

BC/20991
IB/80087

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

EDSON FREITAS DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E GENÔMICA DO VÍRUS
DE POLIEDROSE NUCLEAR DE *Autographa
californica* EM *Diatraea saccharalis* (Fabr.,
1794) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE).**

Orientador: Octávio Henrique de Oliveira Pavan

*Campinas-SP
1993*

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)

Edson Freitas de Araújo

e aprovada pela Comissão Julgadora.

T/UNICAMP
Ar15_a

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

OP
*Campinas, 14
de dezembro
1993*

UNIDADE	IB		
N.º CHAMADA:	T		
	An 15a		
V.	Ex.		
TOMBO BCI	20.996		
PROC.	286.194		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PRECÇO	CR\$ 8.000,00		
DATA	18/02/94		
N.º CPD			

CM00054724-5

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

EDSON FREITAS DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E GENÔMICA DO
VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE
Autographa californica EM *Diatraea saccharalis* (Fabr.,
1794) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE).**

*Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas,
área de concentração: Genética.*

Orientador: Octávio Henrique de Oliveira Pavan

*Campinas-SP
Dezembro-1993*

À LIA E A MEUS
FILHOS TITO E
CIRO (IN MEMORIAN),
POR TUDO QUE
REPRESENTAM PARA MIM.

Dedico.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Universidade Estadual de Campinas.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Leandro e Eremita.

Ao Dr. Octávio Henrique de Oliveira Pavan.

Ao Dr. José Osmar Gaspar.

À Dra. Helena Camarão Telles Ribeiro.

À Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni.

Ao Dr. Cláudio Luis Messias.

Ao Dr. Tomomasa Yano.

À Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin.

A José Torquatro, Marco e Cecília.

Aos colegas Gonçalo, Andrés, Brocchi, Edson, Fernando, Germano, Guilherme, Luzão, Maria Helena, Marymar, Nancy, Nilda, Rosângela e Sílvia.

Às minhas irmãs Léa e Lete.

Ao Núcleo de Processamento de Dados da EAUFBa.

Ao CNPq.

À EBDA.

À UFBA.

À UNICAMP.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram com a elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

1.0	INTRODUÇÃO	1
2.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.0	BACULOVÍRUS	3
2.1.1	CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA MORFOLÓGICA	3
2.1.2	HOSPEDEIROS NATURAIS	4
2.1.3	INFECÇÃO E REPLICAÇÃO <i>IN VIVO</i>	5
2.1.4	VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE <i>Autographa californica</i> (VPNMac)	8
2.1.4.1	EXPRESSÃO GÊNICA EM VPNMac	9
2.1.5	CARACTERIZAÇÃO DOS BACULOVÍRUS POR ANÁLISE DO PERFIL DE RESTRIÇÃO	10
2.1.6	VARIABILIDADE GENÉTICA	11
2.1.7	VARIANTES GENÉTICOS EM VPNMac	14
2.1.8	ALTERAÇÃO NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS VPN	15
2.2.0	<i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr., 1794)	19
3.0.	OBJETIVO	21
4.0.	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1.	MATERIAL	23
4.1.1	INSETOS	23
4.1.2	ISOLADOS VIRAIS	23
4.1.3	ENZIMAS	24
4.2	MÉTODOS	25
4.2.1	MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS VIRAIS	25

4.2.3	PURIFICAÇÃO DOS CRISTAIS VIRAIS POR GRADIENTE DE SACAROSE	26
4.2.4	QUANTIFICAÇÃO VIRAL	27
4.2.5	OBTENÇÃO DAS LINHAGENS VIRAIS	27
4.2.6	ENSAIOS DE MORTALIDADE LARVAL	28
4.2.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIEDROS VIRAIS	30
4.2.8	ANÁLISE DOS MUTANTES MORFOLÓGICOS	31
4.2.9	EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL	31
4.2.10	MEDIDA ESPECTOFOTOMÉTRICA DO DNA	32
4.2.11	DIGESTÃO DO DNA POR ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO	33
4.2.12	TÉCNICA DE ELETROFORESE	33
4.2.13	ANÁLISE GENÔMICA DOS ISOLADOS VIRAIS	34
5.0	RESULTADOS	35
5.1	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ISOLADOS	35
5.2	APARECIMENTO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS	41
5.3	ANÁLISE GENÔMICA DOS ISOLADOS VIRAIS	48
6.0	DISCUSSÃO	55
7.0	CONCLUSÕES	64
8.0	RESUMO	65
9.0	SUMMARY	67
10.0	BIBLIOGRAFIA	69
11.0	ANEXOS	84

1.0 INTRODUÇÃO

Os baculovírus correspondem ao grupo de vírus entomopatogênicos mais bem estudados tanto do ponto de vista biológico quanto molecular. Sua infectividade restrita aos artrópodos, predominantemente à classe Insecta, juntamente com sua capacidade de persistência no ambiente, caracterizam sua potencialidade como agente de controle biológico de pragas de importância econômica de utilização segura a nível comercial.

Uma série de estudos tem procurado ampliar os conhecimentos sobre virulência e especificidade deste patógeno, objetivando a detecção de sistemas patógeno-hospedeiro de maior eficiência na produção de poliedros ativos.

A avaliação da diversidade intra e interpopulacional dos baculovírus, com o auxílio de técnicas de biologia molecular, tem revelado a existência de uma grande variabilidade genética associada a uma variabilidade na virulência e especificidade, permitindo a detecção e isolamento de genótipos de maior potencial como patógeno.

O avanço dos conhecimentos sobre o material genético destes vírus e de seus mecanismos de replicação, levou à descoberta de genes hiperexpressos, prescindíveis ao processo de multiplicação viral, o que tornou possível sua manipulação genética com introdução de genes exógenos, revelando-se um vetor de expressão de genes de eucariotos da maior importância. Por outro lado, uma série de estudos descrevem a construção de baculovírus recombinantes

contendo genes que aceleram a morte do inseto infectado, procurando a obtenção de um sistema mais eficiente no controle de populações de inseto-praga. Estas novas aplicações muito tem contribuído com a ampliação dos conhecimentos sobre os baculovírus (WOOD & GRANADOS, 1991).

Neste trabalho nós utilizamos isolados virais obtidos por RODRIGUES (1989), originados pela passagem seriada do clone E2 do vírus de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (VPNMAC) em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794), devido ao caráter radical das variações biológicas, associadas a alterações bioquímicas encontradas nestes isolados virais. Sendo o isolado E2 do VPNMAC o vírus de inseto mais bem estudado hoje, consideramos tratar-se de um modelo conveniente para o estudo das relações patógeno-hospedeiro nesses vírus, principalmente no que concerne a patogenicidade e especificidade.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACULOVÍRUS

2.1.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA MORFOLÓGICA

Os baculovírus correspondem a um grupo de vírus de invertebrados, representantes do único gênero descrito para a família Baculoviridae. Estes são caracterizados pela presença de uma unidade infectiva (virion) em forma de bastão, com dimensão aproximada de 50 x 250 nm. Os virions são constituídos por um nucleocapsídeo, envolto em um envelope protéico, contendo uma única molécula de DNA circular covalentemente fechada composta de 88 à 153 mil pares de bases (pb) (MATTHEWS, 1982; BILIMORIA, 1986).

Com base na sua morfologia os baculovírus podem ser agrupados em três sub-gêneros (BILIMORIA, 1986):

Sub-gênero A - A unidade viral é composta por uma matriz protéica de forma poliédrica, denominada poliedro, que apresenta em seu interior inúmeros virions. Neste grupo encontram-se os vírus de poliedrose nuclear (VPN). Os VPN são caracterizados pela presença do poliedro durante o seu ciclo de desenvolvimento, cujo tamanho médio quando completo varia de 0,8 à 2,0 μm , sendo constituído predominantemente (95%) por uma proteína estrutural denominada poliedrina, de peso molecular correspondente à aproximadamente 29.000 daltons (FEDERICI, 1986; WOOD & GRANADOS, 1991).

Os VPNS podem ser classificados quanto ao número de

nucleocapsídeos presentes por envelope viral, em: VPN simples (VPNS), aqueles que apresentam um; e VPN múltiplos (VPNM), os que apresentam dois ou mais nucleocapsídeos por envelope (SUMMERS & VOLKMAN, 1976). Nos dois casos um poliedro chega a conter mais de uma centena de nucleocapsídeos.

Sub-gênero B - A unidade viral é composta por uma matriz protéica de formato granular, denominada grânulo, que normalmente encerra em seu interior apenas um virion. Os vírus de granulose (VG) são representantes deste grupo.

Os VG possuem corpo de inclusão (grânulo) de tamanho variando de 0,1 à 1,0 μm , sendo constituído predominantemente por uma proteína de peso molecular de aproximadamente 29.000 daltons denominada granulina (WOOD & GRANADOS, 1991; FEDERICI, 1986).

Sub-gênero C - A unidade viral corresponde à unidade de infecção, desprovida de matriz protéica em qualquer fase do seu ciclo de vida.

Os baculovírus são denominados, dentro dos sub-gêneros, de acordo com o hospedeiro do qual o isolado viral foi originalmente obtido (MATTHEWS, 1987; MOORE e Cols., 1987).

2.1.2 HOSPEDEIROS NATURAIS

Os baculovírus são em sua maioria patógenos de insetos, podendo ser encontrados também infectando crustáceos e aracnídeos (MARTIGNONI & IWAI, 1986). Mais de 800 diferentes isolados destes

vírus foram relatados (WEITZMAN e cols., 1992).

A classe Insecta tem cerca de 600 espécies que servem como hospedeiros destes patógenos (MARTIGNONI & IWAI, 1986). Os principais hospedeiros são da ordem lepidóptera com aproximadamente 500 espécies infectados por estes vírus. Outras espécies hospedeiras pertencem às ordens coleóptera, himenóptera, tricóptera, diptera, homóptera e tisanura (FEDERICI, 1986). Os VPNM e VG tem sua gama de hospedeiros restrita aos lepidópteros, enquanto os VPNS apesar de infectarem principalmente os lepidópteros são encontrados em todas as outras ordens susceptíveis aos baculovírus (WOOD & GRANADOS, 1991).

2.1.3 INFECCÃO E REPLICAÇÃO IN VIVO

Os VPNS são encontrados na natureza na superfície de plantas e no solo (WOOD & GRANADOS, 1991). Por apresentarem corpos de inclusão são resistentes às condições adversas do ambiente, mantendo-se viáveis em alguns casos por dezenas de anos (JAQUES, 1977).

A principal forma de infecção viral ocorre pela ingestão dos poliedros durante a alimentação do hospedeiro na fase de larva (Figura 1). No intestino médio das larvas ocorre a dissolução dos poliedros, por ação do pH elevado (9,0 à 11,5) e provavelmente das proteases aí presentes, resultando na liberação dos virions. Parte dos virions atravessam a membrana peritrófica, que representa uma

provável barreira à infecção, e por fusão com a membrana citoplasmática penetram nas células do tipo colunar do epitélio intestinal. Os nucleocapsídeos penetram no núcleo celular onde se inicia o processo de expressão dos genes e replicação do genoma viral. Ocorre então a produção de unidades virais levando ao entumescimento do núcleo celular, com lise da carioteca e posteriormente lise celular (GRANADOS & WILLIAMS, 1986; BLISSARD & ROHRMAN, 1990; WOOD & GRANADOS, 1991).

Nos VPNs dois fenótipos diferentes de virions são formados durante o ciclo de vida, apresentando mesma identidade genética diferindo no entanto em morfologia, composição de proteína, especificidade de tecido e modo de entrada na célula alvo. Estes são os virions derivados de poliedros (VDP) e os virions extracelulares (EC) ou "budded-virus" (BV). O fenótipo VDP apresenta os virions no interior de poliedros, sendo responsável pela transmissão dos vírus de um inseto para o outro. O fenótipo EC corresponde ao nucleocapsídeo, envolvido em um envelope originado da membrana citoplasmática da célula hospedeira, obtido durante sua saída ou brotação. Este possui no envelope estruturas denominadas peplômeros constituídas por uma glicoproteína de origem viral (gp64). Esta estrutura parece estar relacionada à função dos EC que é o processo de infecção de células dos outros tecidos do hospedeiro (infecção secundária) (BLISSARD & ROHRMANN, 1990).

