

Boletim de Pesquisa 233
e Desenvolvimento

ISSN 1676 - 340
Dezembro, 2008

**Prospecção de genes de virulência em
variantes genotípicos de *Anticarsia
gemmatalis* MNPV**



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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 233

Prospecção de genes de virulência em variantes genotípicos de *Anticarsia gemmatalis* MNPV

Briana Cardoso Ferreira
Maria Elita Batista de Castro
José Francisco Rivera Pinedo
William Sihler
Marlinda Lobo de Souza

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*

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

P 966 Prospecção de genes de virulência em variantes genotípicos de *Anticarsia gemmatalis* MNPV / Briana Cardoso Ferreira... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
29 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 233).

1. *Anticarsia* – Controle biológico. 2. Baculovírus. I. Ferreira, Briana Cardoso. II. Série.

632.96 – CDD 21

SUMÁRIO

Introdução	7
Materiais e Métodos	9
Resultados e Discussão	14
Referências	24

Prospecção de genes de virulência em variantes genotípicos de *Anticarsia gemmatalis* MNPV

Briana Cardoso Ferreira¹
Maria Elita Batista de Castro²
José Francisco Rivera Pinedo³
William Sihler⁴
Marlinda Lobo de Souza²

Resumo

Os baculovirus são vírus patogênicos a insetos, principalmente aos da ordem Lepidoptera. É comum o aparecimento de mutantes defectivos em populações de campo, com ausência de genes essenciais, que são mantidos pela co-infecção de células por diferentes genótipos virais. Esses genótipos quando purificados podem perder a capacidade de infectar a larva hospedeira, devido a deleções em genes *pif* (*per os infectivity factor*), essenciais para a infecção por via oral. Sabe-se que as proteínas PIF estão associadas ao envelope da partícula ODV, necessária para o estabelecimento da infecção primária no inseto. O genoma do *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) foi recentemente seqüenciado sendo então relatada a presença dos genes *pif-1* e *pif-2* no vírus. Neste trabalho, genótipos de AgMNPV derivados do isolado de campo AgMNPV-79 foram selecionados e, através de análise de perfil de restrição do DNA viral, foi confirmada a existência de variantes genotípicos na população. Para a investigação da possível presença de mutantes defectivos, ampliações das regiões de *pif-1* e *pif-2* por PCR foram realizadas em cada variante sendo que todos os clones da população apresentaram ampliações dos dois genes. Todos os clones mostraram-se altamente infecciosos por ingestão oral, porém o genótipo Ag79-01 apresentou maior virulência entre eles. A presença de um terceiro gene *pif* (*pif-3*) foi identificada recentemente no genoma do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Da mesma forma, esse gene é também essencial para o estabelecimento da infecção primária por via oral. Por análise de BLAST o gene foi então identificado como a ORF 114 do genoma do vírus AgMNPV, a qual apresentou uma identidade de aminoácidos de 67% com a ORF do vírus AcMNPV. Com base nessa informação, *primers* para o gene *pif-3* foram desenhados e amostras de DNA dos diferentes genótipos virais foram submetidas a ampliações por PCR. Novamente todos os clones virais apresentaram amplificação de um fragmento correspondente à região de *pif-3*.

Palavras-chave: Baculovirus, *Anticarsia gemmatalis*, genes *pif*, partícula ODV, infectividade oral.

¹Bióloga, MSc, Universidade de Brasília/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

²Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³Biólogo, PhD, Bolsista CNPq/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴Biólogo, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Prospection of virulence genes in *Anticarsia gemmatalis* MNPV genotypic variants

Abstract

Baculovirus are pathogenic viruses to insects, mainly to the ones belonging to the Lepidoptera order. The appearance of defective mutants, lacking essential genes, which are maintained by cells co-infected by different viral genotypes, is a common event in field population. These genotypes, when purified may lose the capacity to infect the host larvae due to deletions in genes *pif* (*per os* infectivity factor), essential for oral infectivity. It is known that PIF proteins are associated with the ODV particle envelope, required for the establishment of the primary infection in the insect. The genome of the *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV) was recently sequenced, and the presence of the genes *pif-1* and *pif-2* in the virus was described. In the present work, genotypes of AgMNPV derived from the field isolate AgMNPV-79 were selected and the existence of genotypic variants in the population was confirmed by viral DNA restriction analysis. To determine the possible presence of defective mutants, amplifications of the *pif-1* and *pif-2* regions have been carried out by PCR in each variant, so that all clones of the population presented amplifications for those two genes. All clones were revealed to be highly infective by oral ingestion, but the virulence assay revealed that the Ag79-01 genotype presented the greatest virulence. Recently, the presence of a third *pif* gene (*pif-3*) was identified in the genome of the *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). In the same way, this gene is also essential for the establishment of the primary infection by oral ingestion. In our studies, based on BLAST analysis, the gene *pif-3* was identified as ORF 114 of the viral genome of the AgMNPV, which presented an identity of 67% with the AcMNPV virus ORF. Primers for the *pif-3* gene were then designed and samples of DNA of the different viral genotypes were amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). Again all viral clones presented a fragment amplification corresponding to the *pif-3* region.

Keywords: Baculovirus, *Anticarsia gemmatalis*, *pif* genes, ODV particles, oral infectivity.

Introdução

Os baculovirus constituem o maior grupo de vírus patogênicos a insetos, principalmente em espécies da ordem Lepidoptera. Possuem um genoma de DNA fita dupla, circular podendo codificar de 100 a 200 proteínas. Pertencem à família *Baculoviridae* que está dividida em dois gêneros *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) e *Granulovirus* (GV) (FEDERICI, 1997; JEHLE et al., 2006; THEILMANN et al., 2005).

Na replicação dos baculovirus duas partículas infecciosas (ODV e BV), geneticamente idênticas e estruturalmente distintas, são formadas. A partícula ODV (*Occlusion Derived Virus*) possui vírions em forma de bastão derivados de sua forma oclusa denominada OB (*Occlusion Body*) ou PIB (*Polyhedral Inclusion Body*) (GRANADOS e WILLIAMS, 1986; THEILMANN et al., 2005).

Os baculovirus, na natureza, possuem em seus corpos de oclusão (OB) partículas ODV que abrigam diversos nucleocapsídeos por envelope. Essa estrutura permite ao vírus abrigar uma extensa variabilidade de genótipos em somente um corpo de oclusão. A infecção de uma célula hospedeira decorrente de genótipos distintos resulta em uma mistura de genomas característica dos baculovirus em campo (LÓPEZ-FERBER et al., 2003).

Essa heterogeneidade pode decorrer da infecção por múltiplos genótipos ou pode ser gerada durante o ciclo de infecção através de mutações pontuais, duplicação de genes, e inserções ou deleções no DNA (CORY e MYERS, 2003). Isso ocorre com frequência nas populações de vírus, principalmente em baculovirus do gênero NPV e em consequência disso é comum encontrar mutantes surgidos espontaneamente. Esses genótipos individuais podem diferir entre si quanto à virulência ou patogenicidade, embora se saiba que cada genótipo é capaz de se replicar e ser transmitido de forma independente. Entretanto, esses mutantes podem sofrer deleções de parte de seu genoma ou apenas em genes essenciais para a replicação viral ou para o estabelecimento da infecção oral, impedindo sua entrada inicial na célula e a replicação individual dentro do hospedeiro por falta de proteínas específicas (LÓPEZ-FERBER et al., 2003; SIMÓN et al., 2005, 2006).

