FIGURA 10. Representação esquemática dos fragmentos variáveis dos variantes genômicos do AgMNPV após digestão com HindIII	59
FIGURA 11. Representação esquemática dos fragmentos variáveis dos variantes genômicos do AgMNPV após digestão com PstI	60
FIGURA 12. Representação esquemática das variações detectadas no genoma dos variantes genéticos do AgMNPV	62
FIGURA 13. Fenograma de 17 variantes do AgMNPV obtidos a partir do método do "neighbor-joining"	67

FIGURA 14. Comparação da região variável localizada no AgMNPV-2D e AgMNPV-D7	73
FIGURA 15. Comparação da sequência de nucleotídeos da região variável PstI-T de dois variantes genéticos do AgMNPV	75
FIGURA 16. Representação linear dos fragmentos PstI-T e PstI-T' dos variantes AgMNPV-2D e AgMNPV-D7 respectivamente	76
FIGURA 17. Sequências repetitivas do AgMNPV-2D	78

1. INTRODUÇÃO

Os baculovírus são os vírus entomopatogênicos melhor estudados tanto do ponto de vista biológico como molecular devido a seu potencial como agentes de controle biológico e como vetores de expressão de genes exógenos. Atualmente existe um grande interesse em se conhecer os mecanismos genéticos responsáveis pelas variações na especificidade e virulência destes patógenos. A avaliação da diversidade, seja entre diferentes tipos de baculovirus ou dentro de um mesmo isolado viral, tem revelado a existência de uma grande variabilidade genética. A análise desta variabilidade é uma fonte de informação que pode ser utilizada para modificá-los e melhorá-los geneticamente.

O vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) tem sido utilizado como inseticida viral em grandes áreas do território Brasileiro para controlar a lagarta da soja, *A. gemmatalis*. O monitoramento sistemático da variabilidade genética, naturalmente encontrada em diferentes isolados de AgMNPV, constitui uma linha de pesquisa essencial para o sucesso do programa de controle biológico. No presente trabalho, variantes genotípicos de AgMNPV foram analisados, regiões variáveis foram detectadas, mapeadas e comparadas. Uma dessas regiões foi detalhadamente analisada.

2. OBJETIVOS

O baculovírus de *A. gemmatalis* é utilizado como inseticida viral em grandes áreas do território brasileiro. O monitoramento constante das variações naturalmente ocorridas no seu genoma é indispensável para assegurar o sucesso do programa. Além disso, o estudo da variabilidade genotípica pode evidenciar quais os mecanismos responsáveis pela virulência e especificidade.

No presente trabalho foram analisados 18 variantes genéticos do AgMNPV. As regiões variáveis foram localizadas no genoma viral, cujo mapeamento foi estendido para um total de 7 enzimas e 82 sítios de restrição. Os objetivos foram:

- 1) Localizar as variações genotípicas de variantes do AgMNPV.
- 2) Avaliar a capacidade de replicação destes variantes genotípicos em dois tipos de células de inseto em cultura.
- 3) Verificar a existência de correlação entre variação genotípica e replicação viral.
- 4) Comparar a dinâmica de diferenciação de dois isolados virais coletados em anos e condições diferentes.
- 5) Analisar detalhadamente uma região altamente variável no genoma viral a partir do sequenciamento e comparação de dois variantes genotípicos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Baculovírus

Os baculovírus são vírus altamente específicos que infectam artrópodes, principalmente os insetos das ordens Lepidóptera, Himenóptera e Díptera. Mais de 600 espécies de insetos têm sido encontradas naturalmente infectadas por baculovírus. Artrópodos das classes Crustácea (Summers, 1977; Machado, 1993) e Arachnida (Crawford & Granados, 1982) também foram descritos apresentando infecções por baculovírus. Geralmente cada tipo de baculovírus infecta somente uma única espécie de inseto ou então espécies relacionadas. Poucos são os exemplos nos quais um único tipo de baculovírus é capaz de infectar vários insetos pertencentes a diferentes famílias (Pavan *et al.*, 1981; Groner, 1986). Esta alta especificidade tem permitido que os baculovírus sejam considerados agentes de controle microbiano contra insetos-praga de interesse agrícola, principalmente os Lepidópteros (Tinsley, 1979; Alves, 1986; Moore *et al.*, 1987). No entanto, a sua especificidade pode ser também motivo de crítica por parte dos agricultores, cujas plantações são infectadas por vários tipos de insetos. Assim sendo, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas para poder compreender quais são os mecanismos genéticos que levam estes vírus a terem uma maior ou menor especificidade ou virulência. Uma forma rápida de introduzir modificações genéticas que pudessem aumentar o espectro e/ou velocidade de atuação dos baculovírus, é a utilização da

tecnologia do DNA recombinante e dos vetores de expressão. O primeiro baculovírus, assim modificado, expressou uma toxina de escorpião específica para insetos (Carbonell *et al.*, 1988). Desde então várias toxinas, hormônios, e enzimas de inseto têm sido expressos em baculovírus (Bonning & Hammock, 1992). No entanto, a aplicação no campo destes vírus recombinantes é muito restrita pelas agências de controle ambiental.

3.1.1 Morfologia e Classificação

Os baculovírus caracterizam-se por apresentar virions contendo um ou vários nucleocapsídeos em forma de bastão, envoltos por uma membrana lipoprotéica ou envelope. O tamanho do nucleocapsídeo pode variar de 40 a 60 nm de diâmetro e de 200 a 400 nm de comprimento (Matthews, 1982). O comprimento do capsídeo pode se estender para acomodar genomas maiores como aqueles de baculovírus recombinantes carregando longos insertos (Fraser, 1986). Os precursores dos nucleocapsídeos consistem em longos capsídeos com DNA, que são separados para formar o nucleocapsídeo típico (Summers, 1971; Hughes, 1972). Os nucleocapsídeos diferem morfológicamente nas suas duas extremidades, sugerindo a existência de polaridade para a orientação do mesmo durante as fases de fixação e penetração através do poro nuclear (Summers, 1971; Kawamoto *et al.*, 1977). O genoma dos baculovírus consiste em DNA circular de dupla hélice que varia de 80 a 220 mil pares de bases (kpb) (Miller, 1984).

A família Baculoviridae é subdividida em duas sub-famílias (Francki *et al.*, 1991):

- 1) Eubaculovirinae com dois gêneros, nos quais os virions encontram-se oclusos num cristal proteico ou corpo de inclusão; os Vírus de Poliedrose Nuclear (NPV do inglês

Nuclear Polyhedrosis Virus) e os Vírus de Granulose (GV do inglês Granulosis Virus), 2) Nudibaculovirinae com um único gênero, NOV (do inglês Non-occluded Virus) no qual os virions não são oclusos numa matriz protéica (Tabela 1).

Os NPVs podem ser subdivididos, dependendo do número de nucleocapsídeos por virion, em simples (SNPV) ou múltiplos (MNPV). Em ambos os casos, vários virions encontram-se oclusos numa matriz protéica predominantemente constituída de poliedrina (Vlak & Rohrmann, 1985). O tamanho dos NPVs varia de 0,5 a 15 μm de diâmetro (Bergold, 1963) e são facilmente visíveis ao microscópio óptico. No caso dos GVs geralmente um único virion (excepcionalmente dois) contendo um único nucleocapsídeo encontra-se ocluso num corpo de inclusão ou grânulo. O maior componente do grânulo é a granulina com peso molecular e sequência de aminoácidos semelhante a da poliedrina (Akiyoshi *et al.*, 1984). O tamanho das partículas virais é muito menor variando de 150 a 300 nm de largura e 300 a 500 nm de comprimento (Federici, 1986).

A homologia encontrada entre os Baculovírus indica que estes são geneticamente relacionados (Smith & Summers, 1982). Rohrmann *et al.* (1981) sugerem que os vírus do grupo Eubaculovirinae evoluíram com os seus hospedeiros. Devido à ocorrência de SNPVs nos insetos das ordens mais antigas e de MNPVs e GVs nas ordens de insetos mais recentemente evoluídas (Lepidóptera), foi sugerido que os MNPVs e GVs se originaram a partir dos SNPVs (Rohrmann, 1986a). No entanto, trabalhos recentes comparando sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene da poliedrina de 12 e

TABELA 1. Características estruturais dos baculovírus.

	Tipos de Vírus				Observações
	SNPV	MNPV	GV	NOV	
DNA circular de dupla hélice	X	X	X	X	Características comuns da família Baculoviridae
Capsídeo protéico	X	X	X	X	
Nucleocapsídeo em forma de bastão	X	X	X	X	
virion (nucleocapsídeo + envelope)	X	X	X	X	
Nº de nucleocapsídeos por envelope	1	1-9	1	1	
Virions oclusos cristal protéico	X	X	X		
Nº virions por cristal protéico	vários	vários	1		
Virions não oclusos				X	
Gênero	NPV		GV	NOV	
Sub-família	Eubaculovirinae			Nudibaculovirinae	

SNPV = Vírus de Poliedrose Nuclear do tipo Simples.

MNPV = Vírus de Poliedrose Nuclear do tipo Múltiplo.

GV = Vírus de Granulose.

NOV = Vírus não Ocluso.

18 baculovírus respectivamente, mostram que os SNPVs e MNPVs são intimamente relacionados e que um não poderia ter dado origem ao outro (Zanotto *et al.*, 1993).

A nomenclatura dos baculovírus utiliza o nome da espécie do hospedeiro onde eles foram originalmente isolados, seguido pela família ou sub-família à qual eles correspondem. A comparação da filogenia de vários baculovírus com a filogenia dos Lepidópteros que eles infectam, demonstra que a sua história evolutiva não está em total acordo com a organização taxonômica dos lepidópteros (Zanotto *et al.*, 1993). Além disso, vários estudos demonstram que os baculovírus encontram-se no campo como populações genotipicamente heterogêneas. Portanto alguns baculovírus originalmente isolados de diferentes hospedeiros, considerados inicialmente como vírus distintos eram, na realidade, variantes genômicos do mesmo vírus (Brown *et al.*, 1984, 1985; Goto *et al.*, 1992). Diante destes fatos, existe uma necessidade em se achar uma melhor classificação taxonômica dos baculovírus que leve em consideração características relevantes aos vírus além do hospedeiro original e morfologia viral.

3.1.2 Ciclo de Infecção Viral

O ciclo natural de infecção dos baculovírus da sub-família Eubaculovirinae pode ser dividida em infecção primária e secundária. A infecção primária inicia pela ingestão do vírus ocluso (OV = Occluded virus) o qual é dissolvido pelas condições de alta alcalinidade (pH 10.9) do intestino do inseto (Pritchett *et al.*, 1982). Os virions assim liberados, denominados vírus derivados do poliedro (PDV = polyhedra-derived virus) (Volkman, 1986), passam através da membrana peritrófica, que é alterada por fatores

presentes na matriz protéica (Derkson & Granados, 1988), entrando em contato com as microvilosidades das células colunares do intestino. O envelope dos virions se funde com a membrana plasmática na região apical das microvilosidades (Kawanishi *et al.*, 1972; Granados, 1978) permitindo a entrada do nucleocapsídeo dentro da célula. Os nucleocapsídeos seguem até o núcleo onde penetram através dos poros nucleares. Em geral, nos GVs o capsídeo fica no citoplasma e o DNA é injetado dentro do núcleo enquanto nos NPVs o DNA é liberado do capsídeo dentro do núcleo (Summers, 1971; Granados, 1980; Wang & Kelly, 1985). Este processo ocorre de 1 a 4 horas após infecção (h.a.i.). A replicação do DNA viral e a montagem dos novos nucleocapsídeos ocorrem no núcleo, ocasionando a infecção primária. Este processo ocorre nas primeiras 24 h após infecção (Granados & Lawler, 1981).

A infecção secundária começa quando os nucleocapsídeos recém sintetizados passam através do citoplasma das células colunares e saem pela região basal para a hemolinfa. Ao atravessar a membrana plasmática celular eles adquirem o envelope o qual apresenta, em um dos pólos, uma modificação estrutural constituída pela presença de pequenos filamentos chamados peplômeros (Adams *et al.*, 1977). Estes vírus denominados Vírus Extracelulares (ECV do inglês "Extracellular Virus), são responsáveis pela infecção das células da hemolinfa e de outros tecidos do hospedeiro onde o processo de infecção, anteriormente descrito, é repetido. Alternativamente, as células infectadas da hemolinfa podem invadir os demais tecidos e transmitir a infecção por contato celular (Keddie *et al.*, 1989).

Os nucleocapsídeos montados nos núcleos dos diversos tecidos podem também obter o envelope pela síntese *de novo* e serem oclusos na matriz protéica durante a fase tardia da infecção. Este fenótipo viral é o responsável pela transmissão horizontal, causando infecção de larvas susceptíveis que ingerem o vírus ocluso.

Existem diferenças serológicas e biológicas entre os dois tipos de virions: PDVs e ECVs. Os ECVs contêm uma glicoproteína de 64kDa (gp64) como um dos componentes principais do envelope. Nos PDVs esta proteína é representada como uma banda muito fraca nos géis de SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis). A proteína 64K é um componente dos peplômeros presentes nos ECVs (Volkman, 1986). Os ECVs são altamente infecciosos quando inoculados na hemolinfa ou em cultura de células de insetos, mas são pouco infecciosos quando introduzidos via intestino do inseto. Em contraste, os PDVs são altamente infecciosos no intestino do inseto mas pouco infecciosos quando injetados diretamente na hemolinfa (Tanada & Kaya, 1993). Os ECVs são utilizados para infectar células de inseto *in vitro*.

3.1.3 Organização Gênica dos Baculovírus

O baculovírus mais extensivamente estudado é o MNPV de *Autographa californica* (AcMNPV). Seu genoma, de 133.894 pb, foi completamente sequenciado (Ayres *et al.*, 1994) e um total de 154 quadros de leitura (ORF = "Open Reading Frame") foram propostos segundo uma série de critérios. Existem quatro características gerais na organização gênica dos baculovírus: 1) Os ORFs encontram-se muito próximos no genoma, com exceção das regiões onde "regiões homólogas" (hr = "homologous

regions") aparecem (as hrs serão discutidos posteriormente. 2) Os ORF estão distribuídos no genoma sem maiores superposições. Até o momento são conhecidos só duas exceções (Guarino & Summers, 1988; Possee et al., 1991). 3) Os genes podem ser transcritos a partir de ambas fitas do DNA (O'Reilly, 1992). 4) Genes transcritos em diferentes fases da infecção viral encontram-se dispersos ao longo do genoma. Tem sido sugerido que a distribuição de genes com transcrição temporal distinta, juntamente com as diferenças nas direções dos genes, sejam importantes na regulação da expressão gênica dos baculovírus (Friesen & Miller, 1985).

A função e localização de vários genes têm sido investigados por diversos autores. A seguir serão apresentados alguns exemplos de genes e suas funções. Estes serão divididos em genes não essenciais, genes relacionados com oclusão viral, genes codificadores de proteínas estruturais, genes envolvidos na replicação do DNA viral, genes relacionados com função celular e genes reguladores (O'Reilly et al., 1994).

3.1.3.1 Genes Não Essenciais

Alguns genes aparentemente são não essenciais, visto que, vírus carregando mutações no gene em questão, são capazes de se replicarem *in vivo* e *in vitro*. Provavelmente estes genes fornecem alguma vantagem durante a infecção viral. Entre os genes caracterizados como não essenciais encontram-se o *egt* (O'Reilly & Miller, 1989), o *pcna* (Crawford & Miller, 1988; O'Reilly et al., 1989) e *p10* (Kuzio et al., 1984; Williams et al., 1989). Estes genes têm sido bem estudados e apresentam fenótipos característicos.

O produto do gene *egt* (ecdisteróide UDP-glicosil transferase) é secretado na hemolinfa e tem a propriedade de transferir uma glicose para o hormônio ecdisona, responsável pela muda dos insetos nos diferentes estágios larvais. Desta maneira o vírus bloqueia o desenvolvimento normal do inseto. O *pcna* (proliferating-cell nuclear antigen) estimula a replicação do DNA viral e a expressão de genes tardios em cultura de células. O *p10* sintetiza uma proteína muito abundante na fase tardia da infecção viral. Deleção deste gene evita a lise de células infectadas.

3.1.3.2 Genes Relacionados com Oclusão Viral

Estes genes estão envolvidos na formação do corpo de inclusão dos baculovírus. Entre eles encontram-se o *polh* (Smith *et al.*, 1983), *fp25* (Fraser *et al.*, 1983) e *p74* (Kuzio *et al.*, 1989). Vírus sem o gene da poliedrina (*polh*) funcional não sintetizam a proteína principal da matriz protéica dos baculovírus e fenotipicamente são vírus não oclusos. Vírus com mutações no gene *fp25* dão lugar ao fenótipo FP (Few Polyhedra = poucos poliedros), comumente encontrado quando o vírus é inoculado por várias passagens em cultura de células. Este fenômeno acontece quando um transposon da célula de inseto é inserido no gene *fp25* tornando-o não funcional. O gene *p74* encontra-se associado com o envelope dos vírus oclusos e é importante na infecção viral no intestino do inseto, durante a infecção primária. Os mutantes do *p74* podem replicar-se em cultura de células, mas os poliedros assim formados não infectam larvas infectadas *per os*.

3.1.3.3 Genes Codificadores de Proteínas Estruturais

Exemplos de genes que codificam proteínas estruturais do virion dos baculovírus são *vp39* (Thiem & Miller, 1989), que codifica a proteína principal do capsídeo, *gp64* (Whitford *et al.*, 1989) e *gp41* (Whitford & Faulkner, 1992; Liu & Maruniak, 1995). O gene *gp64* codifica a principal glicoproteína presente nos ECVs. Anticorpos específicos anti *gp64*, neutralizam a infectividade dos ECVs mas não modificam a virulência dos PDV (Volkman & Goldsmith, 1985). Aparentemente os ECVs penetram nas células através de endocitose mediada por receptores, enquanto que os PDVs entram nas células colunares do intestino do inseto pela fusão do envelope com a membrana plasmática. Portanto, é provável que o *gp64* esteja relacionado com a interação entre os receptores celulares e os ECVs. O produto do gene *gp41* é uma glicoproteína associada com os vírus oclusos. A sua localização parece ser entre o envelope e o corpo de inclusão. Sua função não está totalmente definida, mas parece estar envolvido com a oclusão dos virions ou na infecção das células intestinais do hospedeiro.

3.1.3.4 Genes Envolvidos na Replicação do DNA Viral

Entre os genes envolvidos na replicação do DNA viral encontram-se o *dnapol* (Tomalski *et al.*, 1988) e *hel* (Lu & Carstens, 1991). O gene *dnapol* codifica uma proteína muito parecida com a DNA Polimerase (DNA Pol) de outros vírus. No caso dos baculovírus, não só a DNA Pol sintetizada pelo vírus é ativa, mas a produção de DNA Pol do hospedeiro também é induzida (Miller *et al.*, 1981). O gene *hel* codifica uma proteína que tem homologia com outras proteínas que apresentam atividade de helicase.

Estudos com mutantes de temperatura mostram que a inativação deste gene bloqueia a replicação do DNA.

3.1.3.5 Genes Relacionados com Função Celular

O melhor exemplo de um gene de baculovírus que altera a função celular encontra-se no *p35* (Friesen & Miller, 1987). Este gene bloqueia a apoptose (morte celular programada) induzida pela célula hospedeira quando infectada. Desta maneira, mutantes do *p35* não conseguem infectar células de inseto porque a apoptose não é bloqueada e as células morrem antes do aparecimento de vírus oclusos ou ECV.

3.1.3.6 Genes Reguladores

Vários genes tem sido descritos como genes reguladores. Entre eles encontram-se os genes transcritos na fase precoce imediata (IE = Immediate early): *IE-0* e *IE-1*. Estes genes *IE-0/IE-1* representam o único exemplo de genes "spliced" dentro dos baculovírus (Chisholm & Henner, 1988). O *IE-1* é capaz de transativar alguns promotores precoces (Guarino & Summers, 1986a, 1987).

3.1.4 Expressão Gênica nos Baculovírus

A expressão gênica nos baculovírus segue uma regulação em cascata com quatro fases definidas (Carstens et al., 1979; Maruniak & Summers, 1981; Guarino & Summers, 1986a) na qual os genes de cada fase dependem daqueles sintetizados na fase anterior (Blissard & Rohrmann, 1990). As fases de transcrição são: 1) precoce imediata

(PI); a síntese destas proteínas acontece nas duas primeiras h.a.i. 2) precoce tardia (PT); a síntese destas proteínas acontece aproximadamente seis h.a.i. 3) tardia (T); de dez a doze h. a.i. e 4) tardia hiperexpressa (TH); a partir das quinze h.a.i.

Geralmente os genes são transcritos somente durante uma destas fases, mas alguns genes são transcritos por períodos maiores. Durante as duas primeiras fases, os genes necessários para a replicação do DNA viral (entre outros) são expressos. A replicação do DNA é necessária para ativar a síntese dos genes tardios. As proteínas estruturais são principalmente sintetizadas na fase T, ocorrendo a liberação de partículas virais infecciosas, enquanto na fase TH são sintetizadas as proteínas relacionadas com a produção do corpo de inclusão ou matriz protéica. Tem sido proposto que este sistema de transcrição temporal está relacionado com a regulação da expressão gênica nos baculovírus (Friesen & Miller, 1985).

3.1.4.1 Transcrição dos Genes Precoce Imediatos (PI)

Os genes precoce imediatos ("immediate early genes"), são totalmente dependentes da RNA Pol II do hospedeiro para sua transcrição e, em geral, os promotores destes genes são muito semelhantes aos promotores celulares (O'Reilly, 1992). Estes são os únicos genes que não precisam nenhum produto viral para a sua transcrição. O gene *IE-1*, representa um bom exemplo de gene PI capaz de transativar genes PT (Guarino & Summers, 1986a; Chisholm & Henner, 1988). Por sua vez observou-se que em ensaios de expressão transiente, o gene *IE-1* tem um efeito regulatório negativo sobre outros genes PI (Carson et al., 1991a).

3.1.4.2 Transcrição dos Genes Precoce Tardios (PT)

Os genes precoce tardios ("delayed early genes"), precisam da síntese dos genes precoce imediatos para serem transcritos. Eles são transcritos, pela RNA Pol II do hospedeiro, antes da replicação do DNA viral. Assim sendo, a transcrição dos mRNA das fases precoces, é sensível a α -amanitina, um inibidor da RNA Pol II (Grula *et al.*, 1981).

Os promotores dos genes das fases PI e PT, geralmente apresentam o "TATA box" "upstream" do sítio de iniciação da transcrição. Outra sequência motivo importante é "CAGT", encontrada perto da região de iniciação da transcrição dos genes precoces (Theilmann & Stewart, 1991). Esta sequência pode ser considerada como um bom indicador dos genes virais que são transcritos nessa fase (Ayres *et al.*, 1994). Um exemplo de gene precoce tardio é o *egt* (O'Reilly & Miller, 1989).

3.1.4.3 Transcrição dos Genes Tardios (T)

Os genes tardios ("late genes") são expressos durante ou depois da replicação do DNA viral, e são dependentes do produto dos genes precoces (Thiem & Miller, 1989). Eles codificam principalmente proteínas estruturais do virion. Esta fase se caracteriza pela formação dos nucleocapsídeos. O gene *gp64* (Whitford *et al.*, 1989), que codifica a principal proteína do capsídeo, é expresso durante esta fase. O gene *p74* (Kuzio *et al.*, 1989), e o *gp41* (Liu & Maruniak, 1995) também são exemplos de genes tardios.

3.1.4.4 Transcrição dos Genes Tardios Hiperexpressos (TH)

Os genes tardios hiperexpressos ("very late genes") estão relacionados com o processo de oclusão viral. A expressão destes genes começa aproximadamente 15 h.a.i. e continua até 72 h.p.i. Exemplos típicos desta classe de genes são o gene da poliedrina (*polh*), que de 30 a 70 h.a.i sintetiza a proteína mais abundante na célula (Miller, 1988) e o gene *p10* (Williams *et al.*, 1989) cujo produto encontra-se também fazendo parte do corpo de inclusão.

Ambos os tipos de genes tardios (T e TH) são transcritos por uma RNA Pol resistente a alfa-amanitina (Grula *et al.*, 1981; Fuchs *et al.*, 1983). Isto significa que uma nova polimerase é codificada pelo vírus, ou que o vírus modifica a RNA polimerase do hospedeiro. Esperava-se que a análise direta do genoma viral esclareceria esta questão. No entanto, a comparação detalhada do genoma totalmente sequenciado do AcMNPV não permitiu identificar nenhuma região codificadora da polimerase. Portanto, ou a RNA Pol sintetizada pelo vírus é totalmente diferente das outras polimerases conhecidas, ou o vírus não codifica tal enzima e simplesmente modifica e utiliza a do hospedeiro (Ayres *et al.*, 1994). Também tem sido sugerido que os genes tardios hiperexpressos poderiam ser sintetizados pela RNA Pol III modificada, ou mesmo sintetizada pelo vírus, a qual, no hospedeiro, é responsável pela alta expressão dos genes tRNA (RNA transportador) e RNA ribossomal 5S (Zanotto *et al.*, 1992).

A análise dos promotores tardios mostra que a sequência motivo "TAAG" no sítio de iniciação da transcrição (transcrição iniciando no primeiro A) é essencial para a atividade promotora (Rohrmann, 1986b). O nucleotídeo precedendo esta sequência

influencia a expressão dos genes, sendo "ATAAG" um promotor mais forte que "TTAAG" ou "GTAAG" (Nissen & Friesen, 1989; O'Reilly, 1992). Não é conhecido o mecanismo que diferencia os genes T dos TH. A região promotora deste tipo de genes é muito similar, no entanto, os genes TH são expressos muito tardiamente no processo da infecção. Não se tem encontrado evidências de sítios repressores para estes genes. Acredita-se portanto que a diferença seja devida a taxas de iniciação de transcrição diferentes, ou a uma maior meia vida dos mRNA dos genes TH (Rohrmann, 1986b).

3.1.4.5 Regiões Homólogas (hrs)

Uma característica notável descrita até o momento em seis baculovírus, é a presença de regiões homólogas (hr = homologous regions) dispersas no genoma viral. As hrs foram identificadas no AcMNPV como regiões repetitivas ricas em sítios de restrição da enzima EcoRI, apresentando homologia intragênica por análise de hibridização do DNA com outras regiões do genoma. Inicialmente foram descritas cinco destas regiões denominadas hr1 a hr5 (Cochran & Faulkner, 1983). O sequenciamento dessas hrs revelou a presença de sequências, de aproximadamente 91 nucleotídeos, repetidas de 2 a 8 vezes, apresentando uma palíndrome imperfeita de 28 pares de bases (pb) com o sítio EcoRI no meio (Guarino *et al.*, 1986). O tamanho das hrs no AcMNPV varia de aproximadamente 400 a 800 pb representando a maior sequência separando os ORFs num genoma com organização muito econômica.

Devido à presença conservada de hrs entre vários isolados genéticos do AcMNPV, e a sua distribuição ao longo do genoma Cochran & Faulkner (1983)

sugeriram que se a replicação dos baculovírus ocorresse simultaneamente em várias regiões, as hrs seriam ótimos candidatos a serem origens de replicação do DNA viral (ORI).

Pearson *et al.* (1992) demonstraram que as regiões hr do AcMNPV funcionam como origens de duplicação do DNA. Eles quantificaram a replicação de diversos plasmídeos contendo a sequência completa e fragmentos deletados do hr5 e hr2 em células de *Spodoptera* infectadas com AcMNPV. Para tal, células infectadas com o vírus são transfectadas, utilizando um plasmídeo contendo a região do DNA viral a ser testada como possível ORI. Após 60 horas, o DNA viral e o plasmídeo são extraídos e submetidos a digestão com a enzima de restrição DpnI a qual cliva exclusivamente sítios totalmente metilados. Os plasmídeos amplificados em bactéria (e utilizados na transfecção) são metilados e digeridos pela endonuclease. No entanto, o plasmídeo replicado nas células de inseto não é metilado e não sofre digestão. Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que plasmídeos portadores das regiões homólogas se replicavam nestas condições. Também foi concluído que uma única sequência palindrômica é suficiente para obter replicação do plasmídeo mas que a replicação aumenta substancialmente quando a hr encontra-se completa. Isto significa que dentro de uma hr específica, o número de palíndromes influencia a eficiência de replicação. Resultados similares foram obtidos com outras hrs do AcMNPV (Kool *et al.*, 1993a; Leisy & Rohrmann, 1993).

Pearson & Rohrmann (1995) identificaram que uma das 8 hrs presentes em *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV) era constituída por dois domínios distintos. O nível

de replicação encontrado quando ambos os domínios foram inseridos juntos num plasmídeo foram altos, mas eles separadamente replicaram a níveis muito baixos.

No entanto, existem evidências mostrando que as hrs não são as únicas regiões responsáveis pela replicação do DNA viral (Lee & Krell, 1992, 1994; Kool *et al.*, 1993b, 1994a; Ahrens *et al.*, 1995), e que nem todos as hrs precisam estar presentes no genoma viral para que o vírus consiga replicar-se em cultura de células (Rodems & Friesen, 1993; Majima *et al.*, 1993). Mutantes com a região hr5 deletada foram capazes de se replicar normalmente e produzir vírus infecciosos em células de inseto, mostrando que a perda de pelo menos uma hr não interfere na replicação viral. Recentemente Kool *et al.* (1994b), localizaram e identificaram outras regiões no genoma viral do AcMNPV relacionadas com a replicação viral.

As regiões hr também têm função de "enhancers" de transcrição em AcMNPV. Esta função foi testada usando ensaios de expressão transitória. Para tal, células infectadas pelo vírus foram transfectadas com plasmídeos contendo marcadores de expressão onde as regiões hr tinham sido clonadas (Guarino & Summers, 1986a,b). As hrs estimulam a taxa de transcrição como um ativador cis, independente da posição e orientação em relação ao gene transcrito (Guarino & Summers, 1986b; Guarino *et al.*, 1986), com uma única exceção na qual a sua posição em relação ao promotor foi crucial (Nissen & Friesen, 1989)

Vários promotores precoces podem ser estimulados pela presença de regiões hr como os genes *p35* (Nissen & Friesen, 1989), *p39* (Guarino & Summers, 1986b) e *IE-N* (Carson *et al.*, 1991a, b). Os promotores dos genes da fase precoce tardia podem ser

estimulados exclusivamente pela região hr, mas na presença da proteína reguladora IE-1, a transcrição é aumentada. No entanto as hrs não estimulam promotores da fase tardia, sugerindo que a função de "enhancer" é específica do promotor (Nissen & Friesen, 1989).

Guarino & Dong (1991, 1994) identificaram, dentro da região repetitiva do hr, uma sequência na qual proteínas podem se ligar unicamente na presença do gene transativador *IE-1*, aumentando a expressão de genes da fase precoce tardia 300 vezes. Os dados disponíveis sugerem que as regiões homólogas dos baculovírus podem desempenhar a função dupla de ativar promotores precoces e funcionar como regiões de origem de replicação do DNA.

Outros baculovírus têm sido descritos contendo regiões hr no seu genoma. Sete hrs encontradas em *Bombyx mori* NPV (BmNPV) foram sequenciadas e foi encontrada uma alta homologia com as hrs de AcMNPV (Majima *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1994). A única hr sequenciada do baculovírus *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV) consiste em sequências de 66 pb, repetidas em tandem 12 vezes (Theilmann & Stewart, 1992), e apresenta atividade de "enhancer" de transcrição. As descrições originais sobre a presença de hrs nos baculovírus LdMNPV (McClintock & Dougherty, 1988) e *Choristoneura fumiferana* MNPV (CfMNPV) (Kuzio & Faulkner, 1984; Arif & Doerfler, 1984) foram baseadas no fato destas regiões terem homologia com outras partes do genoma viral em hibridizações DNA-DNA.

3.1.5 Variantes Genômicos

Os baculovírus encontram-se naturalmente como populações heterogêneas de genótipos virais (Maruniak et al., 1984; Shapiro et al., 1991). O estudo das variações naturalmente ocorridas nestes isolados podem ser fundamentais na compreensão dos mecanismos envolvidos com a patogenicidade e especificidade virais.

A análise do perfil de restrição do genoma viral, digerido com várias enzimas, tem sido utilizada para diagnosticar as relações entre os baculovírus. Vírus cujos fragmentos de DNA têm mobilidades semelhantes nos géis de eletroforese podem ser considerados aparentados; mobilidades muito diferentes, sugerem que os vírus são distantes. Este método tem servido para distinguir baculovírus próximos, como por exemplo os vírus de *Autographa californica* e *Trichoplusia ni*, que eram considerados como sendo o mesmo vírus por infectarem os mesmos hospedeiros (Miller & Drawes, 1978). Esta metodologia também tem sido útil para identificar variantes genômicos do mesmo vírus, que em alguns casos, foram isolados originalmente de hospedeiros diferentes e classificados como vírus distintos (Brown *et al*, 1984; Goto *et al.*, 1992).

As vantagens de se utilizar a análise de perfis de restrição na taxonomia dos baculovírus são 1) o genoma total é investigado e não só os genes estruturais; 2) isolados virais relacionados são determinados facilmente; 3) misturas de vírus podem ser reconhecidas e 4) mudanças no genoma devidas a inserções ou deleções podem ser monitoradas (Bilimoria, 1986).

A localização dos sítios de restrição no DNA viral é determinada pelos mapas físicos. Eles ajudam na interpretação dos perfis de restrição, são utilizados para localizar

mudanças no DNA de variantes genéticos (Goto *et al.*, 1992; Smith & Crook, 1993) e para identificar recombinações entre baculovírus próximos (Miller, 1986) ou entre variantes genotípicos do mesmo vírus (Croizier & Ribeiro, 1992).

A purificação em placa de isolados virais selvagens tem resultado na separação de variantes genotípicos com perfis de restrição diferente, demonstrando a heterogeneidade natural dos isolados virais (Lee & Miller, 1978; Maruniak *et al.*, 1984; Maruniak, 1989). Esta variabilidade tem sido detectada tanto em populações geográficas diferentes (Shapiro *et al.*, 1991), como dentro de uma mesma região (Cherry & Summers, 1985).

Variação genética também pode ser obtida após passagens seriadas em culturas de células. Passagens sucessivas do AcMNPV em células têm causado o aparecimento de mutantes denominados FP (few polyhedra), distinguíveis fenotipicamente pela redução na produção de poliedros e manutenção da produção dos ECV (Potter *et al.*, 1976). O estudo comparativo de mutantes FP demonstrou que eles poderiam ter diversas mudanças genotípicas, mas todos tinham DNA celular inserido no genoma viral (Fraser *et al.*, 1983). Além disso, a proteína expressa pelo gene *fp25* não foi detectada nos mutantes FP sugerindo, pela primeira vez, o envolvimento desta proteína com a produção dos mutantes (Fraser *et al.*, 1983). Recentemente, Harrison & Summers (1995) observaram que mutações no gene *fp25* impedem a formação normal do envelope do virion assim como a sua oclusão. No entanto a proteína 25K não foi encontrada no envelope dos PDVs ou ECV. Assim, foi sugerido que a esta proteína é requerida para a expressão dos níveis normais da poliedrina e, que o fenótipo FP é causado pela expressão de poliedrina

abaixo dos níveis necessários para a oclusão viral completa (Harrison & Summers, 1995). Também foram descritos mutantes FP originados pela inserção de transposons do hospedeiro no genoma viral (Fraser *et al.*, 1985).

