



Análise filogenética de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV baseada no gene de virulência *p74*

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 235

Análise filogenética de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV baseada no gene de virulência *p74*

Geraldo F. Almeida

Débora Pires Paula

Zilda Maria de Araújo Ribeiro

Marlinda L. Souza

Maria Elita B. Castro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Miguel Borges*

Secretária-Executiva: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Diva Maria de Alencar Dusi*
Luiz Adriano Maia Cordeiro
José Roberto de Alencar Moreira
Regina Maria Dechechi G. Carneiro
Samuel Rezende Paiva

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*
Margot Alves Nunes Dode

Supervisor editorial: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Foto: Lagarta de *Condylorrhiza vestigialis*, conhecida como Mariposa-do-Álamo. (A) Lagarta infectada pelo baculovirus CvMNPV. (B) Lagarta não-infectada.

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

A 532 Análise filogenética de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV baseada no gene de virulência p74/ Geraldo F. Almeida... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 235).

1. *Condylorrhiza vestigialis* - baculovirus. 2. *Condylorrhiza vestigilis* – lagarta – controle biológico. 3. Álamo. I. Almeida, Geraldo F. II. Série.

632.96 – CDD 21

Sumário

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	13
Conclusões	22
Referências	23

Análise filogenética de *Condylorrhiza vestigialis* MNPV baseada no gene de virulência *p74*

Geraldo F. Almeida¹

Débora Pires Paula²

Zilda Maria de Araújo Ribeiro³

Marlinda L. Souza²

Maria Elita B. Castro²

Resumo

Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus (CvMNPV) é um baculovirus patogênico a lagartas de *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), uma praga de uma espécie florestal, conhecida como Álamo (*Populus* spp., Salicaceae), de considerável importância econômica. Este baculovirus foi recentemente identificado e pouca informação pertinente à sua taxonomia tem sido relatada. No estudo apresentado, o gene *p74* de CvMNPV foi seqüenciado, e sua relação filogenética com outros baculovirus estimada. O gene *p74* codifica uma proteína altamente conservada e é essencial para a infectividade do ODV. A identificação e sequenciamento do gene *p74* de CvMNPV mostrou uma ORF de 1935pb (nº de acesso EU919397 no *GenBank*/EMBL) que potencialmente codifica um polipeptídeo de 644aa com massa molecular predita de 73.613Da. A análise filogenética baseada na seqüência do gene *p74* de CvMNPV manteve a divisão da família *Baculoviridae* e forneceu dados consistentes que o CvMNPV pertence ao Grupo I dos NPV e está mais proximamente relacionado com *Choristoneura fumiferana defective* NPV. Estes resultados constituem uma importante contribuição para a caracterização deste novo vírus (CvMNPV), o qual possui grande potencial para o controle biológico de lagartas *Condylorrhiza vestigialis*.

Palavras-chave: baculovirus, gene *p74*, infectividade oral, *Condylorrhiza vestigialis*, *Populus*.

¹Biólogo, mestrando, Universidade de Brasília / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Bióloga, Ph.D, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Phylogenetic analysis of *Condylorrhiza vestigialis* MNPV based on the *p74* virulence gene

Abstract

Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus (CvMNPV) is a baculovirus pathogenic to *Condylorrhiza vestigialis* caterpillars (Guenée, 1854) (Lepidoptera: Crambidae), a pest of a forest species known as Poplar (*Populus* spp., Salicaceae) of considerable economic importance. This baculovirus was recently identified and few informations pertaining to its taxonomy has been reported. In the present study, the *p74* gene from CvMNPV was sequenced and its phylogenetic relationship with other baculoviruses estimated. The gene *p74* encodes a protein that is highly conserved among all sequenced baculoviruses and is essential for ODV infectivity. The identification and sequencing of the CvMNPV *p74* gene showed an ORF of 1935bp (*GenBank*/EMBL accession number EU919397) that potentially encodes a polypeptide of 644 amino acids with predicted molecular mass of 73.6133 kDa. Phylogenetic analysis based on the CvMNPVp74 deduced amino acid and nucleotide sequences maintained the division of the *Baculoviridae* family and provided consistent data to affirm that the CvMNPV baculovirus belongs to the lepidopteran NPV Group I, and that the CvMNPV is most closely related with *Choristoneura fumiferana* defective NPV (CfDEFNPV). These results constitute an important contribution to characterization of this new virus (CvMNPV) which has a high potential for biological control of *Condylorrhiza vestigialis* larvae.

Keywords: baculovirus, *p74* gene, oral infectivity, *Condylorrhiza vestigialis*, *Populus*.

Introdução

A família *Baculoviridae* é um grupo de vírus entomopatogênicos que infectam artrópodes, principalmente insetos da ordem Lepidoptera (THEILMANN et al., 2005). Os baculovirus têm sido classificados de acordo com o tamanho, a forma e a localização intracelular dos corpos de oclusão (OB) que se formam em células infectadas (HERNIOU et al., 2001). A classificação taxonômica dessa família compreende em dois gêneros: os *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e os *Granulovirus* (GV) (THEILMANN et al., 2005).

Esses dois gêneros apresentam uma diferença marcante com relação à proteína estrutural presente na oclusão cristalina do vírus. Enquanto nos vírus NPV a proteína presente em grande quantidade é a poliedrina, nos GV é a granulina. Estudos filogenéticos de baculovirus, utilizando o gene da poliedrina e posteriormente outros genes conservados, propuseram uma subdivisão dos NPV em Grupo I e Grupo II (ZANOTTO et al., 1993; revisado por HERNIOU et al., 2003).

Diferentemente de outras famílias de vírus, os baculovirus apresentam dois fenótipos: *budded virus* (BV) e *occlusion-derived virus* (ODV) (THEILMANN et al., 2005), que são estruturalmente e funcionalmente distintos em seus ciclos de infecção (ZHOU et al., 2005).

Os ODV estabelecem a primeira fase de infecção dentro da larva hospedeira (infecção primária) e são responsáveis pela transmissão horizontal da infecção, ou seja, a propagação da infecção ocorre entre os insetos hospedeiros, o que garante a permanência do vírus no ambiente. Os BV estabelecem a segunda fase de infecção (infecção secundária), sendo responsáveis pela infecção sistêmica (célula-célula) no hospedeiro (HAAS-STAPLETON et al., 2004) e também pela infecção em cultura de células.