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

Os variantes genotípicos podem ser distinguidos uns dos outros pelo polimorfismo apresentado nas diferenças de tamanho de seus fragmentos de restrição ou por alterações

em suas regiões genômicas como adições, deleções ou duplicações de bases nucleotídicas. Essa alta prevalência de recombinação, comum aos baculovirus, junto com o envelopamento de múltiplos genótipos em um único vírion, podem ser consideradas estratégias evolucionárias garantindo a preservação de altos níveis de variabilidade genética em populações de NPV (SIMÓN et al., 2004).

Algumas vezes as deleções podem afetar genes importantes à virulência de um determinado fenótipo viral. Isso explica o fato de genótipos defectivos selecionados, na maioria das vezes, apresentarem baixa ou nenhuma infecção quando isolados, porém suas partículas BV, uma vez na hemolinfa, causam infecção. A ausência da infecção por via oral desses genótipos defectivos está então associada aos genes *pif* que são essenciais para o estabelecimento da infecção primária da larva hospedeira.

Sabe-se que na ausência de um desses genes a infecção mediada por ODV não ocorre, indicando que os genes *pif* são essenciais para o estabelecimento da infecção primária no inseto. Para o fenótipo BV a ausência de genes *pif* não altera a infectividade uma vez que as proteínas PIF estão ausentes na superfície de sua membrana (FAULKNER et al., 1997; HAAS-STAPLETON et al., 2004; YAO et al., 2004; ZHOU et al., 2005).

Os genes *pif* têm sido atualmente identificados como fatores essenciais na infecção oral da larva hospedeira. As proteínas PIF são exclusivas do fenótipo ODV, localizadas na fração do envelope e estão relacionadas a eventos iniciais da infecção como o processo de ligação e entrada da partícula viral nas células colunares do intestino médio da lagarta. Três genes pertencentes à família *pif*, denominados *pif-1*, *pif-2* e *pif-3* já foram identificados em *Spodoptera littoralis* NPV (SpliNPV) (KIKHNO et al., 2002), *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV) (PIJLMAN et al., 2003) e *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) (OHKAWA et al., 2005), respectivamente, além do gene *p74*, que foi o primeiro a ser relatado em estudos de infecção com o baculovirus AcMNPV (KUZIO et al., 1989). O *p74* tem sido considerado um gene da família *pif* uma vez que é também essencial para a infectividade por via oral do inseto.

A deleção de alguns dos genes *pif* reduz dramaticamente as chances do vírus em infectar seu hospedeiro e de se espalhar na natureza, podendo bloquear sua transmissão. A interrupção dos genes *pif* implica na não liberação do nucleocapsídeo do envelope ODV, impedindo a replicação do vírus em qualquer célula (GUTIÉRREZ et al., 2005). Kikhno et al. (2002) estudaram um mutante de SpliNPV apresentando uma deleção que compreendia toda a ORF do gene *pif*. Esse vírus foi incapaz de infectar a larva por via oral, porém em cultura de células o vírus foi capaz de estabelecer a infecção com formação de poliedro. Esse vírus também foi incapaz de realizar recombinação quando na presença de um plasmídeo contendo a seqüência de *pif*, porém os ODV produzidos continham a proteína devido ao seqüestro desta, mas no DNA do vírus mutante não houve detecção do gene.

Os baculovirus constituem importantes agentes naturais de controle de pragas agrícolas. Sua utilização segura como inseticidas biológicos e perspectivas futuras foi revisada recentemente por Souza et al. (2004, 2007). O inseto-praga *Anticarsia gemmatalis*, conhecido como lagarta da soja, causa danos às plantações de soja na América Latina e no sudeste dos Estados Unidos. Há mais de duas décadas um Baculovirus patogênico a este inseto, denominado *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* (AgMNPV), tem sido aplicado para controle da praga com significantes benefícios econômicos e ecológicos. Assim, esse vírus tornou-se um modelo para uso em programas de controle biológico ou mesmo para controle integrado de pragas.

Neste trabalho procurou-se investigar a presença de mutantes defectivos com alterações na região dos genes essenciais para infecção primária, genes *pif*, em uma população heterogênea de AgMNPV.

Materiais e Métodos

Insetos: Larvas de *Anticarsia gemmatalis* fornecidas pela Plataforma de Criação de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-CENARGEN e mantidas com dieta artificial (GREENE et al., 1976, modificado por HOFFMANN-CAMPO et al., 1985) à temperatura ambiente (25°C).

Vírus: Os vírus utilizados foram:

- **AgMNPV-79** _ Isolado selvagem de *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus* cedido pelo Dr. Flávio Moscardi (Embrapa Soja, Londrina – PR).
- **AgMNPV-2D** _ Clone viral isolado a partir do vírus selvagem AgMNPV-79 pela técnica de *plaque assay* e fornecido pelo Dr. James Maruniak, University of Florida-USA.
- **AgMNPV-Londrina** _ Clones virais (AgL-06, AgL-16, AgL-34 e AgL-37) derivados do isolado selvagem AgMNPV-79, purificados pela técnica de *plaque-assay* (SIEBURTH e MARUNIAK, 1988) e cedidos pelo Dr. Flávio Moscardi (Embrapa Soja, Londrina – PR).

Linhagens celulares de insetos: A linhagem celular BTI-Tn-5B1-4 – *High Five* (GRANADOS et al., 1994), derivada de *Trichoplusia ni*, foi utilizada para amplificação de BV, infecção *in vitro* e purificação de clones por diluição serial.

Multiplificação do vírus AgMNPV-79 e purificação de poliedros: Larvas de *Anticarsia gemmatalis* 2^o/3^o instares foram utilizadas para amplificação e obtenção de poliedros. Os

ensaios foram feitos com 100 μ l de poliedros (PIB) em H₂O milliQ a uma concentração de 1x10⁷ PIB/ml aplicados sob dieta artificial. As lagartas foram mantidas em estufa a uma temperatura de 27°C, fotoperíodo de 14h e umidade relativa de 70%. As lagartas foram monitoradas durante um período de sete dias, sendo coletadas após a morte e armazenadas a -20°C. Para purificação dos poliedros lagartas infectadas e mortas foram trituradas em tampão de homogeneização (ácido ascórbico 1%; SDS 2%; Tris 0,01M, pH 7,8; EDTA 0,001M). O macerado foi filtrado em gaze e centrifugado a 12.000rpm (Sorvall RC-5B, rotor SS-34) por 15min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em TE (Tris 0,01M, pH 7,8; EDTA 0,001M). O material foi novamente centrifugado e o *pellet* ressuspenso em 10ml de TE. Um volume de 5ml do material foi colocado em gradiente de sacarose de densidade 1,17 a 1,30g/ml e centrifugado a 24.000rpm (Sorvall OTD 75B, rotor AH 627) por 40min. Uma banda de poliedros formada no terço inferior do tubo foi coletada com uma pipeta Pasteur e diluída 4 vezes em TE. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (poliedros purificados) ressuspenso em água destilada e armazenado a -20 °C.

