

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/10477
IB/81114

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1989



8194



SELEÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS DE POLIEDROSE NUCLEAR DE
Autographa californica (BACULOVIRIDAE) EM *Diatraea*
saccharalis (Fabr., 1794) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Este exemplar corresponde a redeja final
da tese defendida pela candidata Jaqueline
Josi Samá Rodrigues e aprovada pelo Conselho
Julgadora.

Campinas

JAQUELINE JOSI SAMÁ RODRIGUES

06 de abril de 1989

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas,
Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. OCTAVIO HENRIQUE DE OLIVEIRA PAVAN

CAMPINAS - SP

1989

UNICAMP

CLASSIF.	
AUTOR	R618 A
V.	X
TOMBO B	10477
1B/869	

10/81114

22/10477

Ao Valter,

pela força que sempre me deu

Aos meus pais,

pelo esforço para que eu sempre estudasse

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan pela orientação deste trabalho.

As amigas e colegas de laboratório Ale, Cris, Nancy e Helena pelas discussões que tivemos sobre o assunto e por enfrentarmos juntas as agruras e aventuras de uma tese.

À Profa. Dra. Ana Maria Lima de Azeredo-Espin pela utilização de equipamentos do seu laboratório.

À Laura Maria Ottoboni pela sua paciência e disposição com que me iniciou nas técnicas de eletroforese.

Ao Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena pela auxílio na análise estatística dos dados.

À Rosângela Aparecida Rodrigues pelo auxílio técnico na microscopia e cópias de micrografias e disposição com que sempre me atendeu.

Ao Prof. Dr. Darcy M. Silva, Profa. Dra. Yoko B. Rosato e Prof. Dr. Aquiles E. Piedrabuena pela leitura da tese e sugestões dadas.

À CAPES e CNPq pelas bolsas concedidas.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Baculovírus	1
1.1.1 Classificação e estrutura morfológica	2
1.1.2 Hospedeiros naturais	6
1.1.3 Infecção e replicação <i>in vivo</i>	7
1.1.4 Vírus de Poliedrose Nuclear de <i>Autographa californica</i> (VPNAc)	8
1.2 <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr., 1794)	10
1.3 Inoculação de baculovírus em hospedeiros alternativos ...	10
1.4 Caracterização protéica de baculovírus através de eletroforese	16
1.5 Objetivos	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Material	19
2.1.1 Larvas de insetos	19
2.1.2 Vírus	20
2.2 Métodos	21
2.2.1 Purificação dos cristais virais	21
2.2.1.1 Purificação por centrifugação diferencial .	21
2.2.1.2 Purificação com SDS e 2-Mercaptoetanol	22
2.2.2 Quantificação dos cristais virais	24
2.2.3 Preparo do inóculo	25
2.2.4 Inoculação dos isolados virais	26
2.2.5 Seleção de linhagens	27

2.2.6	Avaliação da mortalidade provocada pelos diferentes isolados virais	28
2.2.7	Avaliação do tamanho dos cristais virais	29
2.2.8	Avaliação da produção de vírus	30
2.2.9	Comparação das proteínas virais por eletroforese em gel de SDS e poliacrilamida	31
2.2.10	Análise estatística dos resultados	34
3.	RESULTADOS	36
3.1	Alterações dos isolados de VPNAc após as passagens seriadas	36
3.1.1	Modificação da atividade biológica	36
3.1.2	Alterações morfológicas do cristal viral	43
3.1.3	Diminuição da produção de cristais virais	47
3.2	Análise comparativa das proteínas dos diferentes isolados de VPNAc	49
4.	DISCUSSÃO	55
5.	RESUMO	66
6.	SUMMARY	69
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
8.	ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Baculovírus

Os baculovírus constituem um dos mais conhecidos e bem estudados grupos de vírus. Atacam principalmente espécies de insetos e, devido a suas propriedades complexas e seu potencial uso em controle biológico de pragas agrícolas, têm sido objeto de estudo de microbiologistas, virologistas, patologistas e entomologistas desde o fim do século passado.

Atualmente, sabe-se que os baculovírus são, em geral, muito específicos e compreendem o único grupo que possui apenas artrópodos como seus hospedeiros (BENZ, 1986), sendo este um aspecto muito importante no que diz respeito quanto à segurança de sua utilização no controle seletivo de pragas de culturas economicamente importantes.

O constante interesse em utilizar estes vírus como inseticidas biológicos fez com que, nesta última década, com os avanços das técnicas de cultura de células, engenharia genética e análise de proteínas e de DNA, se iniciassem estudos sobre sua biologia molecular (MILLER & MILLER, 1982) com o intuito de se obter novos agentes de controle de insetos que fossem mais eficientes (KIRSCHBAUM, 1985).

Em decorrência desses estudos, o interesse pelos baculovírus hoje não se restringe apenas a sua utilização em controle biológico de pragas, mas seu emprego como vetor de expressão gênica em células eucarióticas. Estes vírus possuem um gene não essencial a sua replicação, o da poliedrina, o qual, por sua vez, possui um promotor muito forte (RANKIN e cols., 1988). SMITH e cols. (1983a) foram os primeiros a construir um vírus deste grupo com uma deleção no gene da poliedrina e, desde então, eles vêm sendo utilizados com sucesso para a expressão de genes estranhos em cultura de células de insetos (SMITH e cols., 1983b; PENNOCK e cols., 1984; COELING e cols., 1987; ESTES e cols., 1987; INUMARU & ROY, 1987; LUCKOW & SUMMERS, 1988; MILLER, 1988; SCHMALJOHN e cols., 1988).

1.1.1 Classificação e Estrutura Morfológica

Baculovírus deriva do latim *baculum* que significa vara ou bastão. Embora muitos virologistas prefiram utilizar o termo "grupo" por acharem que gênero e família são conceitos utilizados inadequadamente, segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, *Baculovirus* é um gênero pertencente à família Baculoviridae (MATTHEWS, 1985).

Estes vírus caracterizam-se por conter DNA circular de fita dupla com cerca de 100 a 150 mil pares de bases (BURGESS,

1977; SMITH & SUMMERS, 1978; COCHRAN e cols., 1986) dentro de um capsídeo em forma de bastão, o qual é envolvido por um envelope lipoprotéico. Podem apresentar-se inclusos ou não em um cristal protéico e baseado nisto são divididos em três subgrupos (BILIMORIA, 1986) (Figura 1):

- subgrupo A ou Vírus de Poliedrose Nuclear (VPN) são aqueles que apresentam muitos nucleocapsídeos envelopados (virions) dentro de cada corpo de inclusão. Podem apresentar-se, ainda, de duas formas, com muitos nucleocapsídeos dentro de um mesmo envelope (Vírus de Poliedrose Nuclear Múltiplo - VPN-M) ou com apenas um nucleocapsídeo dentro de cada envelope (Vírus de Poliedrose Nuclear Simples - VPN-S);
- subgrupo B ou Vírus de Granulose (VG) são aqueles que apresentam apenas um nucleocapsídeo envelopado dentro de cada corpo de inclusão.
- subgrupo C ou Vírus Não-Inclusos (NOV - do inglês "non-occluded virus") constituem-se apenas do nucleocapsídeo envelopado, sem apresentar corpo de inclusão.

O nome de cada baculovírus é dado pelo grupo no qual ele se inclui e pelo hospedeiro do qual ele foi primeiramente isolado. Assim, temos, por exemplo, o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatilis* que possui este nome por pertencer ao grupo de poliedrose nuclear (subgrupo A) e por ter sido encontrado pela

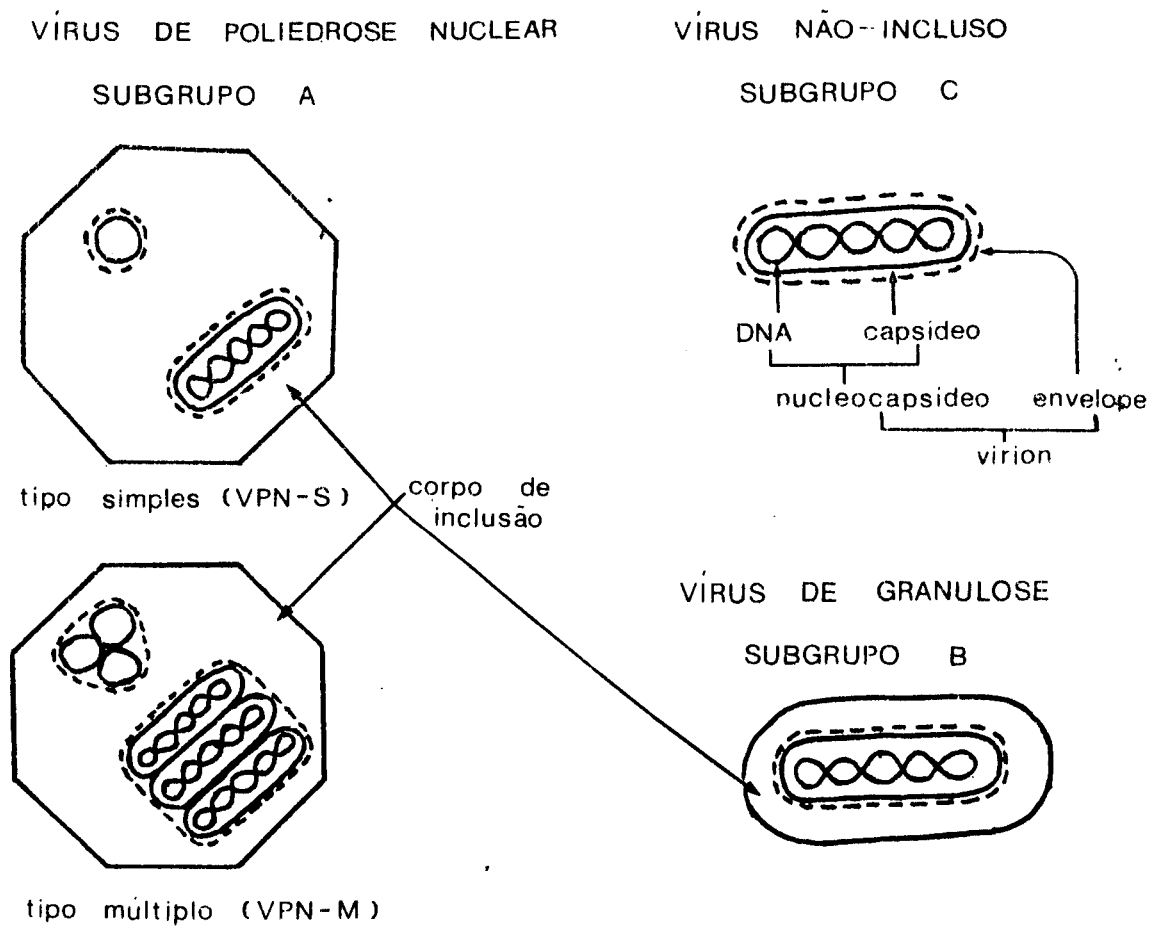


Figura 1. Representação esquemática da estrutura morfológica dos Baculovírus.

primeira vez em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae).

Devido ao fato de que a maior parte dos baculovírus apresenta-se com corpo de inclusão, muita confusão tem sido gerada quanto a alguns termos utilizados na sua identificação, por isso vamos definir aqui a nomenclatura utilizada neste trabalho:

- capsídeo: capa protéica que envolve o DNA;
- nucleocapsídeo: capsídeo + DNA;
- envelope: membrana lipoprotéica que envolve o nucleocapsídeo;
- virion: unidade infectiva; nucleocapsídeo + envelope;
- corpo de inclusão: matriz protéica que envolve os virions;
- poliedro: corpo de inclusão do VPN; constitui-se principalmente de uma proteína chamada poliedrina;
- grânulo: corpo de inclusão do VG; constitui-se principalmente de uma proteína chamada granulina;
- vírus ou cristal viral: unidade viral; corpo de inclusão (poliedro ou grânulo) contendo no seu interior os virions.

Análises ultraestruturais e bioquímicas têm mostrado que mais de 95% da massa de um VPN consiste de uma rede macromolecular de poliedrina na qual os virions estão incluídos (CARSTENS e cols., 1987). Devido a esta grande quantidade de proteína (poliedrina ou granulina) que constitui os corpos de inclusão dos VPNs e dos VGs, é possível observá-los ao microscópio ótico. Os poliedros apresentam um diâmetro médio de 0,6-2,0 μm , enquanto que os VGs, um

tamanho médio de 340-380 x 190-200 nm. Os nucleocapsídeos que se encontram dentro do corpo de inclusão têm um tamanho aproximado de 70-160 x 230-390 nm. Os VPNs podem apresentar até 200 nucleocapsídeos por corpo de inclusão (ACKERMANN & SMIRNOFF, 1983).

1.1.2 Hospedeiros naturais

A ocorrência dos baculovírus é relatada somente no Filo Arthropoda, sendo que sua quase totalidade está dentro da Classe Insecta. Segundo a revisão feita por ROHRMANN (1986a), existem mais de 500 espécies diferentes onde já foi descrita infecção por baculovírus e que se encontram assim distribuídos:

Classe Crustacea

Decapoda	2 VPN-S
----------	---------

Classe Insecta

Trichoptera	1 VPN-S
Hymenoptera	26 VPN-S
Diptera	22 VPN-S
Lepidoptera	355 VPN-M e -S
	113 VG
	2 NOV
Coleoptera	16 NOV

Observa-se que a maior ocorrência é dentro da ordem Lepidoptera e que somente nesta encontram-se Vírus de Poliedrose Nuclear Múltiplo (VPN-M) e Vírus de Granulose (VG).

1.1.3 Infecção e Replicação *in vivo*

Existem muitos estudos e observações feitas sobre a infecção e replicação de baculovírus em seus hospedeiros e boas revisões sobre o assunto podem ser encontradas em MAZZONE (1985), VAUGHN & DOUGHERTY (1985) e GRANADOS & WILLIAMS (1986).

A infecção natural por um baculovírus ocorre no estágio larval de um inseto hospedeiro e dá-se através da ingestão de alimento contaminado com o vírus. Dentro do intestino da larva, sob a ação do pH alcalino (9,5 a 11,5) e provavelmente de enzimas proteolíticas, ocorre a dissolução da matriz protéica do corpo de inclusão e a consequente liberação dos virions do seu interior.

A infecção primária ocorre no intestino da larva. O envelope viral interage com as microvilosidades da célula intestinal e funde-se à sua membrana plasmática permitindo que o nucleocapsídeo penetre no seu citoplasma. Dentro do núcleo ocorre a replicação do DNA viral e a formação de novos virions. Estes virions (não-inclusos) deixam a célula intestinal através da membrana basal e passam à hemocela, onde se dá a infecção

secundária.

Através da hemolinfa, os virions alcançam os vários tecidos da larva. Há diferença na suscetibilidade de cada tecido à infecção viral. A infecção secundária por VPN ocorre principalmente no corpo gorduroso, traquéia e hemócitos, enquanto que VG parece desenvolver-se especialmente em células do corpo gorduroso. Nesta etapa, também ocorre a replicação do DNA viral e a formação de novos virions, mas além disso ocorre a inclusão dos mesmos. Os cristais virais, em grande quantidade, causam um aumento do volume da célula e acabam por destruí-la.

Quando uma larva infecta-se com corpos de inclusão de baculovírus, desenvolve a doença chamada de poliedrose ou granulose, dependendo do tipo de vírus que a infectou. Com o progresso da doença, ela tem seu crescimento reduzido, torna-se flácida e apresenta mudança de coloração. Quando ela morre, seu corpo facilmente se rompe, pois a esta altura seus tecidos estão totalmente destruídos e completamente tomados pelo vírus.