Durante o processo de infecção secundária os VPN e VG apresentam tropismo diferenciado, tendo o primeiro uma gama maior de tipos de células alvo. O VPN infecta preferencialmente corpo

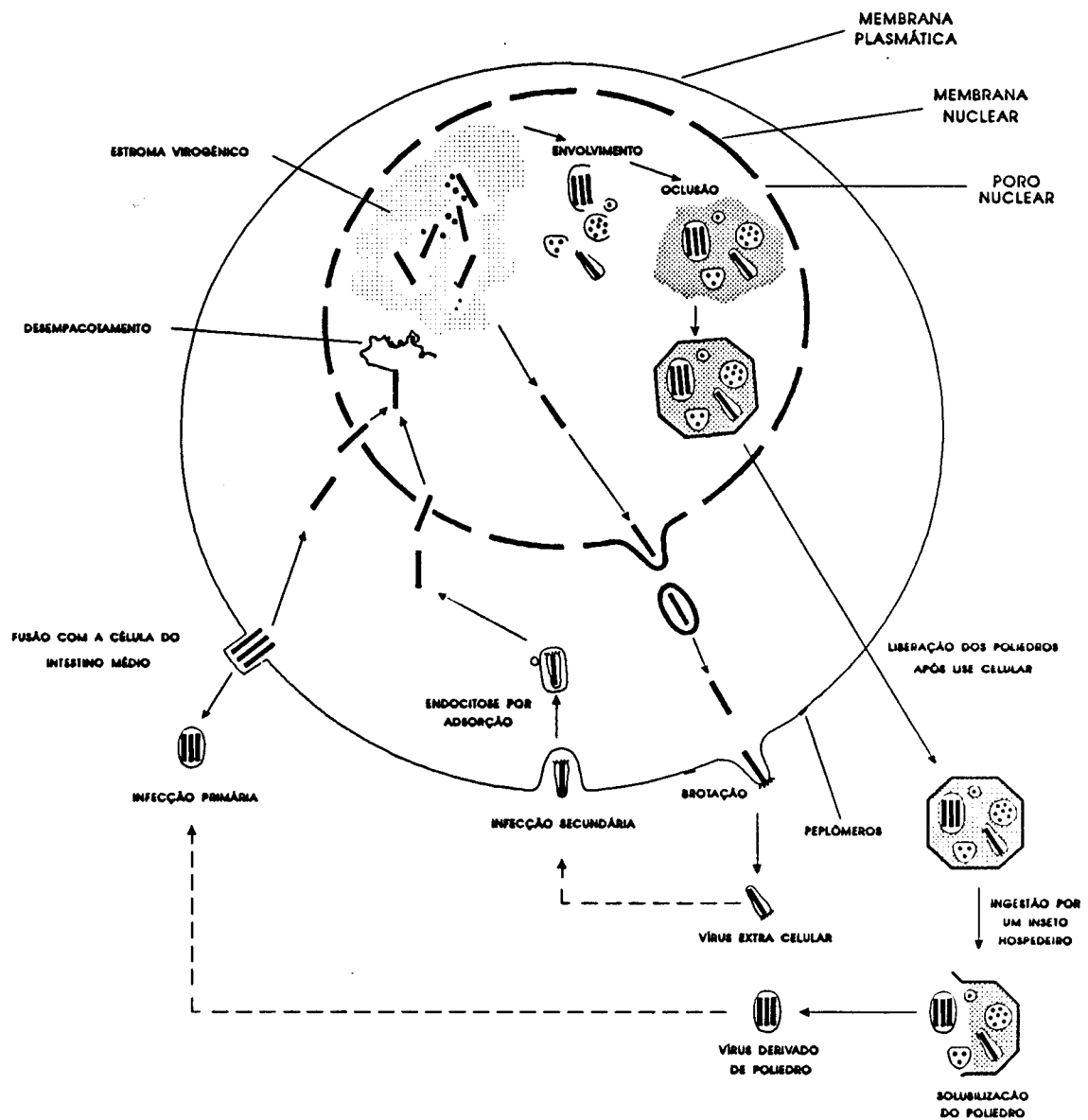


Fig. 1. Ciclo de infecção típico dos vírus de poliedrose nuclear. Este esquema está de acordo com o descrito por Blissard & Rohrmann, 1990.

gorduroso, hipoderme, matriz traqueal, membrana muscular, músculo, gânglio e célula pericardial, enquanto o VG infecta preferencialmente corpo gorduroso, epiderme e matriz traqueal (GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

Os sintomas apresentados pelas larvas infectadas são a alteração na coloração (ficando mais esbranquiçadas), retardamento e redução no desenvolvimento larval com perda de apetite, e flacidez corporal, devido ao rompimento dos tecidos com o avanço da infecção. As larvas podem morrer em períodos variáveis de 2 dias à 3 semanas após a ingestão do vírus, dependendo da temperatura, dose do inóculo, do tipo do isolado viral, espécie e estado nutricional do hospedeiro (GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

2.1.4 VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR *Autographa californica* (VPNMAc)

O VPNMAc foi pela primeira vez isolado em larvas de *Autographa californica* (Noctuidae), praga da cultura da alfafa. Este vírus, pertencente ao sub-gênero A, apresenta uma dupla hélice de DNA circular covalentemente fechada e superespiralada, de 128.000 pb (BLISSARD & ROHRMANN, 1990; WOOD & GRANADOS, 1991), associada à uma proteína codificada pelo vírus, semelhante à protamina ("protamine-like"), de 6,9 kilodaltons (kd) rica em arginina (MILLER, 1988).

Dentre os baculovírus, o VPNMAc corresponde ao que apresenta uma das mais amplas gama de hospedeiro, infectando no mínimo 23

espécies de insetos incluindo 8 famílias da ordem dos lepdópteros, e se replicando em pelo menos 12 linhagens de cultura de células de inseto (HOSTETTER & PUTTLER, 1991). Devido à sua potencialidade como agente de controle biológico e posteriormente como vetor de expressão de genes eucariotos, o VPnMac tem sido amplamente estudado visando a compreensão de suas características genéticas e moleculares (BLISSARD & ROHRMANN, 1990; WOOD & GRANADOS, 1991).

2.1.4.1 EXPRESSÃO GÊNICA EM VPnMac

A expressão gênica dos VPnMac analisada em cultura de células de *Spodoptera frugiperda* se dá por regulação em cascata, onde a expressão de genes das sucessivas fases é dependente de produtos gênicos da fase anterior (MILLER, 1988; BLISSARD & ROHRMANN, 1990). Evidências sugerem que tal regulação seja realizada a nível de transcrição dos genes (GUARINO & SUMMERS, 1986).

Duas fases distintas (precoce e tardia) são observadas com base na replicação do DNA viral. A fase precoce que corresponde ao período que precede à replicação do DNA viral, sendo caracterizada pela expressão de dois tipos de genes que são os genes imediatamente precoces (immediate early-IE), cuja expressão gênica independe de produtos gênicos de origem viral, e os precoces tardios (delayed early-DE) que depende dos produtos gênicos dos genes imediatamente precoces (IE) para serem expressos. A fase tardia compreende desde o início da replicação viral, prosseguindo até o período pós-transcricional onde ocorre a hiperexpressão dos

genes tardios (estruturais).

2.1.5 CARACTERIZAÇÃO DOS BACULOVÍRUS POR ANÁLISE DO PERFIL DE RESTRIÇÃO

A clivagem do genoma viral com endonucleases de restrição, tem sido uma ferramenta fundamental utilizada na caracterização, análise da diversidade e manipulação genética dos baculovírus. Um maior conhecimento do genoma viral foi gerado com a determinação de mapas de restrição e localização de genes nos principais representantes destes vírus.

Mapas físicos baseados no padrão de restrição tem sido obtido para alguns baculovírus como VPNMAC (COHCRAN e cols., 1982; MILLER & DAWES, 1979; SMITH & SUMMERS, 1979); VPN *Rachioplusia* ou (VPN Ro) (SMITH & SUMMERS, 1980); recombinante de VPNAc-Ro (SUMMERS e cols., 1980). GOTO e cols., (1992) obtiveram o mapa de restrição de seis isolados de VG extraídos de larvas de *Xestia nigrum*, *Autographa gamma*, *Hydraecia amurensis*, *Celaena leucostigma*, *Aletia pallens* e *Pseudaletia separata*.

O grau de similaridade entre diferentes genótipos de baculovírus tem sido determinado avaliando-se o perfil de restrição e o grau de associação dos genótipos pelo uso de técnicas de hibridização (SMITH & SUMMERS, 1982; MAEDA e cols. 1990).

Com o desenvolvimento da biologia molecular dos baculovírus, genes virais puderam ser localizados diretamente no genoma, isolados e caracterizados. O maior conhecimento sobre os genes

estruturais dos VPN, poliedrina (ADANG & MILLER, 1982; HOOFT VAN IDDEKINGE e cols., 1983; ZANOTTO e cols., 1991) e p10 (KUZIO e cols., 1984), tornou possível a manipulação genética dos baculovírus, com a introdução de genes exógenos, uma vez que os mesmos são expressos na fase tardia, sendo prescindíveis ao processo de infecção viral a nível da célula. Deste modo os baculovírus tem sido utilizados como vetores de expressão de genes eucariotos (LUCKOW & SUMMERS, 1988; MILLER, 1988), e sua ação como bioinseticida tem sido potencializada com a introdução de genes letais ao hospedeiro no genoma viral (WOOD & GRANADOS, 1991).

2.1.6 VARIABILIDADE GENÉTICA

As populações selvagens dos baculovírus tem demonstrado serem compostas de variantes genotípicas (McINTOSH e cols., 1987), onde tem sido detectada variabilidade genotípica tanto entre populações geográficas distintas (SHAPIRO & cols., 1991; VICKERS e cols., 1991), quanto dentro de população de uma mesma região (CHERRY & SUMMERS, 1985). Esta variabilidade tem sido avaliada de forma direta pela análise do perfil de restrição, tornando possível a obtenção e isolamento de diferentes variantes genéticas destas populações.

SMITH & SUMMERS (1978) analisando populações selvagens de VPnMac detectaram a existência de 8 genótipos distintos dentre 11 isolados obtidos randômicamente por purificação em placa. SHAPIRO

e cols. (1991) trabalhando com VPN de *Spodoptera frugiperda* encontraram 16 variantes distintas dentre 22 isolados analisados. VICKERS & ENTWISTLE (1991) trabalhando com VG de *Phthorimaea operculella* encontraram três genótipos distintos, proximamente relacionados, dentre 8 isolados geográficos analisados. MAEDA e cols. (1990) examinando a variabilidade genética de estoques selvagens de VPN de *Spodoptera litura* (VPNS1), analisaram mais de 100 isolados virais, os quais foram agrupados em quatro grupos distintos segundo as seguintes características: gama de hospedeiro "in vitro", proteína do poliedro, padrão de restrição e hibridização de DNA.

As prováveis causas envolvidas com a existência da variabilidade genotípica em baculovírus correspondem principalmente às mutações ocorridas naturalmente no genoma destes vírus (McINTOSH e cols., 1987), aliado à recombinação entre os genótipos durante o processo de replicação cromossomal (CROIZIER & RIBEIRO, 1992). Dados de literatura tem revelado que elementos genéticos móveis (transposons e retrotransposons) atuam como agentes causadores de variabilidade em populações de baculovírus, estando envolvidos na interação inseto-patógeno promovendo troca de material genético entre os mesmos (BLISSARD & ROHRMANN, 1990), devendo portanto apresentarem relevante influência no aspecto evolutivo deste sistema.

Além da variabilidade natural das populações, variantes genéticos ou mutantes tem sido obtidos, por passagem seriada em culturas de célula bem como por exposição à agentes mutagênicos

(BROWN & cols., 1979; LEE & MILLER, 1979; WOOD e cols., 1981) dentre outros métodos.

Sucessivas passagens de VPnMac em culturas de células ou *in vivo*, tem levado ao aparecimento de mutantes de um tipo denominado FP (few polyhedra) cujo fenótipo corresponde à reduzida produção de poliedros, e manutenção da produção de vírus extracelular (POTTER e cols., 1976; FRASER & HINK, 1982; MILLER, 1988). Inserido no genoma desses mutantes "FP" FRASER e cols., (1983) detectaram DNA originado da célula hospedeira. Um outro tipo de alteração, foi detectada por KOOL e cols., (1991) analisando mutantes de VPnMac que também apresentavam reduzido número de poliedros. Estes, multiplicados em larga escala em bioreatores, apresentaram genomas deletados, que continuavam sua replicação na presença de genomas auxiliares intactos ("helper"), e virions morfologicamente alterados.

CARSTENS e cols., (1986; 1987; 1992) trabalhando com os mutantes morfológicos M5 (BROWN e cols., 1980), M29 (DUNCAN & FAUKNER, 1982; DUNCAN e cols., 1983), e M934 (PARTINGTON e cols., 1990), verificaram que estes apresentam mutação puntual, com substituição de um aminoácido, em região conservada do gene da poliedrina. O mutante M276 descrito por PARTINGTON e cols., (1990) possui uma inserção de 229 pares de bases (pb) na região de codificação da porção carboxiterminal da poliedrina (CARSTENS e cols., 1992).

2.1.7 VARIANTES GENÉTICOS DE VPnMAc

Os estudos desenvolvidos com populações selvagens de VPnMAc têm revelado que estes são compostos por uma diversidade de genótipos (LEE & MILLER, 1978; SMITH & SUMMERS, 1978; MILLER e cols., 1980), mantida naturalmente nestas populações.

Muitos destes variantes genéticos foram clonados em cultura de célula, tendo seus genomas sido posteriormente analisados e comparados, revelando o grau de similaridade entre os mesmos.

SMITH & SUMMERS (1979), utilizando 6 diferentes endonucleases de restrição, verificaram que o variante E2 correspondia, dentre 41 isolados analisados, ao que apresentava maior similaridade nos perfis de restrição com os do tipo selvagem do VPnMAc. Estes autores, analisando os variantes de VPnMAc S3, E2, S1, M3 e R9, verificaram ainda que estes apresentavam os mesmos polipeptídeos estruturais virais, quando analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo no entanto diferenciados pela análise do padrão de restrição, com as endonucleases BamHI, XhoI e EcoRI.

COCHRAN e cols., (1982) comparando os padrões de restrição do variante HR3, descrito neste trabalho, com os de outros variantes de VPnMAc (E2, L1), verificou diferenças entre os mesmos quando utilizou as endonuclease HindIII e PstI. As digestões realizadas com SmaI, BamHI, XhoI e EcoRI mostraram padrão idêntico para as três linhagens analisadas.

A análise dos diferentes variantes genéticos, descrito para o VPnMAc, permitiu identificar regiões no genoma destes vírus, nas

quais a maioria da variabilidade genética ocorre. Estas correspondem a oito regiões de variação, que são encontradas à 8,5-11,0 unidades do mapa (u.m.), 18,3-20,0 (u.m.), 26,8 (u.m.), 52,7-53,4 (u.m.), 58,9-63,7 (u.m.), 70,0- 71,5 (u.m.), 76,2-77,3 (u.m) e 84,1-86,2 (u.m.) (McINTOSH e cols., 1987).