A principal rota de infecção dos baculovirus envolve o fenótipo ODV. Na natureza, a infecção primária começa no intestino médio da larva após a ingestão de corpos de oclusão (OB), também chamados de poliedros. O ambiente altamente alcalino encontrado no intestino médio da larva causa a dissolução destes poliedros e consequentemente a liberação de ODVs (HAAS-STAPLETON et al., 2004; ZHOU et al., 2005). Os ODV liberados atravessam a membrana peritrófica do epitélio do intestino médio (FEDERICI, 1997; HAAS-STAPLETON et al., 2004) e interagem com as membranas das microvilosidades das células colunares e por fusão direta com essa membrana os vírions são desempacotados e penetram na célula via endossomo (SLACK et al., 2001). Os nucleocapsídeos escapam dos endossomos e agora livres no citoplasma, podem seguir duas vias distintas: podem ser transportados para o núcleo das células colunares, iniciando a replicação de novos nucleocapsídeos ou podem migrar

diretamente para a membrana plasmática baso-lateral, de onde brotam e já iniciam a infecção sistêmica. Os novos nucleocapsídeos que se formam no núcleo celular, também brotam pela membrana baso-lateral da célula hospedeira e adquirem um envelope lipídico com proteínas codificadas pelo próprio vírus, formando os vírus extracelulares ou *budded virus* (BV) (BILIMORIA, 1991; O'REILLY et al., 1992; FAULKNER et al., 1997), que Tanto os BV que foram produzidos no núcleo, quanto àqueles que passaram diretamente pelas células colunares, penetram na hemolinfa via membrana baso-lateral, infectam os hemócitos e invadem o sistema traqueal do inseto, onde se espalham pelos túbulos de Malpighi, tecido muscular, tecido adiposo e outros tecidos, até culminar na morte da lagarta hospedeira (ZHOU et al., 2005).

Gene *p74*

O processo de interação ODV x células epiteliais do inseto é mediado, em parte, por produtos de fatores de infectividade oral (PIF, *per os infectivity factor*) altamente conservados, que são essenciais para a infectividade dos ODV, mas completamente dispensáveis para a infectividade de BV (HAAS-STAPLETON et al., 2004). Sendo assim, os PIF são proteínas estruturais requeridas para os eventos iniciais da infecção primária (infecção *per os*).

O primeiro gene *pif* a ser relatado foi o *p74* de AcMNPV (KUZIO et al., 1989). O gene de virulência *p74* é do tipo *very late* (KUZIO et al., 1989), o que é de se esperar, pois de acordo com o processo de replicação dos baculovirus as partículas ODV são formadas no estágio mais avançado da infecção.

Este gene codifica uma proteína de 74 kDa, localizada no envelope ODV. A proteína P74 participa do processo de interação ODV x células colunares do intestino médio da larva, podendo estar individualmente ou cooperativamente com outras proteínas (PIF, PIF-2, ODV-E66, ODV-E25...) envolvida nos eventos iniciais da infecção oral no inseto (SLACK et al., 2001; RASHIDAN et al., 2003; BEILACH et al., 2006).

Aspectos Filogenéticos

O gene *p74* é altamente conservado e a proteína está presente em todos os baculovirus já seqüenciados, o que pode implicar em uma rota comum de entrada do vírus na célula (FAULKNER et al., 1997). Este papel crucial da P74 na geração de progênies capazes de se propagar na natureza somado a uma variabilidade alta da região genômica em torno do *locus* *p74* sugere que este gene foi requerido nos estágios iniciais da diversificação da família

Baculoviridae, por isso esta região foi sujeita a uma seleção biológica positiva durante a evolução, em contraste com a região dos genes vizinhos que por variarem menos têm uma menor pressão seletiva (BELAICH et al., 2006). É importante destacar, que o genoma dos baculovirus é naturalmente muito flexível, ocorrendo, na história evolucionária, vários rearranjos e recombinações gênicas (HERNIOU et al., 2001; 2003).

Tradicionalmente, as seqüências das proteínas dos OB, granulina e poliedrina, têm sido usadas para determinar a relação filogenética entre os membros da família *Baculoviridae*, porém este tipo de abordagem utilizando um único gene tem sido questionado (HERNIOU et al., 2001; KOONIN et al., 2000). Estas proteínas possuem uma seqüência pequena, fornecendo dados limitados e, além disso, a maioria dos resíduos de aminoácidos é bastante conservada entre os baculovirus, oferecendo poucas regiões para estimativas filogenéticas (BULACH et al., 1999). Koonin et al. (2000) têm mostrado ser mais plausível o uso de vários genes conservados ou de toda a seqüência genômica em estudos filogenéticos, pois contêm vários níveis de informação e apresentam análises menos conflitantes em comparação às observadas entre filogenias baseadas em diferentes genes conservados. Porém, estudos realizados utilizando a seqüência da proteína P74 de baculovirus têm dado uma importante contribuição aos estudos filogenéticos dos baculovirus indicando com maior clareza a divisão de grupos de baculovirus dentro de seus gêneros (RASHIDAN et al.; 2003, 2004; BELAICH et al., 2006).

Um recente estudo de similaridades indicou que a seqüência gênica do *p74* dos NPV do Grupo I é mais conservada que a seqüência *p74* presente nos outros grupos da família *Baculoviridae* (NPV II e GV) (BELAICH et al., 2006). É importante ressaltar, que embora a proteína seja conservada entre os diversos tipos de baculovirus, esta possui uma seqüência de aminoácidos diversificada e mesmo entre os membros do próprio grupo poucas regiões são conservadas (BELAICH et al., 2006). Este fato, mais uma vez sugere que esta proteína pode estar associada com a variedade de hospedeiros que o vírus pode infectar e que pode ser uma ferramenta muito importante no estudo da filogenia molecular dos baculovirus.

Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus (CvMNPV)

Condylorrhiza vestigialis MNPV é um vírus patogênico à lagarta *Condylorrhiza vestigialis*, uma praga que causa sérios danos à cultura do álamo. O álamo é uma espécie florestal de alta importância econômica mediante a sua utilização na indústria de palitos, farmacêutica e na produção de biocombustível. Essa planta, também conhecida como choupo, pertence ao gênero *Populus* (família: Salicaceae) (Fig. 1), é encontrada principalmente na região sul do Brasil, Europa, América do Norte e oeste da Ásia (MAY-DE-MIO e AMORIM, 2000).

Diante do interesse pelo uso do baculovirus CvMNPV como bioinseticida, uma alternativa promissora para o controle da lagarta do álamo (Fig. 2), estudos vêm sendo conduzidos no Laboratório de Virologia de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) visando a caracterização deste vírus por meio de análises morfológica, bioquímica e molecular. Como parte destes estudos, o presente trabalho relata principalmente resultados sobre as relações filogenéticas de CvMNPV com outros baculovirus, também já identificados, com base no gene de virulência *p74*.



Fig.1. Plantação de álamo, família Salicaceae, gênero *Populus*. Foto cedida pela empresa Swedish Match do Brasil S.A., de uma plantação localizada no município de Porto União – SC.

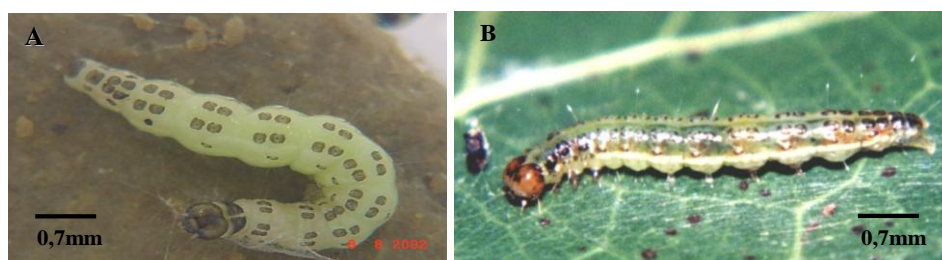


Fig. 2. Lagarta de *Condylorrhiza vestigialis*, conhecida como Mariposa-do-Álamo. (A) Lagarta infectada pelo baculovirus CvMNPV. (B) Lagarta não-infectada.