1.1.4 Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPNAc)

Este vírus tem este nome por ter sido isolado pela primeira vez a partir de lagartas de *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae), inseto praga de culturas de alfafa.

Dentre os baculovírus, o VPNAc é o que tem a maior amplitude de hospedeiros, mais de 30 espécies diferentes de lepidópteros (GRONER, 1986) e, apesar de haver mais de 500 baculovírus relatados na literatura (ROHRMANN, 1986a), este é o que tem sido mais intensamente estudado.

Este vírus é um VPN do tipo múltiplo (VPN-M) e possui um DNA circular de dupla fita que apresenta em torno de 128000 pares de bases, com um peso molecular de 82×10^6 daltons, e seu genoma já foi extensivamente mapeado utilizando-se várias enzimas de restrição (SMITH & SUMMERS, 1979; SUMMERS e cols., 1980; VLAK, 1980; COCHRAN e cols., 1982; VLAK & SMITH, 1982).

Através da técnica de purificação de placa em cultura de células de insetos, muitas variantes genômicas do VPNAc-tipo selvagem têm sido isoladas e caracterizadas. LEE & MILLER (1978) e SMITH & SUMMERS (1978) identificaram, respectivamente, 5 e 8 diferentes variantes genéticas do VPNAc. Algum tempo depois, MILLER e cols. (1980) isolaram mais uma variante deste vírus. Estes autores comprovam que estas variantes ocorrem naturalmente na população selvagem e não são induzidas pela manipulação em laboratório.

Além disso, padrões de restrição do DNA do VPN de *Trichoplusia ni* e VPN de *Rachiplusia ou*, ambos isolados de espécies pertencentes à Família Noctuidae, mostram que estes vírus são muito semelhantes ao VPNAc (MILLER & DAWES, 1978; SUMMERS e cols., 1980).

1.2 *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)

Diatraea saccharalis é um inseto pertencente à Ordem Lepidoptera, Família Pyralidae. É uma das pragas mais importantes da cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Conhecida como broca da cana-de-açúcar, este inseto, na sua fase larval, cava galerias no interior dos colmos da cana, provocando grandes prejuízos econômicos (MACEDO & BOTELHO, 1988).

1.3 Inoculação de baculovírus em hospedeiros alternativos

Devido ao interesse de utilizar-se os baculovírus como inseticida biológico, tornou-se necessário definir exatamente quais os hospedeiros de cada um deles para ter-se uma avaliação do impacto ambiental que sua aplicação no campo pudesse causar. Além disso, este conhecimento é importante para estudos básicos de patogenicidade e virulência destes microrganismos (GRONER, 1986). Em termos práticos, o uso de um vírus, para um controle de pragas, altamente específico e que multiplica-se em um único hospedeiro é desvantajoso porque o vírus não infectaria uma outra população-praga que pudesse estar presente na cultura. Sendo assim, inúmeros trabalhos já foram e continuam sendo realizados sobre patologia de insetos quando inocula-se VPNs em hospedeiros alternativos, tendo como um de seus objetivos a obtenção de vírus polivalentes.

Dentre estudos desse tipo, utilizando-se o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* para infectar hospedeiros alternativos, estão os de VAIL e cols. (1971), VAIL & JAY (1973), VAIL e cols. (1973), FALCON & HESS (1977), TOMPKINS e cols. (1981), WOOD e cols. (1981), VAIL e cols. (1982), BELLONCIK e cols. (1986) e RODRIGUES & PAVAN (1988a).

Há também vários outros trabalhos onde estudou-se a suscetibilidade de hospedeiros alternativos a outros VPNs que não o VPNAc, como por exemplo: SMIRNOFF (1963), VAIL e cols. (1971), FALCON & HESS (1977), PAVAN e cols. (1981), STAIRS e cols. (1981), VAIL e cols. (1982), HAMM & STYER (1985), RIBEIRO (1985), BELLONCIK e cols. (1986), MARTIGNONI & IWAI (1986), GARCIA-CANEDO & PAVAN (1988).

Os resultados desses estudos mostram que, em geral, os VPNs não são restritos a uma espécie hospedeira mas a uma pequena gama de insetos hospedeiros que, na maioria das vezes, são muito próximos taxonomicamente.

Continuando nesta mesma linha, várias pesquisas têm sido feitas na tentativa de adaptar alguns vírus a hospedeiros alternativos através do método de passagem seriada. O resultado é que, muitas vezes, após pelo menos uma passagem do vírus pelo novo hospedeiro, consegue-se uma linhagem mais virulenta para o mesmo ou uma produção de vírus *in vivo* mais eficaz.

Em relação ao VPNAc, TOMPKINS e cols. (1981), após passarem este vírus 13 vezes em larvas de *Spodoptera exigua* e passarem-no por 2 vezes em *Trichoplusia ni*, verificaram que a virulência deste tinha aumentado em 10 vezes para larvas recém-nascidas de *T. ni*.

WOOD e cols. (1981) obtiveram, em cultura de células de *T. ni*, uma linhagem de VPNAc que apresentava uma alta produção de cristais virais por célula e que mostrou-se 2 vezes mais infectiva para lagartas de *T. ni* do que o isolado selvagem.

Em resultados preliminares, RODRIGUES & PAVAN (1988a) também obtiveram uma maior virulência para o VPNAc após este ter sido passado por 5 vezes em larvas de *Diatraea saccharalis*.

Quanto a outros VPNs submetidos à passagem em hospedeiros alternativos, SMIRNOFF (1963) observou um aumento de 1,8 vezes na virulência do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Trichiocampus viminalis* para larvas de *T. irregularis* depois de 3 passagens seriadas.

STAIRS e cols. (1981) e MARTIGNONI & IWAI (1986) obtiveram resultados semelhantes após passarem, respectivamente, 1 vez o VPN de *Choristoneura fumiferana* em lagartas de *T. ni* e *Galleria mellonella* e 5 vezes o VPN de *Orygia pseudotsugata* em lagartas de *T. ni*.

RIBEIRO (1985) conseguiu um grande aumento de virulência quando inoculou repetidas vezes o VPN de *Anticarsia gemmatalis* e o VPN de *T. ni* em larvas de *D. saccharalis*. Após 10 passagens seriadas do VPNAg e 11 do VPNTn, a virulência aumentou em cerca de 100 e 800 vezes, respectivamente, para as larvas daquela espécie.

Como essas passagens seriadas foram feitas com isolados selvagens de VPNs e não com variantes geneticamente homogêneas, é provável que esta adaptação seja decorrência de uma seleção de genótipos virais mais infectivos para seus novos hospedeiros.

Algumas vezes, a adaptação do vírus ao novo hospedeiro resulta na diminuição da virulência para o hospedeiro original (STAIRS e cols., 1981; TOMPKINS e cols., 1981). Entretanto, há outros resultados que mostram que o vírus mantém sua infectividade original (SMIRNOFF, 1963; MARTIGNONI & IWAI, 1986; RIBEIRO, 1989).

Embora existam vários relatos positivos em relação à adaptação de VPNs a hospedeiros alternativos, há resultados contrários em que não ocorreu modificação na virulência de alguns isolados após serem submetidos à passagem seriada (MALEKI-MILANI, 1978; PAVAN e cols., 1981; McINTOSH & IGNOFFO, 1986).

Mudanças na forma e tamanho do vírus após passagem sucessiva em um novo hospedeiro são fatos também descritos na literatura. CUNNINGHAM (1970), VAIL e cols. (1971), VAIL & JAY (1973) e TOMPKINS e cols. (1981) observaram o aparecimento de VPNs

com forma cúbica e tamanho bem maior que os poliedros regulares.

A ativação de um vírus oculto é outro resultado observado em experimentos desse tipo (MALEKI-MILANI, 1978; PAVAN e cols. 1981). Para minimizar os efeitos estressantes que um VPN provoca no hospedeiro alternativo, o que facilita a manifestação de um vírus latente, GRONER (1986) salienta dois requisitos necessários para se fazer estudos de infecção em hospedeiros alternativos: 1) que os insetos utilizados venham de populações sadias e que as larvas sejam criadas a partir de ovos desinfetados e sobre condições que evitem contaminação com outros vírus; 2) que o vírus utilizado seja bem caracterizado e suas propriedades bioquímicas bem conhecidas e que seja confirmado ser o agente causador da morte das larvas. O vírus obtido através de purificação de placa é o mais indicado para os testes.

Em relação à passagem seriada de VPNs em culturas de células, MILLER & MILLER (1982) afirmaram que este processo resulta numa gradual redução da capacidade do vírus em realizar seu ciclo bifásico de crescimento, ou seja, produção de vírus não-inclusos seguido pelos vírus inclusos no poliedro, dentro do núcleo da célula (infecção primária e secundária, respectivamente). Os vírus não-inclusos tornam-se o principal produto de replicação.

Já que a forma inclusa do vírus é a desejada para uso como inseticida biológico, pois a matriz protéica do poliedro lhe confere maior proteção no ambiente externo, conclui-se que o uso de

cultura de células para a produção em massa dos mesmos não é o meio mais vantajoso, além do fato das culturas, em geral, apresentarem inúmeros problemas e um custo elevado (MILLER, 1988).

A contínua passagem de VPNs em cultura de células faz também com que, muitas vezes, surjam mutantes espontâneos que produzem poucos poliedros por cada célula infectada (FP - do inglês "few polyhedra") quando inocula-se clones do tipo MP ("many polyhedra"). Isso foi observado por vários pesquisadores, entre eles HINK & STRAUSS (1976), POTTER e cols. (1976), BURAND & SUMMERS (1982), MILLER & MILLER (1982), FRASER e cols. (1983), ROBERTS (1985) e BEAMES & SUMMERS (1988). Além disso, os mutantes FP apresentam uma DL_{50} maior que a dos mutantes MP e seus corpos de inclusão possuem um número reduzido de virions no seu interior (MILLER, 1986).

Padrões de restrição do DNA de mutantes FP de VPNAc feitos com várias endonucleases mostram que há uma inserção de um elemento genético transponível do tipo "copia-like" quando este é comparado ao DNA do isolado viral original (antes da passagem seriada). Esse fato foi observado por BURAND & SUMMERS (1982), MILLER & MILLER (1982), FRASER e cols. (1983) e BEAMES & SUMMERS (1988) e, com exceção de FRASER e cols., verificou-se que a sequência inserida no DNA viral provinha da célula hospedeira.

VAIL e cols. (1982), após uma única passagem de uma variante geneticamente homogênea de VPNAc em lagartas de *T. ni*,

detectaram a presença de um novo fragmento ($2,17 \times 10^6$ daltons) e a falta de outro ($1,55 \times 10^6$ daltons) no DNA viral. CROIZIER e cols. (1985) encontraram resultados semelhantes para VPN de *Maneistra brassicae* após 25 passagens sucessivas do vírus em seu hospedeiro natural.

1.4 Caracterização protéica de baculovírus através de eletroforese

A necessidade de se identificar e, de alguma forma, diferenciar os baculovírus para se ter certeza da pureza do produto a ser utilizado no campo como inseticida biológico fez com que vários estudos sobre composição protéica destes vírus fossem realizados, utilizando, entre outras, a técnica de eletroforese em gel de SDS e poliacrilamida (CIBULSKY e cols., 1977a).

Existem inúmeras referências sobre eletroforese de proteínas do virion e do poliedro do VPNAc (CIBULSKY e cols., 1977a, b; SUMMERS & SMITH, 1978; MARUNIAK e cols., 1979; VLAK, 1979; MASKOS & MILTENBURGER, 1981; SINGH e cols., 1985; RODRIGUES & PAVAN, 1988b) e de outros VPNs e VGs (McCARTHY & LIU, 1976; ZETHNER e cols., 1979; TWEETEN e cols., 1980; HOTCHKIN, 1981; PAVAN e cols. 1981; MONROE & MCCARTHY, 1984).

Segundo revisão feita por MARUNIAK (1986), os baculovírus possuem de 11 a 26 proteínas estruturais, cujos pesos

moleculares variam de 10000 a 160000 daltons. O principal componente protéico destes vírus do tipo incluso é a proteína do corpo de inclusão, isto é, a poliedrina no caso dos VPNs e a granulina no caso dos VGs. Ambas são proteínas conservadas entre os diferentes baculovírus, possuem um peso molecular em torno de 29000 daltons (ROHRMANN, 1986b) e, como já foi dito, constituem mais de 95% da massa do corpo de inclusão (CARSTENS e cols., 1987).

Em relação ao VPNAc, há trabalhos que relatam desde 12 (CIBULSKY, 1977b) até 24 polipeptídeos fazendo parte da estrutura dos virions com pesos moleculares variando de 16000 a 150000 daltons (SUMMERS & SMITH, 1978).

VLAK (1979), aliando as técnicas de eletroforese e autoradiografia, observou um total de 35 polipeptídeos estruturais presentes nos virions de VPNAc, enquanto que SINGH e cols. (1985) encontraram cerca de 100 em gel bi-dimensional, com pesos variando de 11800 a 105000 daltons.

1.5 Objetivos

A importância de se estudar e caracterizar a biologia e a estrutura dos baculovírus, em diferentes sistemas, por eles serem fortes candidatos a inseticidas biológicos, já foi bem exposta.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de estudar as consequências da passagem seriada do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* em larvas de um hospedeiro alternativo, a *Diatraea saccharalis*.

Para isso, foi avaliado, após cada passagem, o grau de virulência em relação ao hospedeiro, a produção de vírus pelas lagartas infectadas, a aparência externa do corpo de inclusão e o padrão eletroforético dos polipeptídeos estruturais dos vírus.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Larvas de insetos

Os ensaios biológicos foram realizados com lagartas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) com 11 dias de idade (3º instar). Estas foram fornecidas semanalmente pela Secção de Entomologia do Instituto do Açúcar e do Alcool/PLANALSUCAR (Araras-SP) em tubos de vidro com dieta artificial (± 10 lagartas/tubo).

Essas lagartas faziam parte de populações criadas em laboratório e mantidas em dieta artificial como a descrita por HENSLEY & HAMMOND (1968) e modificada por DEGASPARI e cols. (1981).

Os ovos dos quais eclodiam as lagartas eram inicialmente desinfetados e depois colocados em tubos com dieta, previamente esterilizados, e dessa maneira enviados ao laboratório para serem utilizados nos ensaios biológicos.

2.1.2 Vírus

O vírus inoculado inicialmente nas lagartas foi o Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) - variante genética E2, fornecido pelo Dr. J. E. Maruniak, Departamento de Entomologia, Universidade da Flórida.

A variante E2 foi obtida a partir de isolados de VPNAc - tipo selvagem replicados em cultura de células de *Trichoplusia ni* - linhagem TN-368-10 através do método de purificação de placa (SMITH & SUMMERS, 1978; SUMMERS & SMITH, 1978). Por este método é possível separar variantes genômicas que tenham pequenas diferenças nos padrões de restrição do DNA e, dessa forma, obter vírus geneticamente homogêneos (LEE & MILLER, 1978). A estabilidade da variante E2 do VPNAc foi comprovada por SMITH & SUMMERS (1978) depois que esta foi submetida a uma nova purificação de placa sem que o padrão de restrição de seu DNA tenha sido modificado.

2.2 Métodos

2.2.1 Purificação dos cristais virais

2.2.1.1 Purificação por centrifugação diferencial

Este protocolo de purificação utilizado seguiu o descrito por PAVAN e cols. (1981, 1983) com algumas modificações.