A análise e comparação de variantes genéticas permitem identificar regiões no genoma onde ocorre maior variabilidade genotípica. Burand & Summers (1982) replicaram o clone AcMNPV-E2 por 30 vezes (passagens seriadas) em cultura de células e localizaram duplicações do genoma viral nas regiões homólogas hr2 e hr3. Após análise de 35 isolados virais, 14 variantes genotípicas do AcMNPV foram obtidos, e as variações foram mapeadas no genoma (Brown *et al.*, 1985). Inserções de diversos tamanhos de DNA foram novamente mapeadas em regiões associadas com hrs.

Outros investigadores sugerem a existência de relação entre regiões variáveis no genoma dos baculovírus e a localização de hrs. Arif & Doerfler (1984) e Kuzio & Faulkner (1984) mostraram que inserções de aproximadamente 200 pb ocorriam em algumas regiões hr após passagem do vírus em larvas. Majima *et al.* (1993), comparando as hrs do BmNPV com AcMNPV verificaram a existência de uma região hr extra no BmNPV em posição invertida ao AcMNPV. Eles propuseram que um ancestral comum tenha sofrido uma inversão, quebra e ligação do DNA nessa região. Os autores sugerem ainda que duplicações ou deleções de DNA ocorram mais frequentemente nas regiões hr. No entanto, até o presente, não existe um modelo explicando como a variação genotípica estaria relacionada com as hrs em baculovírus.

3.2 Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV)

O AgMNPV tem sido amplamente utilizado como agente microbiano contra a lagarta da soja, *A. gemmatalis* (Lepidóptera: Noctuidae), o pior desfolhador das plantações de soja. Este vírus foi originalmente isolado em 1972 na região de Campinas, Brasil, a partir de lagartas de *A. gemmatalis* infectadas (Allen & Knell, 1977). Posteriormente este vírus foi isolado de outras regiões do Brasil (Carner & Turnipseed, 1977; Corso *et al.*, 1977).

Estudos preliminares mostraram que este vírus tinha grande potencial como inseticida viral para controlar lagartas de *A. gemmatalis* (Carner & Turnipseed, 1977; Moscardi *et al.*, 1981). A partir de 1979, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), iniciou um programa de desenvolvimento do AgMNPV como agente microbiano. Atualmente este vírus é aplicado em mais de 1 milhão de hectares de soja por ano representando um dos programas de controle microbiano mais bem sucedidos do mundo (Moscardi & Sosa-Gomez, 1992). Nos Estados Unidos, este vírus foi testado em pequenas áreas, e seu impacto no manejo integrado de pragas tem sido avaliado com bons resultados (Funderburk *et al.*, 1992). Uma única aplicação viral foi suficiente para controlar a população de insetos durante uma estação, sendo que a aplicação foi feita quando a população larval atingiu a metade da densidade considerada limiar de dano econômico.

A infecção do AgMNPV foi testada em vários hospedeiros alternativos (Carner *et al.*, 1979; Pavan *et al.*, 1981), mostrando a necessidade da aplicação de altas doses para obtenção de mortalidade larval. Através do processo de passagens seriadas em

larvas de *Diatraea saccharalis*, Pavan & Ribeiro (1989) conseguiram aumentar a virulência contra esse hospedeiro sem afetar a virulência contra *A. gemmatalis*.

A estabilidade termal do AgMNPV foi maior que aquela obtida para o NPV de *Trichoplusia ni* (TnMNPV) e o GV de *Diatraea saccharalis* (DsGV), após terem sido submetidos a temperaturas variando de 40 a 100°C, por diversos intervalos de tempo (Ribeiro & Pavan, 1994a). No entanto, a temperatura ideal de produção de AgMNPV *in vivo*, utilizando-se para tal, larvas do hospedeiro alternativo *D. saccharalis*, é de 28°C. Uma redução drástica na produção é observada abaixo de 26 e acima de 30°C (Ribeiro & Pavan, 1994b).

Para o estudo molecular dos vírus, foi estabelecida uma cultura de células a partir de embriões de *A. gemmatalis* (Sieburth & Maruniak, 1988a). A replicação do AgMNPV, AcMNPV e o MNPV de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) foi testada nas células UFL-AG-286. Observou-se que as células foram suscetíveis a infecção pelo AgMNPV e AcMNPV, enquanto uma baixa taxa de replicação do DNA do SfMNPV foi detectada (Sieburth & Maruniak, 1988b).

O isolado viral, originalmente obtido de larvas de *A. gemmatalis* infectadas, foi purificado em placa, e seis variantes genômicos distinguíveis pelo perfil de restrição do DNA foram obtidos (Maruniak, 1989). Um desses variantes genéticos, representando 40% dos variantes obtidos (AgMNPV-2D), foi considerado o protótipo do baculovírus de *Anticarsia*.

O mapa físico do AgMNPV-2D foi construído para 5 enzimas de restrição. A localização do gene da poliedrina do AgMNPV-2D foi determinada utilizando-se o gene

da poliedrina do AcMNPV como sonda (Johnson & Maruniak, 1989). A orientação do mapa genômico seguiu as recomendações descritas para baculovírus (Vlak & Smith, 1982), de maneira a linearizar o genoma entre o fragmento HindIII-G (onde se encontra o gene da poliedrina) e o fragmento HindIII-M. O mapeamento adicional do genoma com 2 enzimas de restrição, leva a um total de 82 sítios de restrição mapeados num genoma de aproximadamente 133 Kpb (Maruniak *et al.*, em preparação).

O sequenciamento do gene e região promotora da poliedrina do AgMNPV-2D (Zanotto *et al.*, 1992), permitiu a comparação deste com outros baculovírus. A árvore filogenética baseada no gene da poliedrina revelou que a história evolutiva dos insetos hospedeiros e dos baculovírus não está em total, alertando uma vez mais sobre os problemas existentes com a nomenclatura atual.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Vírus

Várias preparações de AgMNPV foram utilizadas no presente trabalho. Duas preparações obtidas de larvas de *A. gemmatalis* (lagarta da soja) infectadas no campo: 1) AgMNPV-'79, obtida originalmente em 1972 de larvas infectadas em Campinas (Allen & Knell, 1977), que foi subsequentemente aplicada em campo experimental em 1979 na Flórida, USA. 2) AgMNPV-'85, preparação viral da EMBRAPA do baculovírus de *Anticarsia* do ano de 1985. Além desses, os seguintes isolados virais, purificados em placa (isolados virais geneticamente homogêneos), foram utilizados: 1) AgMNPV-2D, considerado o protótipo do baculovírus de *A. gemmatalis* (Johnson & Maruniak, 1989) por representar 40% dos isolados purificados em placa a partir da preparação viral AgMNPV-'79. 2) AgMNPV-D7, vírus purificado em placa a partir de uma preparação viral de AgMNPV que foi previamente passada no hospedeiro alternativo *Diatraea saccharalis* por vinte gerações (Pavan & Ribeiro, 1989).

4.2 Insetos

Larvas de *A. gemmatalis* (Lepidóptera:Noctuidae) e larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera:Pirálidae) gentilmente cedidas pelos laboratórios do USDA em Gainesville e Canal Point, Flórida respectivamente.

4.3 Células de Inseto

Culturas contínuas de células de *Spodoptera frugiperda*, IPLB-SF-21AE (Vaughn *et al.*, 1977) e um clone isolado destas células, SF-9 (Luckow & Summers, 1988), foram mantidas no meio TC-100 (Life Technologies/Gibco BRL). Células de *Trichoplusia ni*, TN-368 (Hink, 1970) e de *A. gemmatilis*, UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988a) foram também utilizadas e mantidas em meio TC-100. Dez por cento de soro fetal bovino e 50 mg/l de gentamicina foram adicionados aos meios de cultura. Os detalhes relativos ao número de células semeadas e o procedimento utilizado para manutenção destas culturas encontram-se descritos nos Apêndices 1 e 2, respectivamente.

4.4 Bactérias

As seguintes linhagens de *Escherichia coli* foram utilizadas para serem transformadas com plasmídeos contendo os clones de interesse: DH5- α e JM-109 (Promega, Corp.).

4.5 Plasmídeos

Os seguintes plasmídeos da série pGEM (Promega, Corp.) foram utilizados para clonagem do DNA genômico do AgMNPV: pGEM-3Z, pGEM-5Zf(+) and pGEM-7Zf(+).

4.6 Infecção Viral de Larvas e de Células de Inseto

As larvas foram infectadas *per os* utilizando-se poliedros, ou, por meio de injeção intra-hemocélica utilizando-se o vírus extracelular (ECV = extracellular virus). Após alguns dias as larvas apresentaram sintomas típicos de infecção (flacidez, coloração leitosa, parada de alimentação e de movimento), morrendo aproximadamente uma semana após infecção. Larvas infectadas foram coletadas para posterior purificação viral (dos poliedros) e/ou extração do DNA viral.

As células de inseto foram infectadas adicionando ECV ao meio de cultura em contato direto com as células ou diretamente, introduzindo o DNA viral dentro das células (transfecção) (Summers & Smith, 1987). Vinte e quatro h após a infecção, o núcleo das células infectadas começaram a apresentar sinais de hipertrofia e 48 h após infecção os poliedros foram facilmente detectados no núcleo, com auxílio de microscópio óptico (Figuras 1 e 2).

4.7 Purificação de Poliedros a Partir de Larvas Infectadas

As larvas infectadas foram maceradas num tampão de homogenização contendo ácido ascórbico para evitar a melanização do material. Após filtragem, o material foi centrifugado em centrífuga refrigerada. O precipitado foi ressuspenso e centrifugado num gradiente contínuo de sacarose (40%-63%) para eliminar material celular (Maruniak, 1986). A banda contendo os poliedros, localizada aproximadamente no terço inferior do tubo (Figura 3), foi recuperada e a concentração de poliedros foi estimada (Apendice 3). Parte dos poliedros foi utilizada na infecção de outras larvas e parte foi utilizada para extração de DNA viral.

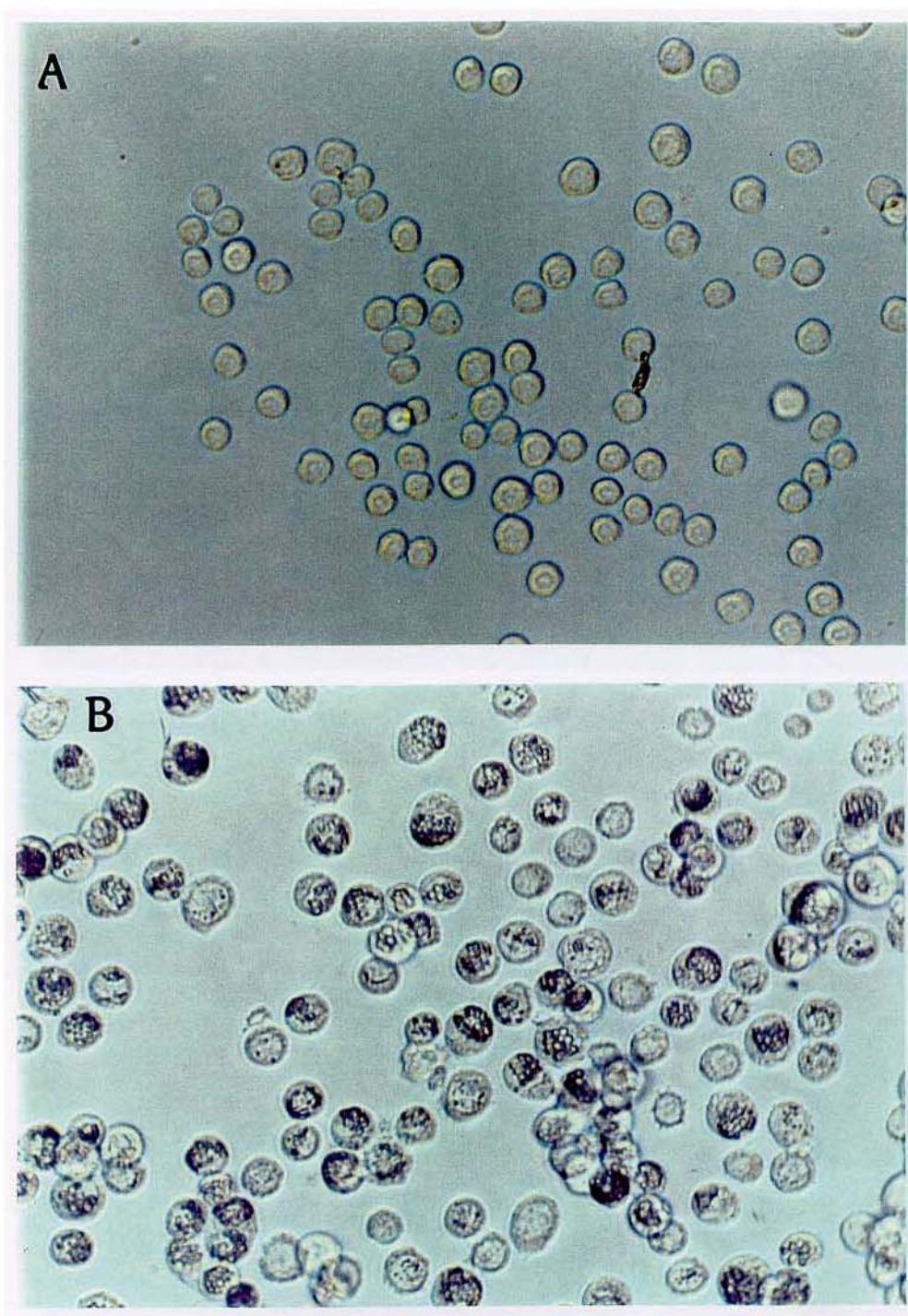


FIGURA 1. Células de *Spodoptera frugiperda* (SF-9). (A) Não infectadas e (B) infectadas com baculovírus 48 horas após inoculação viral. Aumento: 400 x

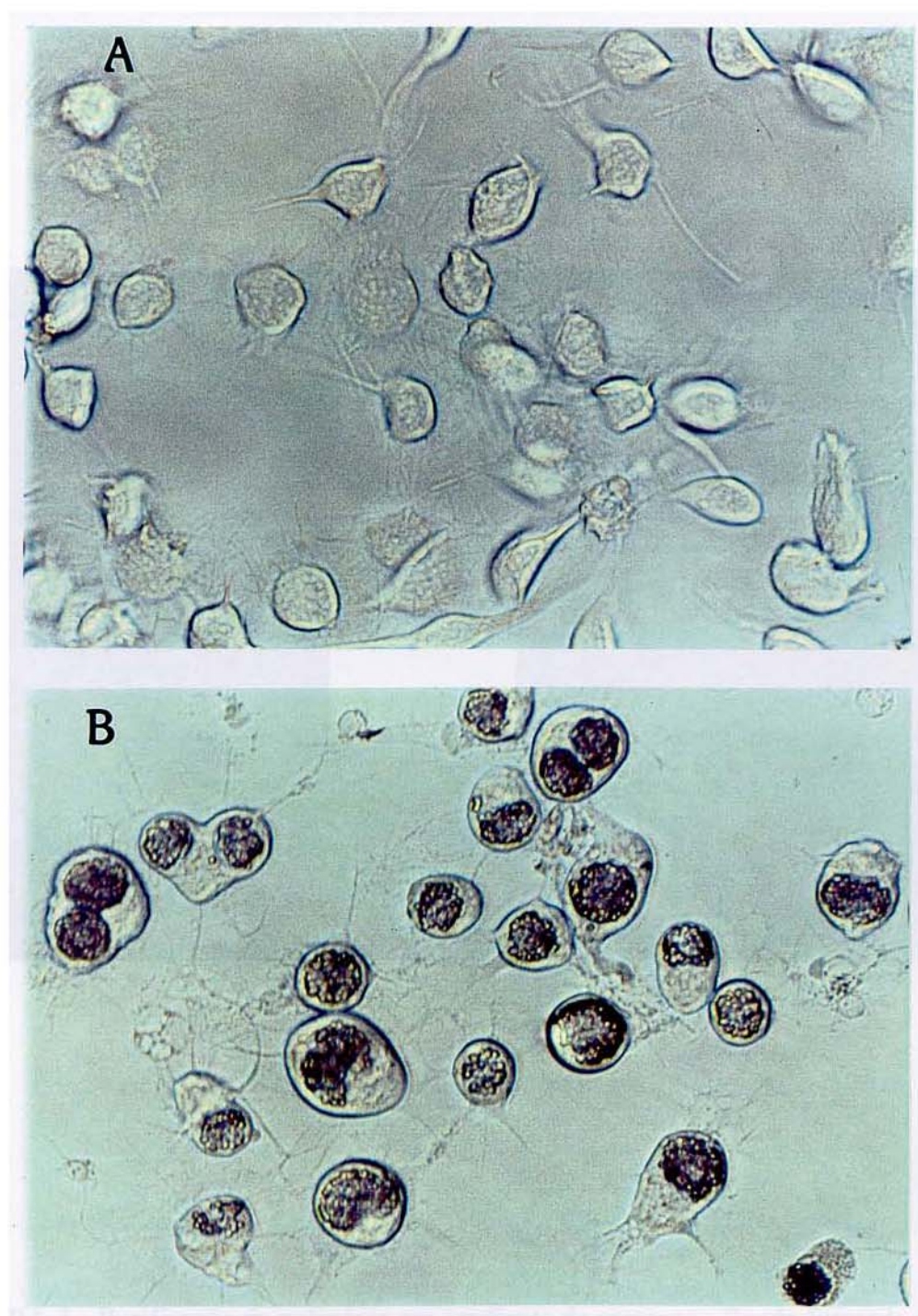


FIGURA 2. Células de *Trichoplusia ni* (TN-368). (A) Não infectadas e (B) infectadas com baculovírus 48 horas após inoculação viral. Aumento: 400 x.

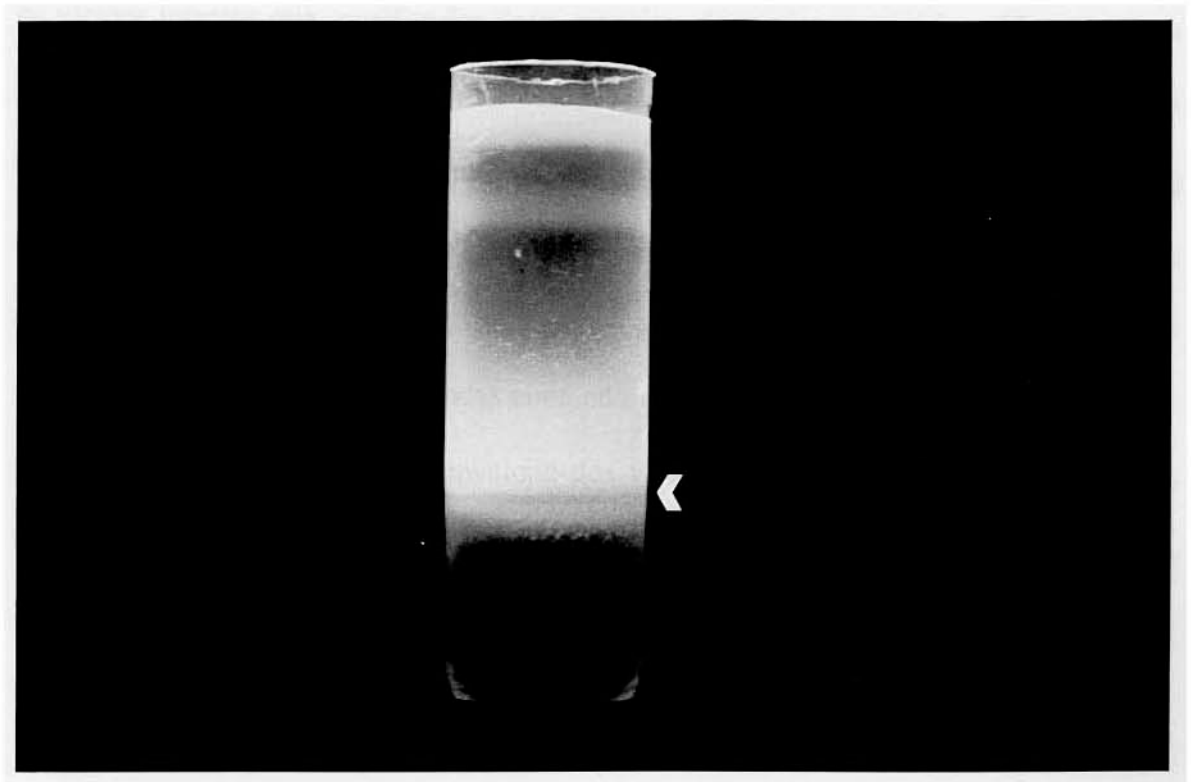


FIGURA 3. Purificação de poliedros em gradiente de sacarose. Banda formada no terço inferior do tubo corresponde a poliedros.

4.8 Extração do DNA Viral a Partir de Poliedros

Os poliedros purificados foram tratados com uma solução alcalina diluída (DAS = diluted alkaline saline) (Summers & Smith, 1975) que dissolveu o poliedro liberando os virions intactos que, purificados desta maneira, denominam-se virions liberados pela solução alcalina (ARV = "Alkali-Released Virions"). Os ARV foram recuperados por bandejamento em gradiente contínuo de sacarose (40%-56%) centrifugado a 80.000x g (Maruniak, 1986). A poliedrina solúvel permaneceu na região superior do gradiente enquanto os ARV bandearam diferentemente, dependendo do número de nucleocapsídeos por envelope (Figura 4). As bandas contendo os ARV foram recuperadas do gradiente e a sacarose foi removida. O envelope dos virions e a proteína dos nucleocapsídeos foram digeridos. O DNA viral foi extraído utilizando-se fenol e éter. Finalmente o DNA foi dialisado em tampão Tris-EDTA (TE) por dois dias. A concentração de DNA foi medida através da absorbância à 260 nm em espectrofotômetro (Apêndice 4).

4.9 Purificação de Vírus Extracelular (ECV) a Partir de Culturas Infectadas

Células de inseto infectadas foram coletadas três dias após a infecção e centrifugadas à 70x g para separar as células do sobrenadante contendo o vírus extracelular (ECV). O ECV foi titulado (Knudson, 1979) e, quando a titulação viral foi baixa, o ECV foi concentrado através de centrifugação em tubos estéreis em centrífuga refrigerada (Apêndice 5).

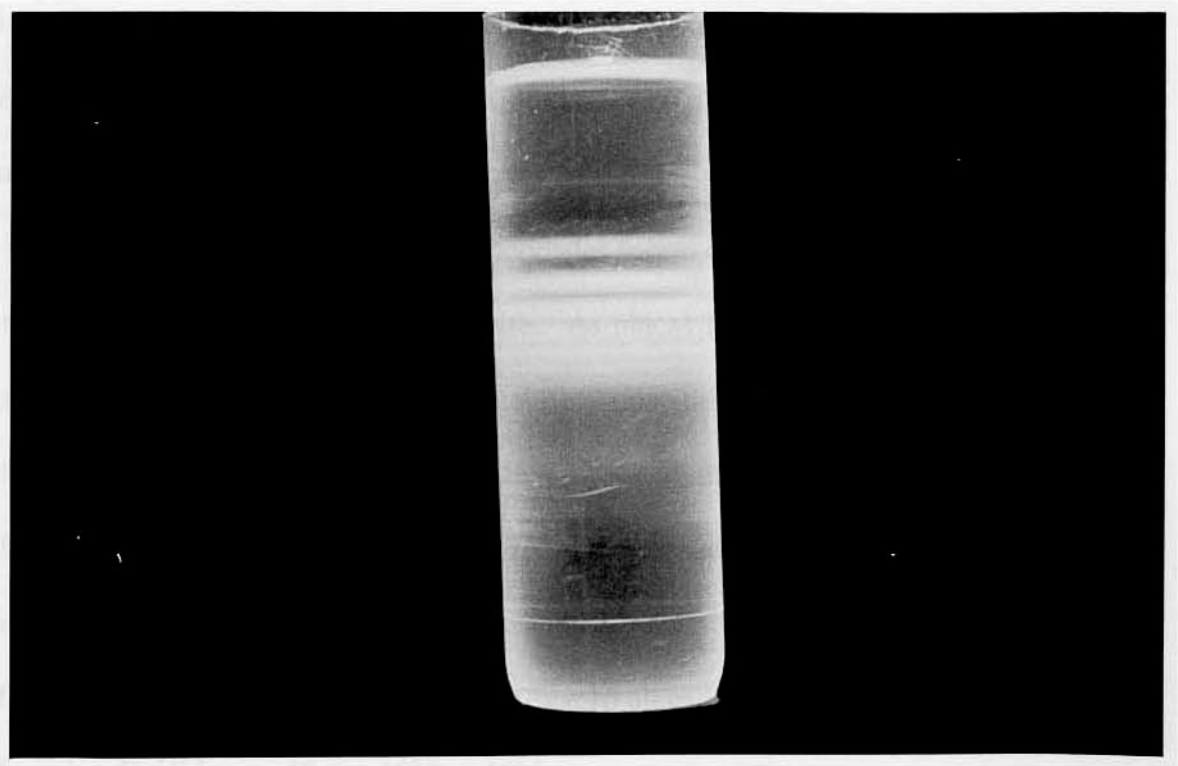


FIGURA 4. Bandeamento em gradiente de sacarose dos virions contendo diferente número de nucleocapsídeos por envelope.

4.10 Titulação Viral Através do Método da Diluição Final

Os baculovírus foram titulados utilizando-se o método "end point dilution" adaptado para baculovírus por Knudson (1979). Primeiramente diluições seriadas dos vírus foram preparadas (10^{-1} a 10^{-8}). Células de inseto foram semeadas em placa com 96 cavidades colocando 0,05 ml por cavidade com a concentração de células necessárias (ver Apêndice 1). A seguir, 0,1 ml da diluição viral foi adicionada em cada cavidade. Um total de 10 cavidades foram infectadas com a mesma diluição viral. Após infectar as células com as 8 diluições virais, as cavidades foram cobertas com óleo mineral estéril para evitar evaporação do meio de cultura. As placas foram incubadas a 26°C por sete dias e o número de cavidades contendo células infectadas foi determinado observando as células em microscópio óptico. Para determinar o título viral expressado em Dose Infecciosa de Cultura de Tecido 50% ($TCID_{50}$ = Tissue Culture Infectious Dose 50%) foi feito o seguinte cálculo: $TCID_{50}$ = maior diluição em que as 10 cavidades foram infectadas (com o expoente positivo ex. 10^4) x 10 elevado à fração do número de células infectadas dividido por 10 (ex $10^{0,6}$) x $10^{0,5}$ (constante) x 10^1 para ter o resultado em ml (devido ao fato de que o volume do inóculo viral foi só 0,1 ml). Detalhes deste procedimento, acompanhado com exemplos de titulações, encontram-se no Apêndice 6.

4.11 Extração do DNA Viral a Partir de Células Infectadas (Microextração)

O DNA viral foi micro-extraído de células infectadas utilizando-se o protocolo modificado a partir do apresentado por Maruniak *et al.* (1984). Células foram semeadas em placa com 24 cavidades e infectadas com o vírus de interesse como indicado no

Apêndice 1. Três dias após a inoculação, as células e o meio de cultura de cada uma das cavidade foram recuperados individualmente e centrifugados em microcentrífuga a 13.000 rpm, de maneira a precipitar tanto as células infectadas como os ECVs. As membranas celulares e o envelope dos virions foram lisados com SDS, e o DNA cromossomal descartado antes de digerir a proteína dos capsídeos com proteinase K. O DNA foi então extraído com fenol e éter e posteriormente precipitado com etanol (Apêndice 7). O DNA extraído desta maneira foi digerido com enzima de restrição e as bandas resultantes foram separadas em gel de agarose contendo brometo de etídio. Os fragmentos de DNA foram examinadas sob luz ultravioleta (UV).

4.12 Construção da Biblioteca Genômica do AgMNPV-2D

O genoma do isolado viral AgMNPV-2D foi clonado na sua totalidade no plasmídeo pGEM-3Z. Para tal, o método do "shot gun" foi utilizado (Sambrook *et al.*, 1989). O genoma viral do AgMNPV-2D e o plasmídeo foram digeridos com a enzima de restrição HindIII. As digestões foram verificadas correndo-se uma alíquota do material em gel de agarose. O DNA foi precipitado com etanol e ressuspendido no volume desejado de água, de maneira a se ter quatro vezes mais terminações digeridas do DNA viral do que do plasmídeo. A ligação foi feita por 4 h. a temperatura ambiente com a enzima Ligase (New England Biolabs). Depois, a enzima foi inativada a 65°C por 10 min. Este DNA foi diluído em água esterilizada na proporção 1:1, 5 μ l da solução diluída foram utilizados para transformar bactérias (*E. coli* DH5 α).

A transformação foi feita seguindo o protocolo básico fornecido com as células competentes pela companhia Gibco/BRL, com pequenas modificações (Apêndice 8). Após transformação, 100 μ l de células de *E. coli* foram plaqueadas em meio LB (Luria Broth) contendo 100 μ g/ml de ampicilina, de maneira a permitir o crescimento somente daquelas bactérias contendo o plasmídeo que confere resistência ao antibiótico. Também foi adicionado ao meio 20 μ g/ml de X-gal. Dois tipos de colônias foram obtidas: a) colônias azuis representando células com o plasmídeo intacto ou religado, nas quais há expressão do gene β -galactosidase e b) colônias brancas cujo gene da β -galactosidase encontra-se interrompido provavelmente pelo fragmento de DNA clonado.

Para verificar qual fragmento do genoma viral foi clonado, o DNA do plasmídeo foi extraído das células bacterianas utilizando-se procedimentos modificados a partir dos métodos descritos por Sambrook *et al.* (1989) para mini preparações de DNA (Apêndices 9 e 10). Um grande número de colônias brancas foi analisado. O DNA dos plasmídeos, o DNA genômico do AgMNPV e o plasmídeo intacto (como controle), foram digeridos com HindIII e separados em gel agarose, por eletroforese. Os fragmentos clonados foram primeiramente reconhecidos pela migração no gel em comparação com os diferentes fragmentos do genoma total digerido com a mesma enzima. Posteriormente a identidade destes fragmentos foi confirmada utilizando outras enzimas de restrição previamente mapeadas no genoma do AgMNPV (Johnson & Maruniak, 1989) cujos sítios de restrição, sendo conhecidos, permitiram prognosticar qual seria o perfil esperado.

Outro procedimento utilizado para a identificação de clones recombinantes foi a hibridização *in situ* de colônias (Sambrook *et al.*, 1989). Para tal, somente colônias

brancas foram transferidas a duas diferentes placas com meio LB e ampicilina, utilizando palitos de dentes estéreis. A posição de cada colônia foi cuidadosamente marcada com ajuda de um "colony grid". Após crescimento das colônias durante 16 h à 37°C, uma destas placas (considerada a placa "master") foi guardada à 4°C. A segunda placa foi utilizada para transferir as colônias a uma membrana de nylon (Zeta-Probe, Bio Rad). As colônias na membrana foram lisadas, o DNA liberado foi desnaturado com uma solução básica e então fixado como descrito no Apêndice 11. Esta membrana foi posteriormente hibridizada com diferentes sondas radioativamente marcadas correspondente a fragmentos do genoma viral digeridos com HindIII. O método de hibridização utilizado foi aquele recomendado para a membrana de nylon Zeta Probe (Bio Rad) (Apêndice 12). As colônias que apresentaram sinal positivo foram crescidas a partir da placa "master", o DNA foi extraído e analisado como explicado anteriormente. A mesma membrana foi utilizada para hibridizar várias sondas. Após a exposição da membrana num filme de raios X, ela foi desibridizada, como descrito no Apêndice 13, e reutilizada. As sondas consistiram de fragmentos do genoma viral que não foram clonados anteriormente, cujo DNA foi extraído diretamente do gel de agarose (Apêndice 14).

Finalmente fragmentos do genoma viral que não foram clonados utilizando o método do "shot gun", foram clonados individualmente extraíndo-se o fragmento digerido do gel de agarose, como indicado no Apêndice 14. O DNA do plasmídeo também foi digerido com a mesma enzima de restrição, corrido em gel de agarose e a banda foi colocada no mesmo tubo que o fragmento a ser clonado de maneira a extrair ambos

fragmentos do gel simultaneamente. O procedimento de ligação, transformação celular e triagem dos clones obtidos foram os mesmos descritos anteriormente.

4.13 Marcação Radioativa do DNA Viral

Dois métodos foram utilizados para marcar o DNA com o nucleotídeo radioativo α -³²P (Sambrook *et al.*, 1989). O primeiro foi "nick-translation", no qual o DNA foi submetido à ação da enzima DNase. que introduz nicks aleatoriamente ao longo da molécula de DNA. Ao mesmo tempo a ação da DNA Polimerase I repara os "nicks" encontrados utilizando os nucleotídeos presentes no meio, dos quais um, o α -³²P-dATP neste caso, era radioativo (Apêndice 15). Este método foi utilizado para marcar as sondas.

O segundo método de marcação foi o "endlabeling", para o qual foi utilizada a enzima Klenow que conserva a atividade exonucleolítica 3'-5' da polimerase I mas perdeu a atividade exonucleolítica 5'-3'. Assim, esta enzima foi utilizada para sintetizar as extremidades da molécula de DNA após digestão com enzimas de restrição (Apêndice 16). Novamente o nucleotídeo marcado foi o α -³²P-dATP.

4.14 Construção do Mapa Físico do Genoma do AgMNPV com PstI e SmaI

Os métodos utilizados para o mapeamento do genoma viral com PstI e SmaI foram aqueles descritos por Maruniak *et al.* (1984) e Johnson e Maruniak (1989).

Utilizando-se os clones da biblioteca genômica do AgMNPV-2D, os fragmentos clonados foram submetidos a digestões duplas: com a enzima utilizada na clonagem

(HindIII) e a enzima a ser mapeada (PstI ou SmaI) respectivamente. Os fragmentos foram marcados radioativamente pelo método "end-labeling" (Apêndice 16). Após eletroforese o gel foi seco a vácuo, à 80°C por uma hora, e exposto a filme de raios X. A mobilidade dos fragmentos foi comparada com a mobilidade dos fragmentos obtidos quando o genoma total foi digerido com as duas enzimas separadas e simultaneamente. Esta triagem preliminar permitiu obter as seguintes informações: a) quais os fragmentos HindIII que não continham nenhum sítio de restrição da enzima a ser mapeada. Neste caso os fragmentos não sendo digeridos pela segunda enzima apresentaram a mesma mobilidade que o fragmento correspondente no genoma viral digerido somente com HindIII; b) quais os fragmentos HindIII que continham sítios de restrição da segunda enzima. Neste caso os fragmentos HindIII foram digeridos pela segunda enzima dando lugar a um número n de bandas. Quando o número de bandas obtidas foi de 3 ou mais, $n-2$ corresponderam a fragmentos inteiros obtidos com a segunda enzima. A mobilidade foi então comparada com a dos fragmentos obtidos quando o DNA genômico foi digerido somente com esta segunda enzima. A obtenção de 2 bandas correspondeu a existência de somente um sítio de restrição. Nesse caso os fragmentos não apareceram nas digestões simples do genoma total mas sim na digestão dupla.