O mais bem estudado isolado de VPNMac corresponde ao clone E2, que é mantido nos laboratórios, em cultura de células de inseto. Variabilidade genética nos estoques virais deste clone têm sido relatada. BURAND & SUMMERS (1982) multiplicando o clone E2 por passagem seriada (30 gerações), em cultura de célula de *Trichoplusia ni*, linhagem TN-368, verificou alteração do genoma pela duplicação de DNA viral, resultando em três padrões de restrição distintos (C6, B6 e B5), os quais apresentaram sequências virais duplicadas inseridas nas regiões hr2 (18,3 a 20,0 u.m.) e hr3 (52,7 a 53,4 u. m.). Outra variante, denominado de isolado E, foi obtido a partir do E2 multiplicado em cultura de célula de *Spodoptera frugiperda* (SCHETTER e cols., 1990). A causa desta variabilidade foi atribuída à inserção de um elemento genético (transposon-like) de origem hospedeira, contendo 634 pares de bases.

2.1.8 ALTERAÇÃO NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS VPN

Os baculovírus possuem uma alta especificidade, atuando numa gama restrita de hospedeiros, que geralmente apresentam entre si proximidade taxonômica (GRONER, 1986). Devido à potencialidade

destes no controle de populações de insetos que constituem pragas de culturas de importância econômica (TINSLEY, 1979; GRONER, 1986; WOOD & GRANADOS, 1991), bem como da inexistência de relatos sobre agentes de controle biológico eficientes para parte significativa destes insetos, diversas pesquisas tem sido realizadas objetivando detectar melhores sistemas patógeno-hospedeiro do ponto de vista de controle destas populações, ampliando a compreensão sobre virulência e especificidade destes patógenos (WOOD & GRANADOS, 1991).

Diferentes graus de eficiência biológica tem sido verificados em baculovírus. Fatores envolvidos no acoplamento e entrada do virion na célula, e na liberação do genoma viral no núcleo celular (uncoating), resultando na expressão gênica e replicação do DNA viral, devem ser determinantes da eficiência do vírus no hospedeiro (GUZO e cols., 1991). O polimorfismo genotípico presente entre e dentro de populações virais tem sido considerada responsável pela maior parte da variabilidade do comportamento biológico, embora outras causas como interação entre vírus e presença de substâncias inibidoras ou estimuladoras da ação viral também possam estar relacionadas.

Dados na literatura indicam que os hospedeiros alternativos exercem pressão de seleção nas populações originais de baculovírus, detectadas por alteração nas frequências de mutantes morfológicos e genótipos, e na virulência dos isolados virais. RODRIGUES (1989), trabalhando com o isolado VPNAc-E2 passado serialmente por larvas de *Diatraea saccharalis* e WATANABE (1975) trabalhando com VPNM de

Bombyx mori em larvas de *Chilo suppressalis*, detectaram um aumento na frequência de mutantes morfológicos (poliedros cúbicos), nos isolados com as sucessivas passagens seriadas. WEITZMAN e Cols. (1992) trabalhando com VPNM de *Panolis flammia*, detectou que variantes genotípicas constituintes desta população eram selecionadas de forma diferenciada quando propagadas em hospedeiro alternativo.

Alguns estudos tem sido realizados com o objetivo de adaptar determinados tipos de baculovírus à hospedeiro alternativo, por meio de passagem seriada, visando a obtenção de vírus mais eficientes, para uma gama mais ampla de insetos que constituem pragas de culturas de importância econômica (GRONER, 1986). O processo de seleção de genótipos mais virulentos, é baseado na diversidade genotípica apresentada naturalmente pelas populações virais ou induzidas por agentes mutagênicos (WOOD e cols., 1981; McCLINTOCK & REICHELDEFER, 1985).

Trabalhos tem demonstrado um aumento da virulência de isolados de VPN quando passados por hospedeiro alternativo, à exemplo de: VPNAc em larvas de *Spodoptera exigua*, *Trichoplusia ni* e *D. saccharalis* (TOMPKINS, 1981; RODRIGUES, 1989); VPN de *T. viminalis* em larvas de *T. irregulares* (SMIRNOF, 1963); VPN de *Choristoneura fumiferana* em larvas de *T. ni* e *Galleria mellonella* e VPN de *Orgyia pseudotsugata* em larvas de *T. ni* (STAIR e cols., 1981; MARTIGNONI & IWAI, 1986); VPN de *Anticarsia gemmatalis* e VPN de *T. ni* em larvas de *D. saccharalis* (RIBEIRO, 1985; PAVAN & RIBEIRO, 1989). Em outros trabalhos não foi observada alteração da virulência dos

baculovírus após sucessivas passagens seriadas em hospedeiro alternativo (MALEKI-MILANI, 1978; McINTOSCH & IGNOFFO, 1986) podendo levar à manutenção (MARTIGNONI & IWAI, 1986; RIBEIRO, 1989) ou mesmo à uma diminuição da virulência do isolado viral (STAIR e cols., 1981; TOMPKINS e cols., 1981) quando testada no seu hospedeiro de origem.

Dados de literatura tem demonstrado uma ação sinérgica entre diferentes tipos virais (TANADA, 1985). Os fatores responsáveis por este incremento da atividade biológica são de natureza protéica, e tem sido descrito como fator sinérgico (synergistic factor - SF) (HARA e cols., 1976; ZHU e cols., 1989) e fator de incremento viral (viral enhancing factor - VEF) (DERKSON & GRANADOS, 1988; GOTO, 1990). Um aumento da susceptibilidade de larvas de *Pseudaletia unipuncta* ao VPN foi observado quando estas foram coinfectadas com VGPU e VPNPU (TANADA & HUKUHARA, 1971; TANADA e cols., 1975). DERKSON & GRANADOS (1988) verificaram que fatores presentes nos corpos de inclusão de VGTni e VPNMAC alteram a membrana peritrófica das larvas de *T. ni* levando a um aumento da infectividade do VPNMAC. GALLO e cols., (1991) verificaram um aumento na virulência de VPNMAC e VPNMAG correspondente a concentração do VEF de VGTni em larvas de *T. ni*.

2.2.0 *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794)

Diatraea saccharalis é um inseto da ordem dos lepidópteros, família Pyralidae, que no estágio larval representa importante praga da cana-de-açúcar nas Américas.

Após a eclosão dos ovos que são depositados na superfície inferior das folhas da planta as larvas invadem o colmo na região do terço superior da cana onde se dá o desenvolvimento larval. Nesse processo são formadas extensas galerias que funcionam como porta de entrada para patógenos, principalmente os fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, que causam uma doença denominada podridão vermelha, que promove a inversão da sacarose, resultando em perda de rendimento e qualidade do açúcar extraído. Em plantas mais jovens ocorre a destruição da região superior da planta causando atraso e perda de massa na plantação (MACEDO & BOTELHO, 1988).

Devido ao comportamento desta praga durante a fase larval, o controle químico é dificultado, uma vez que no interior do colmo da cana-de-açúcar estas estão protegidas da ação dos inseticidas. O controle biológico têm sido uma alternativa de controle da praga, onde tem-se utilizado o microhimenóptero *Apantheles flavipes* e os dípteros *Metagonistilum minense* e *Paratheresia claripalpis* para parasitar larvas deste inseto (DEGASPARI e cols., 1981). Mais recentemente os baculovirus tem sido empregados no controle da praga. Um vírus de granulose descoberto e descrito por PAVAN e cols (1983) tem sido avaliado como agente potencial de controle

(ALMEIDA e cols, 1986; DINARDO e cols, 1987). Um produto comercial registrado em 1989 (Multigen da Agroggen S.A. Biotecnologia Agrícola), à base de um isolado selecionado do VPN de *Anticarsia gemmatalis*, mostrou-se capaz de matar eficientemente não só seu hospedeiro original como larvas de *Diatraea saccharalis* após passagem seriado pelo hospedeiro alternativo (PAVAN & RIBEIRO, 1989).

3.0- OBJETIVO

RODRIGUES (1989), inoculando o variante clonado VPNMAc E2 de forma seriada em larvas de *D. saccharalis*, selecionou isolados virais que apresentaram um aumento de virulência em cinco gerações de seleção de cerca de mil vezes, dados esses inéditos na literatura. Esses isolados foram denominados de IV1-5 representando o número de passagens nas larvas. Além disso observou, ao longo das gerações, o aparecimento e o incremento de mutantes morfológicos (formas cúbicas ao invés de icosaedros). Outra característica observada no processo de passagem por *Diatraea*, foi a redução gradual na produção de poliedros, chegando a ser praticamente nula em IV5, num processo semelhante ao que ocorre com o fenótipo FP (few polyhedra), descrito em literatura. Aliado às alterações biológicas foram observadas também alterações entre os padrões protéicos apresentados pelos IVs, mostrando padrões semelhantes para E2 e IV1, um outro para IV2 e um terceiro para IV3 e IV4.

Pelo fato de que o isolado E2 do VPNMAc é o vírus de inseto mais bem estudado hoje, aliado ao caráter radical das variações biológicas associadas a alterações bioquímicas encontradas nestes isolados virais, consideramos tratar-se de um modelo conveniente para o estudo das relações patógeno-hospedeiro nesses vírus, principalmente no que concerne a patogenicidade e especificidade.

A partir do material obtido por RODRIGUES (1989), este trabalho teve por objetivo ampliar os estudos visando detectar a presença de alterações no genoma destes isolados virais, analisando

sua relação com as alterações biológicas verificadas.

4.0- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 INSETOS

Foram utilizadas larvas de *D. saccharalis* em quarto estágio larval (13 dias de idade), mantidas em laboratório segundo método de criação e dieta artificial descritos por HENSLEY & HAMMOND (1968), modificado por DEGASPARI e cols. (1981). As larvas foram mantidas em dieta artificial a uma temperatura constante de 28°C em fotoperíodo de 12 horas. Para multiplicação e obtenção dos isolados virais empregados nos experimentos, foram utilizadas larvas criadas no Laboratório de Virologia do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para os experimentos de virulência, devido a necessidade de lotes maiores de insetos e com sincronia de desenvolvimento, utilizou-se larvas gentilmente cedidas pelo setor de Entomologia Agrícola do Centro de Tecnologia da COOPERSUCAR mantidas da mesma forma.

4.1.2 ISOLADOS VIRAIS

Neste trabalho utilizou-se isolados IV1 e IV2, representando poliedros obtidos por RODRIGUES (1989) a partir de variante genética do VPnMac, clone E2, após uma e duas passagens seriadas,

respectivamente, em larvas de *D. saccharalis*. Esse clone originalmente utilizado, foi obtido pelo método de purificação em placa (SMITH & SUMMERS, 1978; SUMMERS & SMITH, 1978), multiplicado em cultura de célula de *Trichoplusia ni*, linhagem TN-368-10, inicialmente (1986) cedido pelo Dr. J.E. MARUNIAK, Departamento de Entomologia da Universidade da Flórida.

Os estoques dos isolados E2, IV3 e IV4, analisados por RODRIGUES (1989), não apresentavam quantidade suficiente de poliedros para serem utilizados nos experimentos por nós desenvolvidos.

Como padrão do genótipo do variante VPNAc E2 utilizamos material da mesma origem, cedido mais tarde (1991) pelo Dr. J.E. MARUNIAK. Durante esse período o material foi multiplicado em células, em cultura, em seu laboratório, com o objetivo de aumentar a quantidade de material disponível.

4.1.3 ENZIMAS

Baseado no mapa de restrição do VPNMAc, para a análise dos isolados utilizou-se as endonucleases EcoRI, PstI, BamHI, HindIII, SmaI e XhoI fornecidas pela AMERSHAM.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 MULTIPLICAÇÃO DOS ISOLADOS VIRAIS

Os isolados virais foram multiplicados em larvas de *D. saccharalis*, por inoculação individual, de acordo com o descrito por PAVAN e cols. (1981), com algumas modificações.

Em placas de acrílico, contendo 24 cavidades, foi colocado por cavidade um disco de dieta artificial (3 mm de diâmetro x 1 mm de espessura aproximadamente), ao qual foi aplicado 2,7 µl da suspensão viral, na concentração apropriada, utilizando-se de um microaplicador automático. Ao grupo de larvas controle (testemunha) foram oferecidas discos de dieta sobre o qual foi aplicado 2,7 µl de água destilada. As lagartas foram mantidas em câmara úmida a uma temperatura de 28°C + ou - 1, durante 24 horas, com fotoperíodo de 12 horas. Aquelas que ingeriram todo o inóculo foram transferidas para tubos com dieta não contaminada. O desenvolvimento e mortalidade larval foram monitorados diariamente. Amostras representativas de larvas infectadas foram examinadas ao microscópio de contraste de fase (marca LEITZ, modelo DIALUX 20, num aumento de 400X). As larvas retiradas são estocadas a -20°C até sua utilização.

4.2.2 PURIFICAÇÃO DOS CRISTAIS VIRAIS POR CENTRIFUGAÇÃO DIFERENCIAL

O protocolo de purificação seguido, foi aquele descrito por PAVAN e cols. (1981; 1983) com algumas modificações.

As larvas com sinais típicos de infecção e contendo poliedros foram homogeneizadas com um homogenizador manual, em tampão de extração viral (ANEXO I) numa proporção de 10 ml por grama de tecido de larva infectada. A suspensão viral foi filtrada em gase e centrifugada a 500xg durante 3 minutos, em uma centrífuga de mesa BECKMAN modelo GPR com rotor GH-3.7. O sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de 12.000xg por 30 minutos em uma centrífuga refrigerada, BECKMAN modelo J2 21, rotor JA 20. O precipitado, ressuspenso em uma solução de 0,5 M de NaCl para retirada do SDS (dodecil sulfato de sódio - ANEXO II), foi lavado por duas vezes com água destilada, sendo posteriormente mantido em suspensão e estocado à -20°C. No caso de haver a presença de excesso de contaminantes o ciclo foi repetido.