Material e Métodos

Insetos e vírus - O baculovirus CvMNPV (*Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus*) foi obtido de lagartas *Condylorrhiza vestigialis* infectadas, gentilmente cedidas pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) e pela empresa Swedish Match do Brasil S.A, por intermédio do Dr. Nilton José Sousa e Edilene Buriti Machado, respectivamente.

Identificação e sequenciamento do gene *p74* - a identificação, clonagem, seqüenciamento do gene e processamento da seqüência do gene foram realizados em estudos anteriores pelo Laboratório de Virologia de Insetos do Núcleo Temático de Controle Biológico do CENARGEN. Os principais resultados obtidos foram utilizados para realização do presente trabalho.

Análise computacional da seqüência do gene *p74*: alinhamento múltiplo dos homólogos P74 e construção da árvore filogenética do CvMNPV

Para estimar a relação filogenética entre CvMNPV e os demais baculovirus, baseada na seqüência do gene *p74*, foi realizado a busca de todos homólogos *p74* presentes no banco de dados e o alinhamento múltiplo da seqüência de aminoácidos da P74 de CvMNPV com estes homólogos (Tabela 1), por meio do programa ClustalX 1.81 (THOMPSON et al., 1997) (Tabela 1). A edição do alinhamento múltiplo foi feita pelo programa BOXSHADE versão 3.21, utilizando-se como parâmetros *Gap opening 10*, *Gap extension 0.2*, Matrix Gonnet e sombreamento do *score* de similaridade (www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) (dados não mostrados). A partir do alinhamento, as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método da parcimônia (busca heurística) ajustada com o método Branch e Bound (SWOFFORD, 2000), através do programa PAUP4.0b4a (SWOFFORD, 2002), com análises de bootstrap de 1000 repetições do conjunto de dados. O método de máxima parcimônia baseia-se na análise de estados do caráter, levando em conta o princípio da homologia, ou seja, se dois táxons compartilham uma característica, esta foi herdada do último ancestral comum a ambos (SCHNEIDER, 2003) e tem como base a hipótese de que a árvore mais provável é a que requer o menor número de mudanças para gerar os dados.

É importante lembrar, que a construção da árvore neste trabalho foi realizada observando vários parâmetros. Desta forma, várias árvores foram construídas: apresentando ou não vírus como grupo externo, enraizada e não enraizada e utilizando o alinhamento tanto das seqüências nucleotídicas quanto das peptídicas como informações, desconsiderando os intervalos existentes nas seqüências (*gaps*).

Tabela 1. Genes *p74* de baculovirus utilizados para a análise computacional comparativa.

Nº de acesso (<i>GenBank</i>)	Baculovirus	Posição no genoma	ORF	Tamanho (pb)
NP 818674.1	<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	23773 a 25788	27	2016
NP 872507.1	<i>Adoxophyes orana</i> GV	37367 a 39295	54	1929
YP_006288.1	<i>Agrotis segetum</i> GV	57392 a 59419	56	2028
YP 529814.1	<i>Agrotis segetum</i> NPV	135968 a 137902	144	1935
YP_610989.1	<i>Antheraea pernyi</i> NPV	107.641 a 109.563	129	1923
AAAY19516.1	<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV-2D	112.268 a 114.202	134	1935
AAAY19519.1	<i>Anticarsia gemmatalis</i> NPV-SF	419 a 2353	-	1935
AAA46729.1	<i>Autographa californica</i> MNPV	65 a 2002	138	1938
NP 047536.1	<i>Bombyx mori</i> NPV	108796 a 110733	138	1938
NP_932741.1	<i>Choristoneura fumiferana</i> defectiva MNPV	111.392 a 113.398	132	2007
AAL13071.2	<i>Choristoneura fumiferana</i> GV	337 a 2331	-	1995
AF512031	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV	110.746 a 112.683	130	1938
YP 249621.1	<i>Chrysodeixis chalcites</i> NPV	18970 a 20946	17	1977
YP_717552.1	<i>Clanis bilineata</i> NPV	18543 a 20522	14	1980
NP 891905.1	<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV	47165 a 49177	58	2013
NP_203378.1	<i>Culex nigripalpus</i> NPV	64492 a 66537	73	2046
NP 148844.1	<i>Cydia pomonella</i> GV	48578 a 50644	60	2067
YP_874207.1	<i>Ecotropis obliqua</i> NPV	16243 a 18201	14	1959
NP 203290.1	<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	101.271 a 103.205	121	1935
NP_203576.1	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	16224 a 18290	20	2067
AF334030 89	<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	16195 a 18261	19	2067
YP 473207.1	<i>Hyphantria cunea</i> NPV	19839 a 21773	19	1935
YP 758321.1	<i>Leucania separata</i> NPV	24273 a 26249	-	1977
NP 047663.1	<i>Lymantria dispar</i> MNPV	26.645 a 28.663	27	2019
NP_613243.1	<i>Mamestra configurata</i> NPV-A	144165 a 146138	160	1974
NP 689333.1	<i>Mamestra configurata</i> NPV-B	147569 a 149542	159	1974
ABM05422.1	<i>Maruca vitrata</i> MNPV	94.724 a 96.661	106	1938
YP 025247.1	<i>Neodiprion lecontei</i> NPV	41772 a 43673	47	1902
YP_025157.1	<i>Neodiprion sertifer</i> NPV	49560 a 51464	50	1905
YP 001650925.1	<i>Orgyia leucostigma</i> NPV	16694 a 18652	15	1959
O10365.1	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	112.559 a 114.493	134	1935
NP 663220.1	<i>Phthorimaea operculella</i> GV	46284 a 48260	55	1977
NP_068268.1	<i>Plutella xylostella</i> GV	37776 a 39512	48	1737
YP 758602.1	<i>Plutella xylostella</i> MNPV (isolado CL3)	119644 a 121581	134	1938
NP 703125.1	<i>Rachiplusia</i> MNPV	116.861 a 118.798	138	1938
NP 037891.1	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	124099 a 126060	131	1962
AAO45529	<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	166 a 2106	134	1941
CAA67755.1	<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	148 a 2121	-	1974
NP_258289.1	<i>Spodoptera litura</i> NPV	19706 a 21679	21	1974
NP_059225.1	<i>Xestia c-nigrum</i> GV	71928 a 74060	77	2133

Resultados e Discussão

Gene *p74* e análise de sua sequência - a identificação (Fig. 3), clonagem e seqüenciamento do gene e processamento da sequência do gene foram realizados em estudos anteriores pelo Laboratório de Virologia de Insetos do Núcleo Temático de Controle Biológico do CENARGEN. Sequências nucleotídica e peptídica (Fig. 4) estão depositadas sob o nº de acesso EU919397 no *GenBank*/EMBL.