O tamanho preciso dos fragmentos foi estimado utilizando um digitador e um programa de computador. O digitador permitiu medir a distância de migração das bandas de DNA, em milímetros, a partir de um ponto arbitrariamente elegido como ponto de início. O programa "Southern Job" (Southern, 1979) comparou então a migração dos fragmentos em comparação com os fragmentos do marcador (λ HindIII) cujos tamanhos

eram conhecidos. Esta informação foi imprescindível para a obtenção da ordem correta de todos os fragmentos a serem mapeados. Finalmente o tamanho (medido pelo menos de três diferentes géis) e a ordem de todos os fragmentos foram computados pelo método do quadrado mínimo (Schroeder & Blattner, 1978).

Nos casos em que não foi possível estimar com alta precisão o tamanho dos fragmentos obtidos com as duas enzimas utilizadas, foram feitas digestões extras com outras enzimas cujos sítios de restrição foram previamente mapeadas (Johnson & Maruniak 1989).

4.15 Southern Blots

Fragmentos de DNA separados em géis de agarose foram transferidos a membranas de nylon (Zeta Probe - Bio Rad), utilizando o método alcalino recomendado para esta membrana (Apendice 17). Este procedimento comumente conhecido como Southern Blot (Southern, 1975) foi utilizado durante a análise dos variantes genômicos virais do AgMNPV.

4.16 Mapeamento das Regiões Variáveis do Genoma do AgMNPV

Foram mapeadas as regiões variáveis de isolados genômicos do AgMNPV, obtidos previamente pelo método de purificação em placa descrito por Maruniak *et al.* (1984). Um total de 18 variantes genômicos foram mapeados. Seis provenientes da preparação viral AgMNPV-'79 (Maruniak, 1989) e onze provenientes da preparação viral AgMNPV-'85, foram obtidos após digestão com as enzimas HindIII e PstI (Maruniak,

1992). Após digestão, o DNA foi corrido em gel de agarose 0.75 % e transferido para membranas de nylon. Diversos clones da biblioteca genômica do AgMNPV-2D foram utilizados como sondas para determinar a composição dos fragmentos novos nos diversos variantes. O tamanho dos fragmentos de cada variante genômico foi estimado com o programa "Southern Job" (Southern, 1979) e comparado com o protótipo do AgMNPV, o AgMNPV-2D, cujo genoma foi mapeado com estas duas enzimas. Foram mapeadas as regiões de cada isolado genético, apresentando variação em comparação com o genoma do AgMNPV-2D. Finalmente os perfis de restrição do isolado genômico AgMNPV-D7 digerido com BamHI, EcoRI, HindIII, PstI e SmaI também foram comparados com os perfis do AgMNPV-2D e as variações foram localizadas no mapa físico do genoma do AgMNPV-2D.

4.17 Análise da Divergência Genômica dos Variantes Genéticos do AgMNPV

A análise da divergência dos variantes genômicos do AgMNPV, foi baseada nas modificações encontradas nos sítios de restrição das enzimas HindIII e PstI (aparecimento de novos sítios e/ou perda de sítios de restrição presentes no AgMNPV-2D), assim como nos dados de inserções e deleções de DNA. Para tal, os dados de presença ou ausência de sítios de restrição foram convertidos num grupo de caracteres binários, enquanto os dados de inserções e deleções de DNA foram convertidos num grupo não ordenado de múltiplos caracteres (unordered multistate characters). O programa RADPLOT foi utilizado para criar a matriz de distância, utilizando a combinação dos caracteres acima mencionados (Kambhampati *et*

al., 1992). A análise da divergência foi realizada utilizando o método do "Neighbor-Joining" (NJ), e o fenograma foi gerado usando o pacote MEGA (Kumar *et al.*, 1993).

4.18 Avaliação da Capacidade de Replicação dos Isolados Genéticos *In Vitro*

A atividade biológica dos isolados genéticos foi analisada em cultura de células. Os 18 variantes genotípicos obtidos das preparações de campo de 1979 e 1985 assim como o variante AgMNPV-D7, foram utilizados para infectar, com o MOI (multiplicity of infection = multiplicidade de infecção) de 0.4, células IPLB-SF-21AE em frascos de 25 cm² na densidade de 5x10⁶ células em 5 ml totais. Após 48 h o sobrenadante contendo vírus extracelulares (ECV) foi coletado e titulado, em triplicata, em placas com 96 cavidades (Apêndice 6) nas mesmas células de *Spodoptera*, como descrito por Danyluk & Maruniak (1987). O isolado viral AgMNPV-D7 foi titulado nas células de *Spodoptera*, SF9. As células de *A. gammaealis*, UFL-AG-286, também foram utilizadas na titulação dos ECV dos 18 variantes genéticos do AgMNPV. Estas células foram semeadas na concentração de 3x10⁵ células/ml e 100 µl desta suspensão celular foi aliquoteada por cavidade como recomendado por Sieburth & Maruniak (1988b). A replicação viral foi avaliada pela presença de poliedros nas células inoculadas. O valor do TCID₅₀ foi considerado como indicativo da virulência dos isolados genéticos *in vitro*, uma vez que ela reflete a capacidade replicativa através da quantidade de partículas virais infecciosas presentes no meio.

4.19 Clonagem de uma Região Variável do AgMNPV-2D e AgMNPV-D7

Os fragmentos HindIII-F dos isolados genéticos AgMNPV-2D e AgMNPV-D7 foram clonados no plasmídeo pGEM-3Z (Promega, Corp) usando-se os métodos convencionais (Sambrook *et al*, 1989). Foram feitas subclonagens adicionais para localizar especificamente o sítio variável dentro dos fragmentos HindIII-F.

4.20 Sequenciamento de uma Região Variável do Genoma do AgMNPV

A região altamente variável dos isolados AgMNPV-2D e AgMNPV-D7 foi especificamente localizada no fragmento PstI-T (dentro do fragmento HindIII-F) e subclonada nos plasmídeos pGEM-5Zf(+) e pGEM-7Zf(+) que permitem que o sequenciamento seja feito com "template" de fita simples ou dupla (Promega, Corp). Foram gerados clones com deleções superpostas com a enzima Exonuclease III utilizando-se um protocolo modificado a partir daquele recomendado pela Promega, Corp. (Apêndice 18). Os clones assim gerados foram utilizados para transformar as linhagens de *E. coli* DH5 α ou JM109, para posteriormente extrair-se o DNA de fita dupla (Apêndice 10) ou simples (Apêndice 19), respectivamente, que foi então utilizado para sequenciamento. O sequenciamento foi feito com o método do "dideoxy chain termination" (terminação da cadeia pela incorporação de uma base dideoxy) (Sanger *et al.*, 1977) com a base d-ATP marcada pelo ³⁵S. Os "primers" utilizados foram o T7 e SP6 cujas sequências complementares fazem parte dos plasmídeos pGEM na região adjacente ao sítio múltiplo de clonagem. Foram empregados o kit "Sequenase 2.0" e os protocolos recomendados pela companhia United States Biochemical Corporation

(Apêndice 20). A sequência de bases foi resolvida correndo as reações de sequenciamento em géis de acrilamida 6%. Os géis foram fixados e secos a vácuo, à 80°C, antes de serem expostos a filmes de raios X por 16 horas a -70°C (Apêndice 21).

4.21 Análise das Sequências de DNA

As sequências de nucleotídeos foram analisadas utilizando-se o Pacote de Programas oferecido pelo GCG (Genetics Computer Group, Inc.). Foram utilizados quatro destes programas: 1) as sequências foram inseridas no sistema utilizando-se o editor SEQED, 2) o alinhamento das diversas regiões sequenciadas de um mesmo variante foi feito com o programa LINEUP, que permite editar até 30 sequências simultaneamente, 3) o mapa de restrição da região sequenciada nas duas linhagens virais, assim como a possível tradução desta região em proteína, foi obtida com o programa MAP, 4) a comparação das sequências foi obtida com a ajuda do programa GAP que compara e alinha duas sequências maximizando o número de coincidências ("matches") e minimizando o número de falhas ("gaps") (Needleman & Wunsch, 1970). As instruções sobre o uso destes programas foram obtidas no manual GCG (versão 7.0). No Apêndice 22 encontra-se uma breve descrição dos comandos básicos para o manejo destes programas.

A homologia entre as sequências obtidas do genoma do AgMNPV com outras sequências previamente publicadas e disponíveis em algum banco de dados como Genbank, foi investigada com a ajuda da Rede de Serviços BLAST, proveniente do NCBI (National Center for Biotechnology Information), disponível na INTERNET. As

sequências apresentando alta homologia foram recuperadas ("retrived") utilizando-se o programa FARFETCH (proveniente do Whitehead Institution for Biomedical Research) e o código designado pelo banco de dados genéticos (nucleotide sequence data-bases) para aquela sequência. No Apêndice 23 encontra-se uma breve descrição da utilização destes programas.

5. RESULTADOS

5.1 Construção da Biblioteca Genômica do AgMNPV-2D

Os vinte e cinco fragmentos do genoma do AgMNPV-2D, obtidos após digestão com a enzima HindIII, foram clonados no plasmídeo pGEM-3Z (Promega, Corp.). Estes fragmentos variam de tamanho desde aproximadamente 19.000 pares de bases (pb) (fragmento HindIII-A), até 340 pb (fragmento HindIII-Y). O plasmídeo pGEM-3Z com 2.743 pb foi utilizado para a construção deste banco genômico uma vez que contém um único sítio de restrição para a enzima HindIII.

A Figura 5 apresenta vinte e quatro destes clones (fragmentos HindIII-A a HindIII-X) digeridos com HindIII de maneira a separar os fragmentos clonados do plasmídeo. O genoma total dos variantes genéticos AgMNPV-2D e AgMNPV-D7, assim como o plasmídeo sem nenhum inserto, digeridos com a mesma enzima, também encontram-se nesta figura para fins de comparação. O DNA do fago λ digerido com HindIII, foi utilizado como marcador do peso molecular.

5.2 Construção do Mapa Físico do Genoma do AgMNPV-2D com as Enzimas PstI e SmaI

A construção do mapa de restrição baseou-se no tamanho dos fragmentos obtidos quando o genoma foi digerido com diferentes enzimas. O tamanho dos vinte e cinco

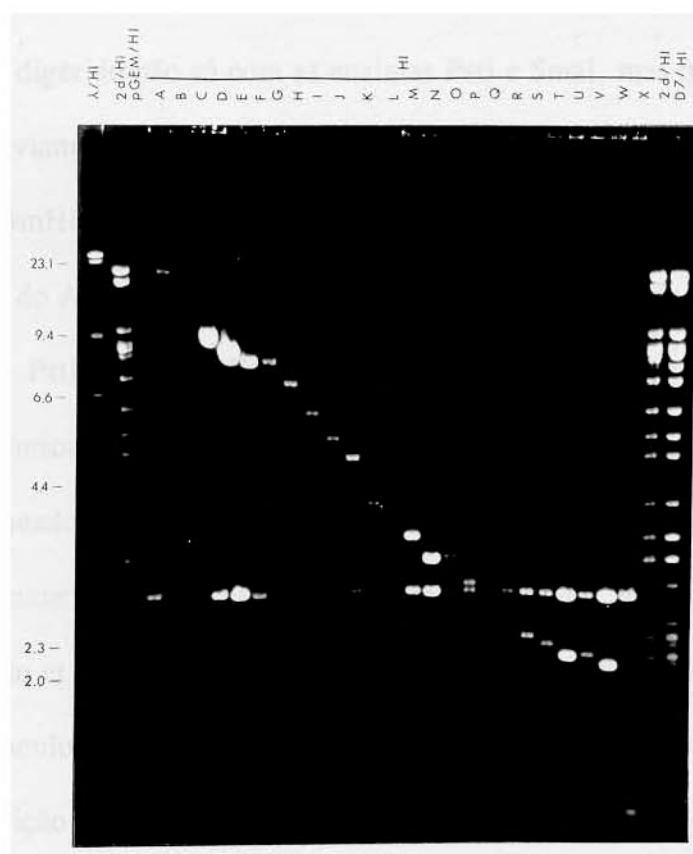


FIGURA 5. Banco genômico do AgMNPV-2D. 24 fragmentos do genoma do AgMNPV-2D (2d) (A - X), clonados no plasmídeo pGEM-3Z (pGEM) encontram-se representados após digestão com a enzima HindIII (HI). O genoma total dos variantes AgMNPV-2D e AgMNPV-D7 (D7), digeridos com HindIII, encontram-se lado a lado para fins de comparação. O DNA do fago λ digerido com HindIII (λ /HI) foi utilizado como padrão de peso molecular.

fragmentos gerados quando o genoma do AgMNPV-2D foi digerido com PstI (fragmentos A - Y) e o tamanho dos 3 fragmentos gerados pela digestão com SmaI (fragmentos A - C) foram estimados após medir a migração destes fragmentos em vários géis com o auxílio de um digitador.

A Tabela 2 apresenta o tamanho dos fragmentos obtidos quando o genoma do AgMNPV-2D foi digerido não só com as enzimas PstI e SmaI, mas também com outras cinco enzimas previamente mapeadas por Johnson & Maruniak (1989): HindIII, EcoRI, BstEII, BglII e BamHI. Também são apresentados os valores dos desvios padrões.

O genoma do AgMNPV-2D, de aproximadamente 133 mil pares de bases (Kpb), foi mapeado com PstI e SmaI. Essa informação foi acrescida ao mapa previamente construído por Johnson e Maruniak (1989). A representação circular do mapa físico do AgMNPV-2D baseado nas 7 enzimas encontra-se na Figura 6. Este mapa encontra-se posicionado de maneira a colocar o fragmento HindIII-G, que contém o gene da poliedrina (Zanotto et al., 1992), na posição 0 como recomendado pela convenção para mapeamento de baculovírus (Vlak & Smith, 1982). Também encontram-se representados os sítios de restrição de cada enzima assim como os fragmentos de DNA por eles gerados. Na região interna encontram-se designadas as quatro coordenadas correspondentes às posições: 0/100%, 25%, 50% e 75% do mapa (unidades de mapa).

A compilação dos dados obtidos com 7 enzimas com as quais o genoma do AgMNPV-2D encontra-se atualmente mapeado, dando um total de 82 sítios de restrição,

TABELA 2. Tamanho dos fragmentos do genoma do AgMNPV-2D (pares de bases $\pm$ desvio padrão[@]) digerido com 7 enzimas de restrição

Frag	Enzimas utilizadas na digestão do genoma do AgMNPV-2D						
	HindIII	PstI	EcoRI	BstEII	BglII	BamHI	SmaI
A	19232 $\pm$ 113	26690 $\pm$ 116	38433 $\pm$ 79	38574 $\pm$ 65	34514 $\pm$ 119	68528 $\pm$ 139	59555 $\pm$ 135
B	16446 $\pm$ 67	15568 $\pm$ 113	18439 $\pm$ 108	25129 $\pm$ 116	29199 $\pm$ 73	33502 $\pm$ 57	51319 $\pm$ 144
C	9942 $\pm$ 43	10150 $\pm$ 39	17923 $\pm$ 113	20850 $\pm$ 73	24135 $\pm$ 56	18143 $\pm$ 112	22112 $\pm$ 59
D	8976 $\pm$ 36	7955 $\pm$ 47	13719 $\pm$ 43	16500 $\pm$ 109	21710 $\pm$ 117	12813 $\pm$ 35	
E	8540 $\pm$ 38	6586 $\pm$ 49	10928 $\pm$ 37	9956 $\pm$ 33	17709 $\pm$ 87		
F	8356 $\pm$ 33	6527 $\pm$ 34	10662 $\pm$ 37	7420 $\pm$ 31	4572 $\pm$ 20		
G	7262 $\pm$ 29	6452 $\pm$ 43	10292 $\pm$ 37	6133 $\pm$ 39	1147 $\pm$ 13		
H	6164 $\pm$ 21	5831 $\pm$ 25	6363 $\pm$ 34	5350 $\pm$ 32			
I	5517 $\pm$ 22	5377 $\pm$ 22	5128 $\pm$ 24	2375 $\pm$ 29			
J	4967 $\pm$ 26	5080 $\pm$ 33	1080 $\pm$ 10	699 $\pm$ 13			
K	4080 $\pm$ 18	4962 $\pm$ 28					
L	3477 $\pm$ 16	4172 $\pm$ 21					
M	3443 $\pm$ 19	3627 $\pm$ 27					
N	3222 $\pm$ 17	2861 $\pm$ 22					
O	3214 $\pm$ 17	2817 $\pm$ 17					
P	2841 $\pm$ 14	2575 $\pm$ 16					
Q	*2512 $\pm$ 44	2530 $\pm$ 13					
R	2381 $\pm$ 12	2276 $\pm$ 22					
S	2381 $\pm$ 12	2264 $\pm$ 12					
T	2267 $\pm$ 10	#2045 $\pm$ 0					
U	2114 $\pm$ 10	2070 $\pm$ 9					
V	2114 $\pm$ 10	1784 $\pm$ 14					
W	2104 $\pm$ 11	1545 $\pm$ 20					
X	1082 $\pm$ 6	895 $\pm$ 6					
Y	337 $\pm$ 4	307 $\pm$ 4					
Total	132971	132985	132986	132986	132986	132986	132986

@ Tamanho dos fragmentos gerados pelo método de Schroeder & Blattner (1978). Número mínimo de três medidas.

* Média de 7 valores estimados pelo programa Southern (1979)

Tamanho do fragmento obtido após sequenciamento

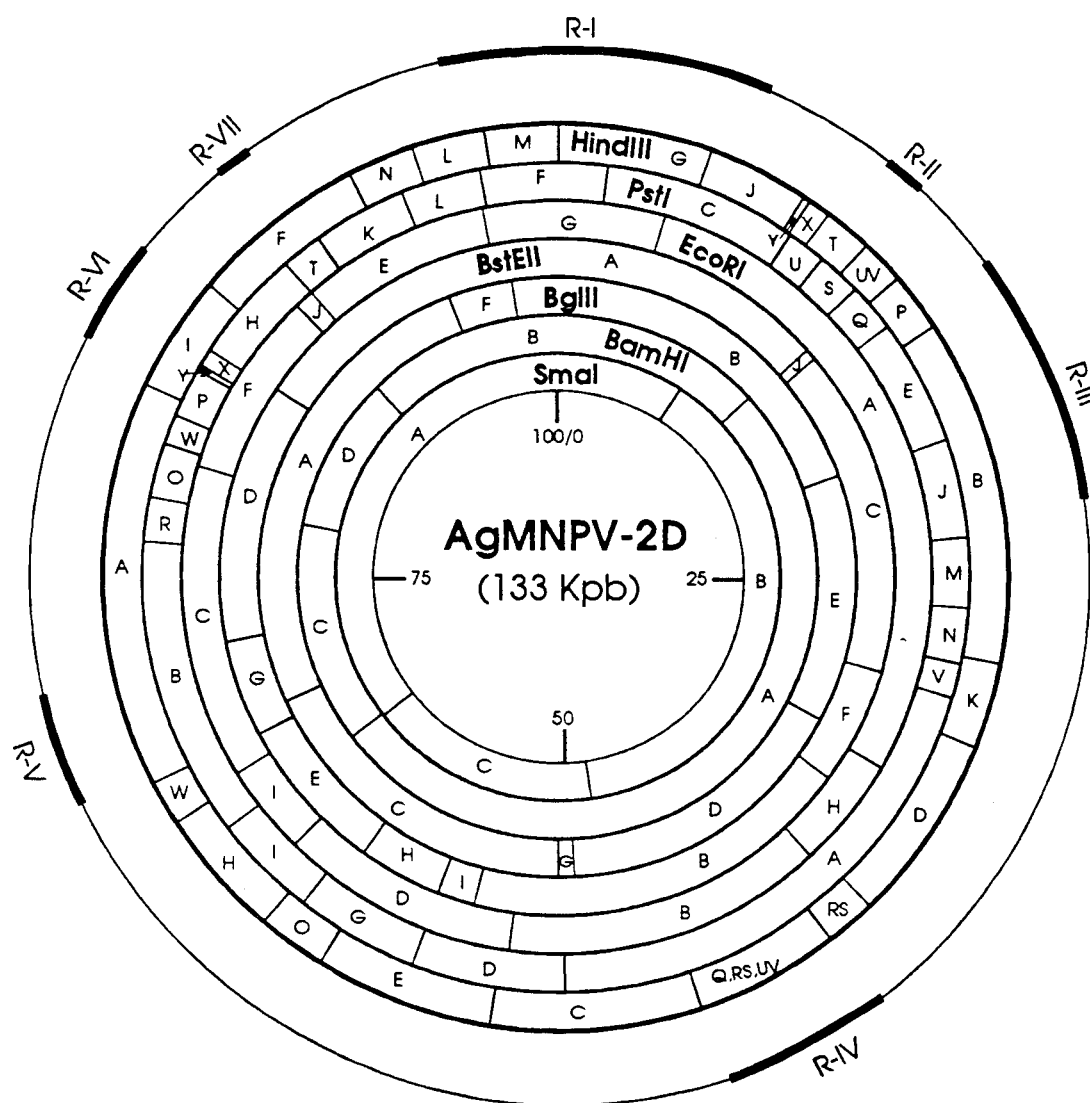


FIGURA 6. Representação circular do mapa genômico do AgMNPV-2D com sete enzimas de restrição. As coordenadas, em unidades de mapa, encontram-se representadas no seu interior. Na periferia do mapa encontram-se indicadas regiões do genoma (R-I a R-VII) onde existem diversas regiões variáveis.

aparecem resumidos na Tabela 3. A ordem dos sítios de restrição no genoma a partir do ponto 0 (correspondente ao sítio HindIII que separa os fragmentos HindIII-G e HindIII-M), a posição dos diferentes sítios de restrição (em termos de pares de bases e de porcentagem do genoma) ao longo do genoma linearizado e o tamanho de cada um dos 82 fragmentos mapeados são apresentados nessa tabela. O único dado que não corresponde ao tamanho do fragmento calculado pelo programa de Schroeder & Blatter (1978) é o fragmento PstI-T o qual foi sequenciado. O tamanho exato encontra-se indicado na Tabela 2.

5.3 Comparação dos Perfis de Restrição dos Variantes Genéticos Obtidos dos Isolados AgMNPV-'79, AgMNPV-'85 e AgMNPV-D7

Os perfis de restrição dos seis variantes genéticos obtidos a partir do isolado viral AgMNPV-'79 e dos 11 variantes genéticos do isolado AgMNPV-'85, assim como o variante AgMNPV-D7 foram comparados entre eles ou com o variante genômico considerado como o protótipo do AgMNPV, AgMNPV-2D, cujo genoma encontra-se mapeado com 7 enzimas de restrição.

Os seis variantes do AgMNPV-'79 (denominados 1A, 2D, 3A, 4B, 5A e 6C), obtidos por métodos de purificação em placa (Maruniak, 1989), foram digeridos com as enzimas HindIII e PstI por serem estas, das enzimas mapeadas, as que digerem o genoma em maior número de fragmentos (25 fragmentos cada uma). A figura 7 apresenta a comparação do perfil de restrição destes 6 variantes digeridos com as enzimas HindIII e PstI. O variante 2D (AgMNPV-2D) foi utilizado como padrão para comparação.

A Figura 8 mostra os perfis de restrição dos 11 variantes genéticos, obtidos a partir do isolado viral AgMNPV-'85, digeridos com HindIII e PstI. Estes variantes foram denominados 3, 6, 16, 17, 18, 33, 34, 35, 36, 37 e 45.

TABELA 3. Sítios de restrição, posição dos sítios em pares de bases (indicando o desvio padrão) e em porcentagem do genoma (unidades de mapa) e tamanho dos fragmentos obtidos com 7 enzimas de restrição no genoma do AgMNPV-2D

Sítio	Enzima	Posição (em pb) $\pm$ dp	Tamanho frag.	Posição (em u.m.)
1	HindIII	0 $\pm$ 0	0	0.0
2	PstI	2541 $\pm$ 31	2541	1.91
3	EcoRI	6035 $\pm$ 31	3494	4.54
4	HindIII	7262 $\pm$ 29	1227	5.46
5	SmaI	12094 $\pm$ 60	4832	9.09
6	HindIII	12229 $\pm$ 38	135	9.20
7	HindIII	12566 $\pm$ 38	337	9.45
8	PstI	12691 $\pm$ 38	125	9.54
9	HindIII	13648 $\pm$ 39	957	10.26
10	PstI	14761 $\pm$ 40	1113	11.10
11	HindIII	15915 $\pm$ 40	1154	11.97
12	PstI	17025 $\pm$ 41	1110	12.80
13	BamHI	17290 $\pm$ 42	265	13.00
14	BstEII	17710 $\pm$ 45	420	13.32
15	HindIII	18029 $\pm$ 41	318	13.56
16	BstEII	18408 $\pm$ 46	379	13.84
17	PstI	19555 $\pm$ 42	1147	14.70
18	HindIII	20870 $\pm$ 43	1315	15.69
19	BglII	25973 $\pm$ 71	5103	19.53
20	PstI	26141 $\pm$ 64	168	19.66
21	PstI	31221 $\pm$ 71	5080	23.48
22	PstI	34848 $\pm$ 75	3627	26.20
23	HindIII	37316 $\pm$ 78	2468	28.06
24	PstI	37709 $\pm$ 78	393	28.36
25	BstEII	39258 $\pm$ 81	1549	29.52
26	PstI	39493 $\pm$ 79	235	29.70
27	HindIII	41396 $\pm$ 79	1903	31.13
28	BglII	43682 $\pm$ 83	2286	32.85
29	EcoRI	44468 $\pm$ 82	786	33.44
30	BstEII	46678 $\pm$ 84	2210	35.10
31	HindIII	50372 $\pm$ 87	3694	37.88
32	EcoRI	50831 $\pm$ 87	459	38.22
33	HindIII	52753 $\pm$ 88	1922	39.67
34	HindIII	59775 $\pm$ 132	7022	44.95
35	SmaI	63413 $\pm$ 137	3638	47.68
36	BglII	65392 $\pm$ 142	1979	49.17
37	PstI	66183 $\pm$ 139	791	49.77
38	BglII	66539 $\pm$ 141	356	50.03
39	EcoRI	69270 $\pm$ 139	2731	52.09
40	HindIII	69717 $\pm$ 139	447	52.42
41	BstEII	71807 $\pm$ 141	2090	54.00
42	PstI	74138 $\pm$ 144	2331	55.75

Tabela 3. Continuação

Sítio	Enzima	Posição (em pb) $\pm$ dp	Tamanho frag.	Posição (em u.m.)
43	BstEII	74182 $\pm$ 143	44	55.78
44	HindIII	78257 $\pm$ 143	4075	58.85
45	BstEII	79532 $\pm$ 144	1275	59.80
46	PstI	80590 $\pm$ 143	1058	60.60
47	HindIII	81471 $\pm$ 143	881	61.26
48	EcoRI	82989 $\pm$ 144	1518	62.40
49	SmaI	85525 $\pm$ 144	2536	64.31
50	BamHI	85818 $\pm$ 144	293	64.53
51	PstI	85967 $\pm$ 145	149	64.64
52	HindIII	87635 $\pm$ 145	1668	65.90
53	EcoRI	88116 $\pm$ 145	481	66.26
54	BstEII	89488 $\pm$ 145	1372	67.29
55	HindIII	89739 $\pm$ 145	251	67.48
56	BglII	90674 $\pm$ 146	935	68.18
57	BstEII	95621 $\pm$ 151	4947	71.90
58	PstI	101535 $\pm$ 183	5914	76.35
59	PstI	103811 $\pm$ 182	2276	78.06
60	BamHI	103961 $\pm$ 182	150	78.17
61	EcoRI	106039 $\pm$ 183	2078	79.74
62	PstI	106628 $\pm$ 183	589	80.18
63	PstI	108173 $\pm$ 183	1545	81.34
64	HindIII	108971 $\pm$ 184	798	81.94
65	PstI	110748 $\pm$ 184	1777	83.28
66	PstI	111055 $\pm$ 184	307	83.51
67	PstI	111950 $\pm$ 184	895	84.18
68	BstEII	112121 $\pm$ 186	171	84.31
69	HindIII	114488 $\pm$ 185	2367	86.09
70	EcoRI	116701 $\pm$ 185	2213	87.75
71	BamHI	116774 $\pm$ 185	73	87.81
72	EcoRI	117781 $\pm$ 185	1007	88.57
73	PstI	117800 $\pm$ 185	20	88.58
74	PstI	119865 $\pm$ 186	2065	90.13
75	HindIII	122844 $\pm$ 187	2979	92.37
76	PstI	124827 $\pm$ 187	1983	93.86
77	BglII	125188 $\pm$ 188	361	94.14
78	HindIII	126066 $\pm$ 187	878	94.80
79	EcoRI	128728 $\pm$ 188	2662	96.80
80	PstI	128999 $\pm$ 188	271	97.00
81	HindIII	129543 $\pm$ 188	544	97.41
82	BglII	129760 $\pm$ 188	217	97.57
83	HindIII	132986 $\pm$ 188	3226	100.00

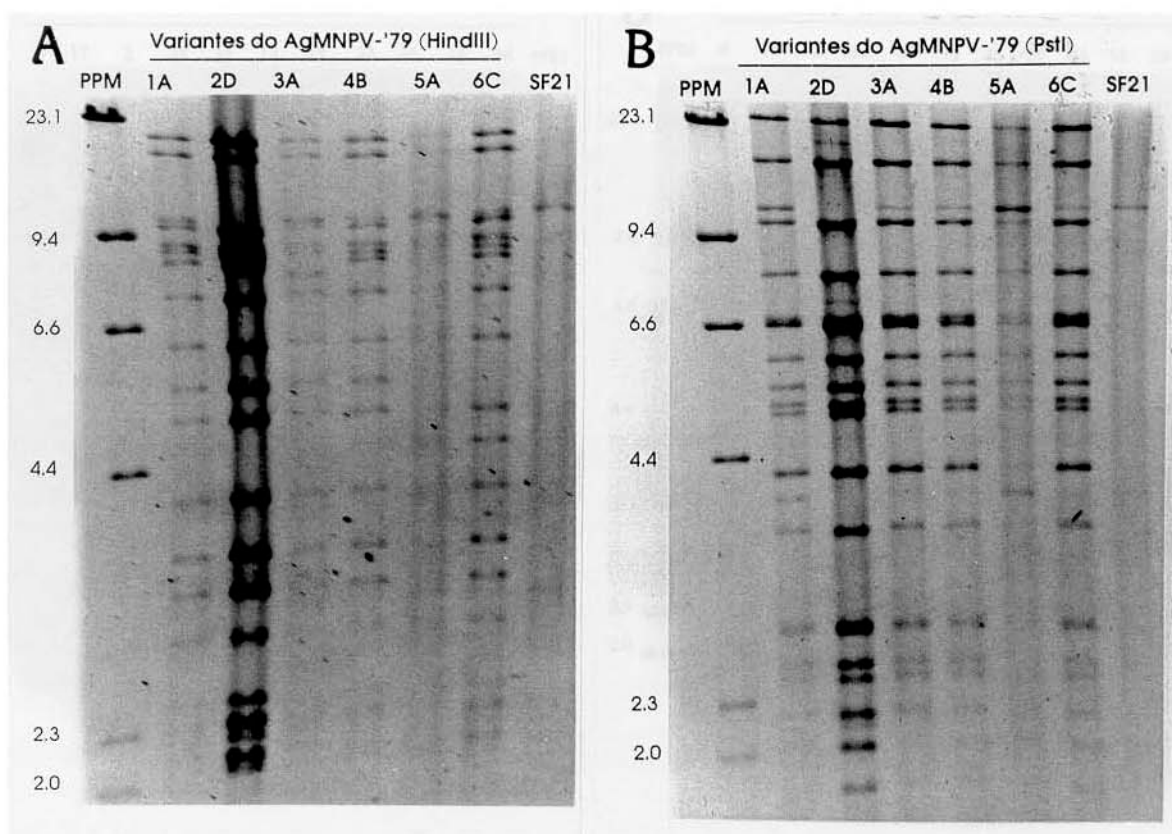


FIGURA 7. Perfis de restrição dos variantes genômicos do AgMNPV-'79, digeridos com HindIII (A) ou PstI (B). O DNA extraído de células de *Spodoptera frugiperda* não infectadas (SF21) apresenta o DNA mitocondrial digerido com a mesma enzima. Padrão de peso molecular (PPM): λ /HindIII. Valores indicados em Kpb.

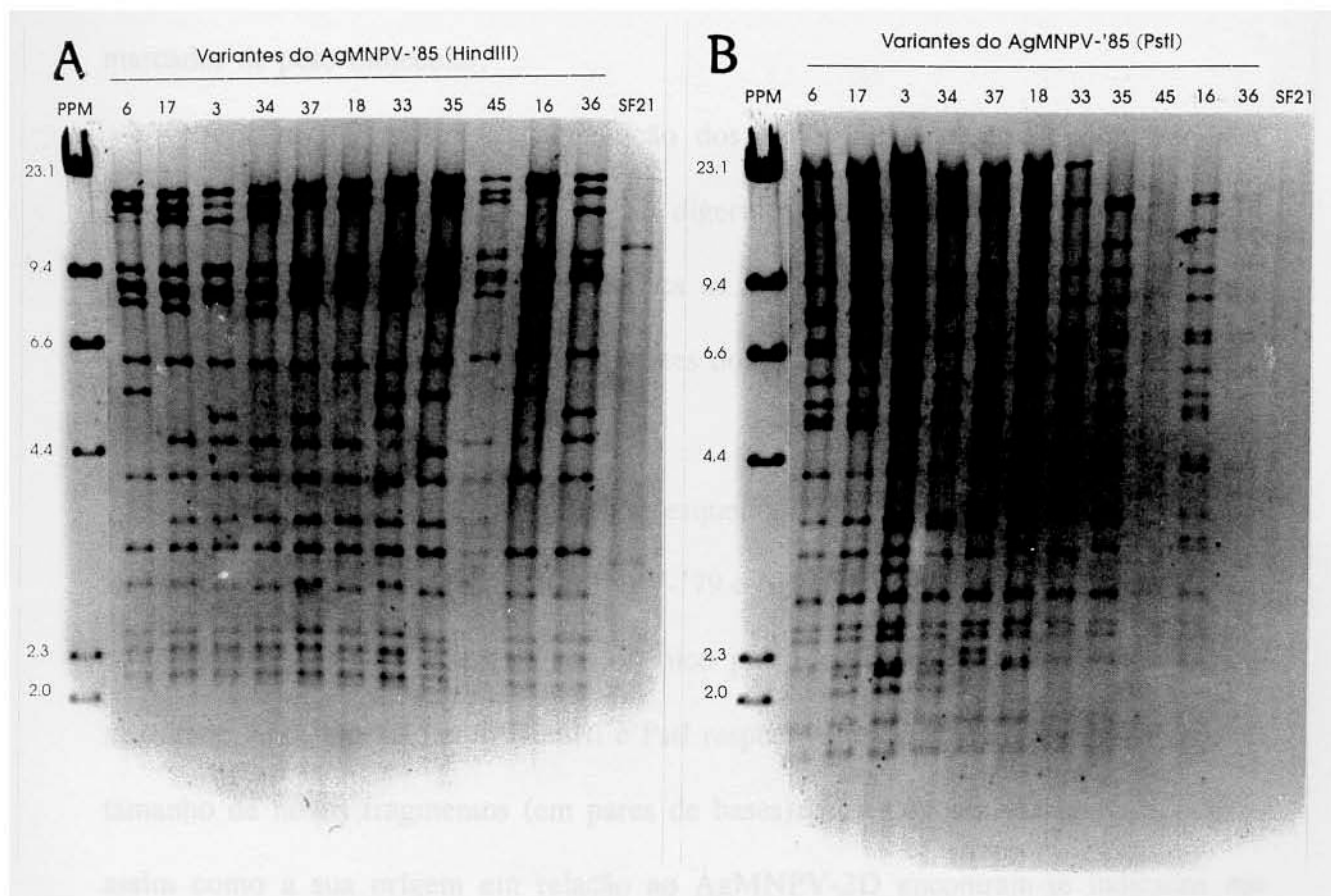


FIGURA 8. Perfis de restrição dos variantes genômicos do AgMNPV-'85, digeridos com HindIII (A) ou PstI (B). O DNA extraído de células de *Spodoptera* (SF21) apresenta o DNA mitocondrial digerido com a mesma enzima. Padrão de peso molecular (PPM): λ /HindIII. Valores indicados em Kpb.