Coleta de hemolinfa de lagartas infectadas: Para a realização desse procedimento, os ensaios foram conduzidos conforme já mencionado acima, porém utilizando lagartas do 4º/5º instar. Após quatro dias da inoculação, as lagartas com sinais de infecção foram anestesiadas (em gelo por cerca de 2min) e tiveram seu último par de patas cortado com tesoura cirúrgica. A cada 500 μ l de hemolinfa coletada foram adicionados 450 μ l de meio TNMFH (Hink, 1970) sem soro e 50 μ l da solução de cisteína 0,1M para impedir a oxidação do material. O material foi esterilizado por filtragem utilizando filtro Millipore 0,45 μ m e estocado a -20°C.

Purificação de clones de AgMNPV-79 por diluição seriada: Para a obtenção de clones virais puros foi utilizada a técnica de diluição serial modificada de O'Reilly et al. (1992), a partir da hemolinfa da lagarta de *A. gemmatalis* infectada com o isolado selvagem AgMNPV-79. Inicialmente, a hemolinfa contendo BV do vírus foi submetida a uma série de diluições utilizando-se placas de cultura (24 poços). Em cada poço foram colocados 150 μ l de meio TNMFH completo e 16,6 μ l do vírus que foram sendo passados de um poço para o outro, obtendo diluições seriais de 10⁻¹ a 10⁻⁸. As células foram contadas com a ajuda de um hemacitômetro e foram diluídas (1x10⁵células/ml) em meio TNMFH complementado com soro bovino fetal estéril (GIBCO BRL) inativado a 60°C/30 min., livre de micoplasma, em uma concentração final de 10% e com adição de antibiótico e antimicótico (GIBCO BRL). Aos poços com as diluições do vírus foram acrescentados 1350 μ l da suspensão de células sendo homogeneizadas e transferidas para placas de cultura com 96 poços iniciando com a

diluição viral mais baixa (10^{-1}). Após quatro dias de infecção os poços foram visualizados sob microscópio de luz e onde havia pelo menos uma a duas células com poliedros em seu interior o sobrenadante foi coletado. Para cada poço coletado foram feitas mais duas diluições seriadas em triplicata até os clones serem purificados.

Multiplicação de clones virais *in vitro*: Os *budded virus* (BV) de cada clone viral foram amplificados em cultura de células Tn-5Bl-4 (*High five*) de acordo com O'Reilly et al. (1992). As células foram crescidas em frascos T-25 (Corning) com meio TNMFH completo a uma concentração de 1×10^6 células/frasco. O sobrenadante foi retirado e 1ml de hemolinfa diluída 1:8 (hemolinfa : meio/cisteína) foi adicionado ficando em contato com as células por uma hora com agitação leve de 10 em 10 min. Após o período de adsorção, o inóculo foi retirado e foi acrescentado meio TNMFH completo e as células foram incubadas em estufa a 27°C. As células foram coletadas com 72h pós-infecção por centrifugação a 3000rpm/5 min./4°C (centrífuga IEC Centra® MP4Rpor). O precipitado celular foi armazenado a -20°C e o sobrenadante a 4°C.

Infecção de Lagartas por BV - Injeção Intrahemocélica: Para esse experimento foram utilizados os BV dos sobrenadantes das células infectadas com cada clone viral. Para os controles foi utilizada injeção de H₂O destilada. As lagartas foram infectadas com cerca de 10µl do vírus por meio de injeção direta na hemocele, utilizando-se uma micro-seringa com agulha de 8mm x 0,3mm. Após injeção, as lagartas foram mantidas em incubadora e monitoradas durante um período de cinco dias até a morte, onde foram coletadas e armazenadas a -20°C.

Extração de DNA de vírus não oclusos (BV): Para extração de DNA a partir dos BV estocados das multiplicações virais em cultura de células, foram utilizados 30ml dos sobrenadantes de cada clone viral e do isolado selvagem de acordo com os protocolos descritos por O'Reilly et al. (1992). Os sobrenadantes foram colocados em tubos de centrífuga de 30ml e no fundo de cada tubo foram aplicados 3 ml de sacarose 25% (Sacarose 25g; NaCl 5mM; EDTA 10mM). Os tubos foram submetidos à ultracentrifugação (SORVAL rotor SW28) a 24000rpm/4°C/75min. Ao sedimento foram acrescentados 200µl de tampão de disrupção (Tris HCl 10mM, pH 7,6; EDTA 10mM, pH 8,0; SDS 0,25%) e 25µl de proteinase K (20mg/ml), deixando as amostras a 37°C/14h. Para extração do DNA, as amostras foram submetidas a ciclos de extração com fenol, fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio : álcool isoamílico (24:1). Para precipitação foi usado etanol absoluto (2,5x do volume da amostra) e 10% de NaAc (3M; pH 5,2), ficando a -20°C/14h. As amostras foram submetidas à centrifugação por 12000rpm/30 min., lavadas com etanol 70% e o DNA resuspenso em 20µl de tampão TE e armazenado a 4°C.

PCR dos genes *pif-1* e *pif-2* a partir de DNA viral: Os oligonucleotídeos (*primers*) foram desenhados com base na seqüência genômica do vírus AgMNPV-2D (OLIVEIRA et al., 2006) disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov (DQ813662 – GenBank) e foram sintetizados pela Invitrogen (Tabela 1).

Tabela 1: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *pif-1* e *pif-2*, e a localização desses e dos respectivos genes no genoma do baculovirus AgMNPV-2D (OLIVEIRA et al., 2006).

AgMNPV-2D	Gene (tamanho)	Nome e posição* (nt)	Seqüência (5' > 3')
ORF ag117 (99.551 > 101.146 nt)	<i>pif-1</i> (1596pb)	AgMNPV-pif1- 3'F (99.345)	TCA.AGA.ATG.TAC.CCT.GAA.G
		AgMNPV-pif1- 5'R (101.433)	CTC.CAC.TAC.TTG.AGC.CAC
ORF ag12 (8.381 < 9.529 nt)	<i>pif-2</i> (1148pb)	AgMNPV- Fwdpif2 (8.585)	CGT.GTT.TAC.GCA.TTC.AAC
		AgMNPV- Revpi2 (9.449)	CAT.CAA.GCT.TAT.CAG.CAC

* Posição do *primer* relativa ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

Foram desenhados *primers* externos à região do gene *pif-1*. Já para os genes *pif-2* os *primers* foram desenhados internamente aos genes. Para multiplicar a região codificadora dos genes utilizou-se a técnica "Polymerase Chain Reaction" (PCR). Os sistemas foram feitos com H₂O milliQ estéril, contendo as concentrações finais de: 20 ng de DNA molde dos clones virais, 0,4µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 0,02mM de MgCl₂, 5U da enzima *Taq* Polimerase (PHT) e 1X do tampão correspondente à enzima em um volume final de 50µl. Os programas para amplificação dos fragmentos de DNA foram realizados de acordo com Tabela 2.

Tabela 2: Programas de PCR para a amplificação de fragmentos de DNA dos genes *pif* de AgMNPV.