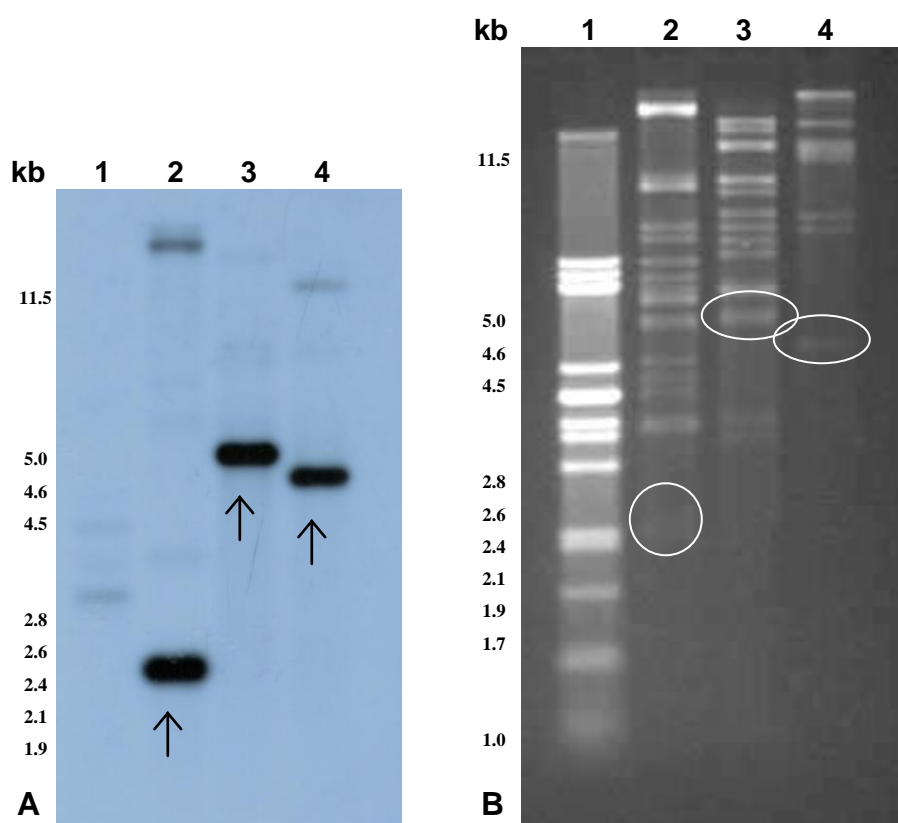


Fig. 3. Identificação de possíveis fragmentos de restrição do DNA de CvMNPV contendo o gene *p74*.

(A) Autorradiograma do *Southern Blot* do DNA de CvMNPV. Hibridização da sonda radioativa (^{32}P) do *p74* com a membrana de nylon. Marcador molecular DNA λ /*Pst*I (1). DNA de CvMNPV digerido com *Hind*III, *Pst*I e *Eco*RI, respectivamente (2-4). As setas indicam os pontos com hibridizações mais intensas entre sonda *p74* radioativa e o DNA genômico de CvMNPV digerido com diferentes endonucleases de restrição.

(B) Perfil de restrição do DNA genômico de CvMNPV. Marcador molecular DNA λ /*Pst*I (1), DNA de CvMNPV digerido com *Hind*III, *Pst*I e *Eco*RI, respectivamente (2-4). Os círculos indicam os respectivos locais onde ocorreram as hibridizações mais intensas no genoma de CvMNPV (eletroforese em gel de agarose 0.8%).

Análise filogenética do baculovirus CvMNPV

Para estimar as relações evolutivas de CvMNPV, a sequência nucleotídica e a de aminoácidos da proteína P74 predita de CvMNPV (Fig. 4) foi comparada com outras 40 sequências de baculovírus depositadas no *GenBank* (Tabela 1) pelo CLUSTALX 1.81 (THOMPSON *et al.*, 1997).

```

1  ATGGCAGTATTAACCGCCGTCGATTTTACGAACGCAAGTCGTTACGCGACTCACATGCAC 60
    M A V L T A V D F T N A S R Y A T H M H
61  AGGCTTGAGTTTATTGAACGTTGGCGCACGCGTTTGCCACATATTTTAATTGATTACACG 120
    R L E F I E R W R T R L P H I L I D Y T
121  TTGCGACCCGCTTCAAGCGACGACGATTATTATGTGCCGCCGAAGCTTAGAGATCGCGCG 180
    L R P A S S D D D Y Y V P P K L R D R A
181  TTAGCAGTCAAGTTGGCATTTAGCCGTCGGGGATTTGACAGCATGAGCTGTTACCCGGTC 240
    L A V K L A F S R R G F D S M S C Y P V
241  CACGAAACCGGCGTAGTGTCCAACCAAACGCCGTTTCATGTACACGCAAACTTCGAAACT 300
    H E T G V V S N Q T P F M Y T Q T S E T
301  AGCGTTGGGTACGCGCAGCCCGCGTGTCTACTTGGACCGAGCCGAGCCATGCGCAAA 360
    S V G Y A Q P A C Y H L D R A A A M R K
361  GCGCTGAAAACGAAGTGCAATCGGCTGAATTTACATACACGCCCAACAACAGTGCCTA 420
    G A E N E V Q S A E F T Y T P N N Q C V
421  ATGGTAGATTCCACTTCAAAAATGTATTTCAATAGCCCATATTTGCGCACCGAGGAGCAC 480
    M V D S T S K M Y F N S P Y L R T E E H
481  ACTATCATGGGCGTGGACGACGTGCCCGCGTTTAACGTGCGTCCCGACCCGGACCCGCTG 540
    T I M G V D D V P A F N V R P D P D P L
541  TTTCCCGAACGATTCAAAGCGAGTTCAACGACGCTTACTGCCGTCGCTTTGGGCGCGAG 600
    F P E R F K G E F N D A Y C R R F G R E
601  CTCATAAACGGCGGCTGCTCTTTTCGCTGGTGGGAATCTTTGATTGGGTTCGTGTTGGGT 660
    L I N G G C S F R W W E S L I G F V L G
661  GACACGCTTTATGTCACGTTCAAATGCTTGCTAATAACATTTTTACCGAATTGCGCGAT 720
    D T L Y V T F K M L A N N I F T E L R D
721  TTTGATTACACGGCGCCGTCGCCCATCCTGCCGCCGCGTCCAATGGTCGATTCCAACGCC 780
    F D Y T A P S P I L P P R P M V D S N A
781  GTACTTGACAATGGCGCGCTGTGCGCGATCGCGCAATCAATTACGACTTTGAAAAATTA 840
    V L A Q W R A V R D R A I N Y D F E K L
841  TTTAGCAAAACGCCTACGTTACAAGATTTGGGCATGGTGGAGAACGGGACGCTGATGCAG 900
    F S K T P T L Q D L G M V E N G T L M Q
901  TTAACGTACACGGCCGAAATTGGATTTACCAAACTCCTATTACATACGAAACGCGCGGA 960
    L T Y T A E I G F T K T P I T Y E T R G
1020  ACGCCGCGTTTCGATTGTTACTGCGCGCAGTTAGATAGGTCGATTAGCGACGAAAACTT 1020
    T P R S I V T A R T L D R S I S D E K L