Devido ao fato de que o DNA dos variantes genéticos apresentados nas Figuras 7 e 8 foram obtidos pelo método de microextração a partir de células infectadas (Apêndice 7), cujo produto apresenta também o DNA mitocondrial dessas células, o processo de microextração de células não infectadas contendo DNA mitocondrial foi adicionado como controle. O DNA do fago λ digerido com HindIII foi utilizado como marcador de peso molecular.

A Figura 9 mostra a comparação dos perfis de restrição de dois variantes genéticos, AgMNPV-2D e AgMNPV-D7, digeridos com 5 diferentes enzimas: HindIII, PstI, EcoRI, BamHI e SmaI. A diferença na migração de algumas bandas, devida a variações no tamanho dos fragmentos destes dois variantes, pode ser detectada com as enzimas HindIII, PstI e EcoRI.

Nas figuras 10 e 11 encontram-se esquematizados unicamente os fragmentos de DNA dos variantes genéticos do AgMNPV-'79 e AgMNPV-'85 cuja mobilidade diferem do AgMNPV-2D. Nessas figuras, o único perfil de restrição representado na sua totalidade, após digestão com HindIII e PstI respectivamente, é o do AgMNPV-2D. O tamanho de novos fragmentos (em pares de bases) presentes nos variantes genômicos assim como a sua origem em relação ao AgMNPV-2D encontram-se indicados nas bandas. O desaparecimento de bandas no gel em relação àquelas presentes em AgMNPV-2D está representado com linhas pontilhadas. Os fragmentos de DNA que co-migram com os fragmentos do AgMNPV-2D não foram incluídos para simplificar a figura.

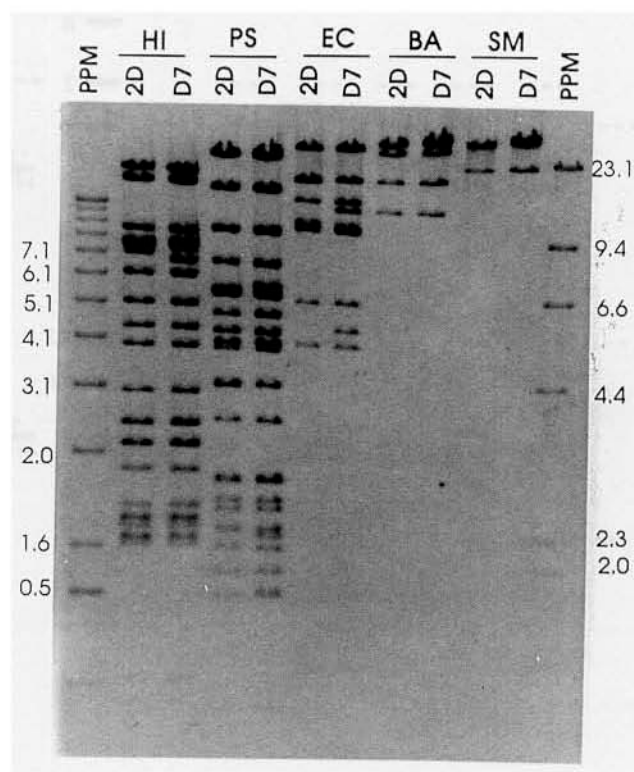


FIGURA 9. Comparação dos perfis de restrição dos variantes AgMNPV-2D (2D) e AgMNPV-D7 (D7) digeridos com as enzimas HindIII (HI), PstI (PS), EcoRI (EC), BamHI (BA) e SmaI (SM). Padrão de peso molecular (PPM): a esquerda, 1 Kb ladder; a direita, λ /HindIII. Valores indicados em Kpb.

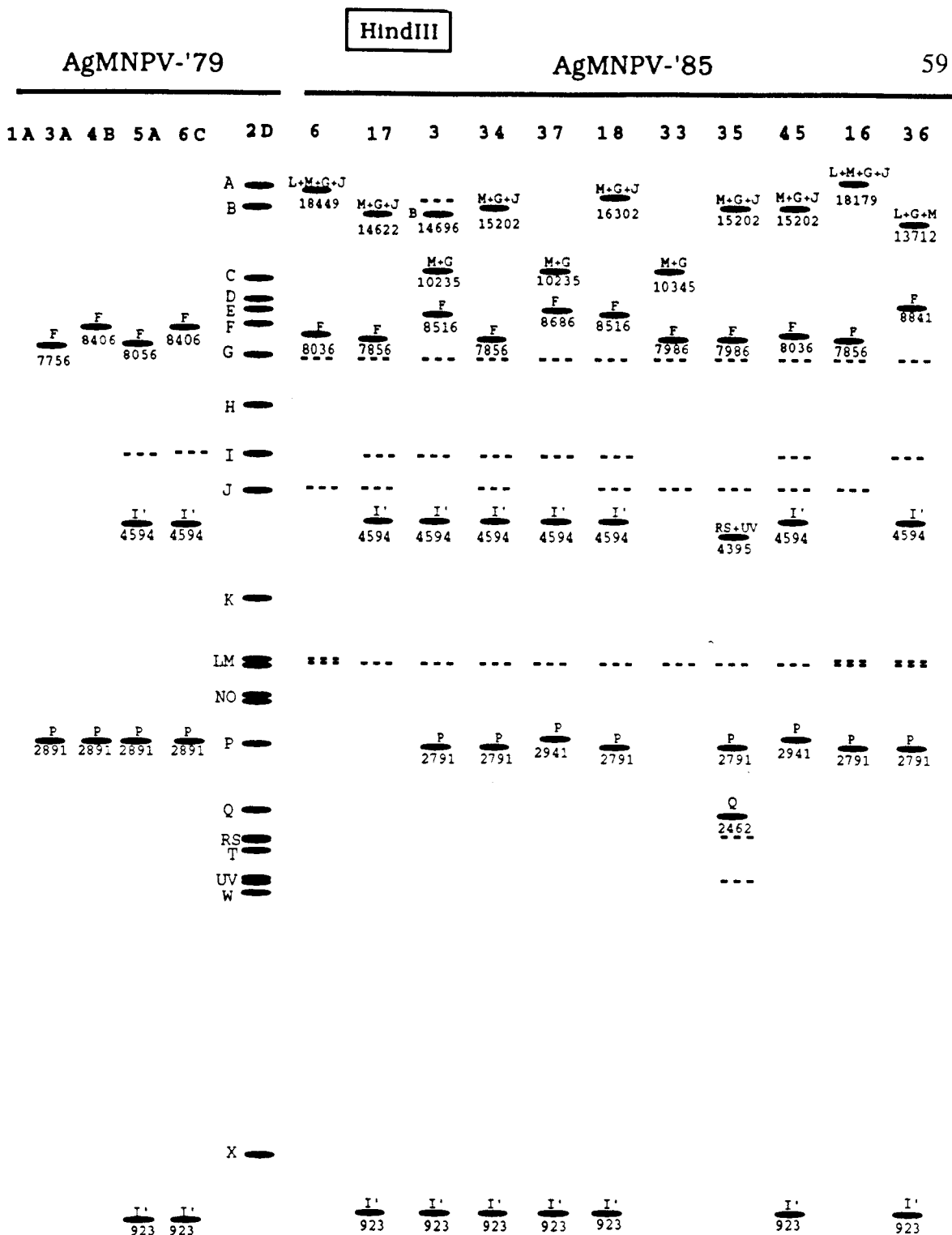


FIGURA 10. Representação esquemática dos fragmentos variáveis dos variantes genômicos do AgMNPV digeridos com HindIII. Os fragmentos representados são unicamente aqueles cuja mobilidade difere daqueles encontrados em AgMNPV-2D. O tamanho dos novos fragmentos e sua origem, determinada por hibridizações, encontram-se descritos junto às bandas. Linhas pontilhadas representam fragmentos ausentes.

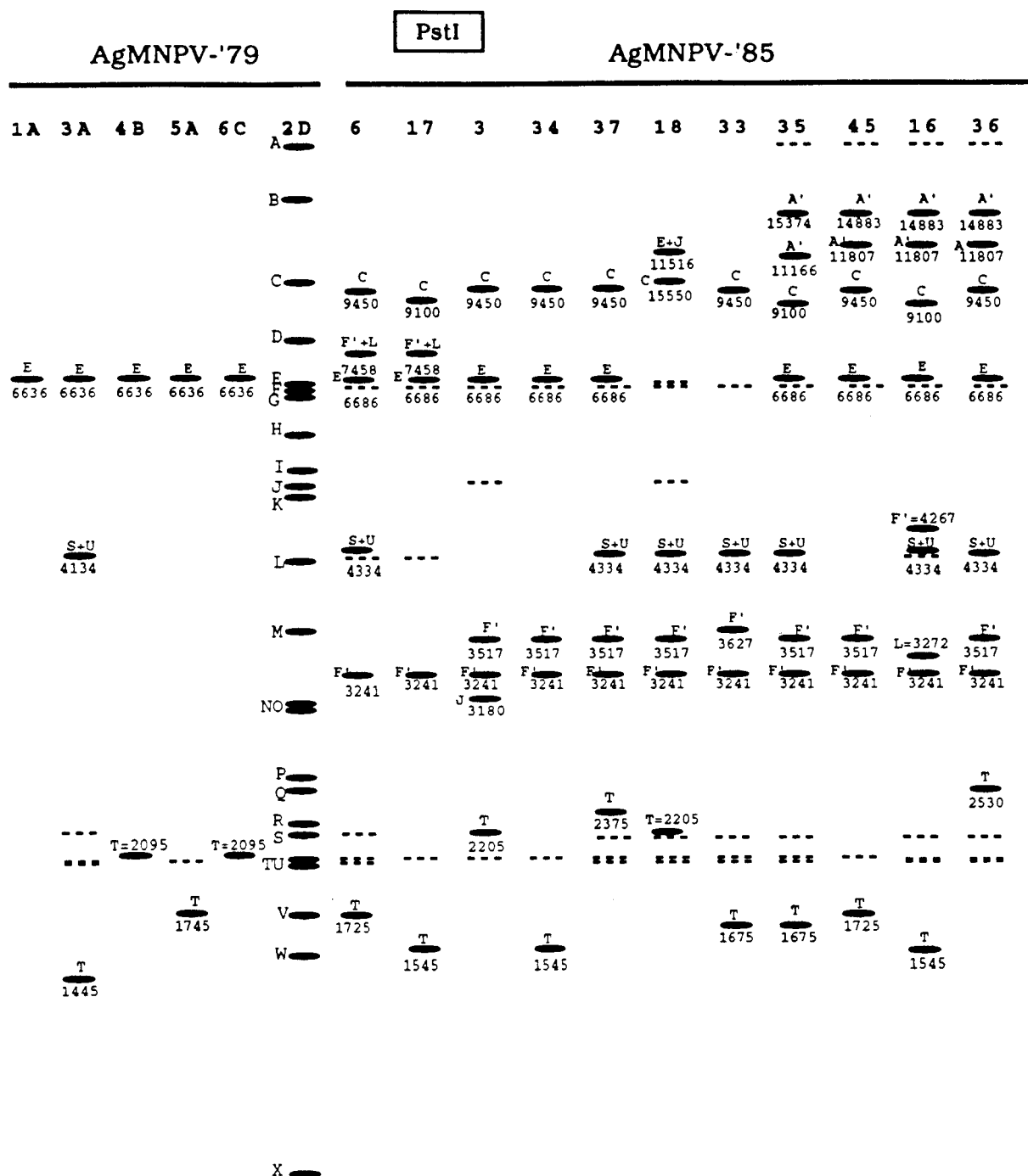


FIGURA 11. Representação esquemática dos fragmentos variáveis dos variantes genômicos do AgMNPV digeridos com PstI. Os fragmentos representados são unicamente aqueles cuja mobilidade difere daqueles encontrados em AgMNPV-2D. O tamanho dos novos fragmentos e sua origem, determinada por hibridizações, encontram-se descritos junto às bandas. Linhas pontilhadas representam fragmentos ausentes.

5.4 Mapeamento das Regiões Variáveis do Genoma do AgMNPV

Após comparar os perfis de restrição dos 18 variantes de AgMNPV descritos anteriormente, as regiões apresentando variação no tamanho dos fragmentos (regiões variáveis) foram localizadas no mapa genômico do AgMNPV-2D. Seis áreas contendo regiões variáveis detectadas nos perfis digeridos com as enzimas HindIII e PstI e uma área detectada através da digestão do variante AgMNPV-D7 com a enzima EcoRI foram mapeadas ao longo do genoma do AgMNPV. A Figura 6 apresenta estas sete regiões denominadas R-I a R-VII.

A figura 12 apresenta, de maneira esquemática, o tipo de variação detectada nos seis variantes genéticos do AgMNPV-'79, nos onze variantes do AgMNPV-'85 e no AgMNPV-D7. Por motivo de simplificação, as variações foram separadas em sete regiões do genoma, existindo no entanto mais de uma região variável na maioria delas. Os tipos de variações detectados foram inserções [representadas por ()], deleções [representadas por)(] e mutações de ponto que ocasionaram o aparecimento de novos sítios de restrição (representado por setas) ou o desaparecimento de sítios de restrição presentes no AgMNPV-2D. Por exemplo, quando o variante AgMNPV-D7 foi analisado, foram localizadas no mapa genômico três regiões variáveis em relação ao AgMNPV-2D, : 1) entre 14,70 e 19,66 unidades de mapa (u.m.) (fragmento PstI-E), 2) entre 66,26 e 79,74 u.m. (fragmento EcoRI-C) e 3) entre 88,58 e 90,13 u.m. (fragmento PstI-T) (ver Figura 12).

A Tabela 4 apresenta o tipo de mutação presente em cada uma das regiões variáveis detectadas. A posição das variações encontram-se especificadas em termos de unidades de mapa e do tamanho do fragmento que elas alteram. Como pode ser

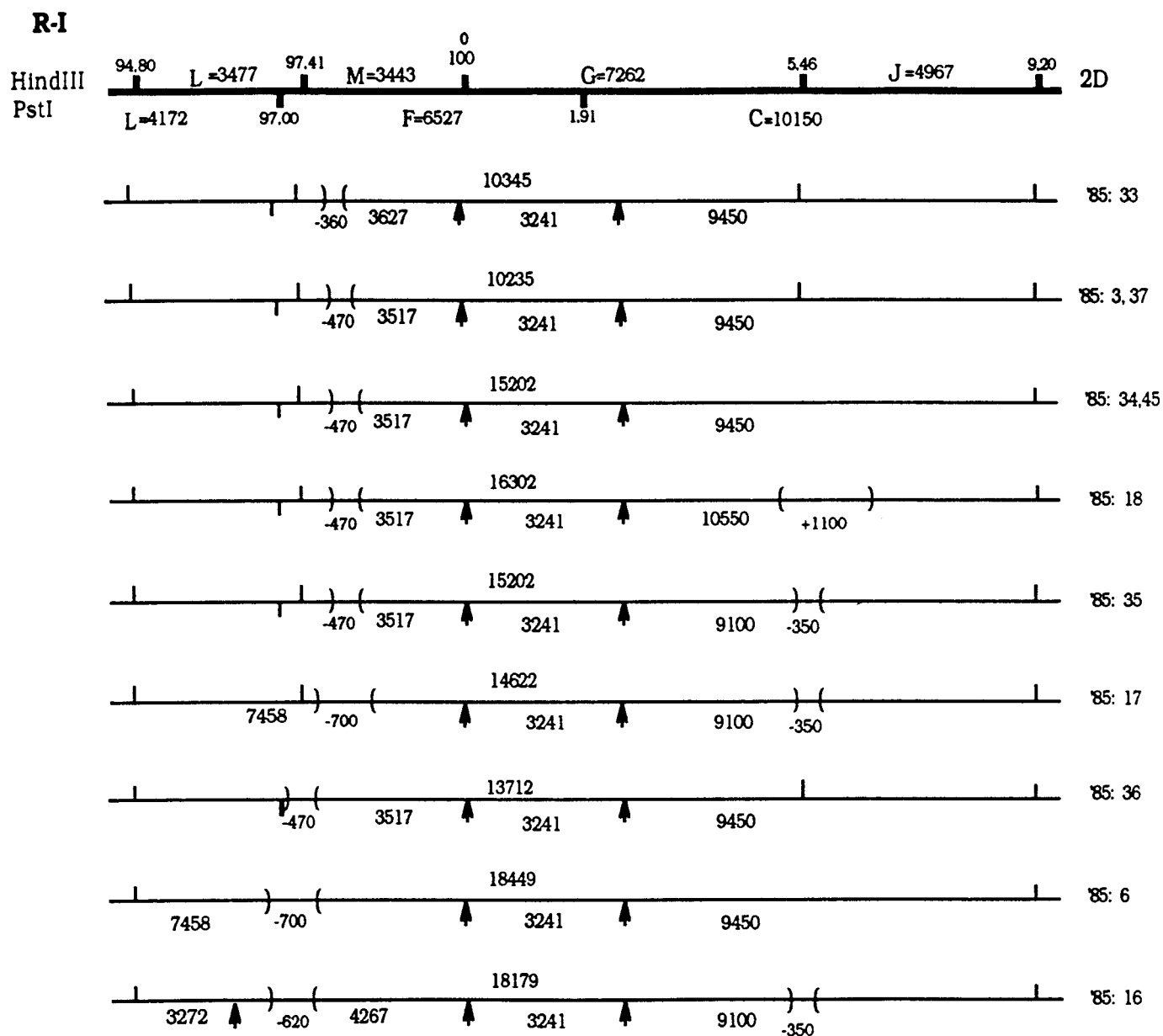


FIGURA 12. Representação esquemática das variações detectadas no genoma dos variantes genéticos do AgMNPV. As variações foram arbitrariamente separadas em 7 regiões (R-I a R-VII) visando a simplificação. A posição dos fragmentos do AgMNPV-2D (2D) em unidades de mapa (próximo ao sítio de restrição), a enzima de restrição utilizada e o tamanho dos fragmentos (em pb) encontram-se representados no mapa no topo da figura. O tipo de variação encontrada nos variantes genômicos estão representados da seguinte maneira: () = inserções,) (= deleções, ↑ ou ↓ = novos sítios de restrição, sítio de restrição ausente = perda do sítio. O tamanho dos novos fragmentos assim formados encontram-se especificados (em pb).

R-II

9,54 11,10 12,80
 PstI U=2070 S=2264 2D

4334

'79: 3A
 '85: 6, 16, 18,
 33, 35, 36, 37

R-III

HindIII 13,56 P=2841 15,69 B=16446
 PstI 14,70 E=6586 19,66 J=5080 23,48 2D

2891 ()
 +50 6636 '79: 3A,
 4B, 5A, 6C

2941 ()
 +100 6686 '85: 37,
 45

() 16496
 +50 6636 '79: 1A

() 16546
 +100 6686 '85: 6, 17

() 16666
 +220 6706 D7

2791 () () 16546
 -50 +150 6686 '85: 16,
 34, 35, 36

2791 () () 16346
 -50 11516 -100 '85: 18

2791 () () 14696
 -50 +150 6686 3180 -1900 '85: 3

Figura 12. Continuação

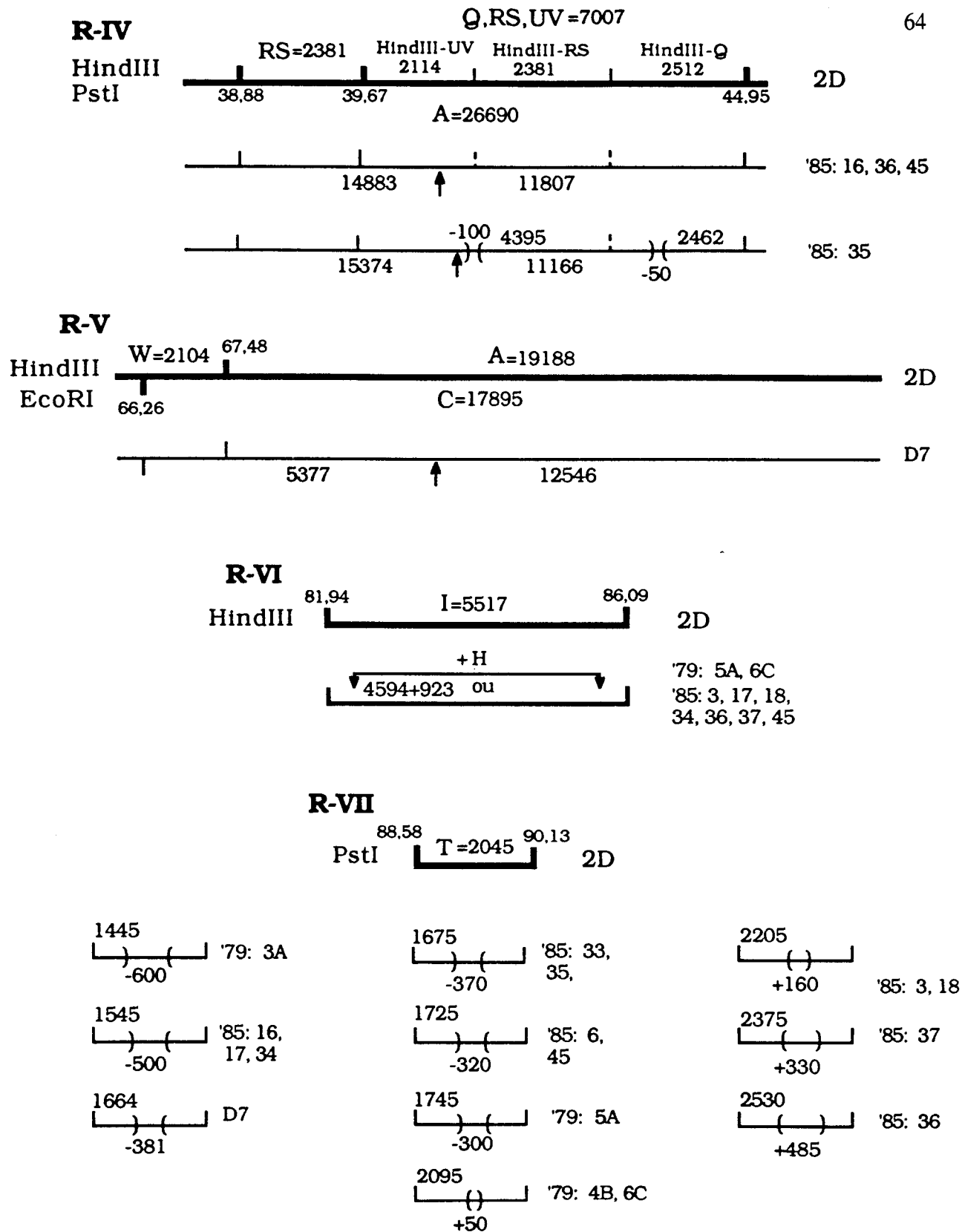


Figura 12. Continuação

TABELA 4. Tipo de variação encontrada nos diferentes isolados genéticos do AgMNPV em relação ao protótipo AgMNPV-2D. A localização da variação encontra-se em termos de unidade de mapa (u.m.) e do tamanho do fragmento alterado.

Posição (u.m.)	0	1,9	2,4	2,43-9,20	5,5	11,10	14,70-15,69	15,69-19,66	15,69-23,48	19,7	19,66-23,48	39,67-44,95	66,3-79,7	81,94-86,09	88,58-90,13	96,32-100	94,80-100	97,00-100	97,41-100	3443
Tamanho (pb)				8988			1315	5721	10351	5080	7007	17895	5517	2045	4887	6920	3987			
AgMNPV-79:																				
1A								+50												
2D																				
3A																				
4B																				
5A																				
6C																				
AgMNPV-85:																				
3	-H,+P	-P	+P					+150												
6	-H,+P	-P	+P					+100												
16	-H,+P	-P	+P	-350				+150												
17	-H,+P	-P	+P	-350				+100												
18	-H,+P	-P	+P	+1100																
33	-H,+P	-P	+P																	
34	-H,+P	-P	+P																	
35	-H,+P	-P	+P	-350																
36	-H,+P	-P	+P																	
37	-H,+P	-P	+P																	
45	-H,+P	-P	+P																	
AgMNPV:																				
D7								+220					+E							

H = sítio HindIII; P = sítio PstI; +/- = ganho ou perda do sítio de restrição respectivamente.

constatado nesta tabela, a região entre 88,6 e 90,1 u.m. apresenta uma ampla gama de variação de tamanhos.

Para verificar se as variações genômicas eram causadas por inserções de DNA cromossomal do hospedeiro, foi efetuada uma hibridização do genoma total dos variantes do AgMNPV, utilizando-se como sonda o DNA cromossomal de células de *Spodoptera*. O resultado negativo demonstrou que não houve inserção cromossomal no genoma viral (dados não apresentados).

5.5 Análise da Divergência dos Variantes Genômicos do AgMNPV

O fenograma gerado pelos métodos UPGMA e NJ separou os variantes genômicos do AgMNPV-'79 e AgMNPV-'85 em dois grupos principais. O primeiro consistindo dos seis variantes obtidos a partir do AgMNPV-'79 e o segundo consistindo dos onze obtidos a partir do AgMNPV-'85. O fenograma gerado pelo método "Neighbor-Joining" (NJ) encontra-se na Figura 13. Variações adicionais encontradas nos variantes do AgMNPV-'85, em comparação àquelas do AgMNPV-'79 (ver Tabela 4), os separa em diferentes grupos. O variante D7 encontra-se agrupado com os do isolado AgMNPV-'79 nesta análise que considera unicamente variações localizadas pela digestão com HindIII e PstI.

5.6 Replicação dos Variantes Genômicos do AgMNPV

A replicação dos diferentes variantes genômicos do AgMNPV foi determinada *in vitro* comparando o valor da dose infecciosa de cultura de tecido 50% (TCID₅₀ = tissue culture infective dose). O TCID₅₀ representa o valor da titulação viral obtida após a infecção inicial das células com inóculos virais contendo a mesma quantidade de

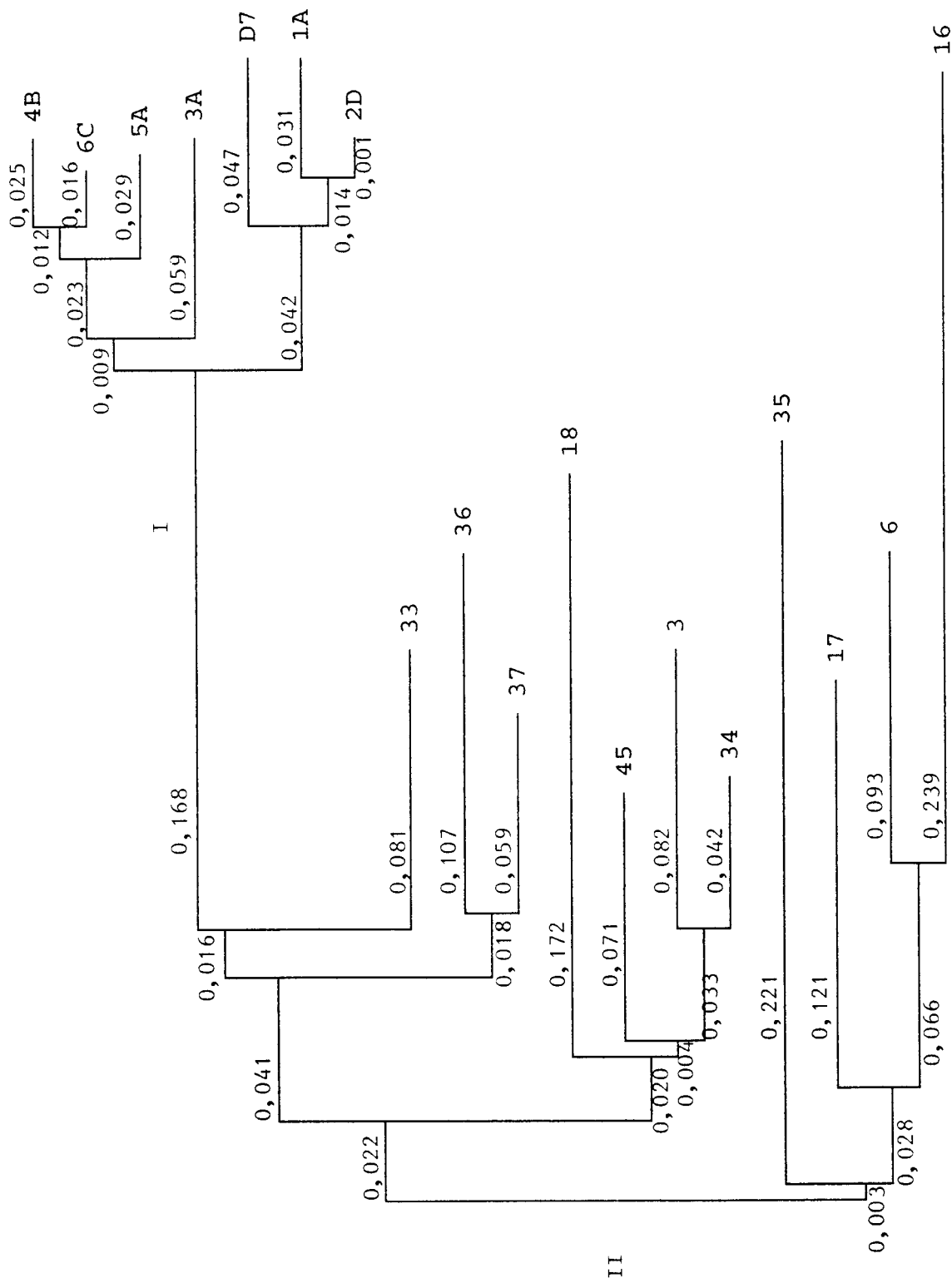


FIGURA 13. Fenograma dos variantes do AgMNPV obtidos a partir do método do "Neighbor-Joining". As distâncias entre os variantes foram baseadas nas diferenças obtidas nos perfis de restrição após digestão com HindIII e PstI. Os números em cada ramificação indicam a distância de divergência entre os variantes. Grupo I = variantes genômicos do AgMNPV-'79; grupo II = variantes genômicos do AgMNPV-'85.

partículas infecciosas ou o mesmo MOI viral. Assim sendo, as diferenças encontradas nos valores de $TCID_{50}$ dos diversos variantes foram considerados como uma medida indireta da infectividade ou virulência em cultura de células.

A tabela 5 apresenta o valor médio da titulação viral dos seis variantes do AgMNPV-'79 nas células de *Spodoptera* (IPLB-SF-21AE) e de *Anticarsia* (UFL-AG-286). A replicação destes 6 variantes não foi significativamente diferente entre eles em nenhuma das linhagens celulares. No entanto, nas células de *Anticarsia* obteve-se uma titulação viral maior que nas células de *Spodoptera*.

Quando a replicação dos onze variantes do AgMNPV-'85 foi comparada, observou-se entre eles certa variação na titulação (Tabela 6). A diferença observada entre a maior e a menor titulação obtida nas duas linhagens celulares foi de aproximadamente um log ($10^{7,57} - 10^{8,47}$ entre os variantes 36 e 45 nas células de *Anticarsia* e $10^{5,70} - 10^{6,87}$ entre os variantes 3 e 45 nas células de *Spodoptera*). Em ambas células a titulação do variante 45 foi a maior, e com todos os variantes do AgMNPV-'85 obteve-se uma maior titulação nas células de *Anticarsia*. A replicação viral dos variantes '85 foi estatisticamente igual ou menor que aquela do AgMNPV-2D (um dos variantes do isolado AgMNPV-'79), em ambas culturas de células.

Uma possível correlação entre alteração gênica e infectividade foi observada analisando-se os variantes crescidos em células de *Spodoptera*, onde o variante 3 apresenta a menor titulação sendo o único com uma deleção de 1900 pb no genoma (entre 19,66 e 23,48 u.m.). No entanto, estes dados não são consistentes com a virulência obtida nas células de *Anticarsia*.

TABELA 5. Valores da capacidade de replicação dos variantes genéticos do AgMNPV-'79 em duas linhagens celulares de inseto a partir do valor do TCID₅₀

Variante genético proveniente do AgMNPV-'79	TCID ₅₀ [@] ± dp	
	<i>A.gemmatalis</i> [#]	<i>S. frugiperda</i> [#]
1A	10 ^{7,90 ± 0,12} a*	10 ^{6,43 ± 0,12} b
2D ^{&}	10 ^{7,87 ± 0,03} a	10 ^{6,40 ± 0,10} b
3A	10 ^{7,99 ± 0,12} a	10 ^{6,60 ± 0,12} b
4B	10 ^{7,87 ± 0,07} a	10 ^{6,50 ± 0,06} b
5A	10 ^{7,97 ± 0,09} a	10 ^{6,83 ± 0,12} b
6C	10 ^{7,83 ± 0,03} a	10 ^{6,50 ± 0,10} b

@ TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50%). Este valor foi obtido após titulação, em triplicata, da mesma suspensão viral em duas diferentes culturas de células. dp: desvio padrão.

Linhagens celulares de inseto:

Spodoptera frugiperda: IPLB-SF-21AE (Vaughn et al., 1977)

Anticarsia gemmatalis: UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988)

* Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferenças significativas a nível de 0,05 pelo teste PLSD de Fisher

& Protótipo do AgMNPV (AgMNPV-2D)

TABELA 6. Valores da capacidade de replicação dos variantes genéticos do AgMNPV-'85 em duas linhagens celulares de inseto a partir do valor do TCID₅₀

Variante genético proveniente do AgMNPV-'85	TCID ₅₀ [@] ± dp	
	<i>A. gammatalis</i> [#]	<i>S. frugiperda</i> [#]
36	10 ^{7,57} ± 0,20 a*	10 ^{6,50} ± 0,15 bc
34	10 ^{7,70} ± 0,27 ab	10 ^{6,50} ± 0,10 bc
35	10 ^{7,70} ± 0,06 ab	10 ^{6,33} ± 0,09 bc
18	10 ^{7,73} ± 0,12 abc	10 ^{6,27} ± 0,30 abc
33	10 ^{7,97} ± 0,07 bcd	10 ^{6,77} ± 0,03 bc
03	10 ^{8,00} ± 0,15 bcd	10 ^{5,70} ± 0,27 a
16	10 ^{8,03} ± 0,07 bcd	10 ^{6,57} ± 0,17 bc
06	10 ^{8,03} ± 0,03 bcd	10 ^{6,77} ± 0,29 bc
37	10 ^{8,07} ± 0,09 cd	10 ^{6,53} ± 0,24 bc
17	10 ^{8,13} ± 0,03 de	10 ^{6,20} ± 0,25 ab
2D ^{&}	10 ^{8,30} ± 0,10 de	10 ^{6,33} ± 0,24 bc
45	10 ^{8,47} ± 0,09 e	10 ^{6,87} ± 0,23 c

@ TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50%). Este valor foi obtido após titulação, em triplicata, da mesma suspensão viral em duas diferentes culturas de células. dp: desvio padrão.