Programa*	Desnaturação 1min. (°C)	Anelamento 1min. (°C)	Polimerização (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
PIF-1	94°	55°	72°/1min.	30	2116
PIF-2		51°			896

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

Ensaio de virulência com larvas de *Anticarsia gemmatilis*: Para realização dos ensaios de virulência, poliedros derivados de larvas infectadas com os clones virais foram purificados como já citado. Os bioensaios foram feitos com o vírus selvagem AgMNPV-79, o clone

viral AgMNPV-2D, os clones purificados por *plaque assay* (AgL-06, AgL-16, AgL-34 e AgL-37) e com quatro clones selecionados por diluição serial. Para facilitar a realização dos bioensaios esses clones foram divididos em 2 grupos, Grupo A e Grupo B, respectivamente. Larvas de *Anticarsia gemmatalis* entre o 2º e 3º instares foram utilizadas para a realização do ensaio de virulência. Foram utilizados seis tratamentos, com duas repetições para cada clone viral, nas seguintes concentrações, com fator de diluição 3X: $4,8 \times 10^4$; $1,6 \times 10^4$; $5,4 \times 10^3$; $1,8 \times 10^3$; $6,0 \times 10^2$ e $2,0 \times 10^2$ OB/ml. Cada tratamento consistiu de 60 larvas, sendo distribuídas três larvas por copo de 50ml contendo 5ml de dieta artificial preparada sem conservantes e com adição da diluição viral. Nos controles não houve incorporação de vírus na dieta. As larvas foram mantidas em incubadora B.O.D., com temperatura entre 27°C a 28°C e fotoperíodo de 14h. Para avaliação da mortalidade, foram feitas observações diárias das larvas, a partir do quarto dia após a inoculação até o estágio de pupa. Ao final dos bioensaios os dados foram analisados pelo programa MicroProbit 3.0 (análise de Probit – Finney, 1978) para determinação da CL₅₀ – concentração letal média (concentração de vírus capaz de matar 50% dos insetos testados em bioensaio) e da TL₅₀ – tempo letal médio (tempo que leva para o vírus matar 50 % dos insetos testados em bioensaio). Outro parâmetro determinado foi o TM – tempo médio de morte (média do tempo necessário para que os insetos testados em um bioensaio morram) pela fórmula descrita por Morales et al. (2001), onde D é o dia de avaliação e N é o número de larvas mortas pelo vírus nesse dia:

$$TM = \frac{(D1 \times N1) + (D2 \times N2) + (D3 \times N3) + (D4 \times N4) \dots (Dn \times Nn)}{\text{Total de larvas mortas pelo vírus}}$$

Análise de restrição de clones virais: Amostras de DNA dos clones virais e do isolado selvagem foram clivadas com as enzimas de restrição *Pst*I (Jena Bioscience) e *Hind*III (Pharmacia). O sistema de digestão consistiu de um volume final de 30µl contendo: 1µg de DNA, 3µl do tampão correspondente (10x) e 1µl de enzima (10U). O sistema foi incubado por ~3h/37°C.

Identificação da ORF do gene *pif-3*: Para identificação da possível ORF de AgMNPV correspondente ao gene *pif-3*, a seqüência elucidada recentemente (OHKAWA et al., 2005) do gene *pif-3* (ORF 115) do vírus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (OHKAWA et al., 2005) foi obtida no banco de dados do GenBank disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov e alinhada com o genoma do vírus AgMNPV-2D utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). Foram desenhados *primers* internos, específicos à região relativa ao gene *pif-3* com base na seqüência obtida no BLASTx (Tabela 3).

Tabela 3: Seqüência dos primers utilizados para amplificação do gene *pif-3* e a localização desses no genoma do baculovirus AgMNPV-2D (OLIVEIRA et al., 2006).

Gene (tamanho)	Nome e posição* (nt)	Seqüência (5' > 3')
<i>pif-3</i> (611pb)	AgMNPV-Fwdpif3 (98.057)	AAC.AGC.ATC.TTG.TCG.TA
	AgMNPV-Revpif3 (98.528)	TTG.ATC.GTG.TAC.GTT.TC

* Posição do *primer* relativa ao primeiro nucleotídeo da seqüência.

Para amplificar a região de *pif-3* foi utilizada a técnica de PCR e reações como descrito no item 2.11. O programa para amplificação do fragmento de DNA foi realizado de acordo com Tabela 4.

Tabela 4: Programas de PCR para a amplificação do fragmento de DNA do gene *pif-3* de AgMNPV.

Programa*	Desnaturação 1min. (°C)	Anelamento 1min. (°C)	Polimerização (°C)	Ciclos	Tamanho esperado (pb)
Pif-3	94°	48°	72°/1min.	30	488

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

Resultados e Discussão

Para averiguação da presença de genótipos defectivos de AgMNPV, surgidos espontaneamente, uma população de clones virais foi selecionada a partir do isolado selvagem AgMNPV-79. Para aumentar a amostragem da população, o sobrenadante de células infectadas com o isolado AgMNPV-79, contendo as partículas BV, foi submetido a diluições seriais para isolamento de novos genótipos. A partir de uma série de três purificações consecutivas, 12 genótipos virais foram obtidos. Cada genótipo foi selecionado com base na capacidade de formação de poliedros durante a infecção de células Tn-5B1-4. Partículas BV desses clones virais permitiram sua amplificação em cultura de células sendo, em seguida, injetadas em lagartas *Anticarsia gemmatalis* para produção de poliedros.

Os genótipos virais, obtidos por diluição serial, foram nomeados: AgMNPV79-01, AgMNPV79-02, AgMNPV79-03, AgMNPV79-04, AgMNPV79-05, AgMNPV79-06, AgMNPV79-07, AgMNPV79-08, AgMNPV79-09, AgMNPV79-10, AgMNPV79-11 e AgMNPV79-12. O DNA de cada clone viral foi extraído a partir de suas partículas BV. Considerando os genótipos obtidos por *plaque assay*, a população viral em estudo totaliza

18 genótipos derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. O vírus selvagem AgMNPV-79 e o clone AgMNPV 2D, protótipo do vírus AgMNPV, foram usados como referência neste trabalho.

A heterogeneidade entre os genótipos da população em estudo foi verificada através da análise do perfil de restrição do DNA dos seguintes clones: AgL-06, AgL-16, AgL-34, AgL37, selecionados por *plaque assay*; Ag79-01, Ag79-02, Ag79-03 e Ag79-04, selecionados por diluição serial e o protótipo AgMNPV-2D. Nos perfis obtidos com as enzimas *Pst*I (Figura 1) e *Hind*III (Figura 2) verificou-se um polimorfismo no tamanho dos fragmentos presentes em cada genótipo, podendo ser diferenciados entre si por seus perfis de restrição.

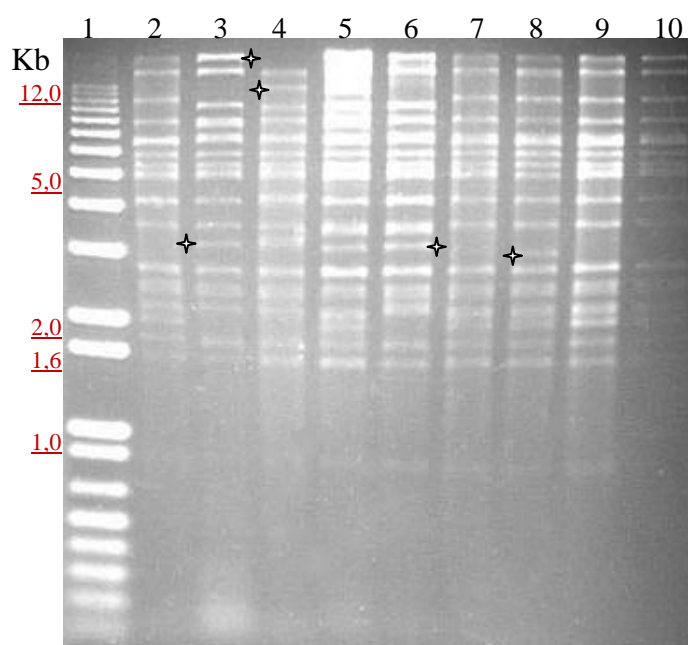


Figura 1: Perfil de restrição do DNA genômico dos clones virais clivado com a enzima *Pst*I. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. As estrelas indicam a presença de diferentes tamanhos de fragmentos entre os genótipos virais. Amostras: (1) marcador DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen); (2) AgMNPV-2D; (3) AgL-06; (4) AgL-16; (5) AgL-34; (6) AgL-37; (7) Ag79-01; (8) Ag79-02; (9) Ag79-03 e (10) Ag79-04.