Lagartas mortas por um determinado vírus foram mantidas a -20°C até o momento da purificação. Estas lagartas foram, então, trituradas num liquidificador durante 1 minuto numa solução de Tris 0,01 M, EDTA 0,001 M, SDS 0,1% com alguns cristais de feniltiouréia, numa proporção de 100 ml de solução para cada 10 g de lagarta infectada. O uso de feniltiouréia serve para prevenir a oxidação do pigmento encontrado nas lagartas e o consequente escurecimento do homogeneizado. O tratamento com SDS, um detergente aniônico, é feito para facilitar o rompimento das células e reduzir o material contaminante aderido à superfície dos cristais. Não há relatos de que o SDS tenha qualquer efeito sobre a estrutura ou infectividade do vírus (MARUNIAK, 1986).

O homogeneizado obtido foi sonificado por alguns segundos e filtrado 2 ou 3 vezes para a retirada de restos de tecidos das lagartas. Este filtrado foi novamente sonificado e submetido à

centrifugação diferencial. Para esta etapa foi utilizada uma centrífuga de mesa FANEM, Excelsa Baby, modelo 208N, com cruzeta horizontal para 8 tubos de 15 ml.

Os passos a seguir podem ser acompanhados na Figura 2. O material filtrado e sonicado foi primeiro submetido a uma centrifugação em baixa velocidade (velocidade #2, aproximadamente 200g) por 1 minuto para precipitar restos de células e material mais denso. O sobrenadante foi coletado e reservado para, numa etapa posterior, ser novamente centrifugado. O precipitado obtido foi ressuspendido na mesma solução de Tris 0,01 M, EDTA 0,001 M, SDS 0,1% e submetido à nova centrifugação em baixa velocidade por 1 minuto. Esta etapa foi realizada para recuperar parte dos cristais virais que encontravam-se junto com o primeiro precipitado. O sobrenadante obtido a partir desta segunda centrifugação foi misturado ao primeiro e submetido, então, a uma velocidade maior de centrifugação (velocidade #7), correspondente a 2200g, por 5 minutos. Este precipitado final foi ressuspendido em água destilada, quantificado e mantido a -20°C até o momento de ser utilizado.

2.2.1.2 Purificação com SDS e 2-Mercaptoetanol

Foi avaliada, ainda, outra metodologia para purificação dos cristais virais pois a purificação apenas por centrifugação diferencial algumas vezes deixa presente na solução final impurezas

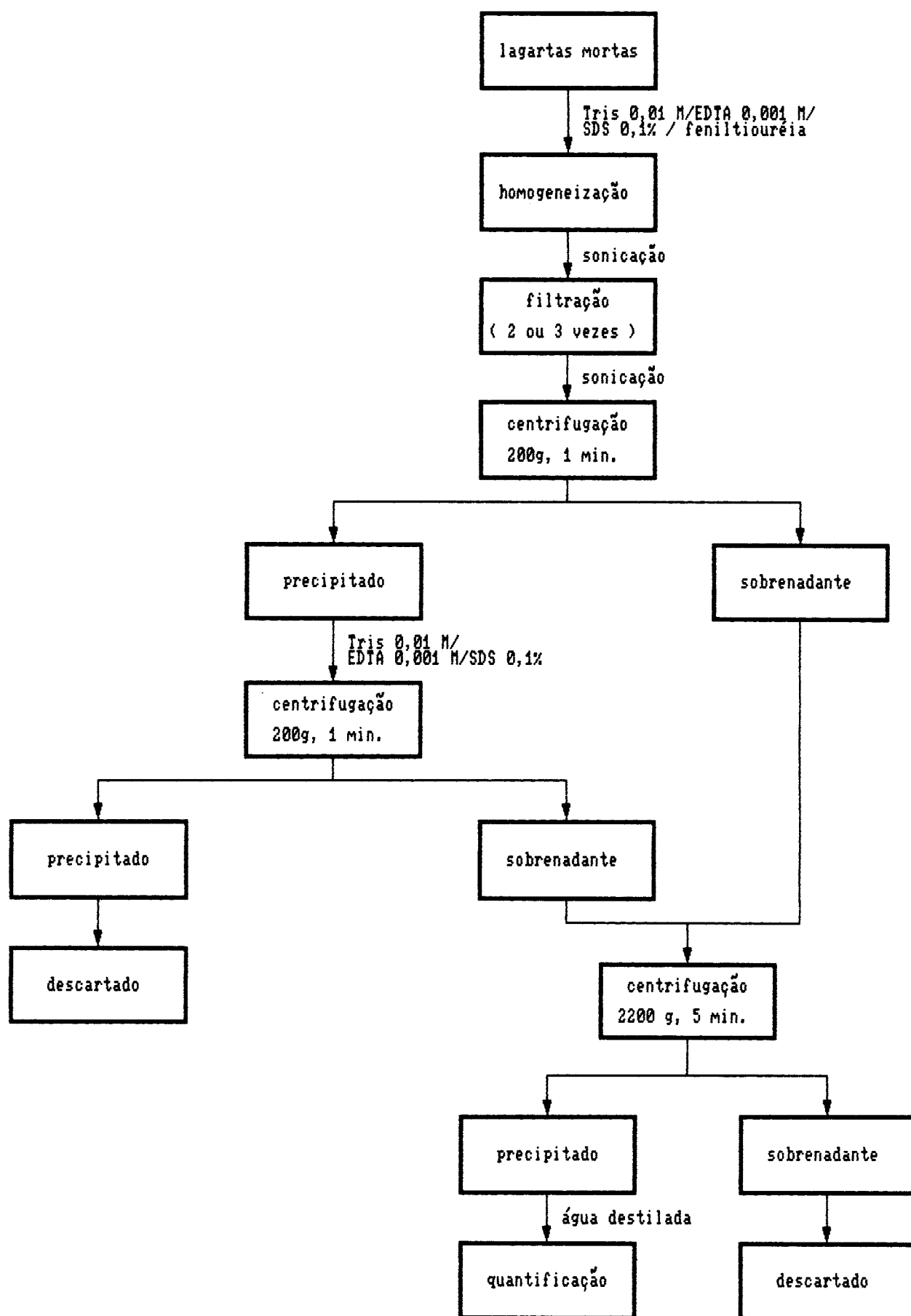


Figura 2. Processo de purificação dos cristais de VPNAc através de centrifugação diferencial.

provindas de restos celulares das lagartas (CAVALLARO, 1988).

Amostras dos 5 isolados virais purificados por centrifugação diferencial que seriam analisadas por eletroforese foram submetidas a esse novo processo de purificação.

O processo utilizado foi o descrito por REIGANUM (1984), que consiste em deixar os poliedros virais numa solução de Tris-EDTA 0,05 M, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 0,5%, pH 7,2, em banho-maria a 70°C por 30 minutos. Seguem-se 2 lavagens com água destilada e, ao final, ressuspende-se o material em água destilada para ser quantificado.

2.2.2 Quantificação dos cristais virais

Diluía-se a solução de vírus purificada 100 ou 500 vezes e observava-se em uma câmara de Neubauer (hemacitômetro) em fotomicroscópio de contraste de fase Dialux 20 - Leitz. Em aumento de 400 vezes, contava-se todos os cristais que encontravam-se nos 4 grandes quadrados de cada canto da câmara e no quadrado central.

Cada solução foi quantificada duas vezes e, ao final, considerava-se a média das duas repetições.

2.2.3 Preparo do inóculo

Após a quantificação, as soluções virais foram diluídas em água destilada e mantidas em soluções estoque numa concentração de 10^7 cristais/ $2,7 \mu\text{l}$. O ajuste da concentração foi feito para $2,7 \mu\text{l}$ pois este foi o volume de solução dado a cada lagarta nos bioensaios.

As soluções virais utilizadas nos diferentes bioensaios realizados foram preparadas a partir de diluições das soluções estoque até chegar-se à dose desejada.

2.2.4 Inoculação dos isolados virais

O inóculo dos diferentes isolados virais nas lagartas de *D. saccharalis* foi sempre individual e realizado conforme o descrito por PAVAN e cols. (1981) com algumas modificações.

Em placas de acrílico, contendo 24 cavidades cada uma, foram colocados pequenos discos de dieta artificial (3 mm de diâmetro x 1 mm de espessura) e sobre cada um destes discos, com o auxílio de um microaplicador, uma gota de $2,7 \mu\text{l}$ de uma solução de vírus com dose conhecida. Para esta etapa foi utilizado ultra-som para homogeneizar as soluções de vírus e seringas descartáveis para

a aplicação do inóculo.

Após a inoculação do vírus sobre a dieta, lagartas de 11 dias de idade (3ª instar) de *D. saccharalis* foram colocadas individualmente dentro de cada cavidade das placas. Estas foram fechadas, colocadas em câmara úmida e mantidas à temperatura constante ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Aproximadamente 20 horas depois, as lagartas que haviam consumido todo o disco de dieta contaminada com o vírus foram transferidas individualmente para tubos de vidro contendo dieta de realimentação sem vírus e sem formol, pois é sabido que este possui atividade antiviral (IGNOFFO & GARCIA, 1968). Deste modo, sabia-se que a mortalidade larval que viesse a ocorrer seria devido a uma única e conhecida dose de vírus inoculada.

Os tubos contendo as lagartas foram colocados em uma câmara de temperatura controlada ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e observados em dias alternados para verificar a mortalidade ocorrida. Para o diagnóstico da infecção foram coletadas amostras de tecidos de lagartas mortas para a observação em microscópio de contraste de fase e confirmação da presença do vírus.

2.2.5 Seleção de linhagens

O método utilizado para seleção de diferentes linhagens de vírus a partir do VPNAc - E2 foi o de passagem seriada, o mesmo utilizado por RIBEIRO (1985, 1989).

Este método consiste em 1º) inoculação de um determinado vírus em um hospedeiro para que ocorra a sua multiplicação, 2º) sua posterior recuperação (purificação) a partir de lagartas (ou cultura de células) infectadas ou mortas e 3º) reinoculação do vírus purificado numa nova população de hospedeiros de uma mesma espécie. Este processo é repetido várias vezes sucessivamente durante quantas vezes forem desejadas. É um método de seleção genética onde se obtém, ao final do processo, os vírus que melhor se replicam na população hospedeira.

Foram realizadas 5 passagens seriadas do VPNAc no hospedeiro alternativo *Diatraea saccharalis* e obteve-se 4 isolados virais designados neste trabalho como IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4, além do VPNAc original (E2). Deste modo, com o inóculo do VPNAc-E2, por exemplo, obteve-se a produção (através da multiplicação dos vírus) da população viral produzida após a primeira passagem do VPNAc em *D. saccharalis* (IV-1) e assim por diante.

2.2.6 Avaliação da mortalidade provocada pelos diferentes isolados virais

Foram realizados bioensaios para se verificar a mortalidade larval sempre que um vírus com uma determinada dose foi inoculado.

Esses foram montados em blocos conforme as doses de vírus que foram inoculadas. As doses utilizadas foram 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 cristais/lagarta ($2,7 \mu\text{l}$). Cada bloco consistia no inóculo dos 5 isolados virais (E2, IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4) com a mesma dose. Para cada dose de cada vírus foram preparadas 5 placas de acrílico, conforme descrito no item anterior, e inoculadas 120 lagartas de *D. saccharalis*. Procurou-se obter cerca de 100 lagartas para cada dose e cada isolado para fazer-se a análise da mortalidade. Isto às vezes não foi possível pois nem todas as lagartas ingeriam por completo o disco de dieta contaminado.

Foi mantido, em todos os blocos, um grupo controle de 100 lagartas que ingeriam dieta inoculada com água destilada, sendo que cada bloco do experimento foi montado com 720 lagartas no total, com cerca de 600 sendo utilizadas na análise.

O experimento, portanto, seguiu o modelo abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_k$$

onde μ = média do experimento

α = vírus $i = 5$

β = dose $j = 6$

e = erro do experimento

$k = 5$ repetições

2.2.7 Avaliação do tamanho dos cristais virais

Foi medido o diâmetro dos cristais de E2 e de IV-4 a partir de fotos tiradas no mesmo microscópio utilizado para observação dos tecidos das lagartas de *D. saccharalis* e soluções virais.

As fotos foram tiradas em um aumento de 400 vezes. A partir delas foi medido, com uma régua, o diâmetro interno em milímetros (mm) dos cristais de E2 e IV-4 e calculado o diâmetro médio de cada um deles.

A transformação da escala de milímetros para micrômetros (μm) foi feita através da fotografia de uma lâmina com escala da Zeiss e ampliação com o mesmo aumento que o das fotos dos vírus.

2.2.8 Avaliação da produção de vírus

Foi avaliada a quantidade de cristais virais produzidos por grama de peso larval a partir de cada um dos isolados virais inoculados nas lagartas de *D. saccharalis*.

Com base nos dados de mortalidade, foi escolhida, para cada um dos isolados virais inoculados, uma dose que provocasse pelo menos 90% de mortalidade larval para que houvesse uma padronização dos efeitos de cada isolado. Para E2 e IV-1, portanto, foi utilizada a dose de 10^6 cristais/lagarta, para IV-2 a dose de 10^5 cristais/lagarta e para IV-3 e IV-4 a dose de 10^3 cristais/lagarta.

As lagartas mortas foram pesadas e a partir delas foram purificados os diferentes isolados virais produzidos. Após a purificação, fazia-se a quantificação e calculava-se a produção de cristais virais por grama de peso larval. Por exemplo, inoculava-se o isolado E2 e, após a purificação e quantificação do vírus na solução, calculava-se quanto havia sido produzido de IV-1 em cada grama de lagarta infectada.

Foram realizadas 3 repetições para a produção de IV-1 e IV-4 e 4 para a de IV-2 e IV-3. Com estes dados foi calculada a produção média de cristais/grama de peso larval para cada um dos isolados virais.

2.2.9 Comparação das proteínas virais por eletroforese em gel de SDS e poliacrilamida

Através de eletroforese em gel de SDS e poliacrilamida foram comparadas amostras protéicas dos 5 isolados virais utilizados neste trabalho, purificadas pelos dois diferentes métodos, centrifugação diferencial e centrifugação diferencial seguida de tratamento adicional com SDS e 2-mercaptoetanol.

O método de análise eletroforética utilizado foi basicamente o descrito por LAEMMLI (1970) com algumas modificações.

Empregou-se eletroforese em sistema descontínuo com gel de separação em gradiente de 8-18% de acrilamida e gel de empacotamento de 3,9% de acrilamida. Os géis foram feitos em aparato vertical e apresentavam dimensões de 10x15x2mm. As concentrações finais de cada constituinte do gel e as demais soluções utilizadas encontram-se no Anexo 1.