4.2.3 PURIFICAÇÃO DOS CRISTAIS VIRAIS POR GRADIENTE DE SACAROSE

Com a finalidade de eliminar a contaminação por outros vírus, presentes nos isolados virais 1 e 2 obtidos de RODRIGUES, procedeu-se a purificação em gradiente. Para isso, uma suspensão viral obtida por centrifugação diferencial de acordo com o protocolo descrito por PAVAN e cols. (1981; 1983), contendo aproximadamente

10^9 poliedros/ml, foi submetida à um gradiente contínuo de sacarose (40-66% p/p), e centrifugada em ultracentrífuga Beckman modelo L8-80 M, rotor SW-41, a 25.000xg durante 30 minutos. As bandas virais foram coletadas, e aquela contendo os vírus de poliedrose foi centrifugada, sendo os poliedros precipitados por centrifugação à 12.000xg durante 30 minutos numa centrífuga refrigerada, Beckman modelo J2-21, rotor JA 20, e lavados posteriormente por duas vezes com água destilada, para retirada do excesso de sacarose. Os vírus foram ressuspensos em tampão 0,01 M tris pH 7,5 e estocados à -20°C até seu uso.

4.2.4 QUANTIFICAÇÃO VIRAL

A quantificação viral foi realizada em um hematímetro de NEUBAUER através de um microscópio LEITZ, modelo DIALUX 20, com contraste de fase, num aumento de 400 X.

Após a quantificação as suspensões virais foram preparadas como um inóculo estoque numa concentração de 5×10^5 cristais/2,7 μ l, e estocadas à -20°C, para posterior utilização. Dosagens menores foram obtidas por diluição seriada a partir do inóculo estoque.

4.2.5 OBTENÇÃO DAS LINHAGENS VIRAIS

A partir dos isolados virais IV1 e IV2 obtidos por RODRIGUES (1989), estocados na coleção de vírus entomopatogênicos do Laboratório de Virologia, obteve-se os outros isolados (IV3, IV4 e

IV5), por passagem seriada destes em larvas de *Diatraea*. Os estoques do IV1 e IV2, utilizados originalmente neste trabalho, apresentavam contaminação por outros virus (vírus de granulose e denonucleose), sendo purificados por gradiente de sacarose conforme descrito anteriormente.

A passagem seriada consistiu em inocular o isolado viral em larvas de *Diatraea*, selecionar as que apresentam sinais típicos de infecção, e extrair os poliedros que representam o novo isolado viral. Esse processo foi repetido para cada geração.

4.2.6 ENSAIOS DE MORTALIDADE LARVAL

Foram realizados ensaios biológicos visando comparar a virulência dos isolados para larvas de *D. saccharalis*.

Num primeiro experimento larvas foram alimentadas com doses de 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 e 5×10^1 poliedros/larva dos isolados IV1 e IV3.

Num segundo experimento larvas foram alimentadas com doses de 5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^4 , 4×10^3 , 8×10^2 poliedros/larva dos isolados IV2, IV4 e IV5.

Num terceiro experimento larvas foram alimentadas com uma dose única de 1×10^5 poliedros/larvas dos isolados IV1, IV3 e IV5. Neste foram separados grupos de aproximadamente 10 indivíduos, criados de forma individual, que correspondiam a repetição do tratamento, para cada tipo viral utilizado.

Nos três experimentos um grupo controle recebeu dieta com água destilada. Para cada isolado e cada dose, um lote de 48 larvas de mesma idade e tamanho aproximado, receberam individualmente os discos de dieta inoculado. Em média, nos três experimentos, inclusive nos grupos controle, em cada lote aproximadamente 40 larvas ingeriram todo o vírus, e foram analisadas diariamente para análise da mortalidade.

Os dados dos dois primeiros experimentos foram utilizados para estimar os valores de dose letal 50% (DL_{50}). Estes experimentos foram realizados em períodos distintos, onde se utilizou um menor intervalo entre doses no segundo experimento, buscando-se uma melhor estimativa da DL_{50} , o que entretanto não foi verificado em relação aos valores de DL_{50} estimados no primeiro experimento. Devido à limitação de material biológico (quantidade de larvas) para realização dos bioensaios estes não foram realizados de forma simultânea.

Para o terceiro experimento foram estimados os valores de tempo letal 50% (TL_{50}) sendo os dados de mortalidade submetidos à análise de variância pelo pacote estatístico STATGRAPHIC.

Para estimar os valores de DL_{50} e TL_{50} foi utilizado o método de análise de probit pelo pacote estatístico do SAS.

4.2.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIEDROS VIRAIS

Visando comparar a capacidade de cada um dos isolados de produzir poliedros virais, larvas mortas pela infecção viral inoculadas com uma dose de 1×10^5 poliedros/larva, foram coletadas, pesadas em balança de precisão MICRONAL, modelo B 360, e armazenadas à -20°C . Para uma avaliação da quantidade de poliedros produzidos, procedeu-se a extração dos diferentes isolados de forma simultânea. O processo de extração segue o protocolo descrito por PAVAN e cols., (1981, 1983). A precipitação dos poliedros do extrato de larvas (filtrado), foram realizadas em tubos tipo "eppendorf" à 12.000xg por 2 minutos, em microcentrífuga Incibrás modelo Spin-I. Duas lavagens com precipitação subsequente foram realizadas em água destilada, sendo posteriormente os poliedros resuspensos em tampão TE (anexo III) e estocados à -20°C . A quantificação viral foi realizada como já descrita, sendo os valores considerados os correspondentes ao valor médio de três contagens.

Deve-se considerar que a produção é medida para o inóculo, ou seja, quando se analisa a produção de IV1 a IV5 esta se analisando a quantidade dos poliedros produzidos dos isolados resultantes a partir do inóculo mencionado. Assim, quando se estima, por exemplo, a produção de IV1 na verdade se conta o número de poliedros do tipo IV2 produzidos pelo inóculo de IV1.

4.2.8 ANÁLISE DOS MUTANTES MORFOLÓGICOS

Os cristais virais foram analisados, em microscópio de contraste de fase (aumento de 400x), pelo exame de amostras tecido de larvas infectadas esmagados entre lâmina e lamínula, e das suspensões virais purificadas. O registro fotográfico destes foi realizado em um Fotomicroscópio ZEISS, modelo 1 .

4.2.9 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

A extração do ácido nucléico foi realizada segundo procedimento de SMITH & CROOK (1988) com modificações.

Uma amostra de suspensão viral contendo um total de 10^9 poliedros, purificados por centrifugação diferencial, foi centrifugada em uma microcentrífuga Spin-Incibrás à 12.0000xg durante 3 minutos. Descartou-se o sobrenadante, e o precipitado foi ressuspendido em um volume de 150 μ l de solução, contendo 1% de SDS, ao qual foi adicionado 3 μ l de proteinase K (20 mg/ml), visando a inativação de nucleases do hospedeiro sendo incubada à temperatura de 56°C por 30 minutos. O poliedro foi rompido pela adição de 30 μ l de Na_2CO_3 1 M, e incubando a solução à uma temperatura de 56°C por 30 minutos. A extração do DNA do nucleocapsideo foi feita utilizando-se 200 μ l de fenol, por duas vezes, misturados suavemente com a solução presente no tubo "ependorf", onde a separação das fases fenol/aquosa foi realizada

mediante centrifugação à 12.000xg por 3 minutos em microcentrífuga, recuperando-se a fase aquosa. Resíduos de fenol foram retirados da amostra pela adição de 200 µl de solução clorofórmio/álcool isoamílico, na proporção de 24:1, que foi suavemente misturada em tubos "eppendorf"; a separação das fases foi realizada de acordo com o anteriormente descrito. O DNA viral, presente na fase aquosa, foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto (-20°C) e 1/10 de volume de 3 M NaOAc pH 4,8, e subsequente resfriamento à -70°C por 30 minutos. Posteriormente a solução foi centrifugada em microcentrífuga à 12.000 g por 30 minutos, e o precipitado lavado com etanol (70%), para retirada do excesso de sal, e novamente centrifugado nas mesmas condições. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 100 µl de tampão TE (ANEXO II) e estocado à -20°C.

4.2.10 MEDIDA ESPECTOFOTOMÉTRICA DO DNA

Os valores da concentração e pureza do DNA extraído foi calculado de acordo com índices descritos por SAMBROOK e cols.(1989) utilizando espectômetro BECKMAN, modelo DU-65. A leitura foi realizada num comprimento de onda de 260 nm, considerando o valor unitário da densidade óptica (D.O.) correspondente à uma concentração de 50 µg de DNA/ml. A estimativa da pureza do material extraído foi dada pela relação D.O. 260/D.O. 280 obtida através de leitura nos comprimentos de onda à 260 e 280

nm respectivamente, considerado adequado quando este valor for igual ou superior à 1,8. Esse nível de pureza permite uma boa digestão pelas enzimas de restrição em geral.

4.2.11 DIGESTÃO DO DNA POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

Os DNAs virais foram digeridos com as endonucleases EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, SmaI e XhoI, fornecidas pela AMERSHAM.

As reações de digestão foram montadas de acordo com o recomendado por SAMBROOK e cols., (1989), onde digeriu-se de 1,0 à 10,0 µg de DNA genômico do vírus, numa proporção de 3-4 unidades de enzimas/µg de DNA, durante 4 a 6 horas, em temperatura de 28°C ou 37°C segundo as recomendações do fabricante.

4.2.13 TÉCNICA DE ELETROFORESE

Para a corrida de eletroforese do DNA foram utilizadas cubas MINI SUB CELL-BIORAD e WIDE MINI C BIORAD, alimentadas por uma fonte de corrente contínua, sendo empregados valores de 15 ou 45 volts por um tempo de corrida de 12 ou 5 horas respectivamente.

As amostras migraram em gel de agarose (0,6-0,8%), separando os fragmentos obtidos por ação de endonucleases de restrição;

utilizou-se o tampão TAE (ANEXO IV) tanto para a corrida eletroforética quanto para a preparação do gel.

A visualização das bandas contendo os fragmentos de DNA foi feita através do uso de luz ultra-violeta, em gel com brometo de etídio na proporção de 0,5 µg/ml de solução de agarose. O registro fotográfico destes se deu com filme POLAROID 667 POSITIVO.

4.2.14 ANÁLISE GENÔMICA DOS ISOLADOS VIRAIS

O padrão de restrição dos isolados virais estudados (IVs), foi obtido para amostras de DNA viral clivadas com as endonucleases EcoRI, HindIII, PstI, BamHI, SmaI e XhoI.

Os padrões obtidos para os isolados foram comparados a um clone de VPNAc E2, cedido pelo Dr. MARUNIAK no ano de 1991 derivado do mesmo clone originalmente utilizado na obtenção dos isolados em *Diatraea*. Esse material foi utilizado em lugar do clone original que não mais tínhamos para análise.

Como marcadores de peso molecular foram utilizados o fago lambda cortado com HindIII, fago lambda + pSPTBM 20 - StyI e SauI, e ladder 1 kb, que co-migraram com as amostras analisadas.

O tamanho dos fragmentos de restrição foi estimado pelo programa Eletroforese (Dr. ADILSON LEITE) baseado na análise de regressão não linear (MÉTODO MARQUARDT), como descrito por PLIKAYTS e cols., (1986).

5.0- RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS ISOLADOS

Os isolados virais do VPnMac utilizados (IV1, IV2, IV3, IV4 e IV5) infectaram as larvas levando ao aparecimento dos sintomas típicos de poliedrose. Larvas infectadas apresentaram perda de apetite, alteração na coloração e redução no desenvolvimento corporal quando comparadas com larvas sadias (testemunhas). Nos estágios finais da infecção as larvas apresentaram flacidez corporal, e em alguns casos foi observado o total rompimento dos tecidos larvais (wilt).

O início da mortalidade larval ocorreu a partir do oitavo dia após inoculação dos isolados virais, para a dosagem mais elevada (5×10^5 poliedros/larva), tendo este período sido ampliado (13º dia) na dosagem de 8×10^2 poliedros/larva. Para a menor dosagem de inóculo utilizada (5×10^1 poliedros/larva) não foi verificada mortalidade na fase larval. No entanto foram observadas mortalidade em pupas para todos isolados virais utilizados, nas diferentes dosagens dos inóculos.

De uma forma geral, foram detectados aumentos dos valores de mortalidade, proporcionais às dosagens crescentes dos inóculos virais (IV1-5) fornecidos às larvas de *D. saccharalis*.

Os dados apresentados na tabela 1 correspondem ao experimento envolvendo os isolados IV1 e IV3. Para todas as doses empregadas a mortalidade apresentada pelo IV3 foi superior a aquela de IV1.

Tabela 1. Mortalidade de *D. sccharalis* (Fabr. 1794), 4º estágio de desenvolvimento, inoculadas com os isolados virais (IV) IV1 e IV3, nas diferentes dosagens, considerando o número total de indivíduos analisados (NA), o número (N) e a porcentagem (%) de indivíduos mortos pelo vírus.

IV	DOSE (poliedro/larva)	NA	N	%
IV1	5×10^1	38	2	5,3
IV3		42	2	4,8
IV1	5×10^2	44	2	5,0
IV3		42	7	16,7
IV1	5×10^3	46	4	8,7
IV3		41	12	29,3
IV1	5×10^4	43	11	25,6
IV3		41	25	61,0
IV1	5×10^5	47	35	74,5
IV3		18	17	94,4

exceto para a dose de 5×10^1 onde os dois isolados apresentaram uma mortalidade de aproximadamente 5%. A maior diferença entre a mortalidade dos dois isolados pôde ser observada nas doses intermediárias (5×10^2 , 5×10^3 e 5×10^4 poliedros/larva) onde IV3 causou uma porcentagem de mortalidade cerca de 3 vezes superior a IV1. Na dose maior, de 5×10^5 poliedros/larva IV3 mostrou ainda nítida vantagem sobre IV1 com valores de 95 e 75% de mortalidade respectivamente.

Os dados da tabela 2 correspondem ao experimento envolvendo os isolados IV2, IV4 e IV5. De modo geral se observou um aumento da mortalidade com o aumento da dose. Da mesma forma os dados mostram, de modo geral um incremento da mortalidade de IV2 para IV4 e deste para IV5.