```

```

1021 GAATCAATTATAGCCCAATTTTGGGAAGAGTATTCGCTCGTGTTTCGGCATTGCCACCGAC 1080
      E S I I A Q F L E E Y S L V F G I A T D
1081 ATAGGTTTTCGACATGCTAATGACCGCGTTTAAAGCATGTAAAAAAATCAATACCGCG 1140
      I G F D M L M T A F K S M L K K I N T A
1141 TTAATCCGTCGCTTAAACGCATGTTAATGAGCACGTCGACGCGTCACGGTACGTTTG 1200
      L I P S L K R M L M S T S Q R V T V R L
1201 CTGGGCGAAACGTACAAAGCGGCCGTGGTGCATTCAATGAACAGGATCGCCATCAAAACG 1260
      L G E T Y K A A V V H S M N R I A I K T
1261 CTCACCACGGCGGCCAAAGCTTTAACTCGCATCGCCATCAAAGCCGCTTCCGTAGTGGGC 1320
      L T T A A K A L T R I A I K A A S V V G
1321 ATCGTGTTGATTCTTTTAAACATTAGCGGATTTAGTTTTGGCATTATGGGACCGTTTGGT 1380
      I V L I L L T L A D L V L A L W D P F G
1381 TACAACAACATGTTTCCGCGTGAATTCCCCGACGATTTGTACGCACGTTTCTCACC 1440
      Y N N M F P R E F P D D L S R T F L T A
1441 TATTTTGAAACGCTCGGCACCAACACGTCGCGCGAAATTATAGAGTTTTTACCCGAATTT 1500
      Y F E T L G T N T S R E I I E F L P E F
1501 TTTTCGGAAATTGTGAAACGGACGACGACGCCACGTTTCAATCGTTATTCCACCTGCTT 1560
      F S E I V E T D D D A T F Q S L F H L L
1560 GATTACGTGGCGCGCTTGAGGTAACTCTGATGGTCAAATGCTGCAGTTTGATGAAAGC 1620
      D Y V A A L E V N S D G Q M L Q F D E S
1621 GACGTAATTGAGGATTTTGATGAAACCACTCTGGTGGTCAAGCGCTGGCCAGCAGTTTCG 1680
      D V I E D F D E T T L V G Q A L A S S S
1681 CTGTACACGCGCCTTGAGTTTATGCAGTACACGTTTAGGCAAAACACGTTATTGGACATG 1740
      L Y T R L E F M Q Y T F R Q N T L L D M
1741 AACGAAAATAATAACAAATTTAATAGAGTGATAGCGGGTTTATTTTATTAAACACAGGG 1800
      N E N N N K F N R V I A G L F L L N T G
1801 GCGGCCGTTGCGGCTTTTATGTTGCATCGAGAGCTTACATTTTTTTGTATACTTTGCGATA 1860
      A A V A A F M L H R E L T F F V Y F A I
1861 TTTTAAATGATCGCGTTGTACTATTTAATCAAAGAACCGTACGAATATTTCAAACCATATA 1920
      F L M I A L Y Y L I K E P Y E Y F K T I
1921 GATTGTGTTTTAACTAAACGACAAAATT 1951
      D L L F *

```

Fig. 5. Sequência completa do gene *p74* do baculovírus CvMNPV e da sequência de aminoácidos P74 deduzida (GenBank - nº de acesso EU919397). Os sítios de anelamento do par de oligonucleotídeos utilizados para completar a clonagem da região terminal do gene *p74* de CvMNPV estão sublinhados. As trincas em negrito representam a iniciação e a terminação do gene (*). A sequência peptídica P74 predita a partir da sequência nucleotídica está em itálico (644aminoácidos) e foi deduzida pelo programa *Translate Toll*.

As considerações filogenéticas apresentadas neste trabalho foram baseadas na árvore filogenética construída pelo método da máxima parcimônia, comumente utilizado em análises filogenéticas (SCHNEIDER, 2003). Dentre as árvores construídas, foram mostradas somente aquelas plausíveis com a diversificação da família *Baculoviridae* apresentada nos estudos filogenéticos até o momento (Fig. 6).

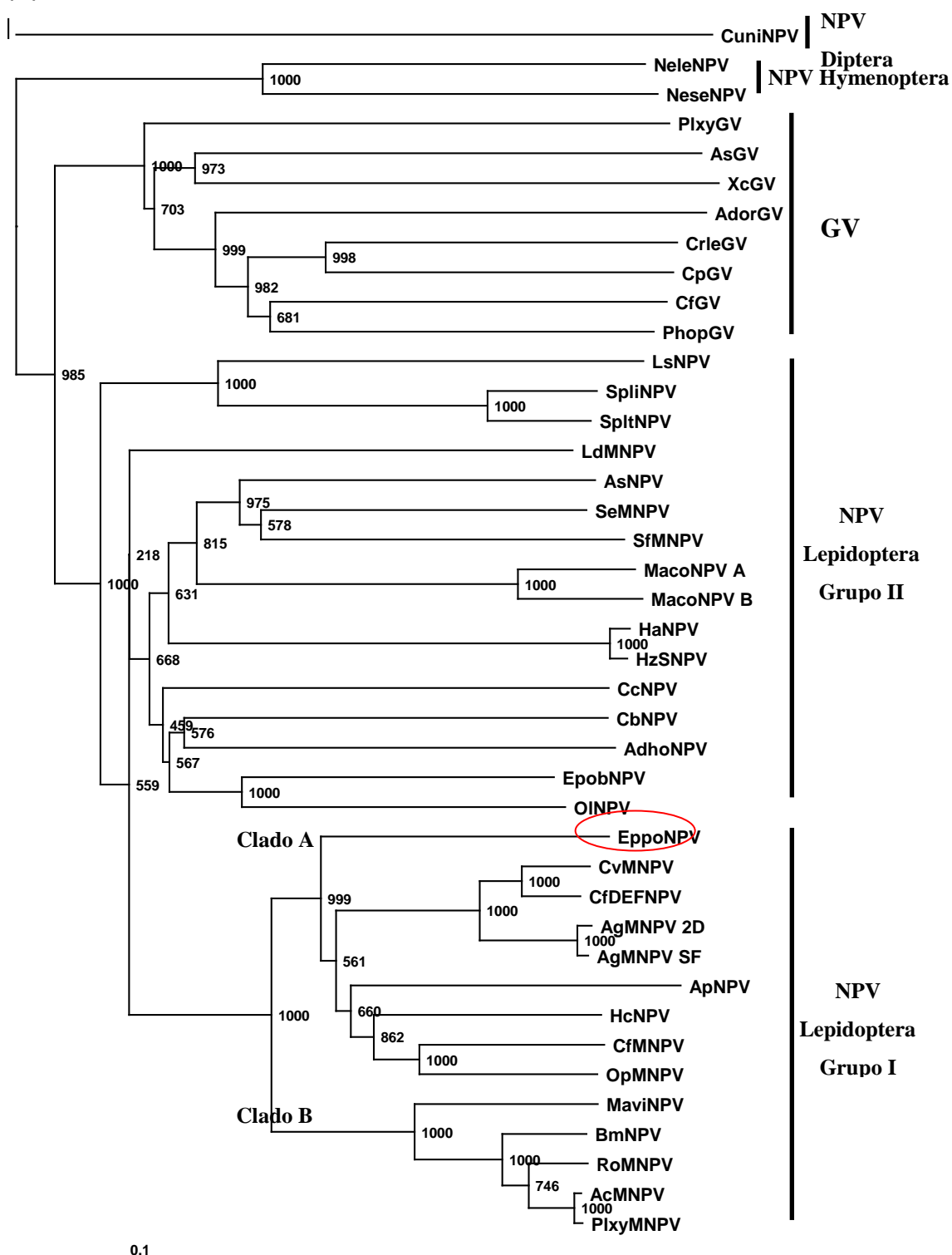
A filogenia do CvMNPV, baseada na seqüência nucleotídica do gene p74 e na seqüência de aminoácidos deduzida, confirmou a clara divisão da família *Baculoviridae* em dois gêneros: *Granulovirus* (GV) e *Nucleopolyhedrovirus* (NPV). Dentro dos NPV, foi observada uma divisão em dois grupos: Grupo I e Grupo II (Fig. 6). Além disso, foi representada também a diversificação dos NPV Lepidoptera, Hymenoptera e Diptera.