O procedimento seguido para o preparo das amostras submetidas às eletroforese pode ser acompanhado na Figura 3. Partiu-se, inicialmente, de amostras dos diferentes vírus com igual concentração. Em tubos tipo "eppendorf", foram colocados 250 μ l de solução viral contendo 5×10^6 cristais/2,7 μ l e estes foram aquecidos em banho-maria a 94°C por 5 minutos. Este aquecimento prévio visava inativar a protease alcalina, uma enzima encontrada

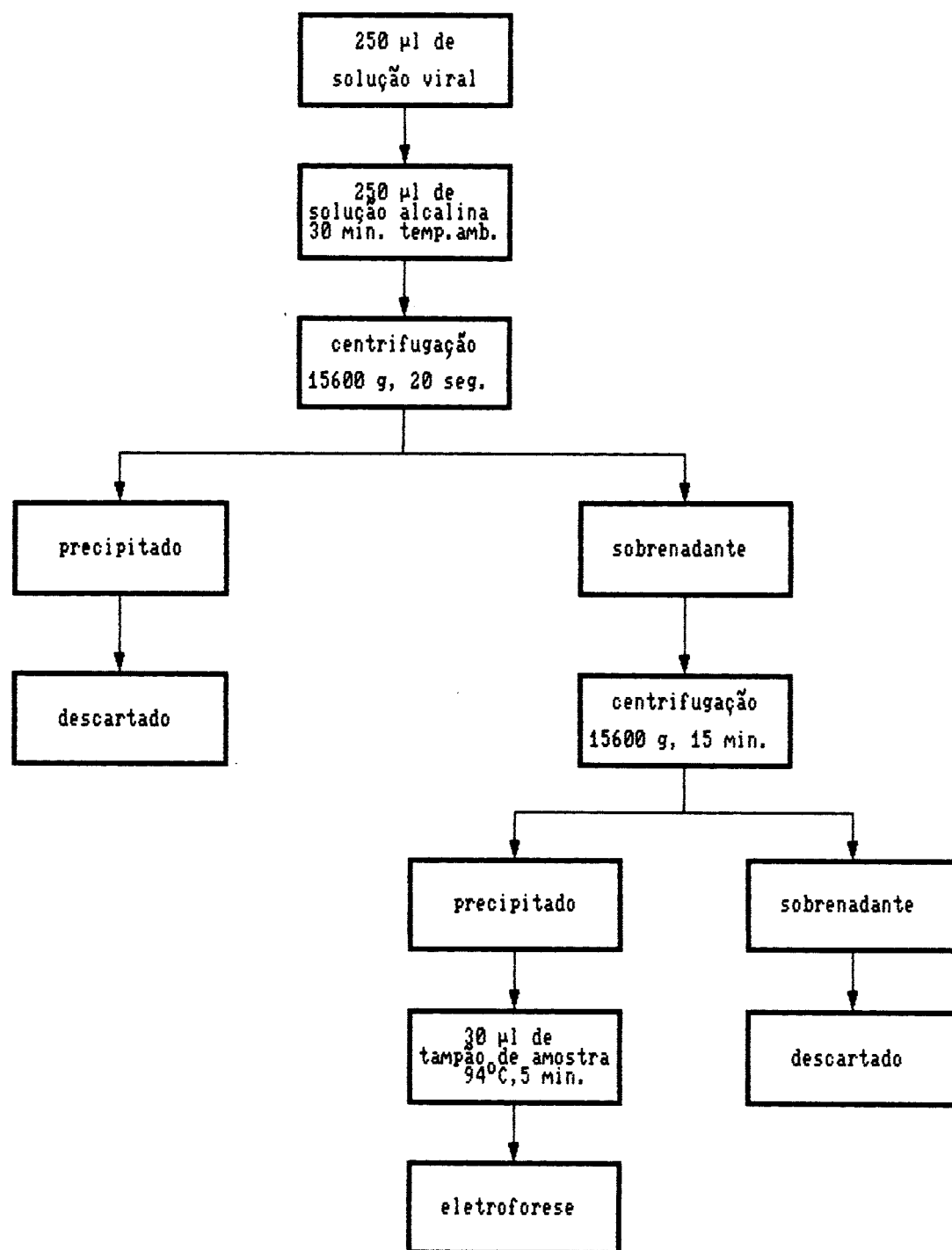


Figura 3. Preparo de amostras de vírus para análise através de eletroforese em gel de SDS e poliacrilamida.

na matriz protéica do cristal viral que, quando em pH alcalino, degrada as proteínas em polipeptídeos menores (EPPSTEIN & THOMA, 1975; EPPSTEIN e cols., 1975; SUMMERS & SMITH, 1975, 1978; MARUNIAK & SUMMERS, 1978; TWEETEN e cols., 1978; MARUNIAK e cols., 1979; WOOD, 1980a)

Os passos seguintes seguem conforme SUMMERS & SMITH (1987) com algumas modificações. À solução viral, foram adicionados 250 µl de solução alcalina de Na_2CO_3 0,5 M, NaCl 0,17 M, EDTA 0,01M, pH 11,0 e deixados em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Esta solução alcalina solubiliza a matriz protéica do vírus, liberando os virions de dentro do cristal. WHITT & MANNING (1987) estudaram o potencial de dissociação dos constituintes desta solução alcalina (Na_2CO_3 , NaCl e EDTA) individualmente e associados e concluíram que cada um deles, quando em pH alcalino, tem um papel importante na indução da dissociação da matriz protéica do VPNAc.

A seguir, os "eppendorfs" contendo os vírus já solubilizados, mas ainda na solução alcalina, foram centrifugados a 15600g por 20 segundos em microcentrífuga para precipitar poliedros que não tivessem solubilizado. O sobrenadante foi transferido para outro "eppendorf" e novamente centrifugado a 15600 g por 15 minutos. Este precipitado foi ressuspensionado em 30 µl de tampão de amostra para eletroforese.

Foram aplicados no gel 25 µl de cada amostra e este foi submetido a 50 volts, enquanto as amostras estavam no gel de

empacotamento, e 100 volts, por aproximadamente 3 horas, quando as mesmas encontravam-se no gel de separação.

Os padrões de peso molecular utilizados foram albumina bovina (66000 d), ovalbumina (45000 d), pepsina (34700 d), tripsinogênio (24000 d), β -lactoglobulina (18400 d) e lisozima (14300 d) e foram preparados conforme instruções do Boletim Técnico MWS 877 da Sigma Chemical Company.

Os géis foram corados por 2 horas e descorados por 24 horas aproximadamente.

Os pesos moleculares relativos foram determinados conforme o método de WEBER & OSBORN (1969).

2.2.10 Análise estatística dos resultados

Para verificar se os 5 isolados virais de VPNAc tiveram efeitos significativamente diferentes sobre as lagartas de *D. saccharalis* foi aplicado o Teste de Friedman de relações múltiplas. O Teste de Friedman é um teste não-paramétrico através do qual pode-se verificar se diferentes amostras (tratamentos) são provenientes de uma mesma população (ou de populações análogas) ou se provém de populações distintas (CAMPOS, 1979).

Foi realizado o cálculo da Dose Letal 50 (DL₅₀), através do Método Probit descrito por BLISS (1935a,b) e FINNEY (1947), dos 5 isolados para se comparar quantitativamente o grau de virulência de cada um. A DL₅₀ é a dose de uma toxina ou patógeno necessária para matar 50% dos indivíduos da população em estudo.

O Tempo Letal 50 (TL₅₀) foi calculado, através do mesmo Método Probit, para se fazer uma comparação da velocidade de ação de cada um dos 5 isolados de VPNAc. O TL₅₀ é o tempo que uma determinada toxina ou patógeno leva para matar 50% dos indivíduos de uma população em análise.

Os diâmetros médios calculados para os cristais de E2 e IV-4 e as produções médias de cristais de cada um dos isolados de VPNAc foram comparadas através do teste t-Student.

3. RESULTADOS

3.1 Alterações dos isolados de VPNAc após as passagens seriadas

3.1.1 Modificação da atividade biológica

As lagartas de *Diatraea saccharalis* infectadas com o VPNAc-E2 e com os isolados virais obtidos após as quatro passagens seriadas (IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4) apresentaram os sintomas típicos de poliedrose, ou seja, pouca mobilidade, flacidez, falta de apetite e coloração esbranquiçada. Dependendo da dose e do isolado viral inoculado, essas lagartas começavam a morrer entre o 8º e o 13º dia após o tratamento.

Não se observou mortalidade das lagartas do grupo controle, todas atingindo a fase de pupa.

A Tabela I mostra o número e a porcentagem de indivíduos mortos para cada dose de cada isolado viral inoculado.

A partir dos dados dessa tabela, observa-se que, para todos os isolados, a mortalidade larval é maior à medida que se aumenta a dose. Além disso, para uma mesma dose, a mortalidade é diferente para cada um dos isolados virais inoculados. Observa-se

Tabela I. Mortalidade de larvas de *D. saccharalis* inoculadas com 5 isolados de VPNAc e seis doses diferentes. (N) número total de indivíduos analisados; (M) número de indivíduos mortos; (%) porcentagem de mortalidade larval ocorrida para cada dose inoculada (cristais/lagarta).

DOSE	E2			IV-1			IV-2			IV-3			IV-4		
	N	M	%	N	M	%	N	M	%	N	M	%	N	M	%
10^1	100	2	2,0	100	4	4,0	100	4	4,0	100	9	9,0	100	11	11,0
10^2	80	2	2,5	79	4	5,1	98	36	36,7	100	61	61,0	100	65	65,0
10^3	100	6	6,0	99	11	11,1	98	65	66,3	100	88	88,0	86	79	91,4
10^4	99	8	8,1	100	13	13,0	100	75	75,0	100	97	97,0	100	98	98,0
10^5	99	57	57,6	98	57	58,2	99	96	97,0	100	98	98,0	100	98	98,0
10^6	100	90	90,0	100	84	84,0	100	97	97,0	97	97	100,0	100	100	100,0
TOTAL	578			576			595			597			586		

que a cada passagem do VPNAc em *D. saccharalis*, obtém-se um aumento gradual da mortalidade larval, indicando a obtenção de isolados mais patogênicos. Nota-se, por exemplo, que os isolados E2 e IV-1 provocaram uma mortalidade em torno de 60% com uma dose de 10^5 cristais/lagarta, enquanto que IV-3 e IV-4 provocaram uma

mortalidade próxima com uma dose de 10^2 cristais/lagarta. Já o IV-2 causou a mesma mortalidade com uma dose intermediária entre estas duas, 10^3 cristais/lagarta.

Com base nos dados da Tabela I, foram calculados os valores para o Teste de Friedman que estão na Figura 4. Os resultados mostram que o VPNAc - E2 não diferiu significativamente do IV-1 e do IV-2, mas com relação a IV-3 e IV-4 teve diferença considerada altamente significativa. O IV-3 e o IV-4 não apresentaram diferença significativa entre si e nem com o IV-2.

O IV-2 foi o único que não foi considerado significativamente diferente de nenhum dos outros isolados, mostrando que ele apresenta um comportamento intermediário entre os isolados obtidos nas primeiras passagens (E2 e IV-1) e os obtidos nas últimas (IV-3 e IV-4).

Como os valores calculados para o Teste de Friedman são obtidos a partir dos "rankings" que cada isolado viral ocupa e que esses dependem da mortalidade que ele provoca, podemos afirmar que o IV-3 e o IV-4 possuem uma virulência maior do que o isolado E2 em relação às lagartas de *D. saccharalis*. Além disso, como os isolados foram obtidos através do método de passagem seriada, ou seja, cada um foi produzido a partir do inóculo do isolado anterior, podemos afirmar também que esta modificação da virulência desde o E2 até o IV-4 foi gradual e progressiva, como mostra a Figura 4.

(a)

	IV-1	IV-2	IV-3	IV-4	R_j
E2	4,5 N.S.	10,5 N.S.	18,0 **	22,0 **	7,0
	IV-1	6,0 N.S.	13,5 N.S.	17,5 *	11,5
		IV-2	7,5 N.S.	11,5 N.S.	17,5
			IV-3	4,0 N.S.	25,0
				IV-4	29,0

(b)

		R_j	
E2	a*	7,0	
IV-1	a, b	11,5	
IV-2	a, b, c	17,5	
IV-3	b, c	25,0	5% = 14,9
IV-4	c	29,0	1% = 17,8

Figura 4. Comparação entre a mortalidade de larvas de *Diatraea saccharalis* provocada pelos 5 isolados virais de UPMAC. Valores calculados para o Teste de Friedman - relações múltiplas.

(a) diferença entre os isolados virais: (N.S.) não-significativa; (*) significativa - $p < 0,05$; (**) altamente significativa - $p < 0,01$; (R_j) soma total dos "rankings". (b) (*) letras diferentes indicam diferenças significativas - $p < 0,05$.

Os valores calculados para DL₅₀ são apenas uma estimativa da mesma (Tabela II). O intervalo de confiança não foi determinado porque a distribuição dos dados foi muito irregular, isto é, os dados não se ajustaram a uma curva de distribuição normal devido ao excessivo intervalo utilizado entre as doses. Embora os dados não se ajustem, o Método Probit estima bem a DL₅₀, dando resultados confiáveis (PIEDRABUENA, 1975).

Pelos resultados observados na Tabela II verifica-se a modificação que ocorreu na DL₅₀ do VPNAc no transcorrer das cinco passagens seriadas em *D. saccharalis*. Enquanto que para o isolado E2 a DL₅₀ para uma população de lagartas de 11 dias de idade de *D. saccharalis* é de $7,15 \times 10^4$ cristais/lagarta, para IV-4 esse valor se reduz para $7,31 \times 10^1$ cristais/lagarta. Conforme o que pudemos observar pela Tabela I a virulência do VPNAc foi aumentada em aproximadamente 1000 vezes após as cinco passagens sucessivas. Essa redução da DL₅₀ desde o E2 até o IV-4 para *D. saccharalis* pode também ser vista mais claramente na Figura 5, que mostra um gráfico contendo as retas e equações de regressão da porcentagem de mortalidade em função da dose inoculada para cada isolado viral.

O efeito dos vários isolados sobre o valor de TL₅₀ podem ser vistos na Tabela III. Para a dose 10^5 cristais/lagarta observa-se que os TL₅₀ de E2 e de IV-1, em torno de 17 - 18 dias, foram maiores do que os TL₅₀ de IV-2, IV-3 e IV-4, em torno de 12 dias. Para as doses 10^4 e 10^3 cristais/lagarta não foram calculados os TL₅₀ de E2 e IV-1, pois, nestas doses, a mortalidade não atingiu o

Tabela II. Estimativa da DL₅₀ (cristais/lagarta) dos 5 isolados virais de VPNAc para lagartas de 11 dias de *Diatraea saccharalis*.

IV	DL ₅₀
E2	$7,15 \times 10^4$
IV-1	$6,96 \times 10^4$
IV-2	$5,46 \times 10^2$
IV-3	$9,50 \times 10^1$
IV-4	$7,31 \times 10^1$

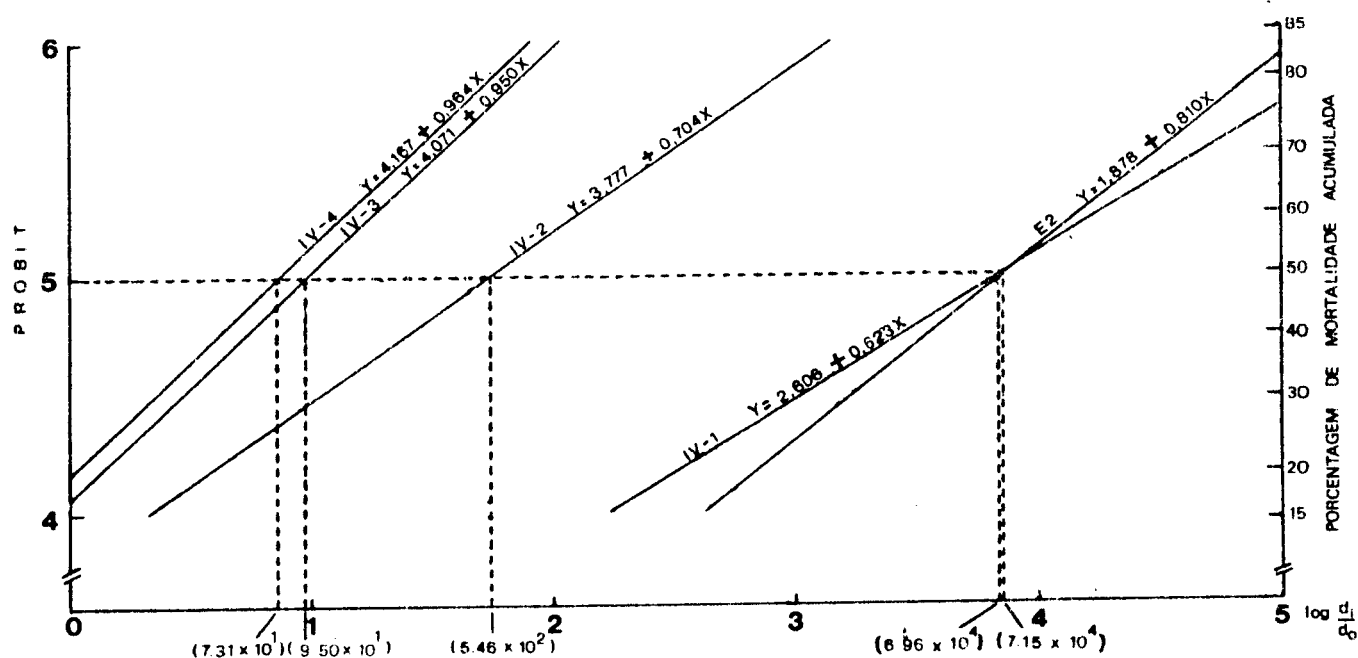


Figura 5. Retas e equações de regressão da porcentagem de mortalidade larval em função do $\log d_i/d_0$ dos 5 isolados virais de VPNAc. Os pontos assinalados nas retas e os números entre parênteses correspondem a DL₅₀ em cristais/lagarta.