A análise do perfil de restrição dos clones virais com enzima *Pst*I revelou dois grupos distintos de genótipos, aqueles selecionados por *plaque assay* (Grupo A: AgL-06, AgL-16, AgL-34, AgL37) e aqueles selecionados por diluição serial (Grupo B: Ag79-01, Ag79-02, Ag79-03 e Ag79-04). Observa-se uma heterogeneidade entre os isolados, sendo que um fragmento de $\sim 3,5$ Kb está presente apenas nos clones do grupo A diferenciando-os dos clones do grupo B. O clone AgL-16 (Figura 1, poço 4) foi o mais distinto em relação ao primeiro grupo, com ausência do fragmento de mais alto peso molecular e presença de um fragmento de ~ 12 Kb. Os clones do segundo grupo assemelharam-se ao protótipo AgMNPV-2D. No entanto, o clone Ag79-02 (Figura 1, poço 8) apresentou um fragmento extra de ~ 3 Kb, diferenciando-o dos demais.

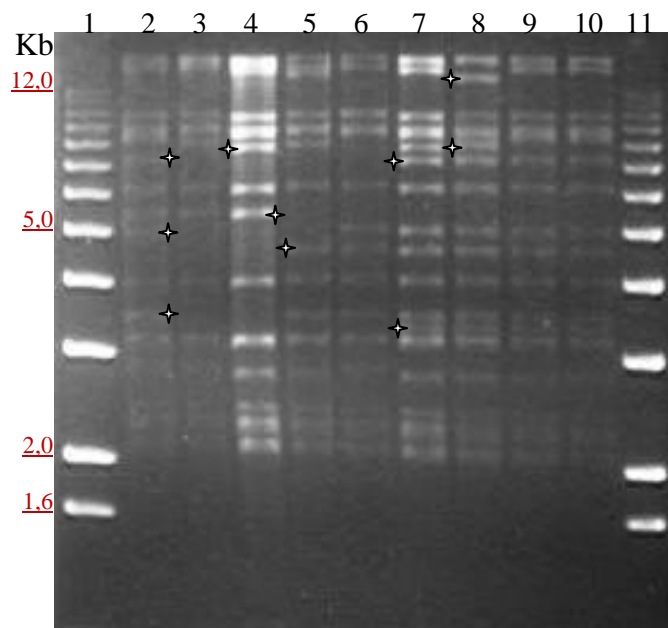


Figura 2: Perfil de restrição do DNA genômico dos clones virais clivado com a enzima *HindIII*. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. As estrelas indicam a presença de fragmentos de tamanhos diferentes ao longo do perfil de clivagem dos genótipos virais. Amostras: (2) AgMNPV-2D; (3) AgL-06; (4) AgL-16; (5) AgL-34; (6) AgL-37; (7) Ag79-01; (8) Ag79-02; (9) Ag79-03, (10) Ag79-04; (1) e (11) marcador DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen).

A análise dos genótipos virais por digestão com a enzima *HindIII* (Figura 2) mostrou novamente heterogeneidade na população. O grupo A apresentou uma maior diversidade de perfil de fragmentação. No grupo B os genótipos foram semelhantes, entretanto os genótipos Ag79-01 (Figura 2, poço 7) e Ag79-02 (Figura 2, poço 8) se distinguiram pela presença de um fragmento extra de ~8Kb. Além disso, o segundo fragmento do genótipo Ag79-02 (*HindIII*-B) apresentou um fragmento de peso molecular mais baixo que os demais. Da mesma forma, um fragmento de ~3,5Kb caracteriza os genótipos do grupo B. O protótipo AgMNPV-2D apresentou perfil de restrição diferente dos demais clones. Os dez genótipos da população analisada apresentaram variações em relação aos fragmentos obtidos através de clivagem com as enzimas *PstI* e *HindIII*. Dois grupos distintos de genótipos foram identificados, aqueles selecionados por *plaque assay* (AgL-06, AgL-16, AgL-34, AgL37) e aqueles selecionados por diluição serial (Ag79-01, Ag79-02, Ag79-03 e Ag79-04). Os clones do segundo grupo assemelharam-se ao protótipo AgMNPV-2D. Os resultados obtidos confirmam a pureza dos clones selecionados, uma vez que nenhuma banda submolar foi detectada nos perfis de restrição do DNA dos genótipos analisados, e revelam a heterogeneidade da população.

A verificação de que a maioria dos genótipos da população em estudo é heterogênea e sabendo-se que mutantes defectivos em relação à capacidade de infecção *per os* do inseto podem ser encontrados constituíram uma justificativa para se investigar, a partir de uma população de campo, a presença dos genes *pif-1* e *pif-2* nestes clones. Para isso o DNA

extraído dos clones foi submetido a reações de PCR com *primers* específicos para as regiões dos genes *pif-1* e *pif-2*. Para a região de *pif-1* todas as amostras apresentaram amplificação de um fragmento de ~2,1Kb (Figura 3) conforme o esperado.

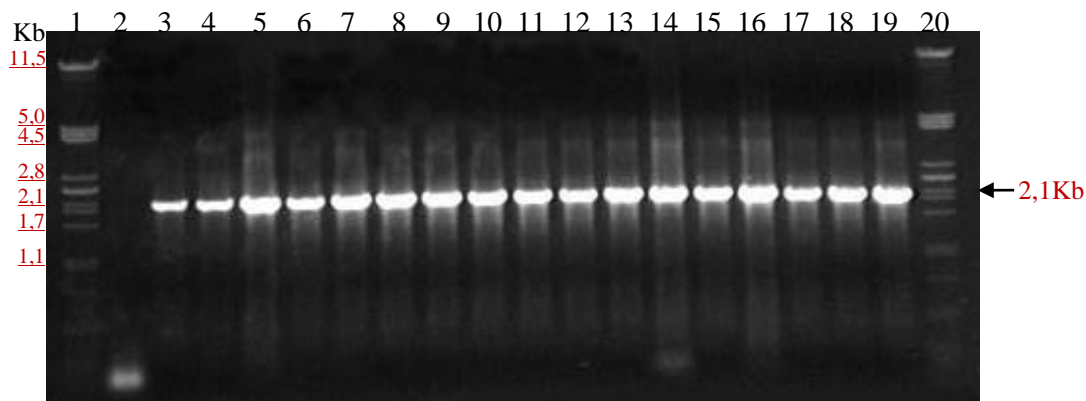


Figura 3: Amplificação do gene *pif-1* pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (2) controle negativo (sem DNA molde); (3) AgMNPV-79; (4) AgL-06; (5) AgL-16; (6) AgL-34; (7) AgL-37; (8) Ag79-01; (9) Ag79-02; (10) Ag79-03; (11) Ag79-04; (12) Ag79-05; (13) Ag79-06; (14) Ag79-07; (15) Ag79-08; (16) Ag79-09; (17) Ag-10; (18) Ag79-11; (19) Ag79-12; (1) e (20) marcador DNA fago λ /PstI.