Tanto pela análise da seqüência nucleotídica quanto peptídica, o Grupo I dos NPV apresenta uma disposição de ramos que favorece sua divisão em dois clados: Clado I-A e Clado I-B. Dentro do Clado I-A, nota-se uma ramificação, que permite a proposição de dois subclados: subclado I-Aa e subclado I-Bb. No subclado I-Aa podemos identificar a presença do baculovirus CvMNPV. Por sua vez, o Grupo II não apresenta seus ramos nitidamente divididos em clados. De forma geral, a divisão da família *Baculoviridae* em dois gêneros ao longo da evolução, as divisões em grupos, clados e subclados propostas pelo filograma é bem sustentada por valores significativos de replicatas (Fig. 6).

A grande diferença entre as duas árvores apresentadas (uma baseada na seqüência nucleotídica e outra na seqüência peptídica) foi quanto ao grupo dos *Granulovirus* (GV). Na filogenia gênica (Fig. 6A), os GV estão mais próximos na escala evolutiva aos NPV-II que dos NPV-I, enquanto que na filogenia protéica (Fig. 6B), a situação se inverte. Porém, ambas colocam os GV como um grupo muito próximo dos NPV Hymenoptera e NPV Diptera (Fig. 6). Na filogenia protéica aqui apresentada (Fig. 6B), os baculovirus SpliNPV e SpltNPV estão agrupados como representantes dos NPV-I. Na literatura, estes dois baculovirus estão mais relacionados com os NPV-II e classificados como integrantes deste grupo (RASHIDAN et al., 2003; 2004; BELAICH et al., 2006).

Em todas as árvores construídas, independentemente da abordagem escolhida (gênica ou protéica, enraizada e não enraizada, com ou sem grupo externo), o baculovirus *Condylorrhiza vestigialis multiple nucleopolyhedrovirus* (CvMNPV) está posicionado no mesmo grupo filogenético (*cluster*) que o *Choristoneura fumiferana defective nucleopolyhedrovirus* (CfDEFNPV) e também é muito próximo, na escala evolutiva, dos vírus *Anticarsia gemmatilis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) e *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus* (EppoNPV), componentes do mesmo subclado (subclado I-Aa) (Fig. 6). Estes resultados concordam com os valores de identidade encontrados entre as proteínas P74 de CvMNPV e homólogos, apresentados pela análise de BLASTN.

(A)