Linhagens celulares de inseto:

Spodoptera frugiperda: IPLB-SF21AE (Vaughn et al., 1977)

Anticarsia gemmatalis: UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988)

* Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferenças significativas a nível de 0,05 pelo teste PLSD de Fisher

& Protótipo do AgMNPV (AgMNPV-2D)

A Tabela 7 apresenta os dados de virulência *in vitro* dos isolados AgMNPV-D7 e do protótipo AgMNPV-2D em células de *Spodoptera* e de *Anticarsia*. Nesse caso, as células de *Spodoptera* utilizadas foram as da linhagem SF9. Os valores de TCID₅₀ obtidos nas células de *Spodoptera* não foram estatisticamente diferentes, no entanto a infectividade do AgMNPV-2D foi quase 100 vezes maior nas células de *Anticarsia*.

5.7 Análise de uma Região Altamente Variável no Genoma do AgMNPV

O mapeamento das regiões variáveis de 18 variantes genéticas do AgMNPV evidenciou a existência de uma região altamente variável entre as posições 88.58 e 90.13 do mapa genômico (fragmento PstI-T) (Tabela 4). Nessa região, ocorrem inserções e deleções de DNA, ocasionando uma variação no tamanho do fragmento PstI-T (Figura 12, R-VII).

Essa região variável do genoma foi analisada mais detalhadamente em dois variantes genéticos, AgMNPV-2D e AgMNPV-D7. A variação do fragmento PstI-T', nesse caso, mostrou ser devida a uma deleção de aproximadamente 381 pb no AgMNPV-D7 quando comparado ao fragmento PstI-T do AgMNPV-2D. A Figura 14a apresenta o perfil de restrição destes dois variantes após digestão do genoma total com HindIII. Também está apresentado os clones HindIII-F dos variantes 2D e D7 digeridos com as enzimas HindIII e PstI. Isto permitiu posicionar a variação dentro do fragmento PstI-T do AgMNPV-2D (de aproximadamente 2050 pb) e no fragmento PstI-T' do AgMNPV-D7 (de aproximadamente 1650 pb). A Figura 14b mostra, no mapa linear, a posição dessa região e as diferenças encontradas nos tamanhos dos fragmentos HindIII-F dos dois variantes genéticos digeridos com HindIII e PstI respectivamente. Nessa figura

TABELA 7. Valores da capacidade de replicação dos variantes genéticos do AgMNPV-D7 e AgMNPV-2D em duas linhagens celulares de inseto a partir do valor do TCID₅₀

Variante genético	TCID ₅₀ [@] ± dp	
	<i>A. gammatalis</i> [#]	<i>S. frugiperda</i> [#]
AgMNPV-D7	10 ^{6,67 ± 0,21} a*	10 ^{6,03 ± 0,06} a
AgMNPV-2D*	10 ^{8,30 ± 0,17} b	10 ^{5,93 ± 0,11} a

@ TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50%). Este valor foi obtido após titulação, em triplicata, da mesma suspensão viral em duas diferentes culturas de células. dp: desvio padrão.

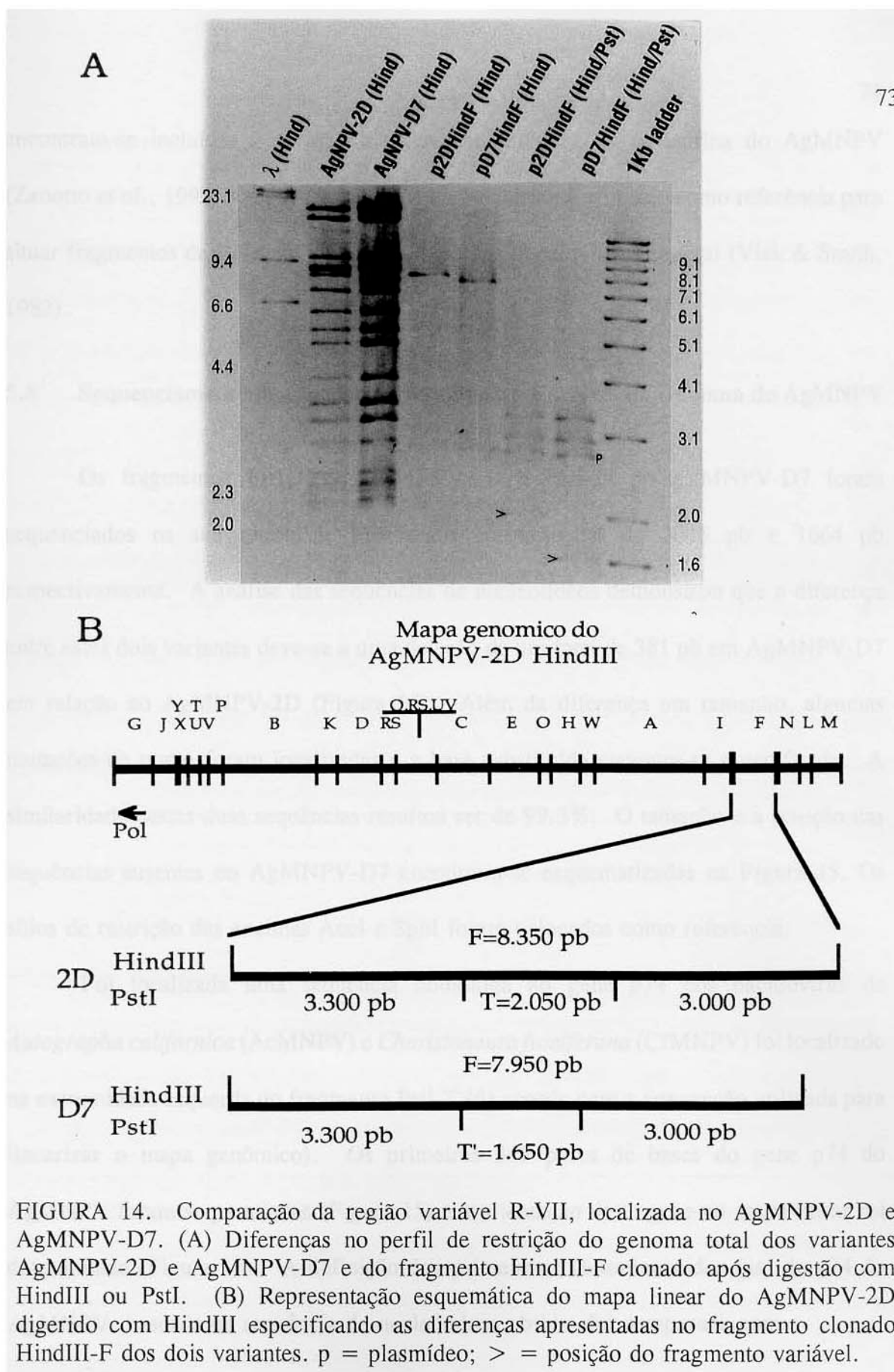
Linhagens celulares de inseto:

Spodoptera frugiperda: SF9 (Luckow & Summers, 1988)

Anticarsia gemmatalis: UFL-AG-286 (Sieburth & Maruniak, 1988)

* Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferenças significativas a nível de 0,05 pelo teste PLSD de Fisher

& Protótipo do AgMNPV (AgMNPV-2D)



encontram-se incluídas a posição e orientação do gene da poliedrina do AgMNPV (Zanotto *et al.*, 1992). A posição do gene da poliedrina é utilizada como referência para situar fragmentos de DNA no mapa genômico nos baculovírus em geral (Vlak & Smith, 1982).

5.8 Sequenciamento de uma Região Altamente Variável no Genoma do AgMNPV

Os fragmentos PstI-T do AgMNPV-2D e PstI-T' do AgMNPV-D7 foram sequenciados na sua totalidade mostrando um tamanho de 2045 pb e 1664 pb respectivamente. A análise das sequências de nucleotídeos demonstrou que a diferença entre estes dois variantes deve-se a uma deleção de um total de 381 pb em AgMNPV-D7 em relação ao AgMNPV-2D (Figura 15). Além da diferença em tamanho, algumas mutações de ponto foram localizadas e a base substituída encontra-se especificada. A similaridade destas duas sequências resultou ser de 99.3%. O tamanho e a posição das sequências ausentes no AgMNPV-D7 encontram-se esquematizadas na Figura 15. Os sítios de restrição das enzimas AccI e SphI foram colocados como referência.

Foi localizada uma sequência homóloga ao gene *p74* dos baculovírus de *Autographa californica* (AcMNPV) e *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV) foi localizado na extremidade esquerda do fragmento PstI-T (de acordo com a convenção utilizada para linearizar o mapa genômico). Os primeiros 349 pares de bases do gene *p74* do AgMNPV foram sequenciadas (Figura 15) e a orientação deste gene no mapa linear foi determinada (Figura 16). A definição dos primeiros 116 aminoácidos (aa) do *p74* do AgMNPV, baseada na sequência de nucleotídeos obtida, foi comparada com a

2D	CTGCAGCTCGGTCCAAGTGGTAACACGCGGGTTGCGCATAAGCTACGCTTGTTCCGAAGTTTGC	100
D7		100
2D	CGTTTCGTGGAACGGGTAACAACTCATGCTGTCGCATCCGCGACGGCTAAATGCCAACTTAACCGCCAGCGCGGATCTCTAAGCAGTGGCGGCACATAA	200
D7		200
2D	TAGTCGTCGTCGCTTGACGCGGGTCGCAACGTGTAATCAATTAAATGTGTGGCAAACGCGTGC	300
D7		300
2D	TTGCGTAACGACTTGCGTTTGTAAGGTCGACGGCGGTCAATACTGCCATGTTTGATTGCTTAAAGTATAAAAAACAACCTTTTTAAACATAATATTTATT	400
D7		400
2D	AAAAAGAATTACAATAGGTCCAATTATAATTAATCAATGGCCTTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGCAAGTGTCTATTTTTGGACTTGCGT	500
D7		500
2D	CAGCGTTGACCTCGCTTACAAGTACAATTAATCTGTAAAGCAAGTGTTCTATTTTAGACGTGCGTCAGCGTTGACCTCGCTTACAAGTACAATCAA	600
D7		600
2D	TCTTGAAAAGCAGGTCCGGTTATGATTAATCAATGGCCTTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTGTAAAGCAAGTGTCTATTTTAGACGTGCGTCAGCG	700
D7	A...G...CA...AA...T.....	700
2D	TTGACCTCGCTTACAAGTACAATCAATCTGAAAAGCAGGTCCGGTTATGATTAATCAATGGCCTTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTGTAAAGCAAG	800
D7		800
2D	TGTTCTATATTTAGGCATGCGTCAGCGTTGACCTCGCTTACAAGTACAATCAATCTGAAAAGCAGGTCCGGTTATGATTAATCAATGGCCTTGCTTTT	900
D7		808
2D	CAAATATGATTGTTCTGTAAAGCAAGTGTCTATATTTAGGCATGCGTCAGCGTTGACCTCGCTTACAAGTACAATCAATCTGAAAAGCAGGTCCGG	1000
D7	T...G.A.T.....	874
2D	TTATGATTAATCAATGGCCTTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTGTAAAGCAAGTGTCTATTTTAGACGTGCGTCAGCGTTGACCTCGCTTACAAGT	1100
D7		974
2D	ACAATCAATCTTGAAAAGCAGGTCCGGTTATGATTAATCAATGGCCTTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTGTAAAGCAAGTGTCTATTTAGGCATG	1200
D7		1074
2D	CGTCAGCGTTGACCTCGCTTACAAGTACAATCAATCTGAAAAGCAGGTCCGGTTATGATTAATCAATGGCCTTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTGT	1300
D7		1098
2D	AAAGCAAGTGTCTATATTTAGGCATGCGTCAGCGTTGACCTCGCTTACAAGTACAATCAATCTGAAAAGCAGGTCCGGTTATGATTAATCAATGGCC	1400
D7		1098
2D	TTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTGTAAAGCAAGTATTCTATATTTAGGCATGCGTCAGCCAATGACCTCGCTTTACGAGTACAATCAATCTTGAAAAG	1500
D7		1119
2D	CAGGTCCGGTTATGATTAATCAATGGCCTTGCTTTTCAAATATGATTGTTCTGTAAAGCAAGTGTCTATATTTAGGCATGCGTCAGCCAATGACCTCG	1600
D7		1219
2D	CTTTACGAGTACAATCAATCTTGAAAAGCAGGTCCGGTTATGATTAATAAATCTCGCAACGCGGTAAACCAACACGTTGATGATAAATAAATTTACGT	1700
D7		1319
2D	ACGGTGAGCAGACGCCCGGAGTTAGGGCGCCGGCTGCGGACACGGTTGCAAAGCAGAGAGACCCGTTGTATTGCAACCTCACACCATACTCATTACTAA	1800
D7		1419
2D	AGTTTACGCAACATGTAATAAAAAATTAATTTAAATAATGTTTTTATTATAAAATTCATAATTAATTTCTGTCTTTTCCAACGCTCGCG	1900
D7	C.....	1519
2D	GCATATTTTTTTGTGAATCTTTAGGTCGTAATATCTGATTGTTGCGCGTGC	2000
D7		1619
2D	TTGCCATTGAACACGTATCGGTTGGTGAACCCGCACCGGCTGCAG	2045
D7		1664

FIGURA 15. Comparação da sequência de nucleotídeos da região variável PstI-T (88.6 - 90.1 u.m.) dos variantes genéticos AgMNPV-2D (2D) e AgMNPV-D7 (D7). Duas regiões do variante D7 apresentam deleções (linhas contínuas) quando comparadas com o 2D cuja sequência encontra-se representada na sua totalidade. Pontos representam bases homólogas. Diferenças entre nucleotídeos encontram-se especificadas. Sequências em negrito indicam parte da sequência do gene *p74* começando no nucleotídeo 349 e orientado da direita para esquerda.

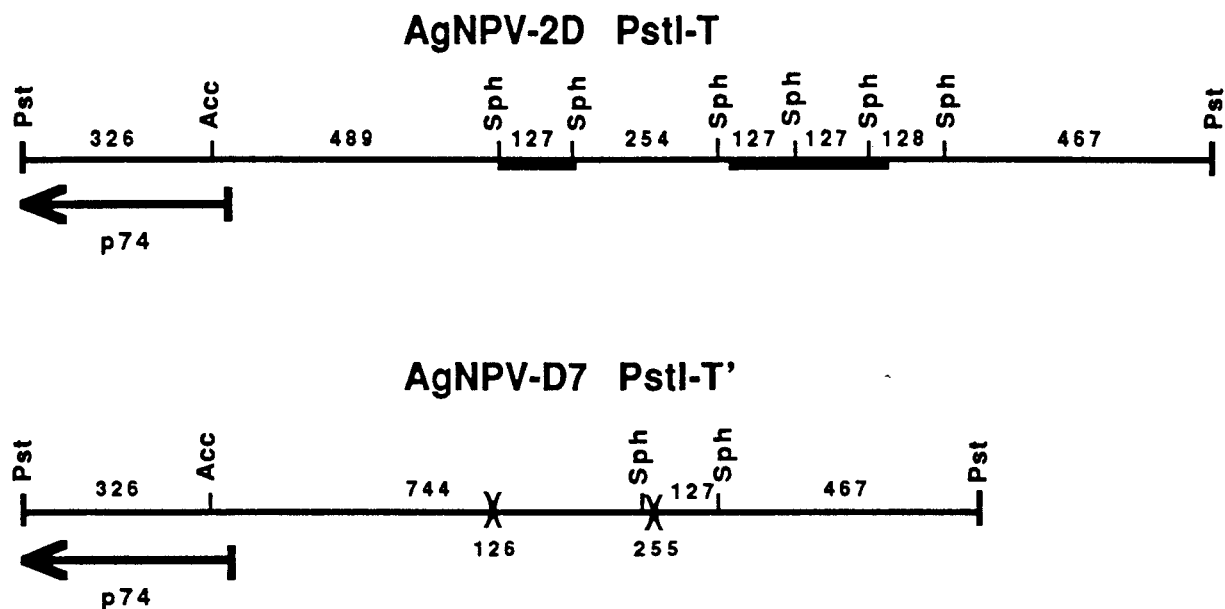


FIGURA 16. Representação linear dos fragmentos PstI-T e PstI-T' dos variantes AgMNPV-2D e AgMNPV-D7 respectivamente. Linhas sólidas abaixo do mapa representam regiões ausentes no variante D7. A localização e tamanho destas deleções encontram-se marcadas no mapa inferior [X]. A natureza repetitiva desta região pode ser observada analisando-se o mapa do variante 2D. Os sítios de restrição das enzimas PstI, AccI e SphI foram colocados como referência. O número presente entre os sítios de restrição representa a distância em pares de bases. A posição e orientação do gene *p74* encontram-se representadas por uma seta à esquerda do mapa.

composição de aa do gene *p74* do AcMNPV (Kuzio *et al.*, 1989) e CfMNPV (Hill *et al.*, 1993). Em ambos casos obteve-se uma homologia de mais de 90%. O gene *p74* sintetiza um polipeptídeo de 645 aminoácidos essencial para a produção de poliedros virulentos em AcMNPV (Kuzio *et al.*, 1989).

5.9 Sequências Repetitivas numa Região Altamente Variável do Genoma do AgMNPV

A análise detalhada das sequências de nucleotídeos mostrou a natureza repetitiva desta região variável. A partir do nucleotídeo 416 da sequência apresentada na Figura 15, o variante AgMNPV-2D contém 10 elementos repetidos de maneira contínua. Cada um destes elementos repetitivos contém de 127 a 128 pb, com exceção do elemento II que contém somente 68 pb que pode, no entanto, ser perfeitamente alinhado com parte da sequência dos outros elementos repetitivos (Figura 17).

O sítio de restrição da enzima SphI (GCATGC) foi encontrado em seis dos dez elementos repetitivos do AgMNPV-2D. Nas outras quatro sequências repetitivas, duas bases do sítio de reconhecimento da enzima encontram-se invertidas (ACGTGTC) inativando assim o sítio de restrição. Estes sítios de SphI e o monitoramento do tamanho dos clones utilizados para o sequenciamento (após ocasionar deleções superpostas com a enzima Exonuclease III) foram indispensáveis para o posicionamento das sequências devido à alta homologia entre os elementos repetitivos. A Figura 17 apresenta a sequência consenso (con) da região repetitiva onde poucas bases, em regiões específicas, apresentam diferenças.

```

**      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
416 AGTCCAATTATAATTAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTATTTTTGGACTTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATTAATCTTGTAAGC 543
544 ..... AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 611
612 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 738
739 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 865
866 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 992
993 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 1119
1120 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 1246
1247 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 1373
1374 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 1501
1502 AGGTCGGTTATGATTAAATCAATGGCCTT GCITTTCAAATATGATTGTTCTTGTAAGC AAGTGTTCTA.TTTTACAGTGGTCAGCGTT.GACCTC GCITTACAAGTACAATCAATCTTGAAAGC 1629
1630 AGGTCGGTTATGATTAA 1648

CON aggtccggttatgattaatcaatggcctt gcitttcaaatatgattgttcttgtaagc aagtgttcta.tatttaggcattgcgtcagcgtt.gacctc gcittacaagtacaatcaatcttgaaagc

=====
<=====
-----><-----

```

FIGURA 17. Sequências repetitivas do AgMNPV-2D. O variante AgMNPV-2D apresenta 10 sequências repetitivas contínuas. Cada sequência repetitiva contém 127 ou 128 pb com exceção do elemento II. O sítio de reconhecimento da enzima SphI (GCATGC) encontra-se sublinhado. Quando duas bases encontram-se invertidas (sequência ACGTGC) o sítio SphI é perdido. Os números no começo e no final de cada linha representam a posição do nucleotídeo na Figura 15. Asteriscos marcam nucleotídeos não conservados em todas as sequências. CON representa a sequência consenso. Sequências marcadas no box mostram regiões deletadas no variante AgMNPV-D7. As setas invertidas indicam palíndromes imperfeitas.

Dentro das sequências repetitivas encontram-se dois palíndromes imperfeitos. O primeiro é de 30 pb, que pode, por sua vez, formar um palíndrome imperfeito com outra sequência de 30 pb localizada 38 bases "upstream" ou 29 bases "downstream" também na região repetitiva (Figura 17).

A presença de sequências repetitivas dentro das quais encontram-se sequências palindrômicas, são características das regiões homólogas (hr=homologous regions) descritos nos seguintes baculovírus: AcMNPV (Guarino *et al.*, 1986), BmNPV (Majima *et al.*, 1993), e OpMNPV (Theilmann & Stewart, 1992). Por este motivo, a sequência consenso das duas palíndromes do AgMNPV foi comparada com todas as sequências palindrômicas sequenciadas no AcMNPV, BmNPV e OpMNPV. A Tabela 8 apresenta as sequências e o valor de identidade de nucleotídeos, obtidos quando a segunda sequência palindrômica do AgMNPV foi utilizada para comparação. Os valores de identidade variam de 70 a 77% com as sequências do AcMNPV e BmNPV e de 57 a 63% com a sequência palindrômica do "enhancer" OpE do OpMNPV.

Quando a sequência do variante AgMNPV-D7 foi analisada e comparada com o variante 2D, as deleções foram localizadas dentro da região repetitiva. Os 381 pb ausentes no variante D7 correspondem a exatamente três destes elementos repetitivos de 127 pb. Portanto a diferença entre estes dois variantes encontra-se no número de elementos repetitivos presentes. No AgMNPV-2D encontram-se 10 sequências repetitivas enquanto o AgMNPV-D7 apresenta 7 destas sequências (Figura 17).

TABELA 8. Comparação da identidade de nucleotídeos (%) entre a sequência palindrômica consenso (con) do AgMNPV com as sequências palindrômicas das regiões homólogas (hr) de outros baculovírus.

Vírus	Sequência Palindrômica	Identidade (%)
AgMNPV		
con hr4	GCTTTACAAGTACAATCAATCTTGAAAAGC	
AcMNPV		
con hr1	.T.....G...TCTA..C.T.....	73
con hr2	G....G...TCTA....T...A.	73
con hr3	.T.....G...TCTA..C.T.....	73
con hr4L	G....G...TCTA..C.T...A.	73
con hr4R	G....G...TCTA....T...A.	73
con hr5	G....G...TCTA.G..T.....	73
BmNPV		
con hr1	.T.....C...G...TCTA..C.T.....	70
con hr2L	G....G...TCTA.G..T...A.	70
con hr2R	.T.....C...G...TCTA..C.T.....	70
con hr3	.T.....C...G...TCTA..C.T.....	70
con hr4L	.T.....G....G...TCTA....T.....	77
con hr4R	G....G...TCTA....T...A.	73
con hr5	G....G...TCTA.G..T...A.	70
OpMNPV		
OpE-II	..C...T...AAG.GT...CA.CC.....	63
con OpE-66	..CG.T.G..AG.GT..GCA.CC.....	57

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização e Mapeamento das Regiões Variáveis

A comparação dos isolados AgMNPV-'79 e AgMNPV-'85, mostrou um total de 17 variantes genéticas distintos sendo que seis foram obtidos de AgMNPV-'79 e onze a partir de AgMNPV-'85. Esses últimos onze variantes apresentam uma maior variabilidade envolvendo regiões adicionais do genoma. Estes dados demonstraram que os vírus modificaram-se ao longo dos anos, a medida em que eles foram aplicados e multiplicados no campo, para subseqüentes aplicações como inseticida viral. Estudos visando avaliar a estabilidade genética do baculovírus de *Anticarsia* estão sendo feitos com outros isolados temporais e geográficos (Castro et al., 1991, 1992). O número e tipo de variantes isolados, pelo método de purificação em placa, representa uma subestimativa do total da variabilidade encontrada naturalmente nas populações virais. Variantes encontrados em baixa densidade tem uma maior probabilidade de serem eliminados devido ao fato de ter-se iniciado o procedimento de isolamento com uma amostra inicial de 50 placas infectadas. Além disso, nem todos os variantes que se desenvolveriam *in vivo* seriam obrigatoriamente capazes de se replicar *in vitro*. Outro aspecto que deve ser considerado é que alguns genótipos só seriam capazes de se replicar em associação com outros. Apesar dessas limitações, o método de purificação em placa

é considerado o mais eficaz no estudo da variabilidade genotípica dos baculovírus (Lee & Miller, 1978; Maruniak *et al.*, 1984; Shapiro *et al.*, 1991).

As variações no perfil de restrição dos baculovírus podem ser causadas por um dos seguintes mecanismos: inserções do DNA do hospedeiro no genoma viral, duplicações de fragmentos do genoma viral, e mutações de ponto (Brown *et al.*, 1985). Os variantes genômicos do AgMNPV-'79 e '85, não apresentaram hibridização com o DNA celular, descartando assim a possibilidade de inserções de DNA do hospedeiro. Isto indica que as modificações genéticas foram devidas a re-arranjos envolvendo unicamente genomas virais. Croizier & Ribeiro (1992) determinaram a existência de processos de recombinação ativa entre variantes de AgMNPV. A maior diversidade genotípica encontrada no isolado '85 pode ser explicada então, não só pelo espaço de tempo transcorrido entre as coletas dos vírus, mas também devido a uma maior possibilidade de recombinação num isolado viral ativamente aplicado nas mesmas áreas (Moscardi, 1989) durante seis anos.

A análise das alterações genômicas encontradas no variante selecionado AgMNPV-D7 com cinco enzimas de restrição, localizou três variações genotípicas em relação ao protótipo AgMNPV-2D. Duas destas encontram-se em regiões apresentando variações já descritas para os outros variantes, e a terceira se localiza numa região definida como variável em trabalhos anteriores (Croizier & Ribeiro, 1992).

O mapeamento das regiões variáveis dos 18 variantes genômicos analisados permitiu localizar algumas regiões contendo numerosos rearranjos quando comparados com outros sítios do genoma. Estes resultados estão de acordo com os dados

apresentados por Croizier & Ribeiro (1992), os quais mapearam seis regiões variáveis com as enzimas EcoRI e BglII. Quatro regiões descritas por esses autores encontram-se muito próximas ou no interior das regiões variáveis detectadas com HindIII e PstI no presente trabalho. A ocorrência de maior variabilidade genética em certas áreas do genoma já tem sido descritas em outros baculovírus (Burand & Summers, 1982, Brown et al., 1985).

6.2 Análise da Divergência dos Variantes Genéticos

A análise da divergência separou os variantes genômicos do AgMNPV-'79 e AgMNPV-'85 em dois grupos distintos, os quais encontram-se, no entanto, relacionados. Esta análise foi feita com o objetivo principal de avaliar a dinâmica de diferenciação destes dois isolados virais. Por isso, foi levado em consideração as diferenças na mobilidade dos fragmentos obtidos pela digestão do DNA viral (Kambhampati *et al.*, 1992). Esta análise resultou no posicionamento do variante D7 junto àqueles do isolado AgMNPV-'79. O D7 é proveniente de um isolado viral, originalmente obtido de larvas de *A. gemmatilis* infectadas, de maneira similar ao isolado AgMNPV-'79, que foi então selecionado em lagartas de *D. saccharalis*. Assim não é totalmente surpreendente que ele seja mais próximo dos variantes obtidos a partir do AgMNPV-'79. No entanto acredita-se que digestões com outras enzimas levem à diferenciação destes variantes.

Os variantes do isolado viral '85 não só encontram-se agrupados separadamente do isolado '79, mas também, as distâncias entre eles são maiores do que as encontradas entre os variantes do '79, evidenciando uma maior heterogeneidade genotípica. O

AgMNPV tem sido utilizado como agente de controle biológico no Brasil desde o final da década de 70. Portanto, os resultados obtidos podem refletir a influência que as aplicações virais nos campos de soja possam ter nas recombinações virais. Assim mesmo, os efeitos que o tempo e outros fatores geográficos e/ou ambientais possam ter tido sobre o isolado '85 devem ser considerados.

Análises filogenéticas tem sido utilizadas para comparar a variabilidade genotípica entre diversos isolados geográficos do SfMNPV (Shapiro *et al.*, 1991). Estes autores observaram que a variação dos vírus coletados de uma localidade era, em geral, menor do que aquela encontrada entre isolados de diferentes regiões, mas concluíram que essa variação não era dependente unicamente da localização geográfica. Bilimoria (1983) sugere que a variação genética está relacionada com a especificidade de hospedeiro, e considera que a análise dos variantes pode ser um instrumento importante no estudo das interações vírus-hospedeiro. Os resultados obtidos com o AgMNPV fornecem informação básica para o estudo da variabilidade genômica que ocorre dentro de um único hospedeiro. Investigações devem ser feitas para responder se existe correlação entre os variantes do AgMNPV e a especificidade do hospedeiro.

6.3 Replicação Viral dos Variantes Genômicos

A replicação de todos os variantes aqui analisados foi significativamente maior na cultura de células do hospedeiro original, *A. gemmatalis*, do que nas células de *Spodoptera*; as quais são também suscetíveis a infecção pelo baculovírus de *Anticarsia*. No entanto, os valores de titulação dos seis variantes do isolado AgMNPV-'79 não

diferiram significativamente, entre eles, em nenhuma das duas culturas de células. Isto já não aconteceu com os onze variantes do isolado '85, nos quais encontram-se diferenças de até 10 vezes entre as titulações obtidas numa mesma cultura celular.

O aparecimento de diferenças na infectividade viral dentro do isolado '85 indica que, durante os anos de aplicação da preparação viral, recombinações podem ter ocorrido levando a modificações genéticas que por sua vez foram responsáveis pelas mudanças na virulência dos variantes genômicos do AgMNPV. Com a intenção de correlacionar a atividade biológica com alterações no genoma, foi realizada inicialmente uma análise geral de todas as variações encontradas nestes isolados. O cenário que se observou foi de uma grande variabilidade nesses vírus, envolvendo várias regiões do genoma e vários tipos de alterações, o que demonstra um sistema complexo e dinâmico. A produção viral obtida de cada um dos variantes foi diferente de um tipo de cultura de células para o outro, com a exceção do variante 45 que apresentou a menor titulação tanto nas células de *Anticarsia* como nas de *Spodoptera*. Brown *et al.* (1985), num mesmo tipo de estudo, não encontraram diferenças significativas na titulação de 14 variantes genômicos de AcMNPV em dois tipos de culturas de células.

Exames mais detalhados de áreas menores do genoma devem ser elaborados de maneira sistemática para se conseguir determinar quais as regiões, e consequentemente quais os genes, envolvidos na infectividade viral. Não há dúvida de que o estudo das variações naturalmente ocorridas pode fornecer uma fonte de conhecimentos necessários para a futura manipulação dos baculovírus.

Pelos dados obtidos nas titulações virais, pode ser constatado que a virulência dos variantes '85 é, de maneira geral, menor ou similar ao AgMNPV-2D (proveniente do isolado '79). Isto significa que algumas modificações afetam negativamente os vírus as quais podem ser detectados pelo método de purificação em placa. Atualmente a análise do isolado viral de 1994 encontra-se em progresso. Desta maneira, será possível monitorar as variações do AgMNPV no campo, ao longo do tempo.

O variante AgMNPV-D7, proveniente de um isolado viral cuja infectividade para o hospedeiro alternativo *D. saccharalis* foi aumentada por meio de passagens seriadas, não apresentou diferenças significativas na infecção das células de *Spodoptera*, mas replicou-se de maneira menos eficiente do que o AgMNPV-2D nas células de *Anticarsia*. Pavan & Ribeiro (comunicação pessoal) descrevem que a infectividade do variante D7 nas larvas de *A. gemmatilis* não foi alterada durante a seleção em *Diatraea*. Os resultados obtidos com as células de *A. gemmatilis* provam que este é um sistema preciso na avaliação de virulência do AgMNPV, capaz de detectar variações não identificadas *in vivo* ou em outras culturas de células. Um mesmo tipo de observação pode ser constatado em AcMNPV recombinantes, onde a expressão de genes inseridos no genoma foi diferente, dependendo do tipo de célula em que foram inoculados (Maruniak *et al.*, 1994)

6.4 Análise de uma Região Altamente Variável

Uma ampla gama de variação de tamanho encontrada na região compreendida entre 88,58 e 90,13 u.m. no DNA do AgMNPV, foi também descrita por Croizier &

Ribeiro (1992). Esta variação encontra-se dentro de uma das quatro regiões homólogas (hr) descritas em AgMNPV (Garcia-Canedo *et al.*, submetido).

As hrs caracterizam-se pela presença de sequências repetitivas contendo palíndromes imperfeitos, as quais têm sido relacionadas com a função de "enhancer" (Guarino & Dong, 1991, 1994). A localização das hrs ao longo do genoma sugeriu que essas fossem origens de replicação do DNA viral (Cochram & Faulkner, 1983). Recentemente, efetuando-se ensaios de expressão transitória, foi comprovado que estas sequências de DNA atuam como ORI (Pearson *et al.*, 1992; Kool *et al.*, 1993a; Pearson & Rorhmann, 1995). Os trabalhos disponíveis até o presente momento em relação as hrs, concentram-se na comparação entre diversos vírus, ou na atividade biológica de um determinado fragmento de DNA.

A análise detalhada e comparativa de dois variantes genotípicos do AgMNPV, contendo diferenças numa das regiões hr, permitiu entender o motivo pelo qual as hrs também têm sido relacionados com variação genética (Burand & Summers, 1982; Brown *et al.*, 1985; Majima *et al.*, 1993). Foi verificado no presente estudo, que o número de sequências repetitivas dentro de uma mesma hr pode diferir entre variantes genéticos. Observou-se que essa variação é gerada pela adição ou eliminação de sequências de 127 pb repetidas em "tandem".

A grande variação encontrada nesta região indica que recombinações devem ocorrer frequentemente. Em células eucariontes, o DNA altamente repetitivo tem sido encontrado fazendo parte de até 17% do genoma total e, nestas regiões chamadas satélites, recombinações ocorrem com mais frequência que no resto do genoma (Alberts

et al., 1983; Lewin, 1994). Recombinação genética entre variantes do AgMNPV tem sido descrita como um processo ativo, *in vitro*, por Croizier & Ribeiro (1992). Portanto, as sequências repetitivas encontradas nos hrs devem facilitar o aparecimento de duplicações e deleções de fragmentos de DNA durante a recombinação genética, devido a pareamentos incorretos ("replication slippage").