Os valores estimados da DL50 foram de 159×10^3 , 24×10^3 , 22×10^3 , 17×10^3 e 3×10^3 poliedros/larva para IV1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente (Tabela 3). Foi observada uma redução dos valores da DL₅₀ de mais de 50 vezes para as linhagens virais submetidas a 4 passagens seriadas *in vivo* (Tabela 3). As reduções mais drásticas, da ordem de 6 vezes, podem ser observadas entre IV1 e IV2 e entre IV4 e IV5.

Os resultados do experimento realizado para comparar a atividade dos IV1, IV3 e IV5, para a dose de 1×10^5 poliedros/larva (Tabela 4) mostram uma diferença estatística da atividade biológica do IV1 com o IV3 e IV5, a um nível de significância de 0,001 pela análise da variância (ANOVA). Não foram observadas diferenças significativas entre IV3 e IV5; os valores

Tabela 2 Mortalidade de *D. saccharalis* (Fabr. 1794), 4^o estágio de desenvolvimento, inoculadas com os isolados virais (IV) IV2, IV4, IV5, nas diferentes dosagens, considerando o número total de indivíduos analisados (NA), o número (N) e a porcentagem (%) de indivíduos mortos pelo vírus.

IV	DOSE (poliedro/larva)	NA	N	%
IV2		40	7	17,5
IV4	8x10 ²	39	7	17,9
IV5		41	19	46,3
IV2		39	7	17,9
IV4	4x10 ³	39	8	20,5
IV5		46	17	37,0
IV2		38	17	44,7
IV4	2x10 ⁴	40	22	55,0
IV5		47	35	74,5
IV2		39	24	61,5
IV4	1x10 ⁵	39	30	76,9
IV5		45	36	80,0
IV2		40	38	95,0
IV4	5x10 ⁵	41	36	87,8
IV5		41	38	92,7

Tabela 3. Valor da dosagem letal 50% (DL_{50}) e equação da reta para os isolados virais IV1, IV2, IV3, IV4 e IV5.

	DL_{50} (poliedro/larva)	EQUAÇÃO DA RETA
IV1	$1,59 \times 10^5$	$y = 0,6815 x - 3,5441$
IV2	$2,43 \times 10^4$	$y = 0,8556 x - 3,7524$
IV3	$2,27 \times 10^4$	$y = 0,6309 x - 2,7483$
IV4	$1,70 \times 10^4$	$y = 0,8312 x - 3,5174$
IV5	$3,10 \times 10^3$	$y = 0,5984 x - 2,0891$

Tabela 4. Mortalidade larval de *D. saccharalis*, inoculadas com os isolados virais (IV) IV1, IV3 e IV5, na dosagem de 1×10^5 poliedros/larva, considerando o número de indivíduos analisados (NA), o número (N) e a porcentagem (%) de larvas mortas pelo vírus.

IV	NA	N	%
IV1	85	46	54,12
IV3	45	33	73,33
IV5	90	65	72,22

* Estes dados não contemplam análise da mortalidade na fase de pupa.

médios de mortalidade apresentados por estes isolados são praticamente idênticos ($V3=0,728$ e $IV5=0,726$). Os resultados relativos ao tempo de mortalidade para matar 50% das larvas analisadas, apresentados para cada isolado viral deste experimento, revelam uma ação significativamente mais rápida dos IV3 e IV5 em relação ao IV1 (Tabelas 5 e 6). Os valores do TL_{50} dos IV3 e IV5 não apresentaram diferença significativa, tendo os respectivos intervalos de confiança valores muito semelhantes (Tabela 6).

A análise dos dados de produção de poliedros, obtidos pela contagem dos cristais virais dos IVs, não revelou uma tendência de aumento ou redução na quantidade destes com a passagem do vírus em larvas de *Diatraea*. Os dados da tabela 7 mostram uma variação aleatória com a maior produção de poliedros por grama de tecido larval para os inóculos de IV3 ($8,00 \times 10^8$) e de IV4 ($7,07 \times 10^8$), e a menor produção pelos inóculos de IV2 ($3,75 \times 10^8$). As produções apresentadas pelos inóculos IV1 e IV5 possuem valor intermediário aos dos outros isolados, sendo em torno de $5,0 \times 10^8$ poliedros/larva.

5.2 APARECIMENTO DE MUTANTES MORFOLÓGICOS

Os poliedros mutantes de forma cúbica foram observados em praticamente todas as larvas infectadas pelos cinco isolados virais. As formas cúbicas apresentaram-se em frequência variável, de larva para larva, chegando em alguns casos a constituírem quase

Tabela 5. Mortalidade acumulada de *D. saccharalis*, 4º estágio de desenvolvimento larval, inoculadas com os isolados virais (IV) IV1, IV3 e IV5 na dosagem de 1×10^5 poliedros/larva, ao longo dos dias após a inoculação viral.

DIAS	IV1 (86)	IV3 (45)	IV5 (90)
09	--	02	--
10	02	06	07
11	02	06	07
12	07	12	20
13	12	20	46
14	23	26	51
15	27	30	55
16	29	31	57
17	35	31	59
18	35	31	64
19	37	31	64
20	43	32	65
21	43	33	--
27	46	--	--
28	47	--	--

Tabela 6. Valor do Tempo letal 50% (TL_{50}), intervalo de confiança e equação da reta para os isolados virais IV1, IV3 e IV5, inoculados em larvas *D. saccharalis* de 13 dias de idade na dosagem de 1×10^5 poliedros/larva.

	TL_{50} (poliedro/larva)			EQUAÇÃO DA RETA
IV1	19,42	- 21,10	- 23,93	$y = 4,69x - 6,22$
IV3	13,77	- 14,70	- 15,67	$y = 6,02x - 5,02$
IV5	13,87	- 15,08	- 16,45	$y = 6,10x - 7,19$

Tabela 7. Produção de cristais de VPNMAc dos isolados virais (IV) IV1, IV2, IV3, IV4 e IV5 em larvas de *D. saccharalis* (4º estágio larval) por grama de tecido larval infectado (PTL) e por larva infectada (PLI). Sendo N o número de indivíduos analisados e PL o peso total de larvas.

IV	N	PL (g)	PTL (10 ⁸ poliedros/g)	PLI (10 ⁷ poliedros)
IV1	6	0,71	4,82	4,29
IV2	5	0,40	3,75	3,00
IV3	7	0,39	8,00	4,48
IV4	6	0,60	7,07	7,00
IV5	14	1,01	5,05	3,96

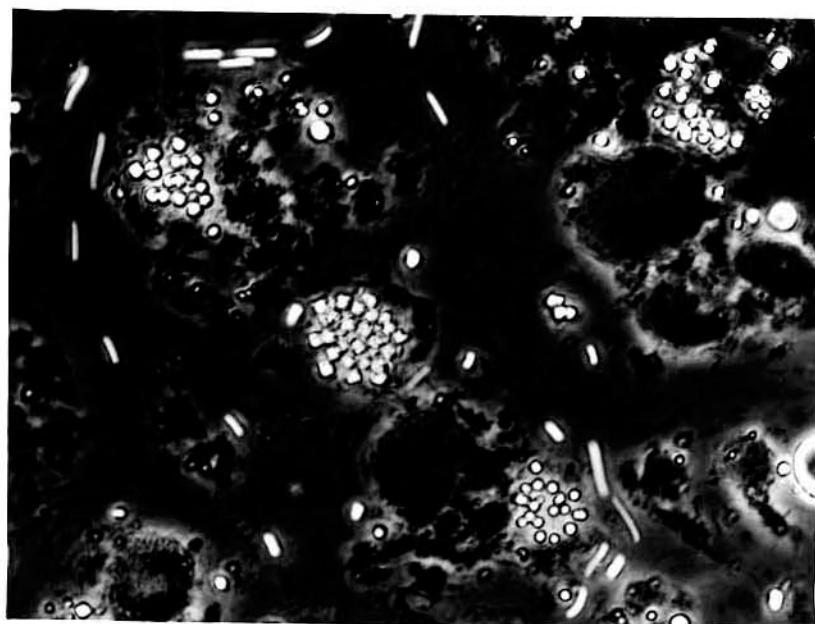


Figura 2. Tecido larval de *D. saccharalis* apresentando células infectadas com poliedros de formatos icosaédrico (seta horizontal) e cúbico (seta vertical) dos isolados de VPNAc IVs.

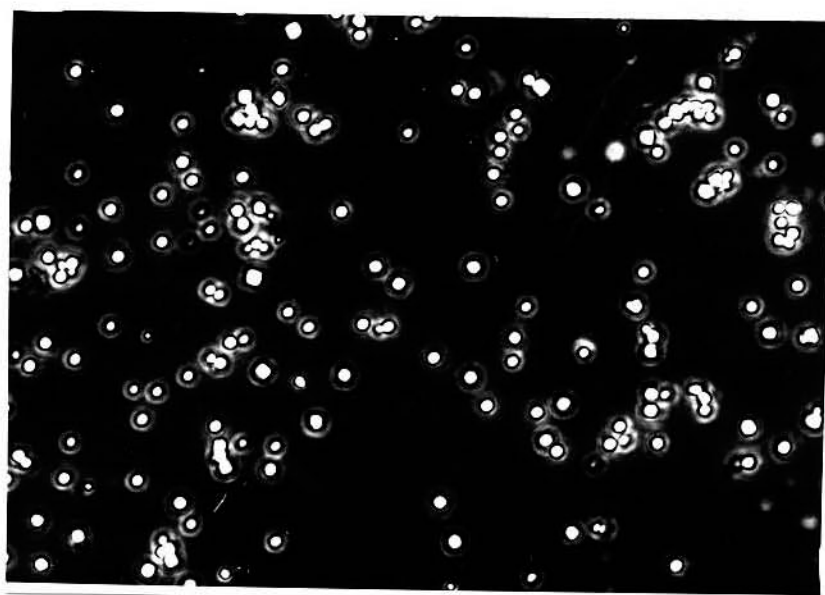


Figura 3. Suspensão viral dos VPNAc IVs apresentando poliedros de formatos icosaédrico e cúbico. As setas indicam cristais com forma cúbica.

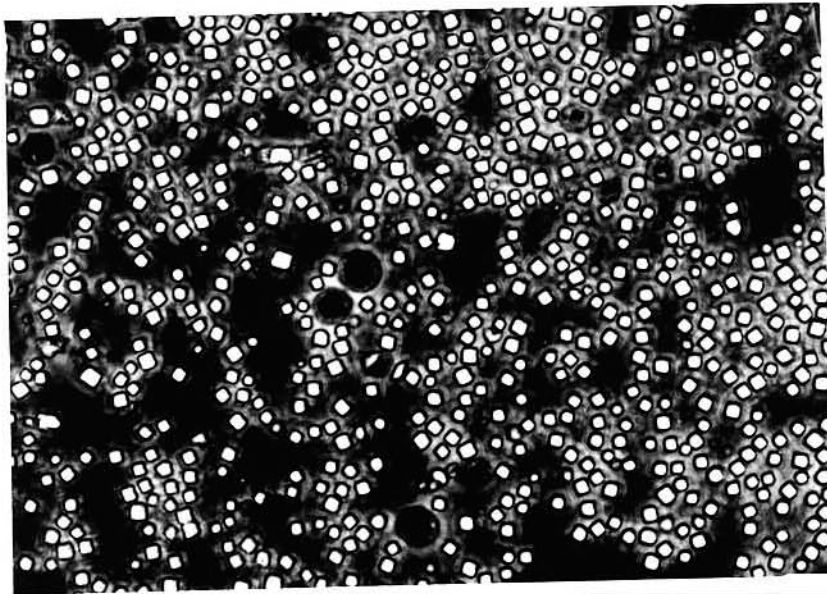


Figura 4. Tecido larval de *D. saccharalis* no estágio avançado da infecção (wilt) apresentando predominância de poliedros mutantes dos IVs (formato cúbico).

a totalidade dos poliedros produzidos (Figuras 2, 3 e 4).

Os poliedros mutantes observados, apresentaram além do formato cúbico, tamanho superior aos poliedros icosaédricos normais de VPNMAC (Figura 2).

5.3- ANÁLISE GENÔMICA DOS ISOLADOS VIRAIS

Os padrões de restrição obtidos para os IVs apresentaram um número de bandas perceptíveis em gel correspondente à 16 para HindIII, 13 para EcoRI, 12 para PstI, 9 para XhoI, 6 para BamHI e 4 para SmaI. Nenhuma diferença nos perfis de restrição foi detectada entre os IVs quando foram analisadas as bandas formadas pela digestão por HindIII, PstI, XhoI, BamHI e SmaI (Figuras 5, 6 e 7).

A análise do padrão de restrição EcoRI dos IVs, no entanto, revela a existência de uma banda submolar, de tamanho estimado em 4,08 kpb, que apresenta uma concentração variável nos diferentes isolados virais, sugerindo uma intensificação da mesma a medida que estes foram passados em larvas de *D. saccharalis* (Figuras 5 e 8). Neste padrão as outras 12 bandas de concentração equimolecular, apresentaram tamanhos estimados em 14,23; 12,83; 11,10; 9,7; 8,9; 7,33; 6,55; 5,31; 3,82; 2,45; 2,37; e 2,01 kpb e são idênticas para os cinco isolados.

Os padrões de restrição apresentados pela clivagem do DNA do isolado E2M mostram diferenças no número de bandas e na migração de

(Figura 9). Os perfis de E2M apresentaram os seguintes números de bandas visíveis em gel: 15 com HindIII, 12 com EcoRI, 6 com BamHI e 4 com SmaI.

O padrão HindIII deste isolado apresentou: 13 bandas idênticas as apresentadas pelo IVs; uma banda de tamanho estimado em 5,8 kpb, ausente no perfil dos IVs; e uma banda, de tamanho estimado ligeiramente menor que a correspondente nos IVs (E2M-4,94 kpb x IV-4,96 kpb).