Da mesma forma, para a região do gene *pif-2* todos os clones também apresentaram amplificação do fragmento esperado de ~800pb (Figura 16).

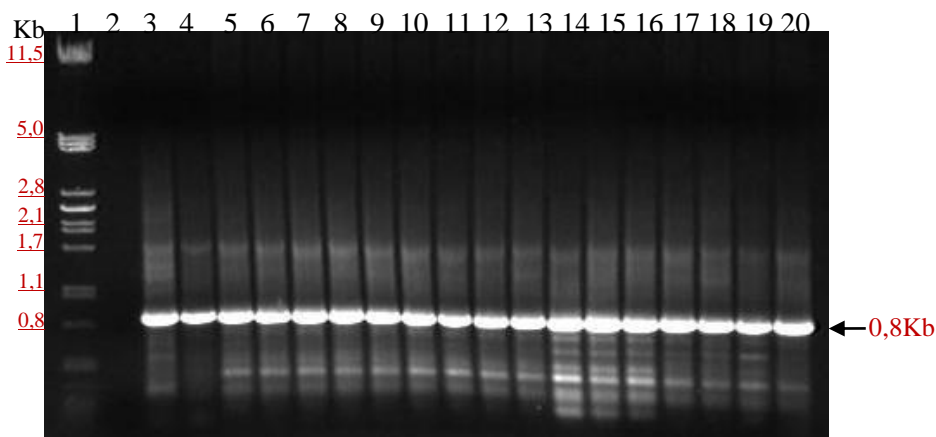


Figura 5: Identificação do gene *pif-2* pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (1) marcador DNA fago λ /PstI; (2) controle negativo (sem DNA molde); (3) AgMNPV-79; (4) AgMNPV-2D; (5) AgL-06; (6) AgL-16; (7) AgL-34; (8) AgL-37; (9) Ag79-01; (10) Ag79-02; (11) Ag79-03; (12) Ag79-04; (13) Ag79-05; (14) Ag79-06; (15) Ag79-07; (16) Ag79-08; (17) Ag79-09; (18) Ag79-10; (19) Ag79-11; (20) Ag-12.

Bioensaios foram realizados para avaliar a patogenicidade dos clones virais AgL-06, AgL-16, AgL-34 e AgL-37 (grupo A) e AgMNPV-79-01, 02, 03 e 04 (grupo B) comparada aos vírus selvagem AgMNPV-79 e o clone viral AgMNPV-2D, em larvas de *Anticarsia gemmatalis* com base na determinação da concentração letal média (CL₅₀), tempo letal médio (TL₅₀), tempo de morte (TM) e da taxa de mortalidade (%).

As tabelas 4 e 5 mostram os resultados da concentração letal média e os respectivos intervalos de confiança (95%) calculados usando o programa de análise de Probit. Observa-se que larvas tratadas com diferentes concentrações dos clones AgL do grupo A não houve grandes variações na CL₅₀, ficando a menor com clone AgL-06 com 894 PIB/ml e a maior a do clone AgL-16 com 1301 PIB/ml (Tabela 4). Enquanto que os clones do grupo B apresentaram concentrações letais (CL₅₀) bastante diferentes, variando de 75 PIB/ml (clone AgMNPV79-01) a 463 PIB/ml (clone AgMNPV79-02), o que corresponde afirmar que o primeiro é capaz de matar 50% da população com uma concentração viral cerca de 6x menor do que o segundo clone. Portanto, o clone AgMNPV79-01 constitui-se como o mais virulento dentre os avaliados (Tabela 5). Os vírus AgMNPV-79 e AgMNPV-2D tiveram suas CL₅₀ muito próximas, não havendo diferença significativa entre eles.

Tabela 4.1: Concentração letal média (CL₅₀) dos clones virais (grupo A) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus*	CL₅₀ (PIB/ml) **	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	χ²
AgMNPV-79	414	323 – 522	1.62	8.39
AgMNPV-2D	616	468 – 826	1.30	5.16
AgL-06	894	689 – 1185	1.40	2.31
AgL-16	1301	1003 – 1740	1.61	9.24
AgL-34	1061	772 – 1516	1.10	5.09
AgL-37	995	576 – 2011	1.70	12.46

*Concentrações utilizadas para cada clone viral: 20, 60, 180, 540, 1600 e 4860 PIB/ml e H₂O

**CL₅₀: Concentração de poliedros necessária para matar 50% da população de larvas em teste.

Tabela 5: Concentração letal média (CL₅₀) dos clones virais (grupo B) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus*	CL₅₀ (PIB/ml) **	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	χ²
AgMNPV-79	551	232 – 1093	1.61	18.18
AgMNPV-2D	432	262 – 854	2.16	14.15
AgMNPV79-01	75	38 – 124	1.63	9.77
AgMNPV79-02	463	352 – 614	1.27	8.83
AgMNPV79-03	151	69 – 277	1.71	16.07
AgMNPV79-04	277	147 – 503	1.59	13.19

*Concentrações utilizadas para cada clone viral: 20, 60, 180, 540, 1600 e 4860 PIB/ml e H₂O

**CL₅₀: Concentração de poliedros necessária para matar 50% da população de larvas em teste.

As TL_{50} dos clones do grupo A, determinadas em relação à concentração de 540 PIB/ml, variaram de 10,28 a 11,55 dias, enquanto que na mais alta concentração (4860 PIB/ml) foi de 8,04 a 8,29 dias, o que representa uma redução de cerca de 2 dias no tempo necessário para que 50% da população de insetos testados morram (Tabela 6). Já no grupo B (Tabela 7) há uma notável diferença em relação à concentração de 540 PIB/ml do clone Ag79-01 que precisou de ~7 dias para matar 50% da população. Essa média foi a menor em relação aos clones desse grupo e também em relação ao selvagem que precisou de ~10 dias para matar as larvas testadas nessa concentração. Na maior concentração usada (4860 PIB/ml), essa redução torna-se ainda mais notável, quando se compara as TL_{50} dos clones dos grupos A e B com as TL_{50} do vírus selvagem Ag79 (6,15 e 6,81 dias), que juntamente com a do clone Ag79-01 de 6,31 dias, se apresentam como os mais eficazes por matar mais rapidamente as larvas testadas sendo portanto, considerados, com base no tempo letal (TL_{50}), os mais patogênicos dos testados nos bioensaios (tabelas 6 e 7).