A função de enhancer ou de origem de replicação desta região altamente variável no AgMNPV vem sendo analisada, porém ainda não dispomos de dados conclusivos. No entanto, a sequência palindrômica, elemento fundamental para a regulação de transcrição dos genes precoces, apresenta alta homologia com as palíndromes do AcMNPV. Além disso observa-se a presença da sequência "AAAGC" no extremo do palíndromo descrito como um possível sítio de ligação dos fatores de transcrição que interagem com as hr (Theilmann & Stewart, 1992). Estes dados, juntamente com o posicionamento das hrs ao longo do genoma do AgMNPV, indicam funções biológicas similares às aquelas descritas em AcMNPV. A relação direta entre a variabilidade genética envolvendo o número de sequências repetitivas, e o modelo de como esta variabilidade ocorre, foram analisados e sugeridas pela primeira vez no presente trabalho.

7. CONCLUSÕES

A partir do presente trabalho foi possível:

- 1) Um melhor detalhamento da estrutura do genoma do AgMNPV através do mapeamento adicional com duas enzimas de restrição além das cinco previamente definidas. Obteve-se assim, um total de 82 sítios de restrição no genoma de 133 kpb.
- 2) Identificar um total de 18 variantes genotípicos do AgMNPV: a) um variante, AgMNPV-D7, proveniente de um isolado viral passado num hospedeiro alternativo; b) seis variantes distintos obtidos a partir do isolado viral AgMNPV-'79 e c) onze variantes obtidos a partir de uma preparação comercial utilizada para controle de pragas em 1985 (AgMNPV-'85). Esses variantes apresentaram variações em sítios adicionais do genoma quando comparados aos variantes do AgMNPV-'79.
- 3) Localizar, no mapa de restrição, sete regiões do genoma contendo variações entre os diferentes variantes genotípicos, resultantes de inserções e deleções de DNA assim como de mutações de ponto, quando comparados com o protótipo AgMNPV-2D.
- 4) Comparar a capacidade de replicação dos variantes obtidos a partir dos isolados AgMNPV-'85 e AgMNPV-'79. Os variantes encontrados em AgMNPV-'85 apresentaram diferenças significativas em dois tipos de células em cultura, diferenças estas não encontradas entre os variantes do isolado '79.

- 5) Sequenciar e comparar uma das regiões variáveis em dois variantes do AgMNPV. As alterações de tamanho encontradas entre estes variantes envolviam a deleção ou inserção de três sequências de 127 pb repetidas em tandem. Diferenças de tamanho nessa mesma região, encontrada nos outros variantes analisados, sugere que deleções ou duplicações de números variáveis desses elementos repetitivos de 127 pb são os responsáveis pela variação.
- 6) Analisar essas sequências repetitivas de 127 pb, apresentando palíndromes imperfeitos com identidade de nucleotídeos de até 77% com regiões palindrômicas de outros baculovírus. Pela análise de sequência, estrutura e localização no genoma, essa região foi identificada como a região homóloga 4 (hr4) de AgMNPV, a qual na porção terminal dos palíndromes apresenta a sequência consenso "AAAGC" possivelmente relacionada com a ligação de fatores de transcrição.

Assim, pode se concluir que o genoma do AgMNPV apresenta regiões variáveis identificáveis através da análise do seu perfil de restrição. Este genoma constitui um sistema dinâmico onde modificações genotípicas são incorporadas produzindo heterogeneidade em diversos isolados virais. Algumas destas modificações foram localizadas numa região relacionada com funções de transcrição e/ou origem de replicação do DNA em outros baculovírus. Neste trabalho, pela primeira vez, analisa-se comparativamente essa região em dois variantes genéticos de um mesmo vírus, e os resultados sugerem que as variações encontradas poderiam modular a replicação e transcrição de AgMNPV.

8. RESUMO

O genoma do AgMNPV-2D (Protótipo do baculovírus de *Anticarsia*) foi adicionalmente mapeado com as enzimas de restrição PstI e SmaI, levando a um total de 82 o número de sítios de restrição localizados no seu genoma. Dezoito variantes genômicos, determinados pelo perfil de restrição após digestão com HindIII e PstI, foram analisados. Dezesete destes variantes foram purificados de dois diferentes isolados virais: 1) o AgMNPV-'79, obtido originalmente em 1972 de larvas infectadas, resultou em 6 genótipos diferentes; 2) uma preparação comercial brasileira de 1985 (AgMNPV-'85), da qual 11 variantes foram identificados. O último variante foi isolado de um vírus selecionado no hospedeiro alternativo *D. saccharalis* por 20 gerações (Pavan & Ribeiro, 1989).

A variação genômica foi localizada no mapa físico do DNA viral. Comparando os isolados '85 e '79 observou-se que não só o número de variantes tinha quase duplicado, mas que a variação foi encontrada em sítios adicionais do genoma. As modificações foram geradas através de rearranjos do genoma viral visto que DNA celular não foi detectado. Isto sugere que através dos anos e, devido à aplicação anual e introdução de isolados geográficos, o AgMNPV-'85 acumulou mais variabilidade.

A análise de divergência do DNA separou os variantes do AgMNPV-'79 daqueles obtidos do AgMNPV-'85. Estes resultados mostram que o isolado '85 representa um grupo de vírus mais heterogêneo.

A replicação de todos os variantes foi analisada e comparada em dois diferentes culturas de células. A virulência foi estimada a partir dos valores do TCID₅₀ obtidos após titulação viral (Knudson, 1979; Brown *et al.*, 1985). Os variantes do isolado '85 apresentaram diferenças na infectividade a ambos tipos de células, sugerindo alguma relação entre virulência e alterações genômicas. O variante AgMNPV-D7 não apresentou diferenças na infectividade nas células de *Spodoptera*, mas se mostrou menos virulento nas células de *Anticarsia* em comparação ao AgMNPV-2D. Estes resultados mostraram que a cultura celular estabelecida a partir do hospedeiro original é mais suscetível, e portanto, mais adequada na análise de AgMNPV.

A região altamente variável (88,58 - 90,13 u.m.) foi sequenciada e comparada entre AgMNPV-2D e AgMNPV-D7. Foram encontradas sequências de 127 pb repetidas em tandem nesta região identificada como uma região homóloga do AgMNPV (hr4) (Garcia-Canedo *et al.*, submetido). As alterações observadas entre os dois isolados foram devidas à presença de diferentes números de sequências repetitivas.

Os hr em baculovírus são relacionados com aumento na transcrição (enhancer de transcrição) e com a origem de replicação de DNA. Estas regiões também apresentam variações em outros baculovírus. No entanto até o momento existem trabalhos comparando variantes apresentando modificações nestas regiões. Este tipo de estudo é importante para compreender os mecanismos pelos quais estes variantes são gerados.

A alta variabilidade observada pode ser explicada por eventos de recombinação, processo este determinado como ativo em AgMNPV (Croizier & Ribeiro, 1992). Numa região repetitiva o aparecimento de duplicações e deleções é facilitado devido a pareamentos errôneos (replication slippage).

O estudo da variação naturalmente ocorrida é uma área importante de investigação e pode representar um instrumento muito poderoso na manipulação e modificação de baculovírus.

9. SUMMARY

The genome of the AgMNPV-2D (prototype of the *Anticarsia* baculovirus) was additionally mapped with PstI and SmaI restriction enzymes, bringing to 82 the number of restriction sites located in its DNA. Eighteen genomic variants, determined by their restriction profiles after digestion with HindIII and PstI, were analyzed. Seventeen of these variants had been plaque purified from two different viral isolates: 1) the AgMNPV-'79, obtained originally in 1972 from diseased larvae, resulted in 6 different genotypes and 2) a 1985 brazilian commercial preparation (AgMNPV-'85), from which 11 variants were identified. The last variant was isolated from AgMNPV selected in the alternate host *D. saccharalis* for 20 generations (Pavan & Ribeiro, 1989).

The genomic variation was located in the physical map of the viral DNA. Comparing the isolate '85 with the '79 it was found that, not only the number of variants had almost doubled, but variation was found in additional genomic sites. The genomic modifications were shown to have been generated through viral genome rearrangements since the presence of cellular DNA could not be detected. This suggests that over the years and by the yearly applications on the field and introduction of geographical isolates, the AgMNPV-'85 accumulated more variability.

The DNA divergence analysis separated the AgMNPV'79 variants from the ones obtained from AgMNPV-'85. These results show that the '85 isolate is a more heterogenous group of viruses.

The replication of all the variants was analyzed and compared in two different cell lines. The virulence was estimated by the TCID₅₀ values obtained after viral titration (Knudson, 1979; Brown *et al.*, 1985). The variants from the '85 isolate presented differences in their infectivity to both cell lines, suggesting some relation between virulence and genomic alterations. The AgMNPV-D7 variant did not differ from the AgMNPV-2D infectivity in *Spodoptera* cells, but showed to be less virulent against *Anticarsia* cells. The results showed the cell line established from the original host to be much more susceptible, and so, more adequate for the analysis of AgMNPV.

A highly variable region (88,58 -90,13 m.u.), of AgMNPV-2D and AgMNPV-D7 was sequenced and compared. Sequences of 127 bp were found to be tandemly repeated in this region which was identified as a homologous region (hr4) of AgMNPV (Garcia-Canedo *et al.*, submitted). The alterations observed between the two isolates were due to a difference in the number of repeated sequences present.

The hrs in baculoviruses have been associated with transcriptional enhancer function and origin of DNA replication. These regions have also been found to be variable in other baculoviruses. However, so far there are no reports of a comparison between variants presenting modifications in these regions. This type of study is important to understand the mechanisms by which these variations were generated.

The high levels of variability observed can be explained by recombination events, shown to be an active process in AgMNPV (Croizier & Ribeiro, 1992), in a repetitive region of the genome which facilitates the deletion and duplication of DNA by replication slippage.

The study of naturally occurring genomic variation is an important area of research and may represent a very powerful tool for the manipulation and modification of baculoviruses.

10. APÊNDICES

APÊNDICE 1. Número de células semeadas para manutenção e infecção viral.

Tamanho do frasco	Tipo de célula	Número de células/Volume total*		Volume do Inóculo Viral
		Manutenção*	Infecção MOI _{≥1} #	
25 cm ²	TN-368	8 x 10 ⁵ /5 ml	2 x 10 ⁶ /5 ml	1,0 ml
	BTI-TN-5B1-4	1 x 10 ⁶ /5 ml		
	UFL-AG-286	2 x 10 ⁶ /5 ml	7,5x10 ⁶ /5 ml	1,0 ml
	IPLB-SF21-AE	2 x 10 ⁶ /5 ml	5 x 10 ⁶ /5 ml	1,0 ml
	SF9	3 x 10 ⁶ /5 ml	4 x 10 ⁶ /5 ml	1,0 ml
75 cm ²	TN-368	2 x 10 ⁶ /15 ml	1 x 10 ⁷ /10 ml	2,5 ml
	IPLB-SF21-AE	4 x 10 ⁶ /15 ml	2 x 10 ⁷ /10 ml	2,5 ml
	SF9	5 x 10 ⁶ /15 ml	2 x 10 ⁷ /10 ml	2,5 ml
150 cm ²	TN-368	5 x 10 ⁶ /40 ml	2 x 10 ⁷ /20 ml	5,0 ml
	IPLB-SF21-AE	1 x 10 ⁷ /40 ml	4 x 10 ⁷ /20 ml	5,0 ml
	SF9	1.5x10 ⁷ /40 ml	4 x 10 ⁷ /20 ml	5,0 ml
250 ml erlen.	SF9 e SF21	8 x 10 ⁶ /30 ml	2 x 10 ⁷ /100ml	
Placa 35 mm ²	TN-368		6 x 10 ⁵ /2 ml	0,1 ml
	BTI-TN-5B1-4		8 x 10 ⁵ /2 ml	0,1 ml
	SF9		1,2x10 ⁶ /2 ml	0,1 ml
	IPLB-SF21-AE		1,5x10 ⁶ /2 ml	0,1 ml
Placa 60 mm ²	TN-368		1,2x10 ⁶ /4 ml	1,0 ml
	SF9		2,5x10 ⁶ /4 ml	1,0 ml
	IPLB-SF21-AE		3 x 10 ⁶ /4 ml	1,0 ml
Placa c/96 cav.	TN-368	Titulação ^o	6 x 10 ⁵ /6 ml	0,1ml/cav.
		Placa viral ^o	6 x 10 ⁵ /18ml	pl. viral
	SF9	Titulação	1,2x10 ⁶ /6 ml	0,1ml/cav.
		Placa viral	1,2x10 ⁶ /18ml	pl. viral
	IPLB-SF21-AE	Titulação	1,2x10 ⁶ /6 ml	0,1ml/cav.
		Placa viral	1,2x10 ⁶ /18ml	pl. viral
Placa c/24 cav.	UFL-AG-286	Titulação	5,4x10 ⁶ /18ml	0,1ml/cav.
	TN-368		1 x 10 ⁵ /ml/cav	0,1ml/cav.
	SF9		2 x 10 ⁵ /ml/cav	0,1ml/cav.
	IPLB-SF21-AE		2 x 10 ⁵ /ml/cav	0,1ml/cav.

@ Número de células semeadas nos diferentes tipos de frascos.

* Número de células semeadas para 2 dias de crescimento. Se 3 dias são necessários (ex. quando semeadas nas sextas-feiras) colocar metade do número de células indicado.

Número de células necessárias quando infectadas com um MOI (Multiplicidade de Infecção) de 1 ou mais. MOI se refere à quantidade (título) de partículas virais infecciosas ($TCID_{50}$ = tissue culture infectious dose) colocadas em contato com as células. Ex. MOI=1 quando a quantidade de vírus é igual ao número de células semeadas; MOI=10 quando o inóculo viral (concentração do $TCID_{50}$) é 10 vezes maior que o número de células semeadas.

o Placa com 96 cavidades pode ser utilizada para titulação viral. A concentração celular aqui indicada é suficiente para semear toda a placa com 0,05 ml por cavidade. Diluições seriadas, do vírus a ser titulado, são feitas (10^{-1} a 10^{-8}). 10 cavidades são inoculadas com cada uma dessas diluições virais, imediatamente depois das células terem sido semeadas.

□ Placa com 96 cavidades pode ser utilizada para crescimento de placas virais. Após purificação em placa, as placas virais individuais assim obtidas podem ser crescidas infectando células de inseto. A concentração celular aqui indicada é suficiente para semear toda a placa com 0,15 ml por cavidade.

APÊNDICE 2. Procedimento para a manutenção de cultura de células de inseto.*

1. Aquecer o meio de cultura à 37°C. Colocar todo o material a ser utilizado, com exceção do meio e das células, dentro da câmara de fluxo laminar e ligar a luz UV por pelo menos 10 min.
2. Examinar a condição das células utilizando um microscópio invertido. Garantir que não exista nenhuma contaminação.
3. Desligar a luz UV e colocar os frascos contendo as células e o meio de cultura.
4. Flambar ligeiramente todo o material antes de ser aberto ou utilizado (incluindo os frascos contendo as células e cada pipeta a ser utilizada).
5. Continuar com o procedimento apropriado para semear as diferentes células:

TN368: Bater a região lateral do frasco com a palma da mão para soltar as células que estão fixadas na parede do frasco.

IPLB-SF-21AE, SF9, UFL-AG-286 e BTI-TN-5B1-4: Descartar o meio de cultura. Adicionar meio fresco (5, 10 ou 20 ml se as células encontram-se em frascos de 25, 75 ou 150 cm² respectivamente). Soltar as células fixadas na parede de frasco utilizando "scrapers" estéreis.
6. Utilizando pipetas estéreis de 1 ml, colocar 0,1 ml de cada suspensão celular num tubo de 1,5 ml (estes tubos não precisam ser estéreis já que esta alíquota de células será utilizada somente para a contagem celular e depois será descartada). Flambar novamente cada frasco antes de recolocar a tampa.
7. Adicionar 0,1 ml de solução corante, "trypan blue" 0,4%. Misturar e contar o número de células utilizando um hematímetro de Neubauer. Estimar também a viabilidade celular. As células mortas tornam-se azuis devido ao corante. As células vivas, cuja membrana celular continua intata, continuam com a sua cor natural. Contar quantos quadrantes sejam necessários para obter pelo menos 100 células e depois fazer os cálculos necessários considerando a diluição feita com o corante. O número de células viáveis é: número de células viáveis x [(10 quadrantes/ μ l)/(número de quadrantes contados)] x diluição pelo corante x 10³ (transformação de μ l a ml) = número de células/ml.

Exemplo 1. 105 células contadas em um quadrante na diluição de 2x:
 $105 \times 10 \times 2 \times 10^3 = 2,1 \times 10^6$ células/ml.

Exemplo 2. 105 células contadas em dois quadrantes, diluição 2x:
 $105 \times 5 \times 2 \times 10^3 = 1,05 \times 10^6$ células/ml.

Exemplo 3. 105 células contadas em cinco quadrantes, diluição 2x:
 $105 \times 2 \times 2 \times 10^3 = 4,2 \times 10^5$ células/ml.
8. Utilizando o apêndice 2, verificar o número de células que deve ser semeado em cada cultura dependendo do tamanho do frasco a ser utilizado. Calcular o volume necessário da suspensão celular previamente contada e o volume de meio de cultura fresco a ser adicionado. Semear as células em novos frascos estéreis.
9. Flambar novamente todo o material antes de ser fechado e guardado. Incubar as células à 26°C. Manter o meio de cultura à 4°C. Limpar a área de trabalho e colocar novamente a luz UV por 10 min.

* Procedimentos utilizados rotineiramente na manutenção de células de inseto no Laboratório de Virologia de Insetos do Prof. James E. Maruniak. Universidade da Flórida, USA.

APÊNDICE 3. Purificação de poliedros a partir de larvas infectadas.*

1. Homogeneizar as larvas infectadas com o tampão preparado em água destilada (aproximadamente 5 ml de tampão por grama de lagarta):
 1% ácido ascórbico
 2% SDS
 0,01 M Tris pH 7,7
 0,001 M EDTA pH 8,0
2. Filtrar em 4 camadas de gaze.
3. Centrifugar o filtrado à 12.000 g/10 min à 4°C (em centrífuga Beckman, rotor JA20 = 10.000 rpm).
4. Ressuspender o precipitado em de água e adicionar NaCl 5M até uma concentração final de 0,5 M.
5. Centrifugar à 17.000 g/12 min à 4°C (centrífuga Beckman, rotor JA20 = 12.000 rpm).
6. Ressuspender o precipitado em água destilada. Colocar a solução diretamente sobre o gradiente de sacarose.
7. Preparar o gradiente contínuo de sacarose de 40% a 63% no tampão TE:

Concentração de sacarose	Densidade	Sacarose	Tampão TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA)
=====			
40%	1,17 g/ml	225 g	350 ml
63%	1,30 g/ml	420 g	250 ml

8. Centrifugar à 80.000 g/30 min (em ultracentrífuga Sorval, rotor AH626 = 24.000 rpm).
9. Recuperar a banda com os poliedros (aproximadamente no terço inferior do tubo).
10. Transferir para outro tubo. Diluir a sacarose em água pelo menos 3 vezes.
11. Centrifugar à 17.000 g/10 min à 4°C (centrífuga Beckman, rotor JA20 = 12.000 rpm).
12. Ressuspender os poliedros em água.
13. Os poliedros purificados podem ser quantificados no microscópio utilizando-se o hematímetro de Neubauer ou a concentração de poliedros pode ser calculada medindo-se a absorbância à 550 nm.
 $(DO_{550} \times 0,28 \times \text{diluição} = \text{concentração de poliedros em mg/ml})$.

* Protocolos utilizados no Laboratório de Virologia de Insetos do Prof. James E. Maruniak. Universidade da Flórida, USA.

APÊNDICE 4. Extração de DNA a partir de poliedros*.

A. Extração de ARV a partir de poliedros.

1. Dissolver os poliedros colocando 1/3 do volume da solução DAS
 DAS (3x): 0,3 M Na₂CO₃
 0,03 M EDTA pH 8,0
 0,51 M NaCl
 Ajustar pH a 10,9
2. Misturar bem e verificar no microscópio se os poliedros foram dissolvidos antes de continuar o procedimento.
3. Preparar gradiente de sacarose contínuo de 40-56% em tampão TE:

Concentração de sacarose	Densidade	Sacarose	Tampão TE (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA)
=====	=====	=====	=====
40%	1,17 g/ml	225 g	350 ml
56%	1,26 g/ml	350 g	255 ml

4. Colocar a solução com os poliedros dissolvidos sobre o gradiente.
5. Centrifugar à 80.000 g/1 h à 4°C (em centrífuga Sorval, rotor AH626 = 24.000 rpm).
6. Remover a camada superior do gradiente contendo principalmente a proteína poliedrina e estocar à -70°C.
7. Remover as bandas contendo os ARV (várias bandas são formadas dependendo do número de nucleocapsídeos por envelope) utilizando uma pipeta Pasteur.
8. Colocar em outro tubo e diluir a sacarose em 3 volumes de TE.
9. Centrifugar à 80.000 g/30 min à 4°C.
10. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado (ARV) em 0,5 ml de TE e colocar num tubo de microcentrífuga.

B. Extração do DNA viral a partir de ARV.

11. Adicionar 40 µl de 20% SDS. Se o DNA for utilizado para infectar diretamente células de inseto (transfecção), substituir o SDS por 20% Laurylsarcosine.
12. Incubar à 37°C/10 min.
13. Adicionar 25 µl de proteinase K (5 mg/ml) e incubar durante a noite (mínimo 6 horas) à 37°C.
14. Extrair o DNA com 0,75 ml de fenol destilado e saturado com TE. Misturar cuidadosamente várias vezes para misturar as fases. O fenol é utilizado para extrair as proteínas do meio.
15. Centrifugar na microcentrífuga por 1 min. Transferir a fase aquosa (superior) a um tubo limpo. Repetir este procedimento mais 2 vezes.
16. Adicionar 0,75 ml de éter saturado com água. Misturar cuidadosamente várias vezes. O éter é utilizado para retirar traços de fenol que estejam presentes na fase aquosa.
17. Centrifugar na microcentrífuga por 1 min e descartar o éter (fase superior). Repetir o item 16 mais duas vezes.
18. Deixar o éter evaporar por alguns minutos.
19. Transferir o DNA para tubos de diálise e dializar em TE por 2 dias trocando o tampão 3 vezes ao dia.
20. Medir a concentração de DNA em espectrofotômetro a 260 nm (DO₂₆₀ x 50 x diluição = concentração de DNA em ug/ml).

* Protocolos utilizados no Laboratório de Virologia de Insetos do Prof. James E. Maruniak. Universidade da Flórida, USA.

APÊNDICE 5. Purificação de vírus extracelulares*.

1. Infectar as células de inseto com vírus (ver apêndice 1).
2. Três dias após infecção, coletar o meio de cultura e as células em tubos estéreis.
3. Centrifugar em centrífuga de mesa à 70 g/10 min ou 15 min dependendo do volume utilizado (em centrífuga Dynac II com tubos de 15 ou 50 ml = 600 rpm). O sobrenadante contém os ECV e o precipitado contém células e restos celulares.
4. Transferir o sobrenadante para outro tubo estéril. O ECV pode ser guardado à 4°C para ser utilizado como inóculo viral em cultura de células ou para injetar larvas via intrahemocélica. O ECV pode também ser titulado ou concentrado para posterior titulação.
Procedimento para concentrar o ECV:
5. Fazer a transferência diretamente num tubo estéril que possa ser usado para centrifugação a altas velocidades. Centrifugar em centrífuga refrigerada à 17.000 g/45 min à 4°C (em centrífuga Beckman, rotor JA20 = 12.000 rpm)
6. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado (ECV) num volume menor do meio de cultura utilizado inicialmente.
7. Titular o vírus novamente, se necessário.

* Protocolos utilizados no Laboratório de Virologia de Insetos do Prof. James E. Maruniak. Universidade da Flórida, USA.

APÊNDICE 6. Titulação viral pelo método da diluição final*.

1. Fazer diluições seriadas do vírus a ser titulado (10^{-1} a 10^{-8}) utilizando o meio de cultura TC-100. Preparar um volume final de 200 μ l/diluição.
2. Marcar numa placa com 96 cavidades uma diluição por fileira.
3. Semear as células a serem utilizadas na concentração indicada no apêndice 1 em todas as 96 cavidades da placa. Colocar 0,05 ml/cavidade. Se o vírus a ser titulado tiver o gene da β -galactosidase, adicionar 45 μ l de X-gal (20mg/ml DMSO) nos 6 ml totais de suspensão celular, de maneira a obter uma concentração final de 150 μ g/ml.
4. Imediatamente, começando com a maior diluição viral (10^{-8}) adicionar 0,1 ml de vírus em cada uma das 10 cavidades da fileira marcada para aquela diluição. Ter cuidado para não contaminar as cavidades vizinhas.
5. Repetir o procedimento com as outras diluições virais (10^{-7} , 10^{-6} , etc).
6. Após ter inoculado as células com todas as diluições (total 80 cavidades), colocar duas ou três gotas de óleo mineral estéril em cada cavidade para evitar o ressecamento das células.
7. Incubar à 26°C. Verificar o número de células infectadas (pela presença de poliedros no núcleo ou pela coloração azul ocasionada pela expressão do gene da β -galactosidase no meio com X-gal) após 5 dias. Mesmo quando poucas células encontram-se infectadas, a cavidade deve ser considerada positiva.
8. Calcular a titulação viral como indicado no seguinte exemplo:

Diluição cavidades com células infectadas (+) ou não (-)

10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
10^{-6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

A = Maior diluição em que as 10 cavidades foram infectadas: $10^{-4} \Rightarrow 10^4$.

B = 10 elevado a fração do número de células infectadas = $10^{6/10} \Rightarrow 10^{0,6}$.

C = Constante que deve ser considerada no cálculo do $TCID_{50} \Rightarrow 10^{0,5}$.

D = Volume considerado para ter a titulação viral por ml de vírus $\Rightarrow 10^1$.

$$TCID_{50} = A \times B \times C \times D$$

$$TCID_{50} = 10^4 \times 10^{0,6} \times 10^{0,5} \times 10^1 = 10^{6,1}.$$

9. Alternativamente a titulação pode ser feita apenas com 3 repetições por diluição viral porém o resultado é menos preciso. Neste caso o cálculo é muito similar porém o valor de B deve ser modificado a: $10^{N/3}$, onde N é o número de cavidades infectadas. Considerando as 3 primeiras colunas do exemplo anterior, teríamos:

$$TCID_{50} = 10^4 \times 10^{0,67} \times 10^{0,5} \times 10^1 = 10^{6,17}.$$

* Protocolo modificado a partir de Knudson (1979).

APÊNDICE 7. Microextração de DNA viral a partir de células infectadas*.

1. Semear na placa com 24 cavidades a quantidade necessária de células de inseto a serem utilizadas (considerar que o DNA extraído de cada cavidade será utilizado para uma só digestão a não ser que o DNA seja marcado radioativamente).
2. Deixar que as células se fixem na placa por 4 h à 26°C.
3. Remover o meio de cultura e adicionar 0,1 ml do inóculo viral (o inóculo viral deve ser ECV).
4. Incubar 1 h à 26°C balançando cuidadosamente as placas 3 vezes cada 10 min para ter certeza que o inóculo cobre todas as células.
5. Adicionar 0,9 ml do meio de cultura e deixar incubar por 2 a 3 dias.
6. Verificar se as células estão infectadas pela presença de poliedros no núcleo.
7. Desprender as células e transferi-las com o meio para um tubo de 1,5 ml. Centrifugar em microcentrífuga por 10 min na velocidade máxima (13.000 rpm) para precipitar as células infectadas e os ECVs.
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 200 µl de EDTA 10 mM.
9. Adicionar 6 µl de SDS 20% e misturar. O SDS lisa as membranas celulares e o envelope dos ECV. Incubar a temperatura ambiente por 30 min.
10. Adicionar 52 µl de NaCl 5 M e misturar cuidadosamente. Incubar no gelo por 10 min. O DNA cromossomal formará um grumo esbranquiçado.
11. Centrifugar por 5 min e transferir o sobrenadante num tubo contendo 10 µl de Proteinase K (5 mg/ml). Incubar à 37°C pelo menos por 3 horas (pode ser a noite inteira).
12. Extrair o DNA com 200 µl de fenol e misturar por 3 a 5 min. Centrifugar por 30 segundos e transferir a fase aquosa (superior) para um tubo limpo. Repetir o procedimento 2 vezes mais.
13. Adicionar 500 µl de éter e misturar por 3 a 5 min. Centrifugar por 30 segundos e descartar o éter (fase superior). Repetir 2 vezes mais.
14. Esquentar o tubo com a tampa aberta para evaporar o excesso de éter.
15. Adicionar 200 µl de LiCl 4 M, misturar e incubar a 4°C durante a noite inteira. Centrifugar por 5 min e transferir o sobrenadante para um tubo limpo. (Este passo é optativo. Ele é necessário só quando enzimas de restrição muito sensíveis forem utilizadas).
16. Completar o volume dos tubos à 360 µl com TE.
17. Adicionar 50 µl de RNase (10 µg/µl) e incubar à 37°C/15 min. Este passo digere o RNA celular presente na preparação.
18. Precipitar o DNA adicionando 40 µl de NaAc 3 M e 800 µl de etanol 100%. Misturar e incubar no gelo por 10 min. Centrifugar por 10 min e descartar o sobrenadante.
19. Lavar o precipitado colocando cuidadosamente 500 µl de etanol 70%. Centrifugar por 2 min, remover o sobrenadante e secar o precipitado (DNA) no vácuo.
20. Ressuspender o DNA em 17 µl TE e incubar à 56°C por 30 min para dissolver totalmente o DNA. Este DNA está pronto para ser digerido, e visualizado num gel de agarose. A quantidade de DNA viral é suficiente para observar as bandas (até 26 bandas) coradas com brometo de etídio.

* Protocolos utilizados no Laboratório de Virologia de Insetos do Prof. James E. Maruniak. Universidade da Flórida, USA.

APÊNDICE 8. Transformação de *Escherichia coli*.*

1. Aliquotar 50 μ l de células bacterianas competentes em tubos de microcentrifuga estéreis e frios. Manter a -70°C.
2. Descongelar um tubo para cada transformação a ser feita. O tubo deve ser colocado no gelo.
3. Diluir a reação de ligação 1:1 em água estéril (5 μ l da reação de ligação:5 μ l de água).
4. Utilizar 5 μ l do DNA previamente diluído para transformar as células de *E. coli*. Para tal, misturar cuidadosamente o DNA diretamente nos 50 μ l de células. Manter as células no gelo durante este procedimento.
5. Incubar as células no gelo por 30 min.
6. Transferir as células à 37°C por 30 segundos. Este passo é comumente conhecido como "heat shock" e é imprescindível para a transformação.
7. Imediatamente depois colocar os tubos de novo no gelo por 2 min.
8. Adicionar 950 μ l de meio S.O.C. e misturar cuidadosamente.
S.O.C. : 2% Bactotripton
 0,5 extrato de levedura
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₄
 20 mM glucose
9. Incubar num agitador à 225 rpm por uma hora à 37°C.
10. Utilizar 100 μ l para plaquear em meio LB contendo 100 μ g/ml de ampicilina e 20 μ g/ml de X-gal.
11. Incubar à 37°C por 16 h.
12. Inocular meio de cultura líquido contendo 100 μ g/ml de ampicilina com colônias brancas (colônias brancas são formadas quando o gene da β -galactosidase é interrompido provavelmente pela presença do fragmento de DNA a ser clonado).
14. Incubar com agitação à 37°C por 16 horas e prosseguir com a extração do DNA para verificar a presença do clone de interesse.

* Protocolo básico fornecido pela companhia Gibco/BRL. Modificado de Hanahan (1983).

APÊNDICE 9. Mini preparação de plasmídeos a partir do método da fervura.

1. Centrifugar 1 ml de uma cultura bacteriana crescida com agitação por 16 h à 37°C que contém o plasmídeo de interesse.
2. Adicionar 100 μ l do tampão STET contendo 2 mg/ml de lisozima (preparar a lisozima fresca).
STET:
 8% sacarose
 0,5% Triton-X
 10 mM EDTA (pH 8.0)
 50 mM Tris (pH 8.0)
3. Misturar até ressuspender totalmente as células.
4. Incubar em água fervendo por somente 40 segundos e transferir imediatamente os tubos ao gelo e incubar por 5 min.
5. Centrifugar na microcentrífuga por 10 min.
6. Descartar o DNA cromossomal acumulado no fundo do tubo.
7. Adicionar ao sobrenadante 100 μ l de isopropanol, misturar e centrifugar imediatamente por 10 min.
8. Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 30 μ l de NaAc 0,3 M (pH 5,2).
9. Adicionar 75 μ l de etanol absoluto e incubar no gelo por 10 min. para precipitar o DNA.
10. Centrifugar por 10 min.
11. Lavar o DNA precipitado com 400 μ l de 70% etanol e secar no vácuo.
12. Ressuspender em 30 μ l de tampão TE ou em água. Este protocolo é rápido mas uma grande concentração de RNA é extraída junto com o plasmídeo de interesse.

* Protocolo modificado a partir do "boiling method" (Holmes & Quigley, 1981).

APÊNDICE 10. Mini preparação de plasmídeos a partir do método de lise alcalina.

1. Centrifugar em microcentrífuga 1 a 4,5 ml de uma cultura bacteriana crescida com agitação por 16 horas a 37°C que contém o plasmídeo de interesse. A utilização do meio TB (terrific broth) é aconselhado neste protocolo.
TB (1 l): 12 g Bacto-triptona
24 g Extrato de levedura
4 ml glicerol
Diluir em água (total 900 ml) e autoclavar
Adicionar 100 ml de uma solução estéril (filtragem) de:
0,17 M KH_2PO_4
0,72 M K_2HPO_4
2. Ressuspender as células em 200 μl de tampão GTE.
GTE: 50 mM glicose
25 mM Tris (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)
3. Adicionar 300 μl de uma solução 0,2 N de NaOH/1% SDS (preparação fresca). Misturar invertendo o tubo cuidadosamente e incubar no gelo por 5 min. A membrana celular é lisada e o meio torna-se viscoso.
4. Adicionar 300 μl de KOAc 3 M, misturar cuidadosamente para não romper o DNA cromossomal e incubar no gelo por 5 min. O DNA cromossomal formará uma massa esbranquiçada.
5. Centrifugar por 10 min e transferir o sobrenadante para um tubo limpo. Descartar o tubo com o DNA cromossomal precipitado.
6. Adicionar RNase A na concentração final de 20 mg/ml e incubar à 37°C por 20 min.
7. Fazer duas extrações utilizando 400 μl de clorofórmio. Misturar várias vezes invertendo o tubo. Centrifugar para separar as duas fases e colocar a fase aquosa (fase superior) num tubo limpo.
8. Adicionar 700 μl de isopropanol. Misturar invertendo o tubo e centrifugar por 10 min. O isopropanol é utilizado para precipitar o DNA.
9. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado adicionando cuidadosamente 500 μl de etanol 70%. Centrifugar brevemente e descartar o sobrenadante com cuidado para não remover o DNA do fundo. Secar o DNA no vácuo.
10. Dissolver o DNA com 32 μl de H_2O . Depois adicionar 8 μl de NaCl 4 M, misturar, e 40 μl de 13% PEG₆₀₀₀. Misturar bem e incubar no gelo por pelo menos 20 min (incubação de 30 a 60 min é aconselhável).
11. Centrifugar por 15 min à 4°C (a temperatura é importante). Retirar o sobrenadante cuidadosamente e lavar o precipitado com 500 μl de etanol 70% como indicado anteriormente. Secar o DNA no vácuo.
12. Ressuspender o DNA em 20 μl de água (quando o DNA for ser utilizado para sequenciamento) ou TE. Determinar a concentração de DNA correndo uma alíquota num gel de agarose ou medindo a absorbância no espectrofotômetro. Geralmente de 10 a 20 μg de DNA são extraídos a partir de 3 ml de cultura utilizando este protocolo.