O padrão de clivagem do DNA de E2M com EcoRI, apresentou 11 bandas com a mesma migração eletroforética das bandas de DNA obtidos para os IVs com a mesma enzima, e uma correspondente a banda de 14,23 kpb encontrada nos IVs, com um tamanho estimado em 15,04 kpb. A banda de 4,08 kpb encontrada nos IVs não está presente em E2M.

O padrão BamHI deste isolado apresentou cinco bandas idênticas as encontradas nos IVs, e uma banda com migração diferenciada àquela correspondente nos IVs (8,93 kpb), ligeiramente maior com um tamanho estimado em 9,3 kpb.

O padrão de restrição de SmaI para E2M apresentou-se idêntico ao observado para os IVs.

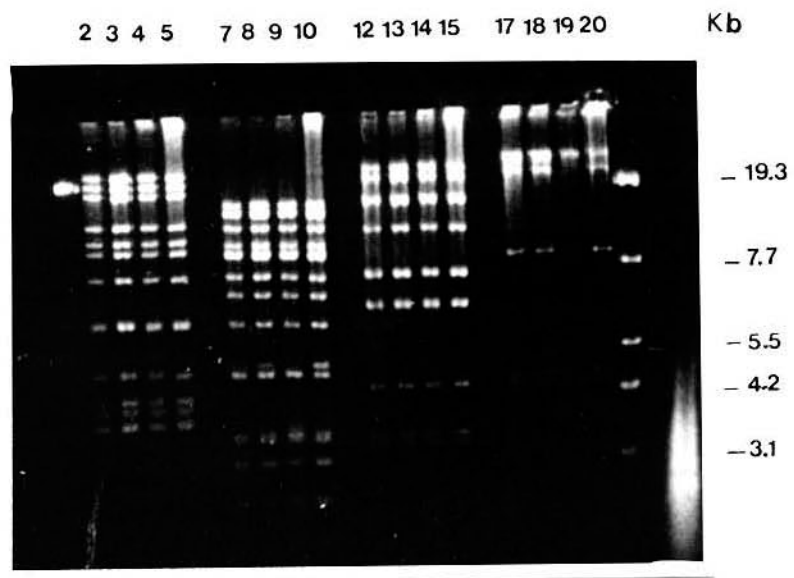


FIGURA 5. Padrão de restrição em gel de agarose 0,7% do DNA genômico dos IVs (1,2,3 e 5) cortado com as endonucleases: PstI (2 a 5), EcoRI (7 a 10), XhoI (12 a 15) e BamHI (17 a 20). Os números ao lado correspondem ao tamanho dos fragmentos em kpb do padrão de peso molecular fago Lâmbda+pSPTBM20-StyI (21).

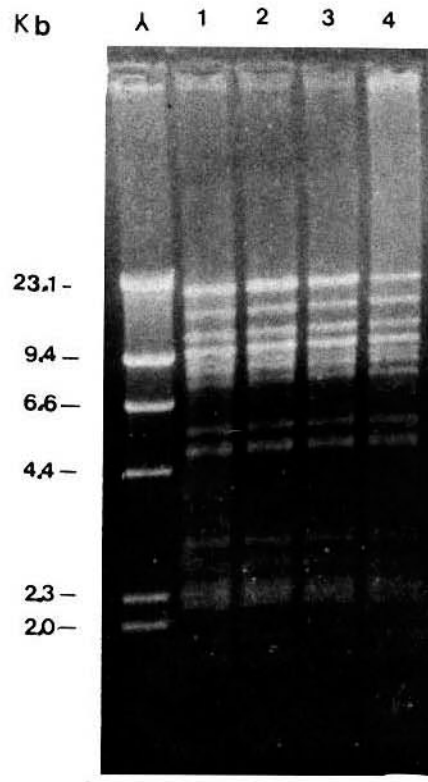


FIGURA 6. Padrão de restrição em gel de agarose 0,7% do DNA genômico dos IVs (1,2,3 e 4) cortado com HindIII. Os números ao lado correspondem ao tamanho dos fragmentos em kpb do padrão de peso molecular fago lâmbda HindIII.

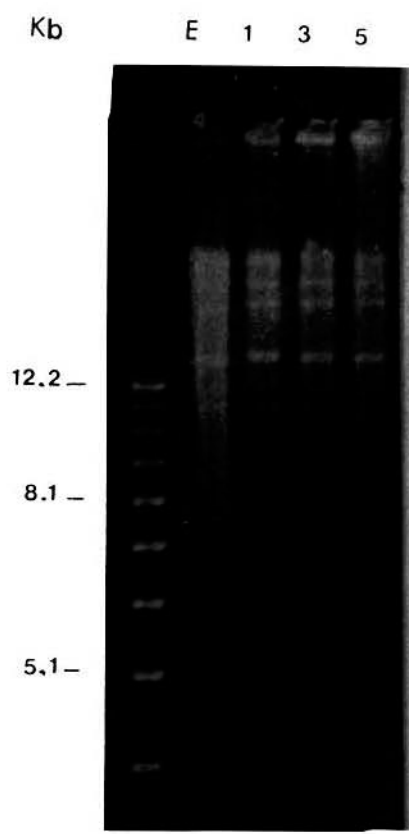


FIGURA 7. Padrão de restrição em gel de agarose 0,7% do DNA genômico dos isolados E2M (E) e IVs (1, 3 e 5) cortado com SmaI. Os números ao lado correspondem ao tamanho dos fragmentos em kpb do padrão de peso molecular Ladder 1Kpb.

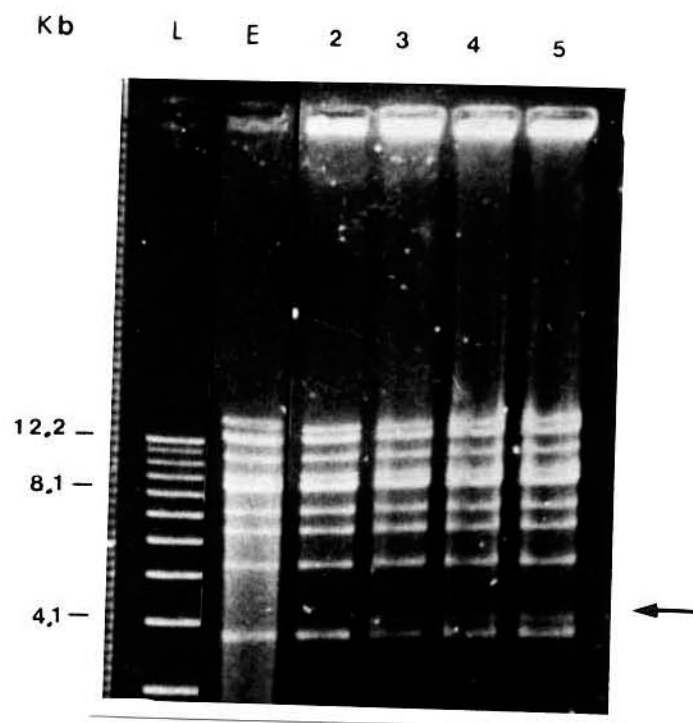


FIGURA 8. Padrão de restrição em gel de agarose 0,7% do DNA genômico dos isolados E2M (E) e IVs (2, 3, 4 e 5) cortado com EcoRI. Os números ao lado correspondem ao tamanho dos fragmentos em kpb do padrão de peso molecular Ladder 1Kpb.

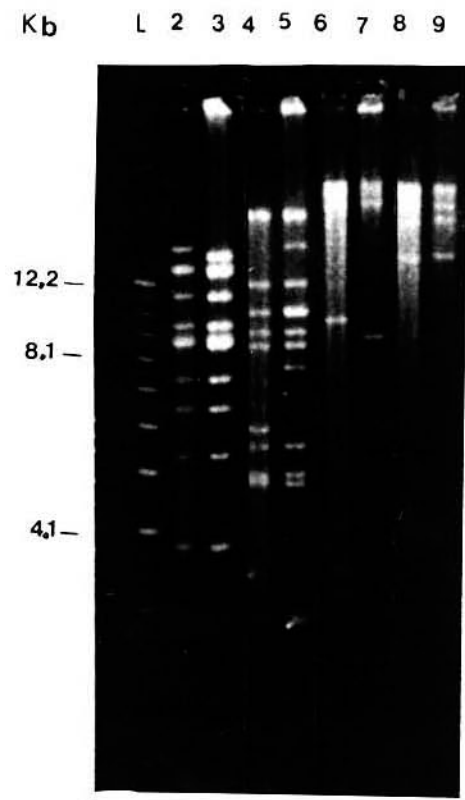


FIGURA 9. Padrão de restrição em gel de agarose 0,7% do DNA genômico dos isolados E2M (E) e IV1 cortado com as endonucleases: EcoRI(2-3), HindIII(4-5), BamHI(6-7) e SmaI (8-9). Os números ao lado correspondem ao tamanho dos fragmentos em kpb do padrão de peso molecular Ladder 1Kpb.

6.0 DISCUSSÃO

Neste trabalho procurou-se analisar cinco isolados virais (IVs), derivados de VPNMac, teoricamente de um variante genético clonado denominado E2 (SMITH & SUMMERS, 1978). Este isolado, inoculado em larvas de *Diatraea saccharalis*, mostrou uma tendência a um aumento gradual da virulência para esse hospedeiro alternativo, com as sucessivas passagens seriadas *in vivo*. Paralelo a esse aumento de virulência, os dados sugerem ainda a presença de pelo menos dois genótipos diferentes, semelhantes a E2, e um aumento também gradual da frequência de um desses variantes genéticos, possivelmente mais adaptado a *Diatraea saccharalis*.

Os resultados de ensaios biológicos revelam que os IVs foram capazes de infectar larvas de *D. saccharalis*, durante o quarto estágio larval, com redução gradual do valor de DL_{50} a medida que foram realizadas as passagens seriadas *in vivo*. Os IV1 e IV5, a primeira e a quinta geração respectivamente, apresentaram virulência significativamente diferentes, e os valores de DL_{50} mostram uma redução em torno de 50 vezes, indicando uma tendência ao incremento da infectividade deste patógeno para esse hospedeiro alternativo.

Os dados de RODRIGUES (1989), utilizou os mesmos isolados 1 e 2 descritos nesse trabalho e obteve os isolados 3 e 4 da mesma forma, por passagem em larvas de *D. saccharalis*. No caso de RODRIGUES, no entanto, as passagens foram feitas utilizando-se larvas de terceiro estágio, e o que se observou foi uma redução

muito mais acentuada no valor de DL_{50} , que foi de praticamente 1000 vezes após quatro passagens seriadas.

Os dados de RODRIGUES mostram um efeito de seleção muito mais rápido que os nossos, que se equiparam, por exemplo, a um trabalho de TOMPKINS e cols. (1981), que obtiveram um aumento de virulência de 10 vezes após 2 passagens seriadas do VPNMAC em larvas de *Trichoplusia ni*.

Considera-se que, de modo geral a interpretação dos resultados desses estudos de transmissão cruzada podem ser dificultadas, devido ao fato de que é comum populações de inseto apresentarem naturalmente, vírus na forma latente e vírus contaminantes, uma vez que os vários tipos de vírus de insetos podem atuar como agentes de "stress", alterando em geral a ação do vírus inoculado (GRONER, 1986). No nosso caso isto pode ter ocorrido, já que nos IV1 e IV2 obtidos de RODRIGUES detectamos a presença do vírus de granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs) (PAVAN e cols. 1983) como contaminante. Além disso CAVALLARO (1988) e STOPPE (1991) relatam a presença de um vírus de denonucleose de *Diatraea saccharalis* (DsDNV) em nossas populações de laboratório de *D. saccharalis*.

A variação na redução do valor de DL_{50} ou do ganho de virulência, entre os valores observados neste trabalho e os de RODRIGUES (1989), podem se dever em parte à diferença de desenvolvimento corporal, ou estágio das larvas testadas. Esse efeito no entanto não seria suficiente para explicar esta diferença tão drástica. Um outro fator também pode residir na presença dos outros vírus contaminantes (VGDs e/ou DNV), causando uma possível

interação sinérgica destes com os VPNMAC, resultando em um incremento acentuado na atividade biológica. Estudos envolvendo interação entre baculovírus, tem revelado a existência de fatores responsáveis pelo incremento da atividade biológica dos mesmos. GALLO e cols., (1991) verificaram um aumento da infectividade de VPNMAC em larvas de *T. ni*, proporcional à concentração do fator de incremento à virulência (VEF-viral enhancing factor) obtido do VGTni, onde para uma mesma dosagem do VPN, a virulência variou de 20,8 a 93,1% quando foi ministrado de 1 a 40 ng/larva do VEF.

DERKSENS & GRANADOS (1988) verificaram alterações da membrana peritrófica de larvas de *T. ni* por ação de fatores presentes no corpo de inclusão de VGTni e VPNMAC, levando à, respectivamente, um aumento de 30 e de 2 vezes da eficiência biológica do VPNMAC neste hospedeiro.

No entanto os dados obtidos por GARCIA-CANEDO (1989), indicam não haver efeito sinérgico resultante da infecção mista do vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) e do DsGV em larvas de *D. saccharalis*.

O trabalho de RODRIGUES apresentou ainda dados muito divergentes dos nossos com relação a produção de poliedros. Enquanto seus dados indicam uma redução gradual da produção de poliedros até a terceira passagem, e um desaparecimento quase total na quarta passagem, em nosso caso esses valores oscilam relativamente pouco sem indicar qualquer tendência de variação significativa.

STOPPE (1991), utilizando VPNMAg, verificou a redução na

produção de cristais, em larvas de *D. saccharalis*. A autora observou essa redução em vírus submetidos a tratamento térmico. O que se observou foi que amostras das larvas infectadas, analisadas por microscopia eletrônica, não apresentavam poliedros nem nucleocapsídeos típicos dos baculovírus, e detectou a presença de vírus contaminantes (DsDNV) nas larvas analisadas. A presença destes vírus poderia nesse caso resultar em uma inibição na produção de poliedros do vírus inóculado.