Tabela 6: Tempo letal médio (TL_{50}) dos clones virais (Grupo A) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	TL_{50} * (dias)	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	χ^2
AgMNPV-79	540	10,32	9,44 – 11,72	9,01	17,83
	4860	6,81	6,38 – 7,4	36,2	29,2
AgMNPV-2D	540	10,28	9,5 – 11,6	12,12	23,61
	4860	8,29	7,71 – 9,10	13,00	28,07
AgL-06	540	11,5	10,82 – 12,5	8,04	9,8
	4860	8,04	7,58 – 8,61	12,79	10,00
AgL-16	540	11,38	10,32 – 13,53	10,33	18,93
	4860	8,22	7,56 – 9,24	13,14	38,71
AgL-34	540	11,55	10,5 – 13,67	10,2	15,93
	4860	8,19	7,52 – 9,22	13,24	40,17
AgL-37	540	11,44	10,88 – 12,25	10,54	11,6
	4860	8,14	7,59 – 8,91	13,57	28,05

* TL_{50} : Média de tempo em dias necessários para matar 50% da população de larvas em teste.

Tabela 7: Tempo letal médio (TL₅₀) dos clones virais (Grupo B) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	TL ₅₀ * (dias)	Limites Fiduciais (95%)	SLOPE	χ^2
AgMNPV-79	540	10,09	9,26 – 11,39	9,2	18,70
	4860	6,14	5,83 – 6,52	15,53	13,61
AgMNPV-2D	540	9,91	9,54 – 10,35	10,0	9,55
	4860	7,28	6,83 – 7,92	17,28	26,39
Ag79-01	540	7,57	7,13 – 8,16	15,7	22,08
	4860	6,31	6,14 – 6,49	16,20	5,27
Ag79-02	540	10,81	10,28 – 11,51	8,6	10,6
	4860	7,50	7,08 – 8,08	16,09	21,39
Ag79-03	540	8,95	8,29 – 9,87	11,0	23,86
	4860	**	**	**	**
Ag79-04	540	8,89	8,61 – 9,21	11,4	12,03
	4860	**	**	**	**

*TL₅₀: Média de tempo em dias necessários para matar 50% da população de larvas em teste.

**Valores não obtidos.

Em relação ao Tempo Médio de Morte (TM), o vírus Ag79 (Tabela 8), levou cerca de 8 dias para matar metade das larvas do ensaio em uma concentração de 540 PIB/ml, e cerca de 7 dias para matar todas as lagartas em teste na concentração de 4860 PIB/ml. Com exceção do genótipo AgL-37 que apresentou TM de ~9 e 8 dias, os genótipos na concentração mais baixa avaliada apresentaram ~8 dias com uma mortalidade de ~35% e TM de ~7 a 8 dias com mortalidade com cerca de 80% para a concentração mais alta avaliada.

Tabela 8: Tempo médio de morte (TM) dos clones virais (Grupo A) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	Número de larvas mortas	Mortalidade (%)	Tempo médio de morte (dias)
AgMNPV-79	540	30	50	8,43
	4860	60	100	7,72
AgMNPV-2D	540	33	55	8,91
	4860	51	85	8,22
AgL-06	540	21	35	8,52
	4860	53	88,3	8,09
AgL-16	540	21	35	8,67
	4860	47	78,3	7,87
AgL-34	540	21	35	8,90
	4860	49	81,6	7,98
AgL-37	540	22	36,6	9,14
	4860	50	83,3	8,00

Já no grupo B (Tabela 9) o clone que apresentou um TM mais baixo (6,8 dias) foi o genótipo Ag79-01 em ambas as concentrações. A mortalidade apresentada na concentração de 540PIB/ml foi de 93,3% com um TM de 7,8 dias. Na concentração de 4860PIB/ml foi de 100% se igualando ao selvagem Ag-79 que obteve TM e taxa de mortalidade semelhantes para a concentração mais alta (6,7 dias e 100%, respectivamente). O genótipo Ag79-02 foi o que obteve um TM mais alto na concentração mais alta testada (~ 8 dias) e taxa de mortalidade mais baixa (91,6%). O genótipo Ag79-01 foi o vírus que obteve melhores resultados em relação aos parâmetros testados, apresentado maior virulência.

Tabela 9: Tempo médio de morte (TM) dos clones virais (Grupo B) em larvas de *Anticarsia gemmatalis* (método de Probit).

Vírus	Concentração (PIB/ml)	Número de larvas mortas	Mortalidade (%)	Tempo médio de morte (dias)
AgMNPV-79	540	29	48,3	8,14
	4860	60	100	6,72
AgMNPV-2D	540	37	61,6	8,97
	4860	58	96,6	7,59
AgMNPV79-01	540	56	93,3	7,84
	4860	60	100	6,87
AgMNPV79-02	540	25	41,6	8,48
	4860	55	91,6	7,76
AgMNPV79-03	540	44	73,3	8,32
	4860	60	100	7,58
AgMNPV79-04	540	46	76,6	8,57
	4860	60	100	7,75

Esses ensaios de virulência evidenciaram diferenças na patogenicidade de cada clone viral. No entanto, o genótipo que mais se destacou, devido a sua alta virulência, foi o clone Ag79-01 que revelou uma CL_{50} de 75PIB/ml, sendo os parâmetros de TL_{50} , TM e taxa de mortalidade mais baixos em relação a todos os clones testados. Todos os clones virais tiveram capacidade de estabelecer infecção primária quando inoculados na dieta dos insetos testados. Portanto, embora a seqüência nucleotídica dos genes *pif* identificados não tenha sido determinada neste trabalho, esses resultados demonstram que não houve modificações genéticas que interferissem na atuação das proteínas PIF nessa população-teste. De acordo com a literatura, alteração em qualquer um dos genes *pif* deveria acarretar o bloqueio da infecção por via oral.

Em trabalho publicado (OLIVEIRA et al., 2006) sobre o seqüenciamento completo do genoma de vírus AgMNPV-2D, o gene *pif-3* não é relatado. Portanto, para identificação da ORF correspondente ao gene *pif-3* do vírus AgMNPV, a seqüência nucleotídica do gene *pif-3* (ORF 115) do vírus AcMNPV foi obtida no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e em seguida realizada uma análise de BLASTx com o genoma do vírus AgMNPV. Na análise do

alinhamento, a ORF 114 de AgMNPV apresentou 83% de similaridade e 67% de identidade com a seqüência protéica de PIF-3 de AcMNPV.

Na análise de BLAST da ORF relativa ao gene *pif-3* de AgMNPV é observada uma maior similaridade de aminoácidos (94%) com a ORF do vírus CfDefNPV. Similaridades nas regiões da ORF 114 de AgMNPV com a ORF 115 (*pif-3*) de AcMNPV sugerem que essa região pode estar envolvida nos processos de estabelecimento da infecção oral.

A ORF 114 foi então identificada como o gene *pif-3* de AgMNPV. Esse gene possui 612 nucleotídeos. Uma ORF de função não conhecida (ag113) está a jusante ao gene e a ORF correspondente ao gene *bro-g* (ORF 115) está situada a montante do gene *pif-3*.

A partir da identificação da ORF relativa ao gene *pif-3* de AgMNPV, *primers* internos foram desenhados para amplificação desta região pela técnica de PCR. Todos os clones selecionados neste trabalho tiveram a região amplificada (fragmento de ~488pb) como apresentado na Figura 6.