* Protocolo modificado a partir do método de lise alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Método recomendado para extrair DNA em pequena escala para sequenciamento.

APÊNDICE 12. Hibridização de sondas de DNA.*

Este procedimento não requer a utilização de nenhum outro DNA (por exemplo DNA de esperma de salmão) durante a pré-hibridização. Uma alta concentração de SDS é suficiente para bloquear a membrana durante este passo de maneira a evitar sinais falso-positivos (background).

A. Pré-hibridização.

1. Umedecer a membrana contendo o DNA previamente fixado num recipiente com água. Isto evita a formação de bolhas de ar que aparecem se a solução de pré-hibridização é colocada diretamente na membrana seca.
2. Colocar a membrana dentro de uma garrafa de hibridização ou dentro de um saco plástico que possa ser selado.
3. Esquentar a solução de pré-hibridização:
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 0,5 M Na_2HPO_4 (pH 7,2) [Para preparar 1 litro de Na_2HPO_4 1 M 7,2: Dissolver 134 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 996 ml de água. Adicionar 4 ml de H_3PO_4 85%]
 pH
 7% SDS
4. Adicionar a solução de pré-hibridização e incubar à 65°C por no mínimo 30 min. Se uma menor estringência for desejada, abaixar a temperatura de incubação. Se a membrana estiver em garrafa, mantê-la em constante rotação. Se estiver em saco plástico, agitar ligeiramente para embeber de maneira homogênea a membrana.

B. Hibridização.

5. Remover a solução de pré-hibridização colocando o mesmo volume de solução fresca (10 a 20 ml).
6. Adicionar a sonda desnaturada (ver apêndice 15). Misturar a sonda na solução com cuidado para não formar bolhas. Incubar na mesma temperatura utilizada anteriormente.
7. Incubar de 4 a 24 horas com ligeira agitação.
8. Retirar a solução de hibridização (esta solução é radioativa!). Guardar esta solução caso outra membrana venha a ser hibridizada com a mesma sonda. Remover a membrana e começar a lavagem.

C. Lavagem.

9. Lavar a membrana duas vezes por 30 a 60 min utilizando 300 ml da seguinte solução:
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 40 mM Na_2HPO_4 (pH 7,2)
 5% SDS.
10. Incubar à 65°C com agitação constante.
11. Lavar a membrana duas vezes nas mesmas condições anteriores utilizando a seguinte solução:
 1 mM EDTA (pH 8,0)
 40 mM Na_2HPO_4 (pH 7,2)
 1% SDS.
12. Se esta membrana não for utilizada para outra hibridização, ela pode ser seca. Recomenda-se, no entanto, colocar a membrana úmida em saco plástico selado e expor o filme de raios X. Se a membrana vier a ser utilizada novamente, ela precisa ser "apagada" como descrito no apêndice 13.

* Protocolo recomendado pela companhia Bio Rad para membranas de nylon, preferencialmente Zeta Probe.

APÊNDICE 13. Desibridização de membranas de nylon para posterior re-hibridização.*

Este protocolo é utilizado para remover sondas de DNA aneladas em membranas de nylon, de maneira que uma nova sonda possa ser utilizada com a mesma membrana.

1. Preparar as seguintes soluções de lavagem:
 - a) 1 litro de 0,4 N NaOH.
 - b) 1 litro de 0,1 x SSC
0,1 M Tris (pH 7,5)Para preparar um litro da solução estoque SSC (20 x), dissolver:
175 g NaCl
88,2 g Citrato de Na
H₂O até um litro
2. Esquentar as soluções a 42°C.
3. Mergulhar a membrana na solução de NaOH agitando constantemente por pelo menos 30 min à 42°C. É importante utilizar um volume tal que a membrana esteja bem mergulhada.
4. Descartar esta solução (como lixo radioativo) e colocar a segunda solução agitando constantemente à 42°C por pelo menos 30 min.
5. Descartar esta solução e checar a membrana com o contador Gaiger se a sonda que foi removido foi previamente marcado com ³²P. Outra maneira de confirmar a eficiência deste procedimento seria expor a membrana num filme de raios X sem secá-la. No entanto, geralmente este procedimento é suficiente para remover a sonda anterior.
6. Começar os passos de pré-hibridização e hibridização com a sonda seguinte.

* Protocolo utilizado no Laboratório de Virologia de Insetos do Prof. James E. Maruniak. Universidade da Flórida, USA.

APÊNDICE 14. Extração de fragmentos de DNA de géis de agarose.*

1. Utilizar agarose com baixo ponto de fusão (low melting agarose) para separar eletroforéticamente os fragmentos de DNA a serem recuperados. Colocar brometo de etídio na concentração final de 0,25 mg/ml no gel e no tampão de maneira a visualizar os fragmentos utilizando luz ultra violeta.
2. Cortar as bandas necessárias e colocar em tubos de microcentrífuga.
3. Fundir o gel colocando o tubo em banho maria a 68°C por pelo menos 30 min.
4. Esquentar a 68°C o seguinte tampão de diluição da agarose:
0,2 M NaCl
0,02 M Tris (pH 7,5)
0,002 M EDTA (pH 8,0).
5. Adicionar o tampão ao tubo com o gel líquido diluindo a agarose até 0,3%. Para tal, achar o fator de diluição simplesmente dividindo a concentração original do gel por 0,3. Medir o volume original e multiplicar pelo fator de diluição previamente calculado. Este valor representa o volume total necessário para que a agarose seja diluída até 0,3%. Portanto só deve ser adicionado a diferença entre este valor total e o volume original do gel.
6. Extrair o DNA três vezes com fenol destilado e saturado com TE. O volume de fenol utilizado deve ser 0,75 vezes o volume total do tubo. Misturar as fases invertendo o tubo várias vezes (por aproximadamente 2 min). Centrifugar brevemente para separar as fases e colocar a fase aquosa (superior) num tubo limpo. Ter cuidado para não pegar o líquido da interfase onde se encontra concentrada a agarose.
7. Extrair duas vezes com éter saturado com água. Utilizar o maior volume possível (mínimo 500 µl). Misturar invertendo o tubo várias vezes. Centrifugar para separar as fases e descartar a fase superior.
8. Evaporar o excesso de éter esquentando os tubos à 56°C por 15 min.
9. O fragmento assim obtido pode ser precipitado ou utilizado diretamente. Se o DNA for precipitado com etanol, recomenda-se a adição de 1 µl de tRNA (10 mg/ml) para servir de carregador.

* Protocolos modificados a partir de Weislander (1979) e utilizado no Laboratório de Virologia de Insetos do Prof. James E. Maruniak. Universidade da Flórida, USA.

APÊNDICE 15. Marcação do DNA através do método Nick Translation.*

1. Colocar num tubo de microcentrífuga:
 - 0,1 µg de DNA a ser marcado radioativamente
 - 1 µl de dGTP 0,4 mM (em 10 mM Tris pH 7,0)
 - 1 µl de dCTP 0,4 mM (em 10 mM Tris pH 7,0)
 - 1 µl de dTTP 0,4 mM (em 10 mM Tris pH 7,0)
 - 2 µl de tampão 10 x concentrado (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mg/ml BSA).
 - 30 µCi de ³²P-dATP
 - completar com H₂O até 18 µl
 - 2 µl da mistura enzimática (DNA Polimerase I:DNase I) (USB Corp.).
2. Incubar por 20 min à 15°C.
3. Inativar a enzima incubando 10 min à 65°C. Colocar no gelo.
4. Para remover os nucleotídeos não incorporados, precipitar o DNA com etanol por 3 vezes. Para tal:
5. Adicionar 1 µl de tRNA (1 µg/ml). O RNA serve como carregador ajudando na precipitação do DNA.
6. Adicionar 30 µl de TE para completar o volume à 50 µl.
7. Adicionar metade do volume (25 µl) de NH₄Ac 7,5 M. Misturar. Adicionar 2 vezes o volume total de 100% etanol (150 µl). Incubar no gelo por 10 min. Centrifugar numa micro centrífuga por 15 min.
8. Retirar o sobrenadante com cuidado (se possível checar com o contador Gaiger se o material marcado encontra-se no fundo do tubo). Adicionar 50 µl de TE e repetir ítems 7 e 8 duas vezes.
9. Secar o precipitado no vácuo.
10. Para desnaturar a sonda ressuspender o DNA em 100 µl de NaOH 0,2 M. Colocar em água fervendo (banho maria) por 5 min. Colocar imediatamente no gelo.
11. Finalmente para neutralizar a sonda adicionar 100 µl de Tris 1 M (pH 7,5).
12. Colocar diretamente na solução de hibridização.

* Protocolo modificado do método apresentado por Sambrook et al. (1989).

APÊNDICE 16. Marcação do DNA através do método "end-labeling".*

1. Digerir o DNA com enzima de restrição. Recomenda-se fazer a reação de digestão num volume total de 20 μ l.
2. Inativar a enzima. Geralmente incubar o DNA a 65°C/15 min é suficiente.
3. Adicionar: 2 μ l de uma solução contendo 1 mM de dCTP, dGTP e dTTP#
2 μ Ci de 32 P-dATP
1 unidade de Klenow (New England Biolab).
4. Incubar à temperatura ambiente por 10 min@.
5. Inativar a enzima incubando à 65°C por 10 min. Colocar no gelo.
6. Para remover os nucleotídeos não incorporados, precipitar com etanol 3 vezes como indicado no apêndice 15. Secar o DNA no vácuo e ressuspender em 40 μ l de TE.
7. Uma alíquota deste material (10-15 μ l) pode ser diretamente carregado num gel de agarose.
8. Após a eletroforese, secar o gel à 80°C por 1 hora no vácuo. Para tal, colocar o gel sobre um papel filtro (Whatman 3MM) e cobrir com plástico.
9. O gel seco é exposto num filme de raios-X.

Dependendo da enzima de restrição utilizada no passo inicial, o nucleotídeo marcado pode ser modificado. Prestar muita atenção na sequência que será copiada pela enzima Klenow.

@ As enzimas que digerem deixando a extremidade 5' do DNA "overhanging" são as mais apropriadas para este método de marcação. Se a enzima utilizada deixa a extremidade 3' "overhanging" ou gera "blunt ends", o tempo de incubação deve ser dobrado assim como o volume a ser colocado no gel de agarose.

* Protocolo modificado do método apresentado por Sambrook *et al.* (1989).

APÊNDICE 17. Transferência alcalina do DNA a membranas de nylon (Southern Blot).

1. Após separar os fragmentos de DNA em gel de agarose, despurinar o DNA colocando o gel numa bandeja e cobrindo com HCl 0,25 M por 10 min com baixa agitação.

PREPARAÇÃO DE 1 LITRO DE HCl 0,25M:

21,5 ml HCl 36.5% (11,6 M)
978,5 ml água destilada

2. Cortar 4 folhas de papel de filtro (Whatmann 3MM) aproximadamente 1 cm mais largo e 10 cm mais longo que o gel, de forma que as extremidades do papel fiquem submersas no tampão de desnaturação.
3. Mergulhar estas 4 folhas de papel filtro em água destilada e colocar sobre um suporte dentro de uma bandeja. Com ajuda de uma pipeta, retirar as bolhas formadas entre as camadas de papel.
4. Preparar 1 litro de NaCl 0,4 M o qual será utilizado como tampão de desnaturação e transferência:
16 g NaOH em 1 litro de água destilada.
5. Colocar o NaOH dentro da bandeja e sobre o papel filtro.
6. Colocar o gel cuidadosamente sobre a pilha de papel. Novamente retirar as bolhas de ar. Cubrir o gel com NaOH 0,4 M.
7. Colocar um plástico sobre o gel e com ajuda de uma lâmina de barbear cortar uma janela ao redor do gel.
8. Cortar uma membrana de nylon (Zeta Probe) exatamente do tamanho do gel e mergulhar em água destilada. Manipular a membrana sempre utilizando luvas. Colocar a membrana em contato direto com o gel começando pela parte central deste. Adicionar NaOH 0,4 M. Retirar as bolhas existentes entre o gel e a membrana.
9. Cortar 4 folhas de papel filtro do tamanho do gel. Mergulhar estas no NaOH 0,4 M e colocar sobre a membrana.
10. Colocar uma pilha de papel toalha em cima do papel filtro, uma placa de vidro e uma pequena garrafa com água fazendo pressão sobre o vidro. Desta maneira o tampão da bandeja será absorvido pelo papel toalha e o DNA será transferido do gel a membrana.
11. Permitir que a transferência ocorra durante 4 a 24 h. Trocar o papel toalha quando for necessário.
12. Após transferência, retirar o papel toalha, o papel filtro e retirar cuidadosamente a membrana.
13. Mergulhar a membrana numa solução SSC (2x) por 5 min.
SOLUÇÃO SSC (20x) (Stock):
175 g NaCl
88,2 g Citrato de Na,
Água até 1 litro.
14. Secar à temperatura ambiente.
15. Colocar entre dois papéis de filtro e secar à 80°C por 30 min à vácuo. Esta membrana pode ser guardada à 4°C até ser utilizada.

* Protocolo recomendado pela companhia Bio Rad.

APÊNDICE 18. Geração de clones com deleções superpostas utilizando o kit "erase-a-base".

A. Considerações gerais.

Este sistema permite a construção de plasmídeos ou subclones de M13 contendo deleções progressivas unidirecionais do fragmento clonado. A enzima Exonuclease III (Exo III) digere DNA que contém "blunt ends" ou 5' "overhanging" mas não DNA com 3' overhanging. Uma série de deleções unidirecionais são obtidas removendo alíquotas em diferentes tempos.

Recomenda-se começar com uma preparação de DNA sem "nicks". Aconselha-se a utilização de DNA purificado em gradiente de cloreto de cério já que a banda do plasmídeo superenrolado pode ser facilmente distinguida do DNA relaxado. Verificar a concentração de DNA obtida e comprovar se este pode ser facilmente digerido pelas enzimas de restrição a serem utilizadas.

Nas condições apresentadas a seguir, aproximadamente 200 bases serão removidas a cada 30 segundos num exemplo onde 10 amostras são necessárias. As concentrações e os volumes dos reagentes podem ser aumentados ou diminuídos segundo as necessidades. Recomenda-se 1 µg de DNA para cada ponto, de forma a ter suficiente para verificar a eficiência de cada passo. O número de amostras necessárias depende do tamanho do DNA.

B. Digestão do plasmídeo com enzimas de restrição.

1. Digerir 10 µg do plasmídeo com uma enzima que gere um "overhang" 3' que protege o DNA da digestão pela Exo III. O sítio desta enzima deve ser o mais próximo do "priming site" utilizado posteriormente.
2. Verificar se a digestão foi completa correndo uma alíquota (0,1% ou 100 ng) num mini-gel de agarose.

Enzimas de restrição que geram terminações 3' overhanging (resistentes a Exo III)		Enzimas de restrição que geram terminações 5' overhanging ou blunt ends (suscetíveis à Exo III)	
Enzima	Sítio de reconhecimento	Enzima	Sítio de reconhecimento
AatII	5'...GACGT ^v C...3'	BamHI	5'...G ^v GATCC...3'
BstXI	5'...CCANNNNN ^v NTGG...3'	ClaI	5'...AT ^v CGAT...3'
KpnI	5'...GGTAC ^v C...3'	EcoRI	5'...G ^v AATTC...3'
NsiI	5'...ATGCA ^v T...3'	EcoRV	5'...GAT ^v ATC...3'
SacI	5'...GAGCT ^v C...3'	HindIII	5'...A ^v AGCTT...3'
SphI	5'...GCATG ^v C...3'	NotI	5'...GC ^v GGCCGC...3'
ApaI	Estas enzimas geram terminações 3' overhang que não são resistentes a ExoIII.	Sali	5'...G ^v TCGAC...3'
PstI		SmaI	5'...CCC ^v GGG...3'
SacII		SpeI	5'...A ^v CTAGT...3'
		XbaI	5'...T ^v CTAGA...3'
		XhoI	5'...C ^v TCGAG...3'

3. Adicionar a segunda enzima de restrição, verificando de antemão o tampão a ser utilizado para poder adicionar a segunda enzima sem modificação do sistema de digestão. Se as enzimas precisarem de concentrações de sais diferentes, começar pela que requer a menor, para posteriormente adiciona-los. De preferência a segunda enzima será aquela que gere terminações com 5' "overhanging" ou "blunt ends", suscetíveis à digestão pela Exo III.

A tabela acima contém algumas enzimas de restrição presentes nos plasmídeos da série pGEM, assim como, a sequência reconhecida pela enzima.

4. Incubar à temperatura adequada à enzima por 2 horas.
5. Precipitar o DNA com etanol de maneira a eliminar as enzimas de restrição e poder concentrar o DNA no volume necessário para continuar o procedimento.

PRECIPITAÇÃO DE DNA COM ETANOL:

- a) Adicionar, dependendo do volume no tubo:
 - 1/2 do volume de NH_4Ac 7,5 M ou
 - 1/10 do volume de NaAc 3 M ou
 - 1/100 do volume de NaCl 5 M
- b) Adicionar 2 x o volume de etanol 100%.
- c) Incubar no gelo por 10 min.
- d) Centrifugar em microcentrifuga por 10 min.
- e) Descartar o sobrenadante. Lavar o DNA precipitado com 70% etanol.
- f) Secar no vácuo o DNA e ressuspender em água ou tampão.

C. Obtenção de deleções pela digestão com Exo III.

6. Ressuspender o DNA no tampão da Exo III (1 x diluído) de maneira a ter 2,5 μl por amostra (no presente exemplo ressuspender em 25 μl de tampão).

TAMPÃO DA EXO III (10 x concentrado):

660 mM Tris (pH 8.0)
6,6 mM MgCl_2

7. Colocar 7,5 μl da solução contendo a enzima S1 nuclease em cada um dos 10 tubos que representa a amostra e incubar no gelo. Esta solução deve ser preparada fresca a partir do tampão estoque 7,4 x concentrado.

SOLUÇÃO COM S1 NUCLEASE (10 pontos):

69 μl água destilada
11 μl do tampão S1 (7,4 x concentrado)
25 unidades da enzima S1 nuclease

TAMPÃO S1 NUCLEASE (7,4 x)

0,3 M KAC (pH 4,6)
2,5 M NaCl
10 mM ZnSO_4
50% glicerol

8. Incubar o tubo contendo o DNA com o tampão da enzima Exo III à 37°C por 3 minutos. Adicionar 300 unidades de Exo III e misturar rapidamente. Nesta temperatura, a enzima digere aproximadamente 450 bases por minuto. Este processo pode ser acelerado aumentando a temperatura de incubação.
9. A intervalos de 30 segundos retirar 2,5 μl e colocar nos tubos contendo a enzima S1 nuclease. Misturar rapidamente e deixar os tubos no gelo até acabar com todas as amostras (neste caso as 10 amostras).
10. Quando todas as amostras forem retiradas, colocar os tubos à temperatura ambiente por 30 min. Durante este período a enzima S1 nuclease removerá qualquer DNA de fita simples que foi deixado na cadeia de DNA após o tratamento com Exo III.
11. Adicionar 1 μl do tampão "stop" da S1 nuclease e incubar por 10 min à 70°C para inativar a enzima.

TAMPÃO STOP DA S1 NUCLEASE:

0,3 M Tris
0,05 M EDTA

12. Colocar uma alíquota de cada tubo (aproximadamente 50 ng de DNA) num mini-gel de agarose 1% para verificar a eficiência da digestão pela Exo III. O tamanho do DNA deve ser gradualmente menor em cada uma das amostras a começar da primeira.
13. Adicionar em cada tubo 1 μ l de tRNA (10 mg/ml) e precipitar o DNA de cada tubo com etanol como indicado anteriormente.
14. Ressuspender o DNA com 10 μ l da solução contendo a enzima Klenow. Esta solução deve ser preparada fresca antes de ser utilizada.

SOLUÇÃO COM ENZIMA KLENOW:	TAMPÃO DA KLENOW (1x):
100 μ l tampão da klenow (1x)	20 mM Tris (PH 8,0)
5 unidades de enzima	100 mM MgCl ₂

15. Incubar à temperatura ambiente por 5 min antes de adicionar 1 μ l da mistura de nucleotídeos contendo 0,125 mM de cada nucleotídeo: dATP, dCTP, dGTP e dTTP.
16. Incubar a temperatura ambiente por 30 min. A enzima Klenow adicionará nucleotídeos naquelas moléculas de DNA que apresentem terminações 5' "overhanging", fazendo com que o DNA fique com "blunt ends" capazes de serem religadas no passo seguinte.
17. Adicionar 40 μ l da mistura de ligação e incubar à temperatura ambiente por 4 horas.

SOLUÇÃO DE LIGAÇÃO (para 10 tubos):	TAMPÃO DA LIGASE (10X):
330 μ l de água destilada	500 mM Tris (pH 7,6)
40 μ l de tampão Ligase (10x)	100 mM mg Cl ₂
40 μ l de PEG 50%	10 mM ATP
4 μ l de 100 mM DTT	
5 unidades de T4 DNA Ligase	

18. Inativar a Ligase incubando os tubos à 65°C/10 min. Colocar no gelo e prosseguir com a transformação bacteriana como detalhado no apêndice 8.

* Protocolo baseado no procedimento apresentado por Henikoff (1984) e modificado a partir daquele recomendado pela companhia Promega, Corporation.

APÊNDICE 19. Preparação do "template" de fita simples a partir de "phagemids" da série pGEM Zf.

A. Considerações gerais.

A série de plasmídeos pGEM Zf (Promega, Corp.) permite a produção do DNA clonado como uma molécula circular de fita simples para sequenciamento ou outras aplicações. A série pGEM Zf encontra-se disponível em duas versões: (+) ou (-) que determinam qual das duas fitas do plasmídeo será secretada como fita simples. Estes plasmídeos contêm os promotores da RNA polimerase SP6 e T7 nos extremos do sítio de clonagem múltiplo permitindo assim utilizar os primers T7 e SP6 para sequenciamento do fragmento clonado. Estes plasmídeos contêm a origem de replicação do bacteriófago f1. Quando a bactéria contendo estes plasmídeos é infectada com um fago "helper", o plasmídeo começa a se replicar como se fosse o bacteriófago f1. O DNA de fita simples, assim replicado, é exportado fora das células bacterianas encapsulado como se fosse uma partícula viral. O DNA é então purificado com os procedimentos de precipitação e purificação detalhados a seguir.

O volume das culturas pode ser modificado dependendo da necessidade. No exemplo a seguir, 5 ml de cultura, com os reagentes em quantidades proporcionais, serão preparados.

É importante que a bactéria contendo o plasmídeo a ser extraído seja F', isto é, que possua o pêlo sexual que permitirá a entrada do DNA do fago. As bactérias *E. coli* da linhagem JM 109 foram transformadas com estes plasmídeos.

B. Preparação do DNA de fita simples.

1. Crescer 2 ml de uma cultura da bactéria contendo o plasmídeo de interesse no meio TYP contendo 100 µg/ml de ampicilina. Geralmente este pré-inóculo é obtido a partir de estoques de glicerol ou de colônias. Agitar à 37°C por 16 horas.

MEIO TYP (por 1 litro):

16 g "bacto-tryptone"
16 g extrato de levedura
5 g NaCl
2,5 g K₂HPO₄

AMPICILINA (estoque):

2,5 mg/ml em água

2. Inocular 5 ml do meio TYP utilizando 100 µl do pré-inóculo crescido anteriormente. Agitar vigorosamente à 37°C por 30 min num tubo de 50 ml para ter boa aeração.
3. Infectar a cultura com o fago "helper" (R408 ou M13K07) num MOI de 10 (i. e. 10 fagos por célula bacteriana). Incubar com agitação vigorosa à 37°C por pelo menos 6 horas.
4. Centrifugar a cultura por 15 min à 12.000 g (em centrífuga Beckman, rotor JA 20 = 10.000 rpm) para separar as células do sobrenadante.
5. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e centrifugar novamente nas condições recomendadas anteriormente. Descartar as células precipitadas. Este passo adicional garante uma menor contaminação de DNA celular.
6. Adicionar 1/4 do volume total da solução de precipitação. Incubar no gelo por 30 min. Esta solução precipita os fagos presentes no sobrenadante.

SOLUÇÃO DE PRECIPITAÇÃO:

3,75 M NH₄Ac (pH 7,5)
20% polyethylene glycol (PEG) (MW 8.000)

7. Centrifugar à 12.000 g por 15 min. Descartar o sobrenadante.

8. Ressuspender os fagos em 400 μ l de tampão TE. Transferir para um tubo de microcentrífuga.
9. Adicionar 400 μ l de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) para lisar os fagos. Misturar por 1 min e centrifugar à 12.000 g por 5 min para remover o PEG em excesso.
10. Transferir a fase aquosa superior para um tubo limpo. Ter cuidado de não transferir a interfase.
11. Adicionar 400 μ l de fenol saturado com TE. Misturar por 1 min e centrifugar como indicado no item 9.
12. Transferir a fase superior a um novo tubo e repetir este procedimento mais duas vezes ou até que não exista material visível na interfase.
13. Extrair 2 vezes com 500 μ l de éter saturado com água. Misturar e centrifugar para separar as fases. Descartar a fase superior.
14. Adicionar 1/2 do volume de NH_4Ac e 2 x o volume de 100% etanol. Incubar a $-20^\circ\text{C}/20$ min para precipitar o DNA. Centrifugar por 15 min.
15. Lavar o precipitado com etanol 70% e secar à vácuo.
16. Ressuspender o DNA de fita simples em 20 μ l de água.
17. Verificar a concentração de DNA aplicando uma alíquota num gel de agarose. É importante lembrar que a mobilidade deste DNA de fita simples será diferente. Geralmente duas bandas são detectadas em géis de agarose 1%: o DNA do fago "helper" e o plasmídeo de fita simples.

* Protocolo recomendado pela companhia Promega, Corp.

APÊNDICE 20. Sequenciamento de DNA pelo método "dideoxy chain termination".*

Este método pode ser utilizado para sequenciar DNA de fita dupla ou simples. Algumas modificações são necessárias nos passos iniciais dependendo do tipo de DNA que será utilizado como "template". Geralmente 450 bases podem ser resolvidas utilizando-se este protocolo básico.

A. Desnaturação do "template" de fita dupla.

1. Quando o plasmídeo de fita dupla é utilizado como "template" para sequenciamento, é recomendado utilizar 3-5 μg de DNA.
2. Desnaturar o DNA colocando o mesmo volume da seguinte solução desnaturante que deve ser fresca.

SOLUÇÃO DESNATURANTE:	Para preparar 5 ml:
0,4 M NaOH	0,08 g NaOH
0,4 mM EDTA (pH 8,0)	4 μl de 0,5 M EDTA (pH 8,0)
	5 ml de água destilada

3. Incubar à 37°C/30 min.
4. Precipitar com etanol adicionando 1/10 do volume de NaAc 3 M e 2 x o volume de etanol 100%. Incubar no gelo por 10 min. Centrifugar por 15 min. Lavar o DNA precipitado com 70% etanol e secar à vácuo.
5. Ressuspender o DNA desnaturado em 7 μl de água destilada.

B. Reação de anelamento.

Quando o "template" é DNA de fita simples, a quantidade a ser utilizada é 1 μg (aproximadamente 0,5-1,0 pmol). Diluir o DNA em água destilada de maneira a obter um volume final de 7 μl . Os passos a seguir são os mesmos para "templates" de fita simples ou dupla. Notar também que uma única reação de anelamento (e subsequente reação de marcação) é necessária.

6. Misturar num tubo:

7 μl de DNA (3 μg DNA fita dupla ou 1 μg DNA fita simples)	TAMPÃO DE SEQUENCIAMENTO (5 x):
	200 mM Tris (pH 7,5)
2 μl de 5 x tampão de sequenciamento	100 mM MgCl_2
1 μl de "primer" (0,5 pmol)	250 mM NaCl

10 μl total	
7. Esquentar o tubo à 65°C/2 min. Deixar esfriar gradualmente até a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C). Este passo permite que o "primer" consiga se anelar com a região homologa do "template".
8. Colocar o tubo no gelo.

C. Reação de marcação.

9. Diluir a enzima Sequenase 2.0 (United States Biochemical) 1:8 no tampão de diluição da enzima.

SEQUENASE 2.0:	TAMPÃO DE DILUIÇÃO:
13 unidades/ μl em:	10 mM Tris pH 7,5
20 mM KPO_4 (pH 7,4)	5 mM DTT
1 mM DTT	0,5 mg/ml BSA
50% glicerol	

10. Adicionar no tubo contendo o DNA anelado com o "primer":

1 μl DTT (0,1 M)	MISTURA DE NUCLEOTÍDEOS (5x):
2 μl mistura de nucleotídeos*	7,5 μM dGTP

5 μCi ^{35}S -dATP (ou ^{32}P -dATP) 7,5 μM dCTP
 2 μl da enzima diluída (3.25 unidades) 7,5 μM dTTP

Misturar rapidamente e incubar perto do gelo por 5 min de maneira que a temperatura do tubo seja próxima à de 4°C . É importante que a temperatura de incubação seja menor que 20°C . Neste passo os nucleotídeos vão sendo incorporados na cadeia crescente de DNA, a partir do "primer", de maneira a marcar radioativamente as moléculas.

@ Se o nucleotídeo marcado não é dATP, deve-se ter o cuidado de modificar a mistura, contendo todos os nucleotídeos menos aquele que está marcado radioativamente. Antes de serem utilizados, diluir a mistura de nucleotídeos em água na proporção 1:4.

D. Reação de terminação.

11. Antes de começar a reação de marcação, marcar 4 tubos com as letras "G", "A", "T" e "C" e colocar em cada um deles 2,5 μl da mistura com a base dideoxi (dd-NTP) correspondente (mistura de terminação):

Mistura de nucleotídeos contendo bases dideoxi (dd-NTP):			
dd-GTP	dd-ATP	dd-TTP	dd-CTP
80 μM d-GTP	80 μM d-GTP	80 μM d-GTP	80 μM d-GTP
80 μM d-ATP	80 μM d-ATP	80 μM d-ATP	80 μM d-ATP
80 μM d-TTP	80 μM d-TTP	80 μM d-TTP	80 μM d-TTP
80 μM d-CTP	80 μM d-CTP	80 μM d-CTP	80 μM d-CTP
8 μM dd-GTP	8 μM dd-ATP	8 μM dd-TTP	8 μM dd-CTP

12. Incubar os tubos à 45°C .
 13. Quando a reação de marcação for completada, transferir 3,5 μl a cada um dos 4 tubos contendo as misturas de terminação. Misturar e deixar incubando à $45^{\circ}\text{C}/5$ min. Durante este passo, as diferentes moléculas de DNA continuam incorporando os nucleotídeos presentes no meio. No entanto, assim que uma molécula incorporar um nucleotídeo dideoxi, a cadeia para de crescer já que nenhum outro nucleotídeo pode ser incorporado.
 14. Adicionar 4 μl da solução "stop" a cada tubo contendo a reação de terminação. Misturar e colocar os tubos no gelo.

SOLUÇÃO "STOP":

95% formamida
 20 mM EDTA (pH 8,0)
 0,05% bromofenol blue
 0,05% xileno cianol FF

15. Esquentar os tubos à 80°C por 5 min antes de colocar 2-3 μl de cada tubo num gel de acrilamida. Quando ^{35}S foi utilizado no nucleotídeo radioativo, os tubos obtidos no passo 14 podem ser guardados a -20°C por vários dias (máximo uma semana) ocasionando pouca degradação do DNA. Se, no entanto, ^{32}P foi utilizado, o DNA deve ser corrido no gel no mesmo dia.

* Protocolo baseado no método descrito por Sanger et al. (1977) e recomendado pela companhia United States Biochemical.

APÊNDICE 21. Preparação de gel de acrilamida para sequenciamento de DNA.*

A. Considerações gerais.

Géis de acrilamida são obtidos pela co-polimerização de acrilamida e N',N'-methylene-bis-acrilamida preparados geralmente na proporção 19:1. Para manter o DNA desnaturado, os géis de sequenciamento são geralmente preparados utilizando uma alta concentração de uréia. A adição de formamida no gel é opcional aumentando a sua capacidade desnaturante.

Os géis de acrilamida são montados em unidades verticais seguindo as recomendações dos fabricantes. A seguir será apresentado um protocolo para preparar um gel de acrilamida 6% numa placa com as seguintes dimensões: 40 cm de comprimento, 21 cm de largura e espaçadores e pentes com 0,4 mm de espessura (Bio Rad).

B. Montagem da placa.

1. Lavar muito bem as placas anterior e posterior de vidro, os espaçadores e o pente. Ter muito cuidado de trabalhar com espaçadores e pentes da mesma espessura (neste caso 0,4 mm). No vidro anterior, após secagem utilizando etanol 95%, colocar uma solução de "Rain-X" e espalhar homogeneamente. Esta solução formará uma fina película que facilitará o desprendimento do gel desta placa uma vez terminado o sequenciamento.
2. Montar a unidade colocando a placa de vidro menor horizontalmente numa mesa. Colocar os espaçadores nos dois extremos da placa e colocar em cima a placa de vidro maior. Prender os vidros assim montados com os grampos providenciados pela unidade (com outras unidades este procedimento é feito utilizando fitas adesivas especiais).
3. Colocar esta unidade verticalmente na bandeja de "pouring". Com outras unidades este passo pode ser substituído colocando a mesma fita adesiva utilizada anteriormente na região inferior das placas.

C. Preparação do gel de acrilamida.

4. Preparar uma solução estoque de 40% acrilamida:
 95 g acrilamida ("molecular grade")
 5 g bis-acrilamida
 água até um volume total de 250 ml.
 Dissolver (se for preciso, esquentar à 37°C) e filtrar em filtro de nitrocelulose com poro de 0,45 µm. Ser extremamente cuidadoso, a acrilamida é uma substância neurotóxica. Estocar à 4°C numa garrafa escura.
5. Preparar o volume necessário do gel. No presente exemplo serão preparados 70 ml:
 Dissolver 33,6 g de uréia em água destilada
 Adicionar 7 ml de TBE (10 x)
 Adicionar 10,5 ml de acrilamida 40%
 Adicionar água destilada até completar 70 ml.

PREPARAÇÃO DO TAMPÃO TBE (10 x):

108 g Tris base
 55 g ácido bórico
 20 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0)
 H₂O até completar 1 litro

6. Filtrar a solução com filtro de papel para descartar qualquer uréia que não foi totalmente dissolvida.
7. Desgaseificar a solução utilizando uma bomba de vácuo.