Tabela III. Tempo Letal 50 (dias) para as várias doses dos 5 isolados virais de VPNAc inoculados em lagartas de 11 dias de *Diatraea saccharalis*.

Dose: 10^5 cristais/lagarta			
IV	TL ₅₀	Intervalo de Confiança	
E2	17,44	16,33	18,63
IV-1	18,19	15,00	22,06
IV-2	12,28	11,72	12,87
IV-3	12,20	11,67	12,75
IV-4	12,39	11,82	13,00
Dose: 10^4 cristais/lagarta			
IV	TL ₅₀	Intervalo de Confiança	
IV-2	23,54	21,65	25,58
IV-3	20,07	19,70	20,45
IV-4	20,16	19,83	20,50
Dose: 10^3 cristais/lagarta			
IV	TL ₅₀	Intervalo de Confiança	
IV-2	17,44	16,41	18,53
IV-3	14,32	14,31	14,33
IV-4	14,97	12,78	17,30
Dose: 10^2 cristais/lagarta			
IV	TL ₅₀	Intervalo de Confiança	
IV-3	20,29	19,18	21,46
IV-4	19,55	18,68	20,46

valor mínimo de 50%. Quanto aos outros três isolados, o TL_{50} de IV-2 foi um pouco maior que o de IV-3 e IV-4. Para todas as doses, os TL_{50} de IV-3 e IV-4 mostraram-se muito semelhantes.

Uma análise conjunta de todas as doses mostra que IV-3 e IV-4 agem mais rapidamente que IV-2 e este, por sua vez, mais que E2 e IV-1. A posição intermediária de IV-2 é notada principalmente para as doses 10^4 e 10^3 cristais/lagarta.

Os resultados do Teste de Friedman e os valores de DL_{50} e TL_{50} sugerem a existência de três grupos distintos no que se refere a sua atividade biológica em relação às lagartas de *Diatraea saccharalis*: E2/IV-1, IV-2 e IV-3/IV-4.

3.1.2 Alterações morfológicas do cristal viral

Todos os cristais de E2 apresentaram forma poliédrica. Sabe-se que os cristais virais, ou corpos de inclusão, dos VPns têm na sua maioria forma poliédrica, como visto através de microscopia ótica e eletrônica (FEDERICI, 1986), mas, às vezes, quando em solução aquosa, estes poliedros observados ao microscópio ótico parecem apresentar forma esférica, como visto para o isolado E2 na Figura 6a.

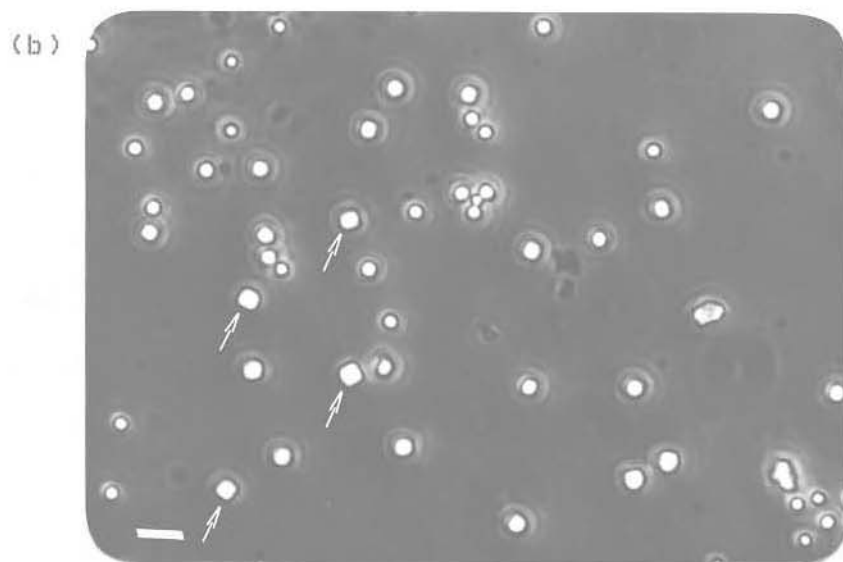
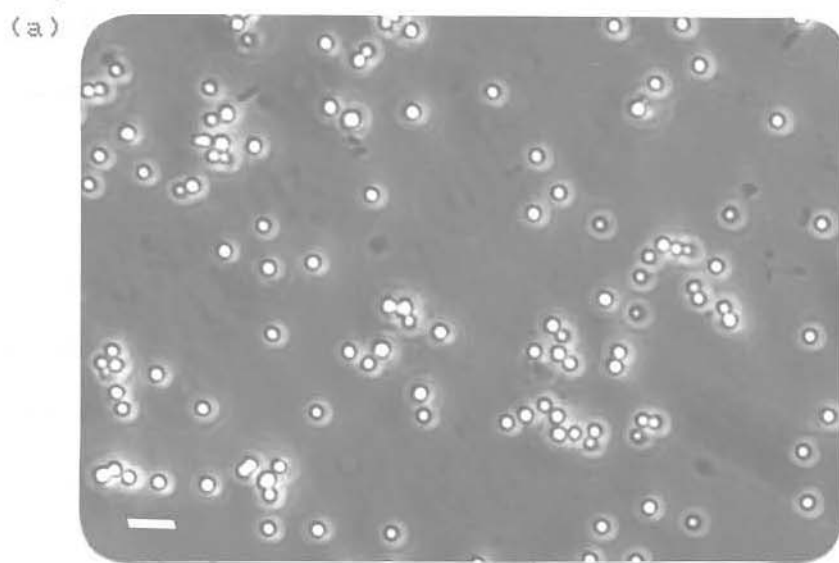


Figura 6. Micrografia dos isolados virais de VPNAc E2 (a) e IV-4 (b). As setas em (b) indicam cristais que apresentam forma cúbica. Barra = 5 μ m.

Em IV-4 foi notada a presença de muitos cristais com forma cúbica, quando observado ao microscópio ótico (Figura 6b).

Para verificar a proporção de cristais cúbicos e poliédricos que ocorreu em IV-4, foram contados um total de 1160 cristais virais a partir de fotos tiradas no microscópio ótico de diferentes soluções de IV-4. Estes resultados podem ser vistos na Tabela IV. Foram encontrados 19,6% de cristais cúbicos e 80,4% poliédricos.

Nos outros isolados (IV-1, IV-2 e IV-3), apareceram alguns cristais cúbicos, porém de modo menos regular.

Além da mudança de forma observada, os cristais de IV-4 pareceram relativamente maiores que os de E2. Para verificar se isto realmente ocorreu, foram feitas medidas de diâmetro, também a partir de fotografias tiradas ao microscópio ótico, de diferentes soluções de E2 e IV-4. Os resultados encontram-se na Tabela V (os valores utilizados para este cálculo estão no Anexo 2).

Foram medidos 835 cristais de E2 e 1160 de IV-4. Os diâmetros médios encontrados foram de $1,22 \pm 0,26 \mu\text{m}$ para E2 e $1,58 \pm 0,29 \mu\text{m}$ para os cristais poliédricos de IV-4. Segundo estes valores, os cristais poliédricos de IV-4 foram cerca de 2 vezes maiores em volume do que os de E2.

Tabela IV. Porcentagem (%) de vírus cúbicos e poliédricos de IV-4.

FORMA	N	%
Cúbica	227	19,6
Poliédrica	933	80,4
TOTAL	1160	100,0

Tabela V. Diâmetro médio (micrômetros) dos isolados virais E2 e IV-4.

IV	N	diâmetro	t*
E2	835	1,22±0,26	a
IV-4 I Ipoliédrico	933	1,58±0,29	b
Icúbico	227	1,91±0,26	c

* letras diferentes indicam diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) de acordo com o teste t-Student.

Os cristais cúbicos de IV-4 apresentaram $1,91 \pm 0,26 \mu\text{m}$ de lado, sendo, portanto, maiores que os poliedros de E2 e de IV-4.

3.1.3 Diminuição da produção de cristais virais

Pelos resultados de produção média de vírus vistos na Tabela VI (os valores utilizados para o cálculo estão no Anexo 3) observa-se que, no decorrer das passagens seriadas, ocorre uma diminuição gradual da produção de cristais virais nas lagartas. O inóculo de E2 resultou numa produção média de IV-1 de $3,57 \times 10^9$ cristais/g de peso larval enquanto que o inóculo de IV-3 resultou numa produção média de IV-4 de $2,20 \times 10^8$ cristais/g de peso larval, ou seja, cerca de 16 vezes menor. Considerando-se que cada lagarta, quando morta por infecção viral, pesou em média 0,1g, a produção média de vírus por lagarta foi de $3,57 \times 10^8$ cristais/lagarta de IV-1 e de $2,2 \times 10^7$ cristais/lagarta de IV-4.

Comparando-se as médias de produção através do teste t-Student, verifica-se que a produção de IV-1 é significativamente diferente da produção de IV-3 e IV-4. A produção de IV-2 não apresentou-se significativamente diferente de nenhum dos outros três isolados virais produzidos e, entre IV-3 e IV-4, também não houveram diferenças significativas.

Tabela VI. Produção média de cristais virais (c/g de peso larval) em lagartas de *Diatraea saccharalis* (3º instar) inoculadas com 4 diferentes isolados de VPNAc.

IV inoculado	IV produzido	produção	t*
E2	IV-1	35,7 × 10 ⁸	a
IV-1	IV-2	17,3 × 10 ⁸	a, b
IV-2	IV-3	9,1 × 10 ⁸	b
IV-3	IV-4	2,2 × 10 ⁸	b

*letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) de acordo com o teste t-Student.

Não foi possível calcular a produção média de cristais de IV-5, a qual seria obtida a partir do inóculo de IV-4. Todas as lagartas que morriam após terem sido inoculadas com IV-4 apresentavam os sintomas típicos de poliedrose. Quando amostras de tecidos e hemolinfa dessas lagartas eram observadas ao microscópio ótico, as células não apresentavam poliedros em seu interior, mas ao mesmo tempo não tinham uma aparência de célula normal, encontrando-se muitas vezes destruídas.

Quando fazia-se o procedimento normal de purificação dos vírus a partir dessas lagartas, tanto os precipitados quanto os

sobrenadantes obtidos após a centrifugação apresentavam uma quantidade extremamente pequena de cristais virais.

3.2 Análise comparativa das proteínas dos diferentes isolados de VPNAc

As proteínas dos cinco isolados de VPNAc, E2, IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4, foram submetidas à eletroforese em gel de gradiente de 8 - 18% de acrilamida, conforme descrito em Material e Métodos.

Na Figura 7 encontra-se a fotografia de uma das corridas eletroforéticas realizadas, mostrando a mobilidade relativa dos polipeptídeos estruturais dos 5 isolados, tanto purificados apenas por centrifugação diferencial como pelo tratamento adicional com SDS e 2-mercaptoetanol.

Foram analisados vários géis como esse da Figura 7 e, após a coloração dos mesmos, pode-se detectar até 23 bandas polipeptídicas diferentes, cujos pesos moleculares aparentes variaram de 16200 a 86700 daltons (Tabela VII). A média dos pesos moleculares foi obtida a partir dos pesos encontrados em três géis (os valores obtidos encontram-se no Anexo 4).

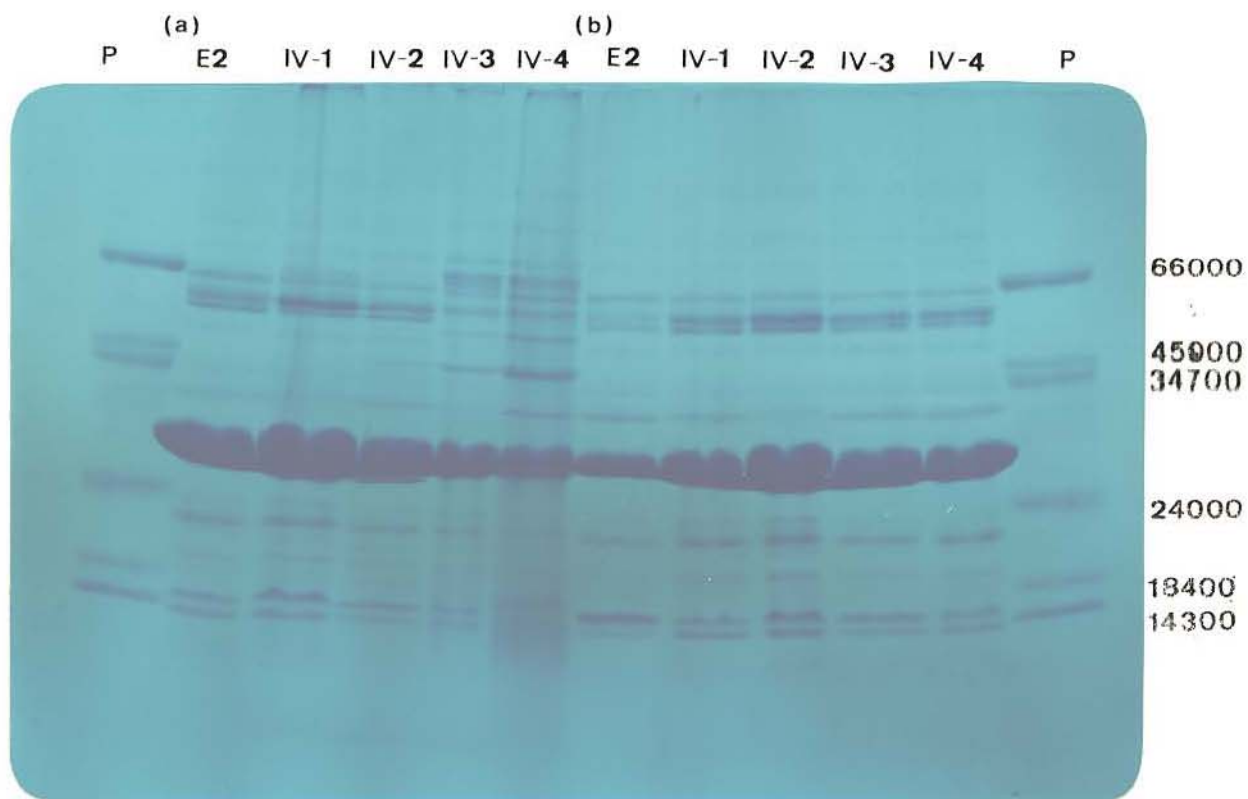


Figura 7. Padrões eletroforéticos dos 5 isolados virais de VPNAc purificados apenas por centrifugação diferencial (a) e pelo tratamento adicional com SDS e 2-mercaptoetanol (b). Os números ao lado da foto referem-se ao padrão de peso molecular (P).