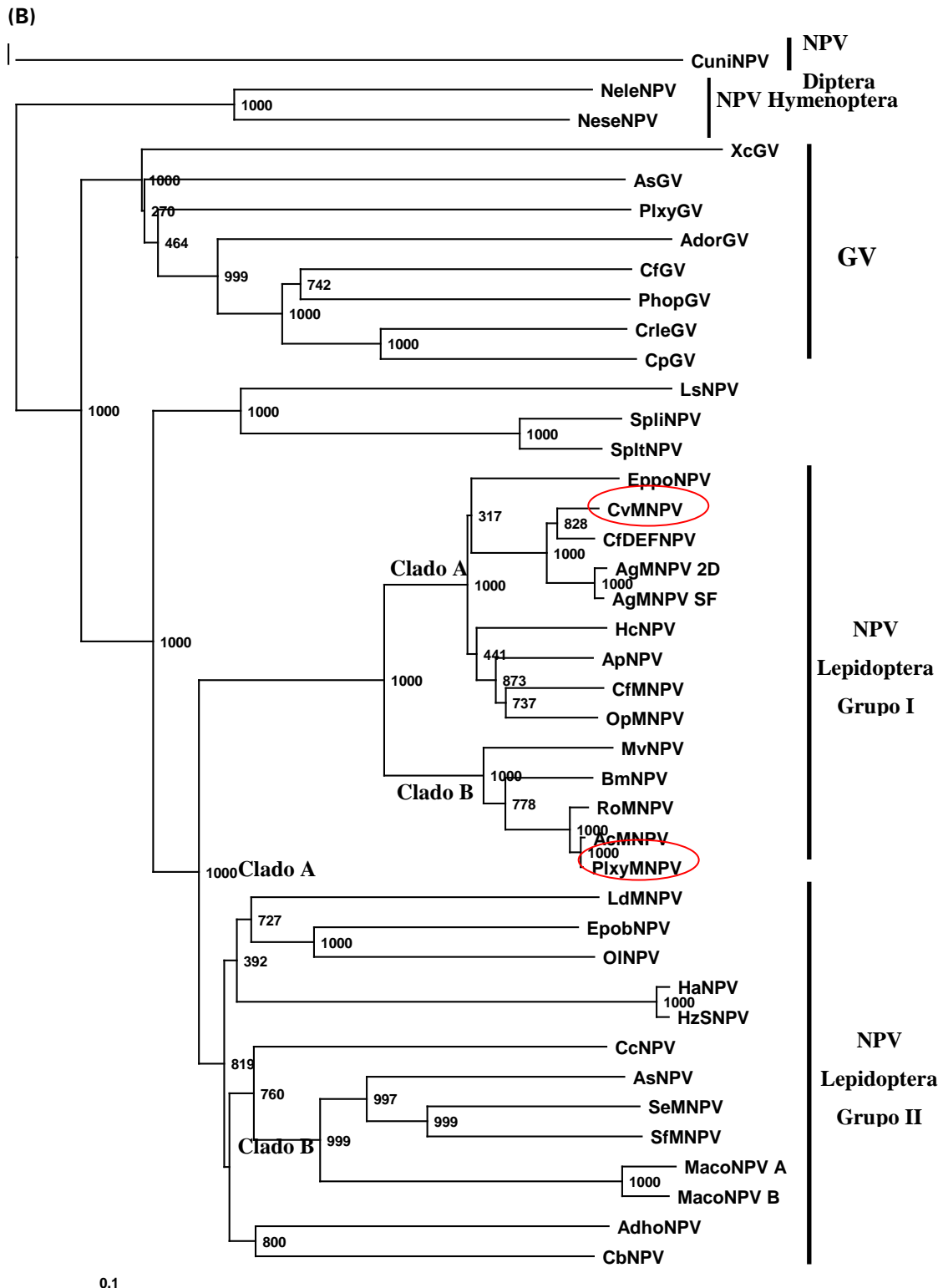


Fig. 6. Filograma de seqüências *p74* da família *Baculoviridae*, enraizado com o grupo externo CuniNPV. (A) Árvore filogenética baseada nas seqüências nucleotídicas. (B) Árvore filogenética baseada nas seqüências de aminoácidos deduzidas. Ambas foram construídas pelo método da máxima parcimônia utilizando o programa PAUP 4.0b4a (SWOFFORD, 2002). A descrição das seqüências utilizadas encontra-se na Tabela 1. Os números são os *bootstraps*

de cada ramo (1000 replicatas). As seqüências não informativas foram ignoradas (*gaps*). O círculo em vermelho indica o baculovirus CvMNPV.

A filogenia do baculovirus CvMNPV proposta foi com base na seqüência do gene *p74* e de sua seqüência de aminoácidos P74 deduzida. A reconstrução filogenética, utilizando o método da máxima parcimônia, de forma geral, apresentou resultados coerentes com propostas já descritas, que divide a família *Baculoviridae* em quatro grupos: NPV (*Nucleopolyhedrovirus*) de Lepidoptera, NPV de Diptera, NPV de Himenoptera e GV (*Granulovirus*) (BELAICH et al., 2006; JEHLE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006).

As duas árvores filogenéticas construídas dividem os NPV em dois grandes ramos, o Grupo I e o Grupo II. As análises dos filogramas propostos neste trabalho mostram que Grupo II não está nitidamente dividido em clados e subclados como o Grupo I. O que se observa no Grupo II é uma maior e mais antiga diversificação entre as espécies a partir do seu ancestral comum, quando comparado com o Grupo I. De acordo com a literatura, as relações filogenéticas dentro do Grupo II são menos estáveis que no Grupo I (COWAN et al., 2004; HU et al., 1997). Hu et al. (1998) relatam que as variações apresentadas na filogenia do Grupo II são devido à diversidade apresentada pelos vírus pertencentes a este grupo ser maior que nos vírus do Grupo I.

Outro aspecto a ser comentado é que na filogenia baseada na seqüência protéica, diferentemente da filogenia gênica, os baculovirus SpliNPV e SpltNPV não são integrantes do Grupo II dos NPV ao contrário do descrito na literatura (RASHIDAN et al., 2003; 2004; BELAICH et al., 2006). Herniou et al. (2001) verificaram que a maioria das variações topológicas da família *Baculoviridae* reside dentro dos NPV do Grupo II e dos GV. Estas variações podem ser devido ao fato de alguns representantes destes grupos apresentarem genomas muito grandes, criando um desbalanço na distribuição dos caracteres. Outra explicação, abordada no trabalho, sugere que algumas espécies são muito similares e outras divergentes, não fornecendo assim caracteres apropriados para estabelecer suas relações filogenéticas. Portanto, análises adicionais são requeridas para validar a composição e a distribuição dos ramos do Grupo II.

Com relação ao grupo composto pelos *Granulovirus*, pelos NPV Hymenoptera e pelo NPV Diptera, os altos valores de *bootstraps* sugerem que as relações dentro destes grupos sejam bem suportadas. A diversificação entre o grupo do NPV Diptera e do NPV Hymenoptera, onde o baculovirus CuniNPV se separa dos baculovirus NeleNPV e NeseNPV, concorda com a árvore publicada por Jehle et al. (2006) e reforça a nova proposta de separação destes baculovirus em dois gêneros: *Gamabaculovirus* e *Deltabaculovirus*, respectivamente.

A utilização de um único de gene para construções filogenéticas ainda é controversa (KOONIN et al., 2000), porém muito utilizada, principalmente quando não se dispõe da seqüência

completa do genoma do baculovirus, como é o caso do CvMNPV. Assim, os dados filogenéticos obtidos neste trabalho apresentaram algumas divergências aos descritos na literatura. Além disso, outro fator que pode ter influenciado esta divergência foi o número de espécies de baculovirus envolvidas na construção do filograma (41 espécies), superior ao número comumente utilizado para este tipo de estudo.

Segundo a topologia apresentada para os clados pertencentes ao Grupo I, I-A e I-B, pode-se sugerir um maior parentesco do baculovirus CvMNPV com os baculovirus CfDEFNPV e AgMNPV, pertencentes ao Clado I-A, cujas relações filogenéticas parecem ser bem suportadas devido os altos valores de *bootstraps*. Isso indica que o CvMNPV deve estar mais proximamente relacionado ao CfDEFNPV do que com outros baculovirus, compartilhando com este táxon um ancestral comum mais recente do que com os outros táxons do Clado I-A. Estudos com base na análise da sequência do gene inibidor de apoptose (*iap-3*) e do gene da DNA polimerase (*dnapol*) de AgMNPV também indicaram o baculovirus AgMNPV como mais próximo de CfDEFNPV (CARPES et al., 2005; DALMOLIN et al., 2005), o que reforça a idéia de que a distribuição do Clado I-A baseada no gene *p74* de CvMNPV seja plausível. Desta forma, os dados obtidos a partir da análise filogenética do CvMNPV, objeto deste estudo e anteriormente classificado somente quanto ao gênero, suportam que esse baculovirus pertence ao Grupo I.

Conclusões

A reconstrução filogenética, utilizando o método da máxima parcimônia, manteve a divisão da família *Baculoviridae* em quatro grupos: *Nucleopolyhedrovirus* de Lepidoptera, *Nucleopolyhedrovirus* de Diptera, *Nucleopolyhedrovirus* de Hymenoptera e *Granulovirus*.

A estimativa filogenética baseada no gene *p74* revelou que o CvMNPV é pertencente ao Grupo I dos *Nucleopolyhedrovirus* de Lepidoptera e está proximamente relacionado na escala evolutiva com o vírus CfDEFNPV.

As análises filogenéticas baseadas no gene *p74* e em sua sequência de aminoácidos deduzida permitiram estabelecer preliminarmente as relações de parentesco do recém-identificado CvMNPV com os demais baculovirus.