8. Transferir 30 ml desta solução num becker. Adicionar 375 μ l de persulfato de amônio 10%. Misturar bem.
9. Adicionar 150 μ l de TEMED. Misturar rapidamente e colocar esta solução dentro da bandeja que contém a unidade de sequenciamento. Os itens 8 e 9 devem ser omitidos quando a unidade é montada utilizando-se fitas adesivas nas laterais e na região inferior das placas. A quantidade de TEMED utilizada neste passo é alta para que uma rápida polimerização ocorra. O objetivo pelo qual colocou-se parte do gel na bandeja onde a unidade encontra-se sustentada é o de bloquear o espaço que existe na região inferior entre as duas placas de vidro.
10. Quando o gel na bandeja estiver polimerizado, colocar a unidade com a bandeja inferior num ângulo de 45°.
11. Adicionar 280 μ l de persulfato de amônio 10% nos restantes 40 ml de gel de acrilamida e misturar.
12. Adicionar 15 μ l de TEMED e misturar. A quantidade de TEMED é suficientemente baixa para permitir colocar o gel entre as placas de vidro sem risco de polimerizar. Ter cuidado para não permitir a formação de bolhas.
13. Colocar o pente com a margem reta em contato com o gel e afundar levemente.
14. Adicionar mais gel antes deste polimerizar de maneira a ter gel em excesso ao redor do pente (o gel de acrilamida "encolhe" levemente durante a polimerização).
15. Colocar 3 grampos segurando o pente e as placas de vidro.
16. Deixar polimerizar pelo menos 1 hora (este gel pode ser coberto com plástico para ser utilizado no dia seguinte).

D. Corrida do gel.

17. Remover a bandeja inferior e o excesso de acrilamida. Remover os grampos e o pente. Se o gel foi montado com fita adesiva, retirar somente a fita da região basal.
18. Preparar 1.500 ml do tampão TBE (1 x) e colocar aproximadamente 800 ml na cuba inferior do aparelho de eletroforese.
19. Colocar as placas de vidro na cuba com tampão evitando qualquer formação de bolhas. Segurar as placas verticalmente e colocar aproximadamente 700 ml de tampão na cuba superior.
20. Colocar o pente com as pontas levemente incrustadas na margem reta do gel.
21. Com ajuda de uma pipeta Pasteur ou uma seringa lavar individualmente todos os poços onde as reações de sequenciamento serão corridas. Isto evita que o excesso de uréia acumulado ocasione problemas com a resolução das bandas.
22. Correr o gel a 55 wats (1.600 V e 30 mA) por 30 min antes de colocar o DNA para esquentar o gel até aproximadamente 40°C.
23. Desligar a corrente e lavar os poços novamente. Antes de colocar 2-3 μ l da solução contendo o DNA, esquentar os tubos ("G", "A", "T" e "C") à 80°C por 5 min.
24. Depositar as amostras de DNA de cada tubo em poços adjacentes do gel. Para tal, utilizar uma ponteira especial para géis de sequenciamento ou uma seringa com agulha menor que 0,4 mm de diâmetro.
25. Correr o gel nas mesmas condições que a "pré-corrida". O corante formará duas bandas. Aproximadamente 1 hora depois que a banda mais escura (e mais lenta) tiver saído do gel, colocar outros 2-3 μ l da reação de sequenciamento para poder obter uma maior quantidade de bandas num único gel.

E. Desmontagem do gel.

26. Após desligar a corrente, remover o tampão. Este tampão é radioativo e deve ser eliminado apropriadamente.
27. Colocar as placas de vidro sobre uma bancada contendo papel absorvente com o vidro maior na região inferior.
28. Retirar os grampos laterais. Cuidadosamente separar as duas placas de vidro de maneira que o gel fique apoiado na placa inferior. Retirar o pente e os espaçadores.
29. Colocar a placa de vidro sustentando o gel numa bandeja e cuidadosamente colocar a solução fixadora até cobrir o gel. Ter cuidado de não descolar o gel da placa de vidro.

SOLUÇÃO FIXADORA:

15% etanol

5% ácido acético

30. Fixar por 30 min. Cuidadosamente retirar o vidro contendo o gel da solução fixadora.
31. Cortar papel de filtro (Whatman 3MM) de tamanho maior que o gel. Começando pelo centro, colocar o papel de filtro sobre o gel de maneira que o papel de filtro o cubra totalmente sem formar bolhas entre eles.
32. Cuidadosamente levantar o papel de filtro com o gel. Colocar o papel com o gel pra cima sobre a bancada.
33. Cobrir o gel com plástico.
34. Secar o gel por 1 hora à 80°C à vácuo.
35. Após seco, retirar o plástico do gel.
36. Expor um filme de raios-X colocando o gel em contato direto com o filme.
37. Incubar à -70°C durante a noite. Se o isótopo utilizado foi ^{32}P , a exposição pode ser reduzida a 4 horas.
38. Revelar o filme de raios-X e ler a sequência das bases utilizando um transiluminador.

* Protocolo recomendado pela companhia USB.

APÊNDICE 22. Análise das sequências de DNA utilizando o Pacote de Programas GCG.

A. Considerações gerais.

O pacote de programas oferecido pelo GCG (Genetics Computer Group) é uma compilação de programas desenhados para a análise de sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos. Mais de 100 programas fazem parte deste pacote que permite editar, mapear, comparar, manipular, analisar e apresentar dados referentes a sequências de DNA, RNA ou proteínas. A seguir uma descrição breve dos comandos básicos de quatro destes programas (SEQED, LINEUP, MAP e GAP) serão apresentados. A maneira pela qual o pacote pode ser ativado varia de acordo com o sistema utilizado. Os procedimentos a seguir descritos são aqueles necessários para operar os programas do GCG.

B. SEQED.

Este programa pode ser utilizado para introduzir novas sequências ou editar sequências existentes.

1. Abrir o programa digitando "seqed" na linha de comando.
2. O programa perguntará: SEQED OF WHAT SEQUENCE?.
3. Colocar então o nome do arquivo que será dado à sequência que está sendo colocada pela primeira vez ou o nome do arquivo já existente que será editado. "<enter>".
4. Uma vez dentro do Seqed, inserir qualquer comentário necessário sobre a sequência na região superior da tela onde o cursor se encontra.
5. "<Ctrl>/Z" move o cursor na linha onde a sequência pode ser então escrita.
6. Se uma nova sequência esta sendo colocada:
Colocar a sequência de bases utilizando letras maiúsculas.
Se uma sequência existente está sendo editada:
Por o cursor na região da sequência onde as mudanças serão feitas.
 - a) Para colocar sequências novas: adicionar sequências do lado esquerdo do cursor.
 - b) Para deletar sequências: utilize o <backspace> para deletar as sequências do lado esquerdo do cursor.
7. Quando a sequência for completada, "<Ctrl>/Z" colocara o cursor na linha de comando. Então escrever:
 - a) "write" para salvar o documento sem sair do programa SEQED.
 - b) "exit" para salvar o documento e sair do programa SEQED.
 - c) "quit" para sair do programa SEQED sem salvar o documento.
8. Os arquivos salvos a partir deste programa terão geralmente a extensão TXT a não ser que seja pedido para serem salvos com outra extensão.

C. LINEUP.

Este programa permite editar múltiplas sequências (até 30) simultaneamente. As sequências podem ser escritas diretamente ou importadas de arquivos já existentes. Uma sequência consenso é apresentada na linha inferior permitindo assim identificar regiões onde existe conflito entre as várias sequências importadas. Este programa permite então obter a sequência final e completa de toda a região que foi sequenciada por partes.

1. Escrever "lineup" na linha de comando.

2. Será perguntado: WHAT SEQUENCE?.
3. Colocar o nome do arquivo onde a sequência consenso será salva.
4. "<Ctrl>/Z" coloca o cursor na linha de comando.
5. Escrever "get ale.txt" onde ale é o nome do arquivo e txt o nome da extensão da sequência a ser importada (lembrar que a extensão txt foi colocada automaticamente se o arquivo foi editado pelo programa SEQED).
6. O programa perguntará o tamanho e a orientação da sequência a ser importada e confirmará quais são os 10 primeiros e últimos nucleotídeos desta sequência. "<enter>" aceita as opções apresentadas pelo programa.
7. Mover o cursor na posição onde a sequência será importada.
8. Prosseguir com as outras sequências.
9. Escrever "auto" na linha de comando para criar a sequência consenso.
10. Escrever "nucl" na linha de comando para que a sequência consenso seja reconhecida como sequência de nucleotídeos posteriormente ao programa MAP.
11. Se o grupo de sequências alinhadas vier a ser salvo, escrever "print" na linha de comando. Um arquivo com o nome do arquivo original mas com a extensão PRETTY será criado.
12. Escrever "write", "exit" ou "quit", dependendo se o arquivo vier a ser salvo ou não antes de sair do programa LINEUP como explicado para o programa SEQED.
13. Os arquivos salvos a partir deste programa terão a extensão CON.

D. Map.

Este programa apresenta o mapa de restrição da sequência de DNA indicada. Se for possível, a tradução da sequência de nucleotídeos a proteína é também apresentada.

1. Abrir o programa escrevendo "map" na linha de comando.
2. O programa perguntará: (LINEAR) MAP OF WHAT SEQUENCE?.
3. Digitar o nome da sequência a ser mapeada (ex. "ale.con").
4. O programa perguntará qual o nucleotídeo inicial e final que deve ser considerado para fazer o mapa. "<enter>" aceita a opção do programa que mapeará a sequência inteira.
5. Será perguntado então qual o nome do arquivo no qual o mapa será encontrado. Geralmente o nome original do arquivo será mantido mas a extensão será MAP se a opção apresentada pelo programa é aceita.
6. O programa MAP é deixado automaticamente após ter dado o nome do arquivo.
7. Para poder ver o mapa feito anteriormente, escrever "type o nome do arquivo" (ex: "type ale.map" onde ale é o nome do arquivo e map a extensão dada diretamente pelo programa MAP).

E. Gap.

O programa GAP alinha e compara duas sequências completas maximizando o número de "matches" e minimizando o número de "gaps".

1. Abrir o programa escrevendo "gap" na linha de comando.
2. O programa pedirá: GAP OF WHAT SEQUENCE 1?.
3. Dar o nome do arquivo de uma das sequências a ser comparada.
4. O programa pedirá a confirmação do tamanho e orientação da sequência. A opção apresentada pelo programa considera a sequência inteira na orientação apresentada. Se isto for aceito, teclar "<enter>".
5. O programa perguntará: TO WHAT SEQUENCE 2?.
6. Colocar o nome da segunda sequência e responder às mesmas perguntas feitas anteriormente.

7. O programa perguntará então: WHAT IS THE GAP WEIGHT (*5.00*)?. Teclar "<enter>" se aceitar o default.
 8. A seguinte pergunta, será: WHAT IS THE GAP LENGTH WEIGHT ((*0.30*)?). Apertar "<enter>".
 9. Colocar o nome do arquivo a ser salvo. O programa colocará o nome da primeira sequência com a extensão PAIR.
 10. Uma lista com vários dados entre eles o número de gaps e a porcentagem de similaridade entre as duas sequências será dada.
 11. Para ver o arquivo onde as duas sequências encontram-se alinhadas e a comparação entre elas é feita, escrever "type nome do arquivo" (ex. "type ale.pair").
- * Procedimentos obtidos a partir do manual de instruções do GCG.

APÊNDICE 23. Obtenção de sequências homologas provenientes do banco de dados genômico utilizando os programas BLAST e FARFETCH.

A. BLAST.

1. Ativar o programa escrevendo "blast" na linha de comando.
2. Três opções apareceram e uma delas deve ser escolhida:
 - A. BLASTP. Compara a sequência de nucleotídeos com o banco de dados de proteínas.
 - B. TBLASTN. Compara a sequência de nucleotídeos com o banco de dados de sequências traduzidas.
 - C. BLASTN. Compara a sequência de nucleotídeos com o banco de dados de outras sequências de nucleotídeos.
3. Escolher a melhor opção (ex. "c <enter>").
4. O programa perguntará qual o banco de dados a ser utilizado (escolher entre genbank ou Gbupdate, ex. "genbank").
5. O programa perguntará então pelo nome do arquivo onde a sua sequência se encontra (ex: "ale.con").
6. Qual o nome do arquivo onde os resultados obtidos após serem procurados no banco de dados serão guardados? (ex. "ale.srch").
7. O programa pergunta se os parâmetros do default podem ser utilizados durante a procura de sequências homologas. Se mudanças nestes parâmetros não forem necessárias teclar "<enter>".
8. O programa procura então estas sequências e na tela apareceram pontos indicando que o sistema está funcionando.
9. Para poder obter a lista com os nomes e códigos das sequências homologas a sua, escrever "type nome do arquivo indicado no item 6" (ex: "type ale.srch").
10. Uma lista contendo códigos, nomes das sequências e valores que indicam o grau de homologia com a sequência em estudo será apresentada. As primeiras sequências da lista são aquelas cuja homologia é maior. Anotar o código destas sequências para poderem ser recuperadas com a ajuda do programa FARFETCH.

B. FARFETCH.

1. Ativar o programa escrevendo "farfetch" na linha de comando.
2. Será perguntado: WHICH DATABASE ENTRY?
3. Digitar "genbank:código"
4. Perguntará OUTPUT FILENAME?. Dar um nome (ex. "ale.out").
5. Para poder obter a sequência que apresenta homologia com a sua, escrever "type nome do file" (ex. "type ale.out").
6. Repetir este procedimento para cada uma das sequências homologas que sejam de interesse.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J.R.; Goodwin, R.H. & Wilcox, T.A. (1977). Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. *Rev. Biol. Cell.* 28, 261-268.
- Ahrens, C.H.; Pearson, M.N. & Rohrmann, G.F. (1995). Identification and characterization of a second putative origin of DNA replication in a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* 207, 572-576.
- Akiyoshi, D.; Chakerian, R.; Rohrmann, G.F.; Nesson, M.H. & Beauderau, G.S. (1984). Cloning and sequence of the granulins gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus. *Virology* 141, 328-332.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J.D. (1983). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York & London. p. 1146.
- Allen, G.E. & Knell, J.D. (1977). A nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatilis*. I. Ultrastructure, replication and pathogenicity. *Florida Entomol.* 60, 233-240.
- Alves, S.B. (1986). *Controle Microbiano de Insetos*. Manole, Ltda, São Paulo. p. 407.
- Arif, B.M. & Doerfler, W. (1984). Identification and location of reiterated sequences in the *Choristoneura fumiferana* MNPV genome. *EMBO J.* 3, 525-529.
- Ayres, M.D.; Howard, S.C.; Kuzio, J.; Lopez-Ferber, M. & Possee, R.D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 202, 586-605.
- Bergold, G.H. (1963). The nature of nuclear-polyhedrosis viruses. In: E.A. Steinhaus (ed). *Insect Pathology, an Advanced Treatise*, v. 1, pp 413. Academic Press, New York.
- Bilimoria, S.L. (1983). Genomic divergence among single-nucleocapsid nuclear polyhedrosis viruses of plusiine hosts. *Virology* 127, 15-23.
- Bilimoria, S.L. (1986). Taxonomy and identification of baculoviruses. In: R.R. Granados & B.A. Federici (eds), *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Vol I, pp. 37-59.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513
- Blissard, G.W. & Rohrmann, G.F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35, 127-155.
- Bonning, B.C. & Hammock, B.D. (1992). Development and potential of genetically engineered viral insecticides. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 10, 455-489.

- Brown, S.E.; Maruniak, J.E. & Knudson, D.L. (1984). Physical map of SeMNPV baculovirus DNA: An AcMNPV genomic variant. *Virology* 136, 235-240.
- Brown, S.E.; Maruniak, J.E. & Knudson, D.L. (1985). Baculovirus (MNPV) genomic variants: Characterization of *Spodoptera exempta* MNPV DNAs and comparison with other *Autographa californica* MNPV DNAs. *J. Gen. Virol.* 66, 2431-2441.
- Burand, J.P. & Summers, M.D. (1982). Alteration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA upon serial passage in cell culture. *Virology* 119, 223-229.
- Carbonell, L.F.; Hodge, M.R.; Tomalski, M.D. & Miller, L.K. (1988). Synthesis of a gene coding for an insect specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene* 73, 409-418.
- Carner, G.R. & Turnipseed, S.G. (1977). Potential of the nuclear polyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *J. Econ. Entomol.* 70, 608-610.
- Carner, G.R.; Hudson, J.S. & Barnett, O.M. (1979). The infectivity of a nuclear polyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar for eight Noctuid hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 33, 211-216.
- Carson, D.D.; Summers, M.D. & Guarino, L.A. (1991a). Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J. Virol.* 65, 945-951.
- Carson, D.D.; Summers, M.D. & Guarino, L.A. (1991b). Molecular analysis of a baculovirus regulatory gene. *Virology* 182, 279-286.
- Carstens, E.B.; Tjia, S.T. & Doerfler, W (1979). Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* polyhedrosis virus I. Synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology* 99, 386-398.
- Castro, M.E.B.; Oliveira, M.D.; Irineu, B.P. & Pinheiro, M.L.S. (1991). Análise molecular de isolados geográficos de *Baculovirus anticarsia*. *Anais da 17ª Reunião Anual de Genética de Microorganismos*. 13. (resumo)
- Castro, M.E.B.; Araujo, S & Oliveira, M.D. (1992). Comparação bioquímica de isolados temporais de vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (AgNPV). *Anais do 3º Simpósio de Controle Biológico*. 198. (resumo).
- Cherry, C.L. & Summers, M.D. (1985). Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr. Pathol.* 46, 286-295.
- Chisholm, G.E. & Henner, D.J. (1988). Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J. Virol.* 62, 3193-3200.
- Cochran, M.A. & Faulkner, P. (1983). Location of homologous DNA sequences interspersed at five regions in the baculovirus AcMNPV genome. *J. Virol.* 45, 961-970.
- Corso, I.C.; Gazzoni, D.L.; Oliveira, E.B. & Gatti, I.M. (1977). Ocorrência de poliedrose nuclear em *Anticarsia gemmatilis* na região sul do Brasil. *An. Soc. Entomol. Bras.* 6, 312-314.

- Crawford, A.M. & Granados, R.R. (1982). Nonoccluded baculoviruses. In: *Procedures of Invertebrate Pathology Microbial Control*, 3rd International Colloquium of Invertebrate pathology, University of Sussex, Brighton, U.K. 154-159.
- Crawford, A.M. & Miller, L.K. (1988). Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 62, 2773-2781.
- Croizier, G. & Ribeiro, H.C.T. (1992). Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus. *Virus Res.* 26, 183-196.
- Danyluk, G.M. & Maruniak, J.E. (1987). In vivo and in vitro host range of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 50, 207-212.
- Derkson, A.C.G. & Granados, R.R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* 167, 242-250.
- Federici, B.A. (1986). Ultrastructure of baculoviruses. In: R.R. Granados & B.A. Federici (eds). *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Vol I, pp 61-88.
- Francki, R.I.B.; Fauquet, C.M.; Knudson, D.L. & Brown, F. (1991). *Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer Verlag, Berlin.
- Fraser, M.J. (1986). Ultrastructural observation of virion maturation in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J. Ultrastruct. Res.* 95, 189-195.
- Fraser, M.J.; Smith, G.E. & Summers, M.D. (1983). Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationships between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 47, 287-300.
- Fraser, M.J.; Brusca, J.S.; Smith, G.E. & Summers, M.D. (1985). Transposon-mediated mutagenesis of baculovirus. *Virology* 145, 356-361.
- Friesen, P.D. & Miller, L.K. (1985). Temporal regulation of baculovirus RNA: overlapping early and late transcripts. *J. Virol.* 54, 392-400.
- Friesen, P.D. & Miller, L.K. (1987). Divergent transcription of early 35- and 49-kilodalton protein genes encoded by the HindIII-K genome fragment of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 61, 2264-2272.
- Fuchs, L.Y., Woods, M.S. & Weaver, R.F. (1983). Viral transcription during *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection: a novel RNA polymerase induced in infected *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 48, 641-646.
- Funderburk, J.; Maruniak, J.; Boucias, D. & Garcia-Canedo, A. (1992). Efficacy of baculoviruses and their impact on pest management programs. In: L.G. Copping, M. Green & R. Rees (eds), *Pest Management in Soybean*. Elsevier, England. pp 88-97.
- Garcia-Canedo, A.; Pavan, O.H.O. & Maruniak, J.E. A variable region of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences. *Virus Res.* (Submetido)

- Goto, C.; Minobe, Y. & Iizuka, T. (1992). Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. *J. Gen. Virol.* 73, 1491-1497.
- Granados, R.R. (1978). Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. *Virology* 90, 170-174.
- Granados, R.R. (1980). Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1377.
- Granados, R.R. & Lawler, K.A. (1981). *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* 108, 297-308.
- Groner, A. (1986). Specificity and safety of baculoviruses. In: R.R. Granados & B.A. Federici (eds), *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Vol I, pp. 177-202.
- Gula, M.A.; Buller, P.L. & Weaver, R.F. (1981). α -Amanitin resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.* 38, 916-921.
- Guarino, L.A. & Dong, W. (1991). Expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J. Virol.* 65, 3676-3680.
- Guarino, L.A. & Dong, W. (1994). Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhancer element hr5. *Virology* 200, 328-335.
- Guarino, L.A. & Summers, M.D. (1986a). Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.* 57, 563-571.
- Guarino, L.A. & Summers, M.D. (1986b). Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed-early gene expression. *J. Virol.* 60, 215-223.
- Guarino, L.A. & Summers, M.D. (1987). Nucleotide sequence and temporal expression of a baculovirus regulatory gene. *J. Virol.* 61, 2091-2099.
- Guarino, L.A. & Summers, M.D. (1988). Functional mapping of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genes required for late gene expression. *J. Virol.* 62, 463-471.
- Guarino, L.A.; Gonzalez, M.A. & Summers, M.D. (1986). Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 60, 224-229.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Harrison, R.L. & Summers, M.D. (1995). Mutations in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus 25 KDa protein gene result in reduced virion occlusion, altered intranuclear envelopment and enhanced virus production. *J. Gen. Virol.* 76, 1451-1459.
- Hashimoto, Y.; Kanamori, Y.; Hayakawa, T.; Katayama, Y.; Kamita, S.G.; Maeda, S. & Matsumoto, T. (1994). Physical mapping of *Bombix mori* nuclear polyhedrosis virus strain D1: identification of novel interspersed homologous regions. *Appl. Entomol. Zool.* 29, 442-448.

- Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28, 351-395.
- Hill, J.E.; Kuzio, J.; Wilson, J.A.; Mackinnon, E.A. & Faulker, P. (1993). Nucleotide sequence of the p74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Biochem. Biophys. Acta* 1172, 187-189.
- Hink, W.F. (1970). Established insect cell line from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Nature* 226, 466-467.
- Holmes, D.S. & Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114, 193-197.
- Hughes, K.M. (1972). Fine structure and development of two polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 19, 198-207.
- Johnson, D.W. & Maruniak, J.E. (1989). Physical map of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. *J. Gen. Virol.* 70, 1877-1883.
- Kambhampati, S.; Blac IV, W.C. & Rai, K.S. (1992). Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): technique, statistical analysis and applications. *J. Med. Entomol.* 79, 939-945.
- Kawamoto, F.; Suto, C.; Kumada, N. & Kobayashi, M. (1977). Cytoplasmic budding of a nuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelopes. *Microbiol. Immunol.* 21, 255-265.
- Kawanishi, C.Y.; Summers, M.D.; Stoltz, D.B. & Arnott, H.J. (1972). Entry of an insect virus in vivo by fusion of viral envelope and microvillus membrane. *J. Invertebr. Pathol.* 20, 104-108.
- Keddie, G.A.; Aponte, G.W. & Volkman, L.E. (1989). The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. *Science* 243, 1728-1730.
- Knudson, D.L. (1979). Plaque assay of baculoviruses employing an agarose-nutrient overlay. *Intervirology* 11, 40-46.
- Kool, M.; Van Den Berg, P.M.M.M.; Tramper, J.; Goldbach, R.W. & Vlak, J.M. (1993a). Location of two putative origins of DNA replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 192, 94-101.
- Kool, M.; Voeten, J.T.; Goldbach, R.W.; Tramper, J. & Vlak, J.M. (1993b). Identification of seven putative origins of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus DNA replication. *J. Gen. Virol.* 74, 2661-2668.
- Kool, M.; Goldbach, R.W. & Vlak, J.M. (1994a). A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 75, 3345-3352.
- Kool, M.; Voeten, J.T.M.; Goldbach, R.W. & Vlak, J.M. (1994b). Functional mapping of regions of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus viral genome required for DNA replication. *Virology* 198, 680-689.

- Kumar, S.; Tamura, K. & Nei, M. (1993). MEGA: Molecular Genetics Analysis. Version 1.01. The Pennsylvania State University. University Park, PA.
- Kuzio, J. & Faulkner, P. (1984). Regions of repeated DNA in the genome of *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 139, 185-188.
- Kuzio, J.; Rohel, D.Z.; Curry, C.J.; Krebs, A; Carstens, E.B. & Faulkner, P. (1984). Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 139, 414-418.
- Kuzio, J.; Jaques, R. & Faulkner, P. (1989). Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* 176, 759-763.
- Lee, H.H. & Miller, L.K. (1978). Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 27, 754-767.
- Lee, H.Y. & Krell, P.J. (1992). Generation and analysis of defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 66, 4339-4347.
- Lee, H. & Krell, P.J. (1994). Reiterated DNA fragments in defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus are competent for AcMNPV-dependent DNA replication. *Virology* 202, 418-429.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press, Oxford. p. 1272.
- Liu, J.-C. & Maruniak, J.M. (1995). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the gp41 gene of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 76, 1443-1450.
- Lu, A. & Carstens, E.B. (1991). Nucleotide sequence of a gene essential for viral replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 181, 336-347.
- Luckow, V.A. & Summers, M.D. (1988). Trend in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/Technology* 6, 47-55.
- Leisy, D.J. & Rohrmann, G.F. (1993). Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology* 196, 722-730.
- Machado, C.R. (1993). Caracterização Parcial do Genoma de um Baculovírus de Camarão (*Baculovirus penaei*). São Paulo. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências.
- Majima, K.; Kobara, R. & Maeda, S. (1993). Divergence and evolution of homologous regions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 67, 7513-7521.
- Maruniak, J.E. (1986). Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: R.R. Granados & B.A. Federici (eds), *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, Vol I, pp. 129-146.
- Maruniak, J.E. (1989). Molecular biology of *Anticarsia gemmatilis* baculovirus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 107-111.

- Maruniak, J.E. (1992). Contribution of molecular biology to the improvement of insect viruses as biological control products. *Pesq. Agropec. Bras.* 27, 143-150.
- Maruniak, J.E. & Summers, M.D. (1981). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus phosphoproteins and synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology* 109, 25-34.
- Maruniak, J.E.; Brown, S.E. & Knudson, D.L. (1984). Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. *Virology* 36, 221-234.
- Maruniak, J.E.; Garcia-Canedo, A. & Rodrigues, J.J. (1994). Cell lines used for the selection of recombinant baculovirus. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. Anim.* 30A, 283-286.
- Matthews, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 17, 1-199.
- McClintock, J.M. & Dougherty, E.M. (1988). Restriction mapping of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA: localization of the polyhedrin gene and identification of four homologous regions. *J. Gen. Virol.* 69, 2303-2312.
- Miller, L.K. (1984). Exploring the genome organization of baculoviruses. In: K. Maramorosch & H. Koprowski (eds), *Methods of Virology*. Academic Press, New York. pp 227-258.
- Miller, L.K. (1986). The genetics of baculoviruses. In: R.R. Granados & B.A. Federici (eds), *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press, Inc., boca Raton, Florida, Vol 1, pp 217-238.
- Miller, L.K. (1988). Baculovirus as gene expression vectors. *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 177-199.
- Miller, L.K. & Dawes, K.P. (1978). Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses: *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni* MNPV. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 1206-1210.
- Miller, L.K.; Jewell, J.E. & Browne, D. (1981). Baculovirus induction of a DNA polymerase. *J. Virol.* 40, 305-308.
- Moore, N.F.; King, L.A. & Possee, R.D. (1987). Viruses of insects. *Insect Sci. Appl.* 3, 275-289.
- Moscardi, F. (1989). Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 51-56.
- Moscardi, F. & Sosa-Gomez, D.R. (1992). Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: L.G. Copping, M.B. Green & R.T. Reeds (eds), *Pest Management In Soybean*. Elsevier, England. pp 98-109.
- Moscardi, F.; Allen, G.E. & Green, G.L. (1981). Control of the velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact of treatment of the natural incidence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Econ. Entomol.* 74, 480-485.
- Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- Nissen, M.S. & Friesen, P.D. (1989). Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J. Virol.* 63, 493-503.

- O'Reilly, D.R. (1992). The organization and regulation of baculovirus genes. In: J.M. Vlak, E.-J. Schlaeger & A.R. Bernard (eds). *Baculovirus and Recombinant Protein Production Processes*. F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland. pp. 11-20.
- O'Reilly, D.R. & Miller, L.K. (1989). A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science* 254, 1110-1112.
- O'Reilly, D.R.; Crawford, A.M. & Miller, L.K. (1989). Viral proliferating cell nuclear antigen. *Nature* 337, 606.
- O'Reilly, D.R.; Miller, L.K. & Luckow, V.A. (1994). *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. Oxford University press, New York and Oxford. p 371.
- Pavan, O.H.P. & Ribeiro, H.C.T. (1989). Selection of a baculovirus strain with a bivalent insecticidal activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 63-65.
- Pavan, O.H.O.; Boucias, D.G. & Pendland, J.C. (1981). The effects of serial passage of a nucleopolyhedrosis virus through an alternate host system. *Entomophaga* 26, 99-108.
- Pearson, M.N. & Rohrmann, G.F. (1995). *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins. *J. Virol.* 69, 213-221.
- Pearson, M.; Bjornson, R.; Pearson, G. & Rohrmann, G. (1992). The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: Evidence for multiple replication origins. *Science* 257, 1382-1384.
- Possee, R.D.; Sun, T.-P.; Howard, S.C.; Ayres, M.D.; Hill-Perkins, M. & Gearing, K.L. (1991). Nucleotide sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus 9.4 Kbp EcoRI-I and R (polyhedrin gene) region. *Virology* 185, 229-241.
- Potter, K.N.; Faulkner, P. & MacKinnon, E.A. (1976). Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 18, 1040-1050.
- Pritchett, D.W.; Young, S.Y. & Yearin, W.C. (1982). Dissolution of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra by the digestive fluid of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera:Noctuidae) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 39, 354-361.
- Ribeiro, H.C.T. & Pavan, O.H.O. (1994a). Baculovirus thermal stability. *J. therm. Biol.* 19, 21-24.
- Ribeiro, H.C.T. & Pavan, O.H.O. (1994b). Effect of temperature on the development of baculoviruses. *J. Appl. Ent.* 118, 316-320.
- Rodems, S.M. & Friesen, P.D. (1993). The hr5 transcriptional enhancer stimulates early expression from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome but is not required for virus replication. *J. Virol.* 67, 5776-5785.
- Rohrmann, G.F. (1986a). Evolution of occluded baculoviruses. In: R.R. Granados & B.A. Federici (eds). *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Vol 1, pp 203-215.
- Rohrmann, G.F. (1986b). Polyhedrin structure. *J. Gen Virol.* 67, 1499-1513.

- Rohrmann, G.F.; Pearson, M.N.; Bailey, T.J.; Becker, R.R. & Beauderau, G.S. (1981). N-terminal polyhedrin sequences and occluded baculovirus evolution. *J. Molec. Evol.* 17, 329-333.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.. New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5468.
- Schroeder, J.L. & Blattner, F.R. (1978). Least-square method for restriction mapping. *Gene* 4, 167-174.
- Shapiro, D.I.; Fuxa, J.R.; Braymer, H.D. & Pashley, D.P. (1991). DNA restriction polymorphism in wild type isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 58, 96-105.
- Sieburth, P.J. & Maruniak, J.E. (1988a). Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* 24, 195-198.
- Sieburth, P.J. & Maruniak, J.E. (1988b). Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 52, 453-458.
- Smith, G.E. & Summers, M.D. (1982). DNA homology among subgroup A, B, and C baculoviruses. *Virology* 123, 393-406.
- Smith, G.E.; Vlak, J.M. & Summers, M.D. (1983). Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10,000-molecular weight protein. *J. virol.* 45, 215-225.
- Smith, I.R.L. & Crook, N.E. (1993). Characterization of new baculovirus genotypes arising from inoculation of *Peris brassicae* with granulosis viruses. *J. Gen. Virol.* 74, 415-424.
- Southern, E.M (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Southern, E.M. (1979). Measurement of DNA length by electrophoresis. *Analytical biochem.* 100, 319-323.
- Summers, M.D. (1971). Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. *J. Ultrastruct. Res.* 35, 606-625.
- Summers, M.D. (1977). *Characterization of Shrimp baculovirus*. Ecological research series EPA-600/3-77-130, Environmental protection agency, Washington, D.C.
- Summers, M.D. & Smith, G.E. (1975). *Trichoplusia ni* granulosis virus granulin: A phenol soluble, phosphorylated protein. *J. Virol.* 16, 1108-1116.
- Summers, M.D. & Smith, G.E. (1987). *A Manual of Methods for Baculovirus Expression Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Tex. Agric. Exp. Stn. Bull. p. 56.

- Tanada, Y. & Kaya, H.K. (1993). DNA-viral infections: Baculoviridae. In: *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego. p 666.
- Theilmann, D.A. & Stewart, S. (1991). Identification and characterization of the IE-1 gene of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 180, 492-508.
- Theilmann, D.A. & Stewart, S. (1992). Tandemly repeated sequence at 3' end of the IE-2 gene of baculovirus *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus is an enhancer element. *Virology* 187, 97-106.
- Thiem, S.M. & Miller, L.K. (1989). Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 63, 2008-2018.
- Tinsley, T.M. (1979). The potential of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. *Annu. Rev. Entomol.* 24, 63-87.
- Tomalski, M.D.; Wu, J. & Miller L.K. (1988). The location, sequence, transcription and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology* 167, 591-600.
- Vaughn, J.L.; Goodwin, R.H.; Tompkins, G.J. & McCawley, P. (1977) The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Vlak, J.M. & Rohrmann, G.F. (1985). The nature of polyhedrin. In: K. Maramorosch & K.E. Sherman, (eds), *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, New York. pp 489-542.
- Vlak, J.M. & Smith, G.E. (1982). Orientation of the genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a proposal. *J. Virol.* 41, 1118-1121.
- Volkman, L.E. (1986). the 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 131, 103-118.
- 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, X. & Kelly, D.C. (1985). Baculovirus replication: Uptake of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus particles by insect cells. *J. Gen. Virol.* 66: 541-550.
- Whitford, M. & Faulkner, P. (1992). Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a gene encoding gp41, a structural glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 66, 4763-4768.
- Whitford, M.; Stewart, S.; Kuzio, J. & Faulkner, P. (1989). Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 63, 1393-1399.
- Wieslander, L. (1979). A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.* 98, 305-309.

- Williams, G.V.; Rohel, D.Z.; Kuzio, J. & Faulkner, P. (1989). A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion deletion mutants. *J. Gen. Virol.* 70, 187-202.
- Zanotto, P.M.A.; Sampaio, M.J.A.; Johnson, D.W.; Rocha, T.L & Maruniak, J.E. (1992). The *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. *J. Gen. Virol.* 73, 1049-1056.
- Zanotto, P.M.; Kessing, B.D. & Maruniak, J.E. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 147-164.