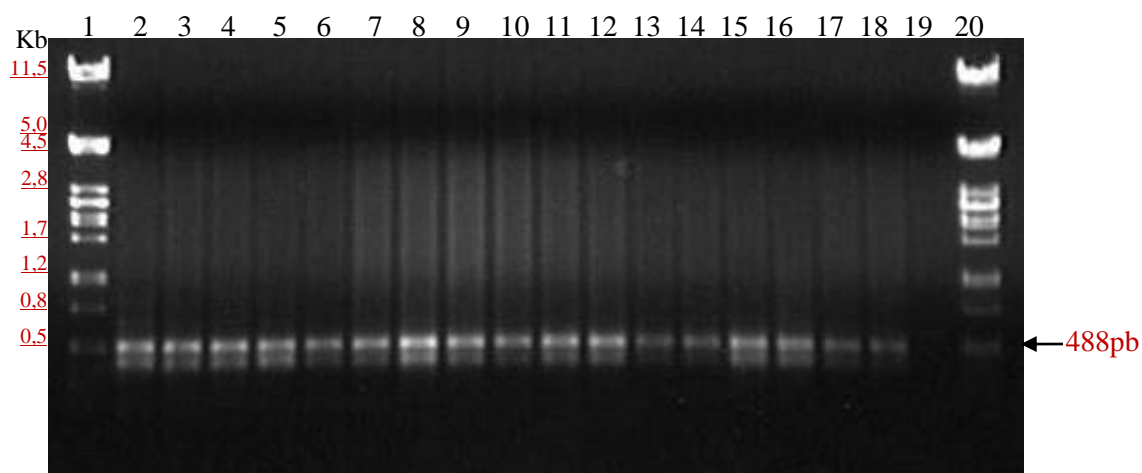


Figura 6: Identificação do gene *pif-3* pela técnica de PCR em clones derivados do vírus selvagem AgMNPV-79. Análise por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Amostras: (2) AgMNPV-79; (3) AgL-06; (4) AgL-16; (5) AgL-34; (6) AgL-37; (7) Ag79-01; (8) Ag79-02; (9) Ag79-03; (10) Ag79-04; (11) Ag79-05; (12) Ag79-06; (13) Ag79-07; (14) Ag79-08; (15) Ag79-09; (16) Ag79-10; (17) Ag79-11, (18) Ag79-12, (19) controle negativo (sem DNA molde); (1) e (20) marcador DNA fago λ /*Pst*I

A ORF 114 de AgMNPV foi identificada como relativa ao gene *pif-3* e seu estudo é de extrema importância e sua função ainda não foi bem elucidada. Análises de expressão temporal dos genes *pif* (RT-PCR) e utilização da técnica de RNA interferente para bloqueio da tradução protéica, bem como o estudo da função e localização das proteínas PIF devem ser realizados para auxiliar o entendimento a respeito dos genes *pif*, sobre seus produtos e o seu papel durante a infecção do inseto.

Os genes *pif* são essenciais para o estabelecimento da infecção oral e o estudo desses genes pode trazer relevantes descobertas a respeito da biologia do vírus, bem como a respeito do processo de fusão que ocorre entre as partículas ODV e as células do intestino

médio do inseto. Esse trabalho constituiu um passo inicial e importante no estudo de genes *pif* do baculovirus *Anticarsia gemmatalis multiple nucleopolyhedrovirus*.

Referências

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- CORY, J. S.; MYERS, J. H. The ecology and evolution of baculoviruses. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, US, v. 34, p. 239-272, 2003.
- FAULKNER, P.; KUZIO, J.; WILLIAMS, G. V.; WILSON, J. A. Analyses of p74, a PDV envelope protein of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* required for occlusion body infectivity in vivo. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 78, 3091-3100, 1997.
- FEDERICI, B. A. Baculovirus pathogenesis. In: MILLER, L. K. (Ed.). **The baculoviruses**. New York: Plenum, 1997. p. 33-59.
- FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1978.
- GRANADOS, R. R.; GUOXUN, L.; DERSKSEN, A. C. G.; MCKENNA, K. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 64, p. 260-266, 1994.
- 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.
- GREENE, G. L.; LEPPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 69, p. 487-488, 1976.
- GUTIÉRREZ, S.; MUTUEL, D.; GRARD, N.; CERUTTI, M.; LÓPEZ-FERBER, M. The deletion of the *pif* gene improves the biosafety of the baculovirus-based technologies. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, NL, v. 116, p. 135-143, 2005.
- HAAS-STAPLETON, E. J.; WASHBURN, J. O.; VOLKMAN, L. E. P74 mediates specific binding of *Autographa californica multiple 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.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B. de; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina, Embrapa-CNPSo, 1985. 23 p. (Embrapa-CNPSo. Documentos, 10).
- JEHLE, J. A.; LANGE, M.; WANG, H.; HU, Z.; WANG, Y.; HAUSCHILD, R. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from *Lepidoptera*. **Virology**, New York, US, v. 346, p. 180-193, 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.
- 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.
- LÓPEZ-FERBER, M.; SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. **Proceedings of the Royal Society of London: Série B Biological Sciences**, London, GB, v. 270, p. 2249–2255, 2003.
- MORALES, L.; MOSCARDI, F.; PARO, F.; SOLDORIO, I. Fluorescent brighteners improve *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) activity on AgMNPV-susceptible and resistant strains of the insect. **Biological Control**, Orlando, US, v. 20, p. 247-253, 2001.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. New York: Oxford University Press, 1992. 347 p.
- OHKAWA, T.; WASHBURN, J. O.; SITAPARA, R.; SID, E.; VOLKMAN, L. E. Specific binding of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of *pif* genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. **Journal of Virology**, Washington, US, v. 79, p. 15258-15264, 2005.
- OLIVEIRA, J. V. C.; WOLFF, J. L. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B. M.; CASTRO, M. E. B.; SOUZA, M. L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J. E.; ZANOTTO, P. M. A. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 87, p. 3233-3250, 2006.
- PIJLMAN, G. P.; PRUIJSSERS, A. J. P.; VLAK, J. M. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects. **Journal of General Virology**, London, GB, v. 84, p. 2041-2049, 2003.
- SIEBURTH, P. J.; MARUNIAK, J. E. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **In Vitro Cell Development of Biology**, v. 24, p. 195-198, 1988.
- SIMÓN, O.; GUTIÉRREZ, S.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *pif* gene of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV). **Virus Research**, Amsterdam, NL, v. 108, p. 213–220, 2005.
- SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. **Proceedings of the Royal Society of London: Série B Biological Sciences**, London, GB, v. 273, p. 783-790, 2006.
- SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; LÓPEZ-FERBER, M.; CABALLERO, P. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 70, p. 5579-5588, 2004.

SOUZA, M. L. de; CASTRO, M. B. de; SIHLER, W.; KROL, E.; SZEWCZYK, B.
Baculoviruses: a safe alternative in pest control? **Pest Technology**, v. 1, p. 53-60, 2007.

SOUZA, M. L.; CASTRO, M. E. B.; MOSCARDI, F. Virus for the biological control of insects. In: PIMENTEL, D.; SCHMID, O. (Ed.). **Encyclopedia of pest management**. New York: Marcel Dekker, 2004.

THEILMANN, D. A.; BLISSARD, G. W.; BONNING, B.; JEHLE, J.; O'REILLY, D. R.; ROHRMANN, G. F.; THIEM, S.; VLAK, J. M. Family *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. 177-185. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

YAO, L.; ZHOU, W.; XU, H.; ZHENG, Y.; QI, Y. The *Heliothis armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus* envelope protein P74 is required for infection of the host midgut. **Virus Research**, Amsterdam, NL, v. 104, p. 111-121, 2004.

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