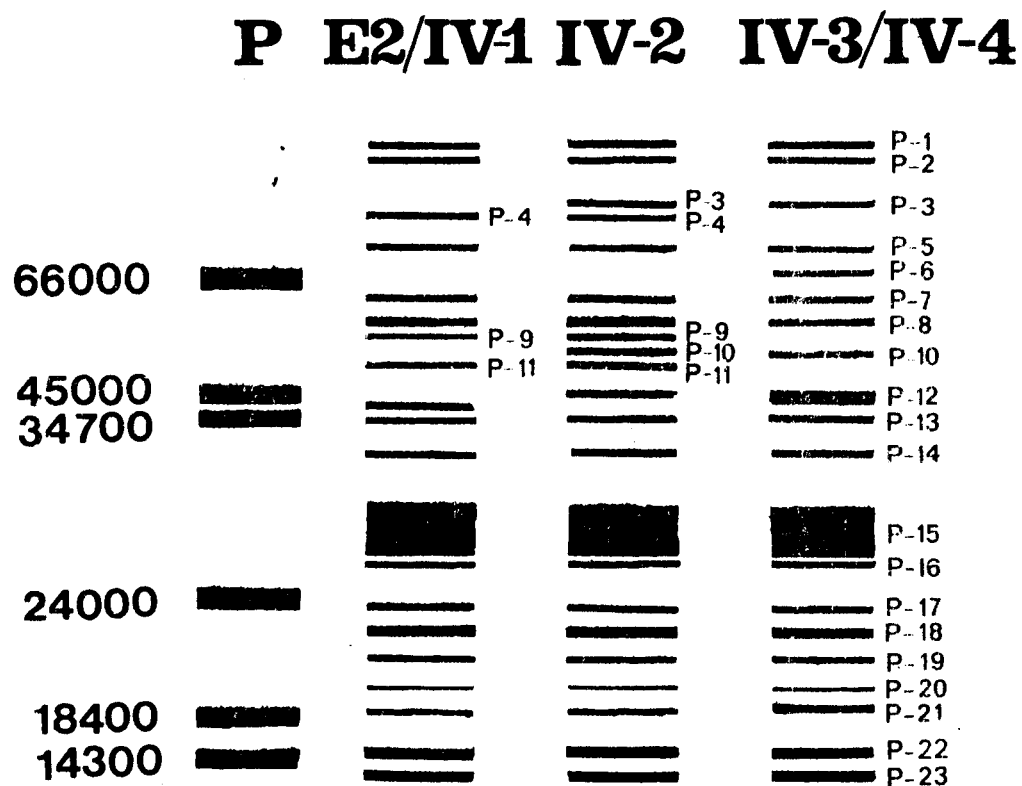


Figura 8. Representação esquemática das bandas polipeptídicas encontradas para os 5 isolados virais de VPNAc purificados apenas por centrifugação diferencial. (P) padrão de peso molecular.

Tabela VII. Pesos moleculares (PM) das 23 bandas polipeptídicas encontradas para os 5 isolados virais de VPNAc obtidos a partir de 3 corridas eletroforéticas.

polipeptídeo	PM (daltons)
P-1	86700 ± 5700
P-2	82000 ± 5300
P-3 ^a	74700 ± 5500
P-4 ^c	70700 ± 3800
P-5	63700 ± 1200
P-6 ^b	60300 ± 1500
P-7	57700 ± 2300
P-8	54300 ± 3800
P-9 ^c	52000 ± 2600
P-10 ^a	49300 ± 1500
P-11 ^c	47200 ± 1800
P-12 ^d	43000 ± 1700
P-13	41200 ± 1300
P-14	37300 ± 2000
P-15	31300 ± 1200
P-16	29500 ± 900
P-17	25000 ± 1000
P-18	23300 ± 800
P-19	22200 ± 800
P-20	20000 ± 1300
P-21	19000 ± 1000
P-22	16800 ± 1500
P-23	16200 ± 1800

^a encontradas somente em IV-2, IV-3 e IV-4 purificados apenas por centrifugação diferencial;

^b encontrada somente em IV-3 e IV-4 purificados apenas por centrifugação diferencial;

^c encontradas somente em E2, IV-1 e IV-2 purificados apenas por centrifugação diferencial e em todos os purificados com SDS e 2-mercaptoetanol;

^d em IV-2, IV-3 e IV-4 purificados apenas por centrifugação diferencial apresentou um peso médio de 44000 d.

Comparando-se os padrões de cada um dos isolados, que podem ser melhor vistos no esquema da Figura 8, nota-se que E2 e IV-1 apresentaram o mesmo padrão eletroforético de 20 bandas polipeptídicas com os mesmos pesos moleculares. Já, os outros 3 isolados, IV-2, IV-3 e IV-4, apresentaram padrões distintos.

Os isolados IV-3 e IV-4 mostraram padrões idênticos entre si, mas diferentes de E2, IV-1 e IV-2. Apenas estes 2 isolados apresentaram a banda P-6.

O isolado IV-2 apresentou um padrão onde apareceram bandas que só existiram em E2 e IV-1 e outras que só existiram em IV-3 e IV-4. As bandas P-4, P-9 e P-11 ocorreram em E2, IV-1 e IV-2 e as bandas P-3 e P-10, em IV-2, IV-3 e IV-4.

A banda P-12 parece ser a mesma em todos os isolados, mas com seu peso molecular um pouco alterado em IV-2, IV-3 e IV-4. Enquanto que nestes 3 isolados ela apresentou um peso molecular médio de 44000 d, nos outros foi de 43000 d. Além disso, ela sempre pareceu estar em maior quantidade em IV-3 e, principalmente, em IV-4.

A poliedrina, principal componente protéico dos baculovírus do subgrupo A, correspondente à banda P-15, não apresentou diferença na sua mobilidade para nenhum dos isolados, sendo que seu peso molecular médio foi de 31300 daltons.

Pela análise eletroforética, E2 e IV-1 apresentam o mesmo padrão de bandas, o mesmo acontecendo com IV-3 e IV-4, enquanto que IV-2 apresenta um padrão distinto de todos e intermediário entre o de E2/IV-1 e IV-3/IV-4.

Os 5 isolados de VPNAc purificados com o tratamento adicional de SDS e 2-mercaptoetanol não apresentaram diferenças nos padrões de bandas observados nos géis de SDS e poliacrilamida.

O padrão obtido foi o mesmo que o de E2 e IV-1 purificados apenas por centrifugação diferencial (Figura 8).

4. DISCUSSÃO

A infectividade da maioria dos VPNS é, em geral, restrita a membros do gênero ou da família do hospedeiro original (GRANADOS & WILLIAMS, 1986).

Dentre os VPNS, é relatado que os do tipo múltiplo (VPN-M) têm uma maior amplitude de hospedeiros que os do tipo simples (VPN-S) (HARPER, 1976). O Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* é do tipo múltiplo e, dentre os baculovírus, é descrito como o que infecta um maior número de espécies: pelo menos 37 distribuídas em 12 famílias de Lepidoptera (GRONER, 1986).

Neste trabalho, observou-se que o VPNAc foi capaz de infectar e desenvolver-se em *Diatraea saccharalis* e, além disso, apresentar um pronunciado aumento de virulência após sua passagem sucessiva nesta espécie.

VAIL & JAY (1973) fizeram estudos de citopatologia e replicação de VPNAc em seis diferentes hospedeiros alternativos e concluíram que o desenvolvimento da infecção nos vários tecidos não modificou significativamente naquelas espécies, apresentando um processo semelhante ao que ocorre em seu hospedeiro original.

Segundo revisão feita por GRONER (1986), o VPNAc infecta pelo menos três espécies da família Pyralidae, sendo uma delas

Diatraea grandiosella. Além desse fato, RIBEIRO (1985) conseguiu infectar *D. saccharalis* com dois vírus, o VPN de *Trichoplusia ni* e o VPN de *Anticarsia gemmatalis*, obtendo também um aumento de virulência para ambos após passagem seriada naquela espécie. Face a esses resultados, além de considerar que VPNTn é um vírus extremamente semelhante ao VPNAc (MILLER & DAWES, 1978), era esperado que o VPNAc se desenvolvesse bem em *D. saccharalis*.

Excetuando-se RIBEIRO (1985), dentre os valores descritos na literatura para aumento de virulência de VPNs após passagem sucessiva em hospedeiros alternativos, o maior é o encontrado por TOMPKINS e cols. (1981) que relatam um aumento de 10 vezes na capacidade de VPNAc infectar larvas de *T. ni* após passá-lo 2 vezes por esta espécie.

O aumento obtido por RIBEIRO (1985) para VPNAg e VPNTn após 10 e 11 passagens por *D. saccharalis* foi de 100 e 800 vezes, respectivamente, valores extremamente altos comparados aos outros encontrados na literatura. Na continuação deste trabalho, RIBEIRO (1989) conseguiu um aumento total de 1500 vezes para VPNAg após 20 passagens deste vírus naquela mesma espécie.

Surpreendentemente, o VPNAc apresentou um aumento maior ainda, cerca de 1000 vezes, após somente 5 passagens do vírus naquela espécie, mostrando, portanto, uma velocidade muito maior de adaptação ao novo hospedeiro. Além disso, a DL₅₀ do último isolado obtido (IV-4) foi 22 vezes menor do que a DL₅₀ para lagartas de *D.*

saccharalis de mesma idade apresentada pelo vírus original da espécie, o Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (GARCIA-CANEDO, 1989).

Neste trabalho como no de RIBEIRO (1985), considerou-se como aumento de virulência a redução proporcional da DL₅₀. Apesar de ambos apresentarem uma grande alteração deste valor, a verificada por aquela autora foi bem mais gradual do que a constatada neste caso. Aqui, apenas entre a 2ª e a 3ª passagem do VPNAc em *D. saccharalis* houve uma redução de quase 130 vezes na DL₅₀.

A explicação para esse aumento de patogenicidade de alguns baculovírus para novos hospedeiros dada por alguns pesquisadores é que, a partir de uma alta dose inicial do vírus, ocorre uma seleção efetiva de genomas virais infectivos para os hospedeiros durante as passagens (STAIRS e cols., 1981; RIBEIRO, 1985), sendo talvez esta a justificativa do aumento ser lento e gradual.

Ao contrário do que ocorreu nesses casos, aqui o primeiro inóculo de VPNAc em *D. saccharalis* foi de E2, uma variante geneticamente homogênea (SMITH & SUMMERS, 1978). Neste caso, a explicação mais provável para essa brusca modificação da virulência é que tenham ocorrido mudanças a nível de material genético de E2 na 1ª e/ou 2ª passagem do vírus em *D. saccharalis*. Uma dessas alterações estaria relacionada ao aumento da patogenicidade e

velocidade de ação do vírus sobre as lagartas de *D. saccharalis*. A partir daí, agora com uma população heterogênea, os virions cujo DNA capacitasse-os a serem mais infecciosos teriam sido selecionados durante as outras passagens e/ou poderiam ter continuado a sofrer alterações.

Isso é possível pois já foram descritos vários casos de alteração do DNA viral após passagem em hospedeiros alternativos ou mesmo no hospedeiro original (VAIL e cols., 1982; CROIZIER e cols., 1985), sendo que em alguns deles verificou-se que havia uma sequência inserida no DNA do vírus que provinha da célula hospedeira (BURAND & SUMMERS, 1982; MILLER & MILLER, 1982; CARSTENS, 1987; BEAMES & SUMMERS, 1988).

WOOD e cols. (1981) sugeriram que são necessárias apenas sutis mudanças no genoma viral para que ocorra alteração da virulência. Eles obtiveram isolados de VPNAc com virulências significativamente diferentes mas não observaram mudanças nos padrões de restrição do DNA viral. Este mesmo resultado foi obtido por MARTIGNONI & IWAI (1986) para VPN de *Orygia pseudotsugata*.

A forma cúbica dos cristais virais que surgiu durante as passagens seriadas dificilmente deve ser a causa do aumento de 1000 vezes da virulência, pois em IV-4 essa perfazia apenas cerca de 20% do total de vírus.

Essas formas cúbicas provavelmente devem ser devidas a mutações no gene da poliedrina à semelhança do encontrado por CARSTENS e cols. (1986). Estes autores comprovaram que a aparência cúbica de um mutante de VPNAc obtido por BROWN e cols. (1980) que produzia apenas um único e enorme (15µm de lado) corpo de inclusão por célula era devida a uma mutação puntual que causou a substituição de prolina por leucina no aminoácido 58 da poliedrina. Esta única mutação foi a responsável pela aparência cúbica do vírus e pela mobilidade alterada do polipeptídeo em gel de SDS e poliacrilamida.

Em relação ao aumento de virulência acompanhado de aumento de tamanho dos cristais virais, obtivemos resultados semelhantes aos de TOMPKINS e cols. (1981). Seus isolados virais, após passarem 2 vezes por larvas de *T. ni*, apresentaram poliedros 5 vezes maior em volume, além de 1,24 vezes mais virions por poliedro e 1,3 vezes mais nucleocapsídeos por virion. Esse maior número de virions e nucleocapsídeos poderia explicar, em parte, o aumento de 10 vezes na virulência obtido para larvas daquela espécie.

No nosso caso, o aumento de volume dos cristais virais em cerca de 2 vezes pode, como no caso anterior, ter sido acompanhado por um aumento do número de virions e nucleocapsídeos, mas certamente não explica o aumento de 1000 vezes da virulência do VPNAc.

Da mesma maneira, neste trabalho e no de TOMPKINS e cols., observou-se a redução da produção de cristais virais pelos respectivos hospedeiros utilizados. Enquanto que esses autores, após 2 passagens seriadas, observaram uma redução de 2 vezes na produção de vírus, nós obtivemos uma diminuição progressiva que, após 4 passagens, foi 16 vezes menor e na 5ª passagem (IV-4 → IV-5) ocorreu uma quase ausência de cristais virais.

Os dados sugerem que ocorreu algo semelhante aos mutantes FP, que produzem poucos poliedros por célula como já foi descrito anteriormente, ou, mais provavelmente, ao mutante morfológico que não produz corpo de inclusão, como o encontrado por DUNCAN & FAULKNER (1982) e DUNCAN e cols. (1983). Esses autores obtiveram um mutante de VPNAc que produzia quantidades normais de virions e que sintetizava poliedrina normalmente, mas que não formava corpo de inclusão. CARSTENS e cols. (1987) constataram que a incapacidade de formar o corpo de inclusão era devida a uma mutação puntual no gene da poliedrina desse mutante que causou uma substituição de fenilalanina por leucina na posição 84 da cadeia de aminoácidos.

Outro fato conhecido que pode impedir a formação do corpo de inclusão é a alteração de proteínas do envelope viral ou a sua ausência (WOOD, 1980b). Estudos de microscopia eletrônica demonstram que vírus submetidos a muitas passagens seriadas em cultura de células de insetos mostram defeitos nos processos de aquisição do envelope viral e de inclusão (MILLER, 1986).