A avaliação da produção de poliedros dos isolados virais (IVs), revela que estes apresentam o fenótipo descrito como MP (Many polyhedra), mantendo uma produção normal de cristais virais, não sendo detectado portanto uma tendência à diminuição da produção destes, com as cinco passagens seriadas realizadas em *D. saccharalis*. Com dados semelhantes aos nossos BURAND & SUMMERS (1982) não verificaram alteração na produção de poliedros, quando analisaram variantes genéticas obtidos a partir do clone VPNMac E2, passados de forma seriada por 30 vezes em células TN-368.

A análise do padrão de restrição de EcoRI dos IVs, mostrou um aumento da concentração de uma banda submolar e peso molecular estimado em 4,08 kpb. Estes dados indicam a presença de pelo menos dois genótipos no que deveria ser originário de um clone viral. Como observado por MCINTOSH e cols. (1987) existem claras diferenças de virulência, entre variantes genéticas e combinações destes, para todos os VPNS estudados inclusive no caso de VPNAc. Os nossos dados indicam que a passagem do isolado, em um hospedeiro de espécie e família (Piraliidae versus Noctuidae) diferente do

hospedeiro natural do VPNAc, tenha gerado uma pressão de seleção que parece ter favorecido o genótipo que contém a banda EcoRI de 4,08 kpb.

De forma similar, WEITZMAN e cols. (1992) verificaram haver uma seleção diferenciada de genótipos, dependendo da larva hospedeira (*Panolis flammea* ou *Mamestra brassicae*), para dois variantes distintos de VPN de *P. flammea*.

BROWN e cols. (1985) propuseram que no mínimo três mecanismos estariam envolvidos com o aparecimento da variabilidade em baculovírus detectada por variações do perfil de restrição dos DNAs virais. Esses mecanismos seriam a duplicação de sequências do genoma viral, inserção de sequências do genoma da célula hospedeira e mutações de ponto.

CROIZIER & RIBEIRO (1992) mostram em VPNAg que a recombinação entre variantes pode chegar a 80% da progênie obtida em células em cultura, e representar um mecanismo importante na manutenção da variabilidade desses vírus.

A alteração no genoma viral, detectada nos variantes genéticos que compõem o estoque IV, deve ter envolvido poucos pares de bases do DNA, uma vez que não foram detectadas alterações na mobilidade dos 12 outros fragmentos de restrição do padrão EcoRI, ou quaisquer alterações nos perfis das outras cinco enzimas analisadas. Esta alteração, observada no fragmento EcoRI de 4,08 kpb, deve representar uma pequena inserção no genótipo do vírus, provavelmente localizada na região hr4 do genoma, como a encontrada nos variantes de VPNAc, M3 e S3 (SMITH & SUMMERS, 1978).

Uma outra possível explicação para o aparecimento de um novo genótipo nos IVs seria pela inserção de DNA do hospedeiro, *D. saccharalis* no genoma do vírus. Essa inserção de origem celular, no entanto, teria provavelmente gerado uma alteração na migração dos fragmentos de DNA, detectáveis nos padrões de restrição obtidos pelas enzimas utilizadas, o que não foi observado, sendo deste modo pouco provável ser esta a causa da variabilidade genotípica encontrada.

Os genótipos presentes nos IVs deveriam provavelmente estar presentes no inóculo que se assumiu como sendo um clone de E2 utilizado originalmente por RODRIGUES (1989). Os nossos resultados indicam que provavelmente o que se utilizou como inóculo não seria o variante E2, uma vez que este além de apresentar essa diferença no perfil de EcoRI apresenta ainda diferenças no padrão HindIII. A sugestão de que o inóculo inicial seria uma mistura de pelo menos dois genótipos diferentes se deve ao fato de que a banda variável (4,08 kpb EcoRI) foi detectada, já na primeira passagem (IV1), em concentração alta o suficiente para ser visível. Como o que se analisou foi uma mistura de vários indivíduos infectados, o aparecimento de uma alteração em um indivíduo dificilmente seria detectável numa banda corada com brometo de etídeo sem um processo de clonagem *in vivo*. A baixa frequência com que esse novo variante apareceria não concorda com o que foi observado.

Os resultados apresentados por BURAND & SUMMERS (1982) e SCHETTER e cols. (1990) reforçam a hipótese de que o que se considerou como clone de E2 seria na verdade uma mistura de

variantes genéticos. Esses autores observaram que outros variantes genéticos foram obtidos a partir da passagem seriada do clone VPNMAC E2 em cultura de célula de inseto. BURAND & SUMMERS (1982) obtiveram variantes originados de E2, a partir de inserção de regiões duplicadas do próprio genoma. Já a variação genotípica detectada por SCHETTER e cols. (1990) foi atribuída à inserção de um elemento genético (transposon-like) de origem hospedeira (cultura de célula de *Spodoptera frugiperda*), com um tamanho correspondente à 634 pb.

A análise genômica dos IVs mostra claramente que os perfis correspondem a variantes genéticos de VPNAC provavelmente derivado do clone E2. Foram observados os mesmos padrões de restrição quando utilizou-se as endonucleases PstI, XhoI, BamHI e SmaI e padrão diferente para as enzimas EcoRI e HindIII. As diferenças encontradas no padrão HindIII correspondem ao aparecimento de duas bandas de peso molecular estimado em 15,0 e 7,6 kpb. Estas bandas são correspondentes as encontradas no padrão descrito para o variante L1 (MILLER & DAWES, 1979), e cuja origem é atribuída à presença de um sítio de restrição no interior de uma banda de 21,5 kpb (COCHRAN e cols., 1982).

A diferença observada entre os padrões EcoRI de IVs e E2, se deve a banda submolar de 4,08 kpb presente nos IVs. Uma banda correspondente é também encontrada nos variantes de VPNMAC M3, S3 (SMITH & SUMMERS, 1978); e E (SCHETTER e cols., 1990).

Os genótipos correspondentes aos IVs representam pelo menos dois variantes genéticos de VPNMAC e o que contém a banda EcoRI de

4,08 kbp apresenta diferenças genotípicas com os variantes de VPnMac descritos na literatura tais como E2, M3, S3, (SMITH & SUMMERS, 1978); E (SCHETTER e cols., 1990); L1 (MILLER & DAWES, 1979); HR3 (COCHRAN e cols., 1982) C6, B6 e B5 (BURAND & SUMMERS, 1982) e com o isolado que designamos como E2M fornecido pelo Dr. J.E.MARUNIAK.

Além das alterações já descritas, a passagem do VPnMac E2 em larvas de *D. saccharalis* resultou no aparecimento de mutantes morfológicos, apresentando poliedros de formato cúbico e de dimensão superior aos poliedros icosaédricos normais. A provável causa do aparecimento destes, também relatados por RODRIGUES (1989), deve estar relacionada com alterações no gene da poliedrina, à semelhança de outros mutantes morfológicos descritos em literatura. Estas alterações devem envolver um pequeno número de pares de bases, uma vez que não foram detectadas alterações no padrão de migração, das bandas de DNA que contém o gene da poliedrina EcoRI-I, PstI-D, XhoI-D (SMITH e cols., 1983).

CARSTENS e cols. (1986; 1987; 1992) analisando os mutantes morfológicos M5 (BROWN e cols., 1980), M29 (DUNCAN & FAUKNER, 1982; DUNCAN e cols., 1983), e M934 (PARTINGTON e cols., 1990) verificaram que estes apresentam mutação puntual, com substituição de um aminoácido na região da poliedrina. A análise do mutante M276 descrito por PARTINGTON e cols. (1990), por outro lado, revelou a presença de uma inserção de 229 pb na região de codificação da porção carboxiterminal da poliedrina (CARSTENS e cols., 1992).

A demonstração cabal da correlação entre a alteração genômica

verificada neste trabalho, e a alteração da atividade biológica, poderia ser realizada pela clonagem dos dois genótipos de um mesmo estoque IV, onde sua capacidade de replicação poderia ser comparada *in vivo*, em larvas de *D. saccharalis*, e em culturas de células de *T. ni*, linhagem TN-368-10, a partir da qual os isolados foram originalmente obtidos.

7.0 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- 1) Os isolados virais IVs são formados por uma mistura de pelo menos dois genótipos distintos, que correspondem à variantes genéticos de VPNMAC.
- 2) Estes isolados virais se mostraram capazes de infectar larvas de *D. saccharalis* no 4º estágio de desenvolvimento larval, revelando uma tendência ao incremento da atividade biológica quando passados de forma seriada neste hospedeiro.
- 3) A inoculação destes variantes genéticos de VPNMAC em larvas de *D. saccharalis* resultou no aparecimento de mutantes morfológicos, apresentando cristais virais de formato cúbico e tamanho superior aos do isolado selvagem utilizado originalmente.
- 4) A quantidade de poliedros produzidos foi normal para cada um dos isolados virais, após um total de seis passagens seriadas.
- 5) Os dados sugerem que temos selecionado de um variante genético de VPNMAC, de alta patogenicidade para *Diatraea saccharalis*, e que esse variante pode ser selecionado por sua passagem em larvas deste hospedeiro.

8.0 RESUMO

Neste trabalho foram obtidos e analisados 5 isolados virais (IVs), obtidos por passagem seriada do VPNMAC, originalmente fornecido como clone E2, em larvas de *Diatraea saccharalis*.

Ensaio biológicos foram realizados com larvas de 4º estágio de *Diatraea saccharalis* visando avaliar a capacidade do isolado de se desenvolver neste hospedeiro alternativo e analisar alterações biológicas observadas em trabalho anterior no mesmo laboratório.

Os dados mostram um aumento gradual de virulência resultando numa redução de aproximadamente 50 vezes no valor da dose letal 50% com as sucessivas passagens em larvas de *Diatraea*. Observou-se ainda o aparecimento de mutantes com poliedros de formato cúbico em frequências variáveis em substituição aos poliedros icosaédricos. O processo de infecção mostrou características típicas de infecção por NPV e em nosso caso a produção de poliedros virais apresentadas por estes isolados foi normal, não sendo afetada pelas passagens seriadas neste hospedeiro alternativo.

Associada as alterações biológicas observadas pode-se observar alterações a nível do genoma viral. A análise do perfil de restrição dos isolados obtidos revelou que os cinco isolados virais (IVs), correspondem a uma mistura de pelo menos dois variantes de VPNMAC proximoamente relacionado ao variante genético clonado denominado E2. O que se conclui é que ocorreu o aumento de frequência de um dos genótipos presentes no inóculo inicial com as passagens seriadas neste hospedeiro, evidenciada pelo gradual

aumento de concentração de uma banda submolar presente no padrão de restrição da enzima EcoRI.

SUMMARY

This work reports the obtention and analyses of 5 viral strains originated from the serial passage of a genomic variant of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) in *Diatraea saccharalis* larvae.

Bioassays were done using 4th instar larvae of *Diatraea* in order to evaluate the capacity of the strains to develop and adapt to this alternate host species. The present work represents a continuation of a study performed in this laboratory using the same biological system.

The results showed a gradual increase in the strains virulence resulting in a reduction of about 50 fold of the LD₅₀ values after the 5 passages in the insect larvae. Besides this the appearance of morphological mutants exhibiting polyhedra with a cubic instead of the normal icosahedral shape and significant increase in size. The infection process in the cells was normal showing the typical symptoms of this type of virus. The number of polyhedra production was unaltered for the different generations of the viral strains.

The analyses of the viral genome of the strains showed alterations associated to the passage of the strains in the insect larvae. The restriction enzyme profile of the 5 strains indicated that they correspond to a combination of at least two different genomic variants of AcNPV that resemble very much the E2 strain which we were supposed to be working initially. The restriction profiles show that the passage of the original inoculum in the *D.*

saccharalis larvae resulted in the frequency increase of one of the genomes indicated by the gradual increase of a specific band in the restriction profile of the enzyme EcoRI. The genome alterations could be related to the increase of virulence and the other observed alterations.

10.0 BIBLIOGRAFIA

- ADANG, M.J. & MILLER, L.K. 1982. Molecular cloning of DNA complementary to mRNA of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: location and gene products of RNA transcripts found late in infection. *J. Virol.* 44:782-793.
- ALMEIDA, L.C.; BOTELHO, P.S.M. & PAVAN, O.H.O. 1986. Avaliação do vírus da granulose para o controle da broca da cana-de-açúcar. Em: *Controle Microbiano de Insetos*. Ed. Alves, S.B., Editora Manole Ltda. p. 203-209.
- BILIMORIA, S.L. 1986. Taxonomy and identification of baculoviruses. In: Granados R.R. e Federici, B.A. Eds. *The Biology of Baculovirus*. Boca Ratón, Flor. CRC. Vol.1, Cap 2.
- BLISSARD, G.W. & ROHRMANN, G.F. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.*, 35:127-155. 1990
- BROWN, M.; CRAWFORD, A.M. & FAULKNER, P. 1979. Genetic analysis of a baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Isolation of temperature-sensitive mutants and assortment into complementation groups. *J. Virol.*, 31:190-198.

- BROWN, M.; A.M. & FAULKNER, P., COCHRAN, M.A. & CHUNG, K.L.,
1980. Characterization of two morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with large cuboidal inclusion bodies. *J. Gen. Virol.* 50:309-316.
- BROWN, S.E., MARUNIACK, J.E. & KNUDSON, D.L., 1985. Baculovirus (MNPV) genomic variants: Characterization of *Spodoptera exempli* MNPV DNA and comparison with other *Autographa californica* MNPV DNA. *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*, 119:223-9.
- CARSTENS, E.B. 1982. Mapping the mutation site of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedron morphology mutant. *J. Virol.* 43:809-818.
- CARSTENS, E.B.; LIN-BAI YE & FAULKNER, P. 1987. A point mutation in the polyhedrin gene of a baculovirus, *Autographa californica* MNPV, prevents crystallization of occlusion bodies. *J. Gen. Virol.*, 68:901-905.
- CARSTENS, E.B.; KREBS, A. & GALLERNEAULT, C.E. 1986.
Identification of an amino acid essential to the normal assembly of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus

polyhedra. J. Virol., 58:684-688.