Referências

- ALTSHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MEYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment searching tool. **Journal of Molecular Biology**, London, GB, v. 215, p. 403-410, 1990.
- BEILACH, M. N.; RODRÍGUEZ, V.; BILEN, M. F.; PILLOFF, M. G.; RAMANOWSKI, V.; SCIOCCO-CAP, A.; GHIRINGHELLI, P. D. Sequencing and characterization of *p74* gene in two isolates of *Anticarsia gemmatalis* MNPV. **Virus Genes**, Norwell, US, v. 32, p. 59-70, 2006.
- BILIMORIA, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 1-72.
- BLISSARD, G. W.; WENZ, J. R. Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 66, p. 6829-6835, 1992.
- BRAUNAGEL, S. C.; RUSSEL, W. K., ROSAS-ACOSTA, G.; RUSSEL, D. H.; SUMMERS, M. D. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, US, v. 100, p. 9797-9802, 2003.
- BULACH, D. M.; KUMAR, C. A.; ZAIA, A.; LIANG, B.; TRIBE, D. E. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 73, p. 59-73, 1999.
- CARPES, M. P.; CASTRO, M. E. B.; SOARES, E. F.; VILLELA, A. G.; PINEDO, F. J. R.; RIBEIRO, B. M. The inhibitor of the apoptosis gene *iap-3* of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) encodes a functional IAP. **Archives of Virology**, New York, US, v. 150, p. 1549-1562, 2005.
- COWAN, P.; BULACH, D.; GOODGE, K.; ROBERTSON, A.; TRIBE, D. E. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of the *Helicoverpa zea* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: placement of the virus in lepidoptera nuclear polyhedrosis virus group II. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 75, p. 3211-3218, 2004.
- DALMOLIN, C. C.; DA SILVA, F. R.; MELLO, L. V.; RIGDEN, D. J.; CASTRO, M. E. B. Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of the DNA polymerase gene of the *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. **Virus Research**, Amsterdam, NL, v. 110, p. 99-109, 2005.
- FAULKNER, P.; KUZIO, J.; WILLIAMS, G. V.; WILSON, J. A. Analysis of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity *in vivo*. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 78, p. 3091-3100, 1997.
- FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum Press, 1997. p. 33-59.
- GRANADOS, R. R. Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. **Virology**, New York, US, v. 90, p. 170-174, 1978.

GRANADOS, R. R.; LAWLER, K. A. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology**, New York, US, v. 108, p. 297-308, 1981.

GRANADOS, R. R.; WILLIAMS, K. A. *In vivo* infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R. R.; FEDERICI, B. A. (Ed.) **The biology of baculoviruses**. Boca Raton: CRC Press. 1986. v. 1, p. 89-108.

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

HERNIOU, E. A.; LUQUE, T.; CHEN, X.; VLAK, J. M.; WINSTANLEY, D.; CORY, J. S.; O'REILLY, D. Use of the whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 75, 8117-8126, 2001.

HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S.; O'REILLY, R. D. The genome sequence and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, US, v. 48, p. 211-34, 2003.

HORTON, H. M.; BURAND, J. P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 67, p. 1860-1868, 1993.

HU, Z. H.; ARIF, B. M.; MARTENS, J. W. M.; CHEN, X. W.; SUN, J. S.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 79, 2841-2851, 1998.

HU, Z. H.; BROER, R.; WESTERLAKEN, J.; MARTENS, J.; JIN, F.; JEHL, J. A.; WANG, L. M.; VLAK, J. M. Characterization of the ecdysteroid UDP-glycosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria*. **Virus Research**, Amsterdam, NL, v. 47, p. 91-97, 1997.

JEHL, J. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B. C.; CORY, J. S.; HERNIOU, E. A.; ROHRMANN, G. F.; THEILMANN, D. A.; THIEM, S. M.; VLAK, J. M. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology**, New York, US, v. 151, 1257-1266, 2006.

KIKHNO, I.; GUTIERREZ, S.; CROIZIER, L.; CROIZIER, G.; LÓPEZ FERBER, M. Characterization of pif, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 83, p. 3013-3022, 2002.

KOONIN, E. V.; ARAVIND, L.; KONDRASHOV, A. S. The impact of comparative genomics on our understanding of evolution. **Cell**, Cambridge, US, v. 101, p. 573-576, 2000.

KUZIO, J.; JACQUES, R.; FAULKNER, P. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. **Virology**, New York, US, v. 173, p. 759-763, 1989.

MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **Journal of Molecular Biology**, London, GB, v. 53, p. 159-62, 1970.

MARUNIAK, J. E.; BROWN, S. E.; KNUDSON, D. L. Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. **Virology**, New York, US, v. 136, p. 221-234, 1984.

MAY-DE-MIO, L. L.; AMORIM, L. Doenças do álamo. **Floresta**, Curitiba, v. 30, p. 139-153, 2000.

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

OLIVEIRA, J. V.; WOLFF, J. L.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. A. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 87, 3233-3250, 2006.

RASHIDAN, K. K.; NASSOURY, N.; GIANNOPOULOS, P. N.; MAUFFETTE, Y. E.; GUERTIN, C. Identification, characterization and phylogenetic analysis of conserved genes within the p74 gene region of *Choristoneura fumiferana* granulovirus genome. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Korea (South), v. 37, 700-708, 2004.

RASHIDAN, K. K.; NASSOURY, N.; TAZI, S.; GIANNOPOULOS, P. N.; GUERTIN, C. *Choristoneura fumiferana* Granulovirus P74 protein, a highly conserved baculoviral envelope protein. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Korea (South), v. 36, p. 475-487, 2003.

ROHRMANN, G. F. Baculovirus structural proteins. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 73, p. 749-761, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SCHNEIDER, P. J. **Métodos de análise filogenética**: um guia prático. Bragança, PA: GRAFIPEL, 2003. 124 p.

SLACK, J. M.; DOUGHERTY, E. M.; LAWRENCE, S. D. A study of the *Autografa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV envelope protein P74 using a GFP tag. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 82, p. 2279-2287, 2001.

SUMMERS, M. D. J. Electron microscopic observations on granulos virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, US, v. 35, p. 606-625, 1971.

SWOFFORD, D. L. **PAUP - Phylogenetic Analysis Using Parsimony**: and other methods. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2000.

SWOFFORD, D. L. **PAUP - Phylogenetic Analysis Using Parsimony**: and other methods. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

TANADA, Y. E.; HESS, R. T. Development of a nuclear polyhedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 28, p. 67-76, 1976.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. DNA-viral infections: *Baculoviridae*. In: TANADA, Y.; KAYA, H. K. (Ed.). **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 171-244.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D. R.; ROHRMANN, G. F.; THIEM, S.; VLAK, J. M. *Baculoviridae*. In: FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Virus taxonomy**: classification and nomenclature of viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. p. 177-186. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VOLKMAN, L. E.; GOLDSMITH, P. A.; HESS, R. T. Alternate pathway of entry of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: fusion at the plasma membrane. **Virology**, New York, US, v. 148, p. 288-297, 1986.

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

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