Quanto às proteínas estruturais dos diferentes isolados de VPNAc, o número de polipeptídeos encontrados e seus respectivos pesos moleculares foram semelhantes a dados já descritos por outros autores. Analisando as proteínas dos virions de diferentes isolados de VPNAc em gel de SDS e poliácridamida, SUMMERS & SMITH (1978) encontraram 24 polipeptídeos cujos pesos moleculares variaram de 16000 a 150000 daltons, MARUNIAK e cols. (1979), 22 polipeptídeos com pesos entre 16000 e 125000 daltons, VLAK (1979), 22 polipeptídeos com pesos entre 11600 e 93000 daltons e MASKOS & MILTENBURGER (1981), 22 polipeptídeos com pesos entre 12400 e 92500 daltons.

É difícil comparar diretamente esse tipo de resultado com o de outros trabalhos pois inúmeros fatores podem provocar diferenças na obtenção dos dados. Dentre esses fatores estão, por exemplo, a não-inativação da protease alcalina, fazendo com que aumente o número de bandas encontradas, diferentes tempos de corrida eletroforética, diferentes tampões e concentrações dos géis, erros de extrapolação nos gráficos de pesos moleculares em função da mobilidade e hospedeiro a partir do qual foi isolado o vírus. Por isso, neste trabalho as comparações dos padrões eletroforéticos foram feitas no mesmo gel e com o mesmo tratamento para se evitar erros já mencionados que ocorrem quando se comparam géis diferentes.

A poliedrina apresentou um peso molecular médio de 31300 daltons, o qual está de acordo com outros trabalhos em que se

utilizou eletroforese para a determinação do peso molecular desta proteína. Para a poliedrina de VPNAc, CIBULSKY e cols. (1977a) e MASKOS & MILTENBURGER (1981) encontraram um peso molecular de 29000 daltons, SUMMERS & SMITH (1978), MARUNIAK e cols. (1979), SUMMERS e cols. (1980) e MARUNIAK & SUMMERS (1981), 30000 daltons e CAVALLARO (1988), 32000 daltons.

Essa proteína não apresentou diferença entre os 5 isolados de VPNAc, apoiando a hipótese de que é uma proteína específica do vírus e que é um produto gênico estável, o qual não se modifica após contínuas passagens por um sistema biológico alternativo (MARUNIAK e cols., 1979; MASKOS & MILTENBURGER, 1981).

Esse mesmo resultado não ocorreu em relação às outras proteínas dos mesmos isolados após a variante genética E2 de VPNAc passar sucessivamente em *Diatraea saccharalis*. Além de ocorrerem modificações à nível protéico, estas foram graduais, da mesma maneira que foram as alterações biológicas. Quando os vírus foram purificados por centrifugação diferencial, a eletroforese identificou os mesmos 3 grupos de vírus encontrados quanto à diferença na atividade biológica em relação a *Diatraea saccharalis*: E2/IV-1, IV-2 e IV-3/IV-4.

CIBULSKY e cols. (1977b), MARUNIAK e cols. (1979), HOTCHKIN (1981) e MASKOS & MILTENBURGER (1981) descreveram casos semelhantes onde foram detectadas diferenças no padrão eletroforético de proteínas dos virions quando o vírus foi

inoculado em um outro hospedeiro.

Sabe-se que diferenças na mobilidade eletroforética no sistema de SDS e poliacrilamida podem ocorrer quando apenas 1 aminoácido é modificado numa proteína (DE JONG e cols., 1978; CARSTENS e cols., 1986). Isto é o que pode ter ocorrido, por exemplo, com o polipeptídeo P-12, que apresentou uma diferença média de 1000 daltons entre E2/IV-1 e IV-2, IV-3/IV-4.

O tratamento adicional com SDS e 2-mercaptoetanol na purificação dos vírus não permitiu que as diferenças entre os 5 isolados de VPNAc fossem evidenciadas. A explicação para isso permanece para ser melhor estudada e pode auxiliar na identificação dos polipeptídeos alterados.

Se ocorrem alterações na virulência de um vírus para um determinado hospedeiro, é possível que estas estejam relacionadas às proteínas do envelope viral, pois este é importante na especificidade do vírus já que interage com a membrana da célula intestinal do inseto para dar início ao processo de infecção (KEDDIE & VOLKMAN, 1985; MAZZONE, 1985).

Segundo VLAK (1979), a maioria das proteínas estruturais dos baculovírus é sintetizada por eles próprios, mas algumas podem ser derivadas da célula hospedeira como, por exemplo, as do envelope viral, que podem ser adquiridas quando o nucleocapsídeo sai da célula carregando proteínas da sua membrana. Além disso, de

acordo com SMITH & SUMMERS (1978), diferenças polipeptídicas podem ser resultado de mecanismos regulatórios da maturação do vírus, de polipeptídeos precursores incorporados às proteínas estruturais do vírus ou de variação genética na população.

Alterações à nível de regulação dos vários passos da infecção viral, inclusive de ação do vírus sobre o DNA do hospedeiro, são também hipóteses possíveis para explicar alterações de virulência.

Modificações desse tipo ou de proteínas estruturais codificadas pelo vírus certamente encontram-se codificadas no DNA viral. Entretanto, ressalta-se novamente que apenas sutis mudanças na sequência gênica do vírus são necessárias para que isso ocorra (WOOD e cols., 1981).

A passagem seriada de uma variante geneticamente homogênea de VPNAc em *Diatraea saccharalis* provocou uma série de alterações biológicas e estruturais neste vírus, sem sabermos exatamente se qualquer uma delas estão diretamente relacionadas umas as outras. As evidências mais fortes são quanto aos 3 grupos de vírus, E2/IV-1, IV-2 e IV-3/IV-4, que foram identificados a nível de atividade biológica e de proteínas estruturais, os quais indicam uma possível relação entre estas proteínas e a alteração de virulência.

Os resultados mostraram que, sob diversos aspectos, alguns dos isolados foram considerados significativamente diferentes de outros, o que deve refletir-se também a nível genético. Isso, aliado ao fato de que inicialmente partiu-se de um inóculo viral geneticamente homogêneo, indica que houveram alterações ou mutações no DNA viral durante as passagens do VPNAc em *Diatraea saccharalis*. Essas alterações ou teriam provocado o surgimento de uma variabilidade genética na população e foram sendo selecionadas ou então foram sofrendo contínuas modificações, as quais, por sua vez, traduziram-se em alterações fenotípicas.

O primeiro passo a ser dado para que essa hipótese seja elucidada deve ser a análise do perfil de restrição do DNA dos vários isolados virais. Isso nos permitirá verificar se ocorreu realmente alguma alteração e se foi do tipo adição e/ou deleção de nucleotídeos. Ocorrendo adição e/ou deleção, deve-se procurar saber sua origem e seu efeito sobre a alteração da virulência.

Devido ao fato do VPNAc ter passado em *D. saccharalis*, esse vírus teve sua virulência aumentada para essa espécie. Dessa forma, embora sem se conhecer os mecanismos de como isso ocorre, este trabalho comprovou mais uma vez que a passagem seriada de um vírus em hospedeiro alternativo é um bom método de manipulação genética e seleção de isolados virais.

5. RESUMO

Foram realizadas cinco passagens seriadas do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) no hospedeiro alternativo *Diatraea saccharalis*, sendo que o inóculo inicial foi uma variante genética deste vírus (E2). Quatro isolados virais foram obtidos (IV-1, IV-2, IV-3 e IV-4), além do VPNAc original (E2). Foram analisados dados de mortalidade, tempo de ação do vírus, estrutura morfológica do cristal viral, produção de vírus por inseto e proteínas estruturais do vírus.

Os principais resultados e conclusões foram:

a) O VPNAc foi capaz de infectar, multiplicar-se e produzir cristais infectivos no hospedeiro alternativo *Diatraea saccharalis*.

b) A virulência do VPNAc para lagartas de *D. saccharalis*, medida através da DL₅₀, aumentou progressivamente em cerca de 1000 vezes.

c) Alguns cristais virais apresentaram forma cúbica ao invés da poliédrica normal, sendo que no último isolado obtido (IV-4) estes perfizeram 20% do total de cristais.

d) Os poliedros de IV-4 foram cerca de 2 vezes maior em volume do que os poliedros do primeiro isolado inoculado (E2).

e) Houve uma redução gradual da produção de vírus por larvas infectadas. Esta diminuição da produção foi de 16 vezes após a 4ª passagem do vírus por *D. saccharalis* e, após a 5ª passagem, ocorreu uma quase ausência de cristais virais.

f) Os isolados de VPNAc apresentaram diferenças quanto a seus polipeptídeos estruturais quando analisados em gel de SDS e poliacrilamida.

g) Dentre os cinco isolados virais estudados, foram identificados três grupos, E2/IV-1, IV-2 e IV-3/IV-4, quanto à atividade biológica e padrões eletroforéticos de suas proteínas estruturais, observando-se um aumento de virulência acompanhado por uma progressiva alteração dos peptídeos. O isolado IV-2 apresentou características intermediárias entre os outros dois grupos, E2/IV-1 e IV-3/IV-4.

h) O tratamento adicional com SDS e 2-mercaptoetanol na purificação dos vírus não permitiu que se evidenciassem as diferenças nos padrões eletroforéticos dos cinco isolados virais.

i) As alterações que ocorreram com o VPNAc provavelmente devem ter sido causadas por modificações do DNA viral provocadas pela passagem do vírus, originalmente uma variante geneticamente homogênea, em larvas do hospedeiro alternativo *D. saccharalis*.

j) A passagem seriada em hospedeiro alternativo é um método que permite fácil manipulação genética e seleção de isolados virais e um importante instrumento na compreensão do complexo sistema patógeno-inseto.

6. SUMMARY

The genetic variant E2 from the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) was serially passed for five generations in its alternate host *Diatraea saccharalis* the sugarcane borer. From these passages four isolates were obtained besides the original inoculum (IV-1, IV-2, IV-3, IV-4 and E2). These isolates were compared to each other considering larval mortality, mode and timing of action, morphology of the polyhedra, polyhedral production and protein profile.

As a result of this analysis the following results and conclusions were reached:

a) The AcNPV-E2 was able to infect and produce infective polyhedra in its alternate host *Diatraea saccharalis*.

b) A drastic and progressive increase in the virulence of the AcNPV isolates, indicated by a thousand fold reduction of the LD₅₀ values, was observed for *D. saccharalis* larvae.

c) The increasing presence of abnormal larger cubic shaped polyhedra opposed to the regular polyhedral shape reaching 20% of the total number of polyhedra in the forth generation of the virus isolate (IV-4).

d) A two fold increase in the number of polyhedral volume was observed when comparing the original (E2) and the selected inoculum (IV-4).

e) A 16 fold reduction in the number of polyhedra produced per gram of infected larvae was observed when comparing the original inoculum (E2) and the forth generation (i.e. virus produced by inoculum IV-3). The inoculation of IV-4 resulted in an almost total absence of polyhedra in the infected larvae.

f) The AcNPV isolates presented differences in the protein profile in the SDS polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

g) Based on the protein profile and biological activity the five isolates can be separated in the three groups, E2/IV-1, IV-2 e IV-3/IV-4, indicating a growing virulence followed by an progressive alteration of peptides. The IV-2 isolate in both perspectives represents an intermediate group.

h) The protein differences were not observed with the treatment of SDS and 2-mercaptoethanol in the purification procedure.

i) The original isolate E2, a genetically homogeneous genetic variant, by being serially passed in the larvae of *D. saccharalis* probably suffered genetic modifications generating new isolates with distinct biological and biochemical characteristics.

j) This work demonstrates the serial passage method in an alternate host is a simple, fast and efficient method for directed genetic manipulation of baculovirus genome and a important tool in understanding the coevolution of this insect-pathogen complex.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, H.W. & SMIRNOFF, W.A. 1983. A morphological investigation of 23 baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 41:269-80.
- BEAMES, B. & SUMMERS, M.D. 1988. Comparisons of host cell DNA insertions and altered transcription at the site of insertions in few polyhedra baculovirus mutants. *Virology*, 162:206-20.
- BENZ, G.A. 1986. Introduction: Historical Perspectives. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.1-35.
- BELLONCIK, S.; LAVALLEE, C. & HAMELIN, C. 1986. Relative pathogenicity of nuclear polyhedrosis virus from *Mamestra brassicae*, *Euxoa messoria*, *Agrotis segetum*, *Autographa californica*, and *Heliothis* spp. for larvae of *Euxoa scandens* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 47:8-11.
- BILIMORIA, S.L. 1986. Taxonomy and identification of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.37-59.
- BLISS, C.I. 1935a. The calculation of the dosage mortality curve. *Ann. appl. Biol.*, 22:134-67.

- BLISS, C.I. 1935b. The comparison of dosage mortality data. *Ann. appl. Biol.*, 22:307-33.
- BROWN, M.; FAULKNER, P.; COCRHAN, 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.*, 50:309-16.
- 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.
- BURGESS, S. 1977. Molecular weights of lepidopteran baculovirus DNAs: derivation by electron microscopy. *J. gen. Virol.*, 37:501-10.
- CAMPOS, H. 1979. *Estatística Experimental Não-paramétrica*. 3ª ed. Piracicaba, Departamento de Matemática e Estatística ESALQ/USP.
- CARSTENS, E.B. 1987. Identification and nucleotide sequence of the regions of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus genome carrying insertion elements derived from *Spodoptera frugiperda*. *Virology*, 161:8-17.

- 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., 58:684-8.
- _____; LIN-BAI, Y. & 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: 901-5.
- CAVALLARO, A.C. 1988. Método de Purificação do Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (VGDs) e Caracterização de seu principal Componente Protéico. Campinas. (Dissertação de Mestrado).
- CIBULSKY, R.J.; HARPER, J.D. & GUDAUSKAS, R.T. 1977a. Biochemical comparison of polyhedral protein from five nuclear polyhedrosis viruses infecting Plusiine larvae (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., 29:182-91.
- _____; _____ & _____. 1977b. Biochemical comparison of virion proteins from five nuclear polyhedrosis viruses infecting Plusiine larvae (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., 30:303-13.

- COCHRAN, M.A.; BROWN, S.E. & KNUDSON, D.L. 1986. Organization and expression of the baculovirus genome. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.239-58.
- _____; 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.*, 41:940-6.
- COELINGH, K.L.W.; MURPHY, B.R.; COLLINS, P.L.; LEBACQ-VERHEYDEN, A. M. & BATTEY, J.F. 1987. Expression of biologically active and antigenically authentic parainfluenza type 3 virus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein by a recombinant baculovirus. *Virology*, 160:465-72.
- CROIZIER, G.; CROIZIER, L.; BIACHE, G. & CHAFAUX, J. 1985. Évolution de la composition génétique et du pouvoir infectieux du baculovirus de *Mamestra brassicae* L. au cours de 25 multiplications successives sur les larves de la Noctuelle du Chou. *Entomophaga*, 30:365-74.
- CUNNINGHAM, J.C. 1970. Strains of nuclear polyhedrosis viruses displaying different inclusion body shapes. *J. Invertebr. Pathol.*, 16:299-300.

- 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.
- DE JONG, W.W.; ZWEERS, A. & COHEN, L.H. 1978. Influence of single amino acid substitutions on electrophoretic mobility of sodium dodecyl sulphate-protein complexes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 82:532-9.
- DUNCAN, R. & FAULKNER, P. 1982. Bromodeoxyuridine-induced mutants of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus defective in occlusion body formation. J. gen. Virol., 62:369-73.
- _____; CHUNG, K.L. & FAULKNER, P. 1983. Analysis of a mutant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with a defect in the morphogenesis of the occlusion body macromolecular lattice. J. gen. Virol., 64:1531-42.
- ESTES, M.K.; CHAN, W.C.; ERICSON, B.; SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. 1987. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. J. Virol., 61:1488-94.
- EPPSTEIN, D.A. & THOMA, J.A. 1975. Alkaline protease associated with the matrix protein of a virus infecting the cabbage looper. Biochem. Biophys. Res. Commun., 62:478-84.