CARSTENS, E.B.; WILLIAMS, G.V.; FAULKNER P. & PARTINGTON, S.

1992. Analysis of polyhedra morphology mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: molecular and ultrastructural features. J. Gen. Virol. 73:1471-1479.

CAVALLARO, A.C. 1988. Método de purificação do vírus de granulose de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794): VGDs e caracterização protéica de seu principal componente protéico, Campinas, Tese (Mestrado), UNICAMP, IB.

CHERRY, C.L. & SUMMERS, M.D. 1985. Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Spodoptera litorallis*. J. Inverteb. Pathol. 46:289-295.

COCHRAN, M.A.; CARSTENS, E.B.; EATON, B.T. & FAULKNER, P. 1982.

Molecular cloning and physical mapping of restriction endonuclease fragments of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA. J. Virol., 41:940-946.

CROIZIER, G. & RIBEIRO, H.C.T. 1992. Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus wild populations. V. Research, 26:183-196.

- DEGASPARI, N.; BOTELHO, P.S.M. & MACEDO, N. 1981. Controle químico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar na região centro sul do Brasil. Bol. Tec. IAA/PLANALSUCAR, 3:1-16.
- DERKSEN, A.C.J. & GRANADOS, R.R. 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology, 167:242-250.
- DINARDO , L.L.; TERAN, F.O.; PAVAN, O.H. & PAZELLE, A.C. 1987. Avaliação entomológica do Vírus da Granulose para o controle de *Diatraea saccharalis*. Boletim Técnico Coopersucar, 41: 18-22.
- DUNCAN, R.; CHUNG, K.L. & FAULKNER, P. 1983. Analysis of a mutant of *Autografa californica* nuclear polyhedrosis virus with a defect in the morphogenesis of the occlusion body macromolecular lattice. J. Gen. Virol. 64:1531-1542.
- DUNCAN, R. & FAULKNER, P. 1982. Bromodeoxyuridine-induced mutants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in occlusion body formation. J. Gen. Virol. 62:369-373.
- ERLANDSON, A.M. 1990. Biological and Biochemical comparison of *Mamestra configurata* and *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus isolates pathogenic for the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertbr. Pathol., 56: 47-56.

- FEDERICI, B.A. 1986. Ultrastructure of Baculoviruses. In:
GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of
Baculoviruses*. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 61-
88.
- FINNEY, D.J. 1947. *Probit Analysis*. London, Cambridge University.
- FRASER, M.J. & HINK, W.F. 1982. The isolation and
characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria
mellonella* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 117:366-378.
- FRASER, M.J.; SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. 1983. Acquisition of
host cell DNA sequence by baculoviruses: Relationship between
host DNA insertions and FP mutant of *Autographa californica* and
Galleria mellonella nuclear polyhedrosis viruses. *J. Virology*,
47: 287-300
- GALLO, L.G.; CORSARO, B.G.; HUGHES, P.R. & GRANADOS, R.R. 1991.
In vivo enhancement of baculovirus infection by the viral
enhancing factor of a granulosis virus of the *Cabbage Looper*,
Trichoplusia ni (Lepidoptera:Noctuidae). *J. Invert. pathol.*,
58:203-210.
- GARCIA-CANEDO, A.M.G. 1989. Infecção Mista de *Diatraea
saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) com dois
Baculovirus. Campinas. (Dissertação de Mestrado).

- GOTO, C. 1990. Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection by a granulosis virus (GV) isolated from the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L. (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 25:135-137.
- GOTO, C.; MINOBE, Y. & IIZUCA, T. 1992. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigum* and five other noctuid species. *J. Gen. Virol.*, 73:1491-1497.
- GRANADOS, R.R. & WILLIAMS, K.A. 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.177-202.
- GRONER, A. 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.177-202.
- GUARINO, L.A. & SUMMERS, M.D. 1986. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J. Virol.*, 57:563-571.
- GUZO, D.; DOUGHERTY, E.M.; LYNN, D.E.; BRAUN, S.K. & WEINER, R.M. 1991. Changes in macromolecular synthesis of gypsy moth cell

line IPLB-L d652Y induced by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection. *J. Gen. Virol.* 72:1021-1029.

HARA, S.; TANADA, Y. & OMI, E.M. 1976. Isolation and characterization of a synergistic enzyme from the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invert. Pathol.* 27:115-124.

HENSLEY, S.D. & HAMMOND, J.R.A.M. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J. Econ. Entomol.*, 61:1742-3.

HOOFT VAN IDDEKINGE, B.J.L.; SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autografa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 131:561-565.

HOSTETTER, D.L. & PUTTLER, B. 1991. A new broad host spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirb), (Lepdóptera:Noctuidae). *Env. Entomol.* 20:1480-1488.

JAQUES, R.P. 1977. Stability of entomopathogenic viruses. In *Environmental Stability of Microbial Insecticides*, ed. D.L. Hostetter. C.M. Ignoffo, 10:99-117. 119pp.

- KOOL, M.; VONCKEN, J.W.; VAN LIER, F.L.J.; TRAMPER, J. & VLAK J.M. 1991. Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology*, 183:739-746.
- KUZIO, J.; ROHEL, D.Z.; CURRY, C.J., KREBS, A.; CARSTENS, E.B. & FAULKNER, P. 1984. Nucleotide sequence of the p10 polypeptide gene of *Autografa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 139:414-418.
- LEE, H.H. & MILLER, L.K. 1978. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Virol.*, 27:754-67.
- LUCKOW, V.A. & SUMMERS, M.D. 1988. Trends in the development of baculoviruses expression vectors. *Biotechnology*, 46: 47-55.
- MACEDO, N. & BOTELHO, P.S.M. 1988. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). (Lep.: Pyralidae). *Brasil Açucareiro*, 106:2-12.
- MAEDA, S.; MUKOHARA, Y. & KONDO, A. 1990. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. *J. Gen. Virol.*, 71:2631-2639.
- MARTIGNONI, M.E. & IWAI, P.J. 1986. A catalog of viral diseases

of insect, mites and ticks. USDA FOREST SERVICE PNW - 195.
Washington. DC:USPGO.

MATTHEWS, R.E.F. 1985. Viral Taxonomy for the nonvirologist. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39:451-74.

McCLINTOCK, J.T. & REICHELDERFER, C.F. 1985. In vivo treatment of a nuclear polyhedrosis virus of *Autographa californica* (Lepidoptera:Noctuidae) with chemical mutagens: determination of changes in virulence in four lepidopteran hosts. *Env. entomol.*, 14:691-695.

McINTOSCH, A.H. & IGNOFFO, C.M. 1986. Restriction endonuclease cleavage patterns of commercial and serially passaged isolates of *Heliothis* baculovirus. *Intervirology*, 25: 172-6.

McINTOSH, A.H.; RICE, W.C. & IGNOFFO, C.M. 1987. Genotypic variants in wild-type populations of baculovirus. In: K. Maramorosch (Ed.), *Biotechnology in Invertebrate Pathology and cell culture*, 305-325. Academic Press, New York.

MILLER, L.K. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 177-199.

MILLER, L.K. & DAWES, K.P. 1979. Physical map of the DNA genomes of *Autografa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*

29:1944-1055.

MOORE, N.F., KING, L.A. & POSSEE, R.D. 1987. Viruses of insects. *Insect Science Applications*, 3:275-289.

PAVAN, O.H.P., BOUCIAS, D.G. & PENDLAND, J.C. 1981. The effects of serial passage of a nucleopolyhedroses virus through an alternat host system. *Entomophaga*, 26:99-108.

PAVAN, O.H.P., BOUCIAS, D.G., ALMEIDA, L.C., GASPAR, J.O., BOTELHO, P.S.M. & DEGASPARI, N. 1983. A granulosis virus of *Diatraea saccharalis* (Fabr.1794), I. Pathogenicity, replication and ultrastruture. *International Congress ISSCT, Havana*, 18: 644-659.

PAVAN, O.H.P. & RIBEIRO, H.C.T. 1989. Selection of a baculovirus strain with a bivalent inseticidae activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84:63-65.

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

PLIKAYTIS, B.D.; CARLONE, G.M.; EDWARDS, P. & MAYER, W. 1986.

Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linear-duplex DNA based pair number after gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 152:346-364.

POTTER, K.N.; FAULKNER, P. & MacKINNON, E.A. 1976. Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Virol.*, 18:1040-50.

RIBEIRO, H.C.T. 1989. Estudo comparativo de cinco isolados de baculovírus em *Diatraea saccharalis*. Tese de Doutorado, UNICAMP, IB.

RODRIGUES, J.J.S. 1989. Seleção genética do vírus de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Baculoviridae) em *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Piralidae). Tese de mestrado, I.B., UNICAMP, S.P..

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor, V. 1-3.

SCHETTER, C.; OELLIG C. & DOERFLER, W. 1990. An insertion of insect cell DNA in the 81-map-unit segment of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA. *J. Virol.* 64:1844-

1850.

- SHAPIRO, D.I., FUXA, J.R., BRAYMER H.D. & PASHLEY, D.P. 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 58: 96-105.
- SMITH, I.R.L. & CROOK, N.E. 1988. In vivo isolation of baculovirus genotypes. *Virology*, 166:240-244.
- SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. 1978. Analysis of Baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology*, 89:517-27.
- SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. 1979. Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases SmaI, KpnI, BamHI, SacI, XhoI, and EcoRI. *J. Virol.*, 30:828-38.
- SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. 1982. DNA homology among subgroup A, B and C baculoviruses. *Virology*, 123: 393-406.
- SMIRNOFF, W.A. 1963. Adaptation of a nuclear-polyhedrosis virus of *Trichiocampus viminalis* (Fallén) to larvae of *Trichiocampus irregularis* (Dyar). *J. Invertebr. Pathol.*, 5:104-10.

STAIR, G.R.; FRASER, T. & FRASER, M. 1981. Changes in growth and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from *Choristoneura fumiferana* after passage in *Trichoplusia ni* and *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, 38:230-5.

STOPPE, N.C. 1991. Análise da multiplicação de vírus entomopatogênicos no hospedeiro *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Pyralidae), Campinas, Tese (Mestrado), UNICAMP, IB.

SUMMERS, M.D., SMITH, G.E., KNELL J.D. & BURAND, J.P. 1980. Physical maps os *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedroses virus recombinant. *J. Virol.*, 34: 693-703.

SUMMERS, M.D. & VOLKMAN, L.E. 1976. Comparison of biophysical and morphological properties of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from *in vivo* and *in vitro* host systems. *J. Virol.* 17:962-72.

TANADA, Y. 1985. A synopsis of studies on the synergistic property of an insect baculovirus: A tribute to Edward A. Steinhaus. *J. Inver. pathol.* 45:125-138.

TANADA, Y.; HESS, R.T. & OMI, E.M. 1975. Invasion of a nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm, *Pseudaletia*

unipuncta, and the enhancement of a synergistic enzyme. J. Invertbr. Pathol. 26:99-104.

TANADA, Y. & HUKUHARA, T. 1971. Enhanced infection of a nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*, by a factor in the capsule of a granulosus virus. J. Invertebr. Pathol. 17:116-126.

TINSLEY, T.W. 1979. The potential of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. Annu. Rev. Entomol. 24:63-87.

TOMPKINS, G.J.; VAUGHN, J.L.; ADAMS, J.R. & REICHELDERFER, C.F. 1981. Effects of propagating *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis virus and its *Trichoplusia ni* variant in different hosts. Environ. Entomol., 10:801-6.

VICKERS, J.M., CORY, J.S. & ENSTWISTLE, P.F. 1991. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosus virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Invertebr. Pathol. 57:334-342.

WEITZMAN, M.D.; POSSEE, R.D. & KING L.A. 1992. Characterization of two variants of *Panolis flammea* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol. 73:1881-1886.

WOOD, H.A. & GRANADOS, R.R. 1991. Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45: 69-87.

WOOD, H.A., HUGHES, P.R., JHONSTON, L.B. & LANGRIDGE, W.H.R. 1981. Increased virulence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by mutagenesis. *J. Invertebr. Pathol.*, 38: 236-241.

ZANNOTO, P.M.A.; SAMPAIO, M.J.A.; JOHNSON, D.W.; ROCHA, T.L. & MARUNIAK, M.E. The *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons. *J. Gen. Virol.* 73:1049-1056.

ZHU, Y.; HUKUHARA, T. & TAMURA, K. 1989. Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertbr. Pathol.* 54:49-56.

11.0 ANEXOS

I. Tampão de extração viral

O tampão de extração viral é composto por 1% de duodecil sulfato de sódio (SDS), 1% de ácido ascórbico, 0,01M de "trizamida" pH 7,7 e 0,001M de etileno diamino "tetraciclato" de sódio (EDTA).

Para uma solução final de 10ml, adiciona-se:

100 µl de 1M tris pH 7,4

100 µl de 0,5M EDTA pH 8,0

1000 µl de SDS 10%

1000 µl de ácido ascórbico 10%

II. Solução estoque de Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

Cem gramas do SDS é dissolvido em 900 ml de H₂O destilada aquecido a 68 graus centígrados, e o pH é ajustado para 7,2 pela adição de HCl. Água destilada é adicionada até atingir o volume final de 1000 ml.

III. Tampão TE (pH 7,6)

10mM tris Cl pH 7,6

1mM EDTA pH 8,0

IV. Tampão TAE

O tampão de corrida é composto por 0,04M tris-acetato e 0,001M EDTA e 0,1% de ácido acético glacial.

Para um litro de solução estoque TAE 50X, adiciona-se:

242,0g de tris base

57,1ml de ácido acético glacial

100,0ml de 0,5M de EDTA (pH 8,0)