- EPPSTEIN, D.A.; THOMA, J.A.; SCOTT, H.A., & YOUNG, S.Y. 1975. Degradation of matrix protein from a Nuclear-Polyhedrosis Virus of *Trichoplusia ni* by an endogenous protease. *Virology*, 67:591-4.
- FALCON, L.A. & HESS, R.T. 1977. Electron microscope study on the replication of *Autographa* Nuclear Polyhedrosis Virus and *Spodoptera* Nuclear Polyhedrosis Virus in *Spodoptera exigua*. *J. Invertebr. Pathol.*, 29:36-43.
- 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.; SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. 1983. Acquisition of host cell DNA sequences by Baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* Nuclear Polyhedrosis Viruses. *J. Virol.*, 47:287-300.
- GARCIA-CANEDO, A.M.G. 1989. Infecção Mista de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) com dois Baculovírus. Campinas. (Dissertação de Mestrado).

- GARCIA-CANEDO, A.M.G. & PAVAN, O.H.O. 1988. Efeito da infecção mista em *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar) com Vírus de Poliedrose Nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) e Vírus de Granulose de *Diatraea saccharalis* (VGDs). XV Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Piracicaba, p.98.
- 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.89-108.
- 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.
- HAMM, J.J. & STYER, E.L. 1985. Comparative pathology of isolates of *Spodoptera frugiperda* Nuclear Polyhedrosis Virus in *S. frugiperda* and *S. exigua*. J. gen. Virol., 66:1249-61.
- HARPER, J.D. 1976. Cross-infectivity of six plusiine nuclear polyhedrosis virus isolates to plusiine hosts. J. Invertebr. Pathol., 27:275.
- 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.

- HINK, W.F. & STRAUSS, E. 1976. Replication and passage of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus plaque variants in cloned cell cultures and larval stages of four host species. J. Invertebr. Pathol., 27:49-55.
- HOTCHKIN, P.G. 1981. Comparison of virion proteins and granulin from a granulosis virus produced in two host species. J. Invertebr. Pathol., 38:303-4.
- IGNOFFO, C.M. & GARCIA, C. 1968. Formalin inactivation of nuclear-polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol., 10:430-2.
- INUMARU, S. & ROY, P. 1987. Production and characterization of the neutralization antigen VP2 of Bluetongue virus serotype 10 using Baculovirus expression vector virology. Virology, 157:472-9.
- KEDDIE, B.A. & VOLKMAN, L.E. 1985. Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus: importance of the 64K envelope glycoprotein. J. gen. Virol., 66:1195-200.
- KIRSCHBAUM, J.B. 1985. Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control. Ann. Rev. Entomol., 30:51-70.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-5.

- 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 baculovirus expression vectors. Biotechnology, 6:47-55.
- MACEDO, M. & BOTELHO, P.S.M. 1988. Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). Brasil Açucareiro, 106:2-12.
- MALEKI-MILANI, H. 1978. Influence de passages répétés du virus de la polyédrose nucléaire de *Autographa californica* chez *Spodoptera littoralis* (Lep.:Noctuidae). Entomophaga, 23:217-24.
- MARTIGNONI, M.E. & IWAI, J.P. 1986. Propagation of multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* in larvae of *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol., 47:32-41.
- MARUNIAK, J.E. 1986. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. The Biology of Baculoviruses. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.129-46.
- _____ & SUMMERS, M.D. 1978. Comparative peptide mapping of Baculovirus proteins. J. Invertebr. Pathol., 32:196-201.

- MARUNIAK, J.E. & SUMMERS, M.D. 1981. *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus phosphoproteins and synthesis of intracellular proteins after virus infection. *Virology*, 109:25-34.
- _____, _____, FALCON, L.A. & SMITH, G.E. 1979. *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus structural proteins compared from *in vivo* and *in vitro* sources. *Intervirology*, 11:82-8.
- MASKOS, C.B. & MILTENBURGER, H.G. 1981. SDS-PAGE comparative studies on the polyhedral and viral polypeptides of the nuclear polyhedrosis viruses of *Mamestra brassicae*, *Autographa californica*, and *Lymantria dispar*. *J. Invertebr. Pathol.*, 37:174-80.
- MATTHEWS, R.E.F. 1985. Viral taxonomy for the nonvirologist. *Ann. Rev. Microbiol.*, 39:451-74.
- MAZZONE, H.M. 1985. Pathology associated with baculovirus infection. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press. p.81-120.
- MCCARTHY, W.J. & LIU, S.Y. 1976. Electrophoretic and serological characterization of *Porthetria dispar* polyhedron protein. *J. Invertebr. Pathol.*, 28:57-65.

- McINTOSH, A.H. & IGNOFFO, C.M. 1986. Restriction endonuclease cleavage patterns of commercial and serially passaged isolates of *Heliothis* baculovirus. Intervirology, 25:172-6.
- MILLER, D.W. & MILLER, L.K. 1982. A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element. Nature, 299:562-4.
- MILLER, L.K. 1986. The Genetics of Baculoviruses. In: GRANADOS, R. R. & FEDERICI, B.A., eds. The Biology of Baculoviruses. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 217-38.
- _____. 1988. Baculoviruses as gene expression vectors. Ann. Rev. Microbiol., 42:177-99.
- _____ & DAWES, K.P. 1978. Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses: *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni* MNPV. Appl. Environ. Microbiol., 35:1206-10.
- _____, FRANZBLAU, S.G.; HOMAN, H.W. & KISH, L.P. 1980. A new variant of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. J. Invertebr. Pathol., 36:159-65.
- MONROE, J.E. & MCCARTHY, W.J. 1984. Polypeptide analysis of genotypic variants of occluded *Heliothis* spp. baculoviruses. J. Invertebr. Pathol., 43:32-40.

- PAVAN, O.H.O.; BOUCIAS, D.G. & PENDLAND, J.C. 1981. The effects of serial passage of a nucleopolyhedrosis virus through an alternate host system. *Entomophaga*, 26:99-108.
- ____; ____; ALMEIDA, L.C.; GASPAR, J.O.; BOTELHO, P.S.M. & DEGASPARI, N. 1983. A granulosis virus of *Diatraea saccharalis* Fabr. I. Pathogenicity, replication and ultrastructure. International Congress ISSCT, Havana, 18:644-59.
- PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C. & MILLER, L.K. 1984. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Mol. Cell. Biol.*, 4:399-406.
- PIEDRABUENA, A.E. 1975. Contribuição ao Estudo das Doses Letais. Campinas. (Tese de Doutorado).
- 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.
- RANKIN, C.; OOI, B.G. & MILLER, L.K. 1988. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene*, 70:39-49.

- REIGANUM, C. 1984. Polyacrylamide gel electrophoresis of Baculovirus proteins: a simplified and sensitive modification for differentiating between isolates. *J. Invertebr. Pathol.*, 44:134-9.
- RIBEIRO, H.C.T. 1985. Seleção Genética e Interação de Baculovírus em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). Campinas. (Dissertação de Mestrado).
- _____. 1989. Seleção Genética e Dinâmica de Baculovírus a diferentes fatores, em *Diatraea saccharalis*. Campinas. (Tese de Doutorado).
- ROBERTS, P.L. 1985. Isolation of large and small plaque variants of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Arch. Virol.*, 85:123-8.
- RODRIGUES, J.J.S. & PAVAN, O.H.O. 1988a. Aumento da virulência do Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* (VPNAc) em *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). XV Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Piracicaba, p.99.
- _____. & _____. 1988b. Caracterização protéica de Vírus de Poliedrose Nuclear de *Autographa californica* selecionados em *Diatraea saccharalis*. XXXIV Congresso Nacional de Genética, São Paulo, p.858.

- ROHRMANN, G.F. 1986a. Evolution of occluded baculoviruses. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., eds. *The Biology of Baculoviruses*. Vol. I. Boca Raton, Florida, CRC Press. p.203-15.
- ROHRMANN, G.F. 1986b. Polyhedrin structure. *J. gen. Virol.*, 67:1499-513.
- SCHMALJOHN, C.S.; SUGIYAMA, K.; SCHMALJOHN, A.L. & BISHOP, D.H.L. 1988. Baculovirus expression of the small genome segment of Hantaan virus and potential use of the expressed nucleocapsid protein as a diagnostic antigen. *J. gen. Virol.*, 69:777-86.
- SINGH, S.P.; GUDAUSKAS, R.T.; HARPER, J.D. & EDWARDS, J. 1985. Two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 45:249-51.
- 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.
- 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.
- _____; FRASER, M.J. & SUMMERS, M.D. 1983a. Molecular engineering of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. J. Virol., 46:584-93.
- _____; SUMMERS, M.D. & FRASER, M.J. 1983b. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Mol. Cell. Biol., 3:2156-65.
- STAIRS, 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.
- SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. 1975. *Trichoplusia ni* granulosus virus granulin: a phenol-soluble phosphorylated protein. J. Virol., 16:1108-16.
- _____ & _____. 1978. Baculovirus structural polypeptides. Virology, 84:390-402.

SUMMERS, M.D. & SMITH, G.E. 1987. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station, Bull. 1555.

_____, _____, KNELL, J.D. & BURAND, J.P. 1980. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* Nuclear Polyhedrosis Virus recombinants. J. Virol., 34:693-703.

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.

TWEETEN, K.A.; BULLA Jr., L.A. & CONSIGLI, R.A. 1978. Characterization of an alkaline protease associated with a granulosis virus of *Plodia interpunctella*. J. Virol., 26:702-11.

_____, _____ & _____. 1980. Structural polypeptides of the granulosis virus of *Plodia interpunctella*. J. Virol., 33:877-86.

VAIL, P.V. & JAY, D.L. 1973. Pathology of a Nuclear Polyhedrosis Virus of the alfalfa looper in alternate hosts. J. Invertebr. Pathol., 21:198-204.

- VAIL, P.V.; SUTTER, G.; JAY, D.L. & GOUGH, D. 1971. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. *J. Invertebr. Pathol.*, 17:383-8.
- _____; JAY, D.L. & HUNTER, D.K. 1973. Infectivity of a nuclear polyhedrosis virus from the alfalfa looper, *Autographa californica*, after passage through alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 21:16-20.
- _____; KNELL, J.D.; SUMMERS, M.D. & COWAN, D.K. 1982. *In vivo* infectivity of Baculovirus isolates, variants and natural recombinants in alternate hosts. *Environ. Entomol.*, 11:1187-92.
- VAUGHN, J.L. & DOUGHERTY, E.M. 1985. The replication of baculoviruses. In: MARAMOROSCH, K. & SHERMAN, K.E., eds. *Viral Insecticides for Biological Control*. New York, Academic Press. p.569-633.
- VLAK, J.M. 1979. The proteins of nonoccluded *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus in an established cell line of *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.*, 34:110-8.
- _____. 1980. Mapping of BamHI and SmaI DNA restriction sites on the genome of the nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper, *Autographa californica*. *J. Invertebr. Pathol.*, 36:409-14.

- VLAK, J.M. & SMITH, G.E. 1982. Orientation of the genome of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus: a proposal. J. Virol., 41:1118-21.
- WEBER, K. & OSBORN, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bioch. Chem., 244:4406-12.
- WHITT, M.A. & MANNING, J.S. 1987. Role of chelating agents, monovalent anion and cation in the dissociation of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus occlusion body. J. Invertebr. Pathol., 49:61-9.
- WOOD, H.A. 1980a. Protease degradation of AcNPV proteins. Virology, 103:392-9.
- _____. 1980b. Isolation and replication of an occlusion body-deficient mutant of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. Virology, 105:338-44.
- _____; HUGHES, P.R.; JOHNSTON, L.B. & LANGRIDGE, W.H.R. 1981. Increased virulence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus by mutagenesis. J. Invertebr. Pathol., 38:236-41.

ZETHNER, O.; BROWN, D.A. & HARRAP, K.A. 1979. Comparative studies on the nuclear polyhedrosis viruses of *Lymantria monacha* and *L. dispar*. J. Invertebr. Pathol., 34:178-83.

8. ANEXOS

Anexo 1. Soluções utilizadas para eletroforese e concentração dos constituintes dos géis de SDS e poliacrilamida.

- a. Tampão de amostra:
- | | |
|--------------------|---------|
| Tris | 0,124 M |
| SDS | 4% |
| 2-Mercaptoetanol | 10% |
| Glicerol | 20% |
| Azul de bromofenol | 0,02% |
- b. Tampão da cuba de eletroforese:
- | | | |
|---------|---------|--------|
| Tris | 25 mM | |
| Glicina | 0,192 M | pH 8,3 |
| SDS | 0,1% | |
- c. Corante:
- | | |
|----------------|-------|
| Coomassie blue | 0,25% |
| Metanol | 45% |
| Ácido acético | 19% |
- d. Descorante:
- | | |
|---------------|-----|
| Metanol | 30% |
| Ácido acético | 7% |
- e. Gel de empacotamento:
- | | |
|----------------------|-----------------|
| Acrilamida | 3,9% |
| Tris-HCl | 0,125 M, pH 6,8 |
| SDS | 0,1% |
| Persulfato de amônio | 0,05% |
| TEMED | 0,05% |
- f. Gel de separação:
- | | |
|----------------------|---------------------------|
| Acrilamida | 8-18%, gradiente contínuo |
| Tris-HCl | 0,375 M, pH 8,8 |
| SDS | 0,1% |
| Persulfato de amônio | 0,04% |
| TEMED | 0,04% |
| Glicerol | 0-10%, gradiente contínuo |

Anexo 2. Diâmetro (micrômetros) dos isolados virais E2 e IV-4.

diâmetro (μm)	E2	IV-4	
		poliédrico	cúbico
0,45	14	1	-
0,67	30	-	-
0,90	105	17	-
1,13	274	56	-
1,35	298	266	5
1,58	97	292	39
1,80	13	192	76
2,03	3	81	71
2,25	1	22	26
2,48	-	4	7
2,70	-	1	2
2,93	-	-	1
3,15	-	1	-
TOTAL	835	933	227

Anexo 3. Produção de cristais virais por grama de peso larval de *Diatraea saccharalis*.

IV inoculado	IV produzido	produção
E2	IV-1	$10,00 \times 10^8$
		$37,00 \times 10^8$
		$60,10 \times 10^8$
IV-1	IV-2	$1,92 \times 10^8$
		$6,20 \times 10^8$
		$16,60 \times 10^8$
		$44,30 \times 10^8$
IV-2	IV-3	$3,14 \times 10^8$
		$6,00 \times 10^8$
		$11,20 \times 10^8$
		$16,00 \times 10^8$
IV-3	IV-4	$1,50 \times 10^8$
		$1,91 \times 10^8$
		$3,18 \times 10^8$

Anexo 4. Pesos moleculares (daltons) dos polipeptídeos estruturais dos 5 isolados de VPNAc.

polipetídeo	gel 1	gel 2	gel 3
P-1	93000	85000	82000
P-2	88000	80000	78000
P-3	81000	72000	71000
P-4	75000	69000	68000
P-5	65000	63000	63000
P-6	62000	60000	59000
P-7	59000	59000	55000
P-8	56000	57000	50000
P-9	53000	54000	49000
P-10	51000	49000	48000
P-11	49000	47000	45500
P-12	44000	44000	41000
P-13	42500	41000	40000
P-14	39500	37000	35500
P-15	32000	32000	30000
P-16	30000	30000	28500
P-17	25000	26000	24000
P-18	23500	24000	22500
P-19	22000	23000	21500
P-20	19000	21500	19500
P-21	18000	20000	19000
P-22	15500	18500	16500
P-23	14500	18000	16000