



Baculovírus recombinante para controle de praga

Construção de um baculovírus *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) geneticamente modificado para o controle da lagarta da soja, *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)

INTRODUÇÃO

O uso de inseticidas químicos, além de ser prejudicial ao meio ambiente e ao homem, é, na maioria das vezes, de alto custo para o agricultor. O controle biológico de pragas utilizando microorganismos é uma alternativa ao uso de inseticidas químicos. Uma das principais vantagens do uso de inseticidas biológicos ou bioinseticidas é a sua alta especificidade com relação à praga alvo, não afetando outros insetos, plan-

dos exclusivamente em invertebrados e principalmente nos insetos. Dentre os insetos, várias pragas da ordem lepidóptera são infectadas por baculovírus. Como os baculovírus são altamente específicos, o seu uso para controlar pragas da lavoura é bastante seguro, pois eles não infectam o homem, nem as plantas, nem outros insetos (Groner, 1989). Uma das vantagens do uso desse vírus para o controle de *A. gemmatalis* é o grande tempo entre a infecção e a morte do

Ag	Lo	Spli	Bs	Ld	Mb	Hear	Ac	Cf	Op	CfDEF	Ag
Identidade	49	50.3	54	54.1	54.3	54.4	71	76.8	79	96.7	100
Similaridade	37.6	40.2	44.8	45.9	45.3	44.9	63	73.3	74.3	95.9	100

Tabela 1. Porcentagem de similaridade e identidade de aminoácidos das proteínas EGT de diferentes baculovírus. Os dados foram obtidos usando os programas Blast, Fetch e Gap do UWGCG package da Universidade de Wiconsin (USA). Ag = *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV); Bs= *Bussura supressaria* nucleopolyhedrovirus (BsMNPV); Hear = *Heliothis armigera* nucleopolyhedrovirus (HearMNPV); LoGV = *Lacanobia oleracea* granulovirus (LoGV); Spli = *Spodoptera litoralis* nucleopolyhedrovirus (SpliMNPV); Mb= *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus (MbMNPV); Ld= *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (LdMNPV); *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV); Op = *Orgyia pseudosugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV); *Choristoneura fumiferana* DEF nucleopolyhedrovirus (CfDEF)

Bergmann Morais Ribeiro, Ph.D.
Prof. do Departamento de Biologia Celular,
Pesquisador do Laboratório de Microscopia
Eletrônica e Virologia, Universidade de
Brasília, Campus Universitário, Brasília DF
bergmann@umb.br

Francisco José Rivera Pinedo, M.Sc.,
Estudante de doutorado do curso de Biologia
Molecular do Departamento de Biologia
Celular, Universidade de Brasília, Campus
Universitário, Brasília DF

tas e animais. Vários países utilizam bioinseticidas para controle de pragas da lavoura e esses agentes já representam mais de 2% do mercado de inseticidas no mundo. O Brasil possui o maior programa mundial de uso de um vírus contra uma praga. O uso do baculovírus *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) contra a lagarta da soja (*A. gemmatalis*) já é usado em mais de 1 milhão de hectares de soja no país e constitui uma alternativa real ao controle químico dessa praga (Ribeiro *et al.*, 1998; Moscardi *et al.*, 1999).

Os baculovírus são vírus encontra-

inseto alvo (4-14 dias), desta forma, após a aplicação do vírus, o inseto ainda consegue causar dano à lavoura antes de sua morte.

O baculovírus AgMNPV pertence à família Baculoviridae, que possui DNA circular, dupla-fita, com mais de 100.000 pares de bases (pb) (Murphy *et al.*, 1995) e que foram encontrados infectando apenas artrópodes (Federici *et al.*, 1986). Durante a infecção, ocorre a produção de duas formas virais fenotipicamente distintas. O vírus extracelular, ou "budded virus", é produzido na fase inicial da infecção e é responsável pela disseminação do vírus de célula a

Vírus	LC ₅₀	Intervalo de confiança	
		menor	maior
AgMNPV	78	41	174
vAgEGTΔlacZ	25	12	48

Tabela 2. Valores de LC₅₀ para os vírus selvagem AgMNPV e recombinante vAgEGTΔlacZ

célula, dentro de um mesmo inseto. A outra forma do vírus é produzida na fase tardia da infecção e resulta da oclusão de vírions em corpos protéicos de inclusão. Essa forma do vírus é denominada de corpo de oclusão (CO) ou poliedro e é responsável pela disseminação do vírus entre insetos, no meio ambiente. O baculovírus melhor caracterizado até o momento é o *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), que possui o genoma totalmente seqüenciado (Ayres *et al.*, 1994) e cujo ciclo de infecção tem sido exaustivamente estudado *in vitro* e *in vivo*.

A expressão gênica dos baculovírus é regulada em cascata e dividida em duas classes principais de genes: Os genes precoces (P), que são expressos antes da replicação do DNA viral e os genes tardios (T), que dependem da replicação do DNA viral e da expressão de fatores transcricionais virais (Blissard *et al.*, 1990, Friesen, 1997, Lu & Miller, 1997). A presença de promotores fortes, hiper-expressos e genes não essenciais para a replicação do vírus em cultura de células, permitiram o desenvolvimento de vetores de expressão baseados em baculovírus (O'Reilly *et al.*, 1992, Possee, 1997; Jarvis, 1997) e a manipulação genética desses vírus visando ao aumento da propriedade inseticida (Tomalski & Miller, 1991; Stewart *et al.*, 1991).

Os níveis de hormônios ecdisteróides, responsáveis pela mudança de estágio larval e pela metamorfose do inseto hospedeiro, são regulados pelos baculovírus durante o seu ciclo de infecção (O'Reilly & Miller, 1989, O'Reilly, 1995, Burand *et al.*, 1996). Essa regulação é feita através da expressão

da enzima viral ecdisteróide UDP-glicosiltransferase (EGT), uma enzima que catalisa a transferência de um monossacarídeo (UDP-glicose ou UDP-galactose) para o hormônio ecdisona, causando, dessa forma, sua inativação.

tam-se menos e morrem mais cedo em relação às larvas infectadas com o vírus tipo selvagem. (O'Reilly Miller, 1991). Todos os baculovírus seqüenciados até o momento possuem um gene *egt* (Ayres *et al.*, 1994; Ahrens *et al.*, 1997; Gomi *et al.*, 1999; Kuzio *et al.*, 1999; Ijkel *et al.*, 1999).

Embora o baculovírus AgMNPV esteja sendo usado em larga escala no Brasil, pouco se sabe sobre a sua biologia molecular. Uma pequena porção do genoma do AgMNPV foi seqüenciado até o momento (Zanotto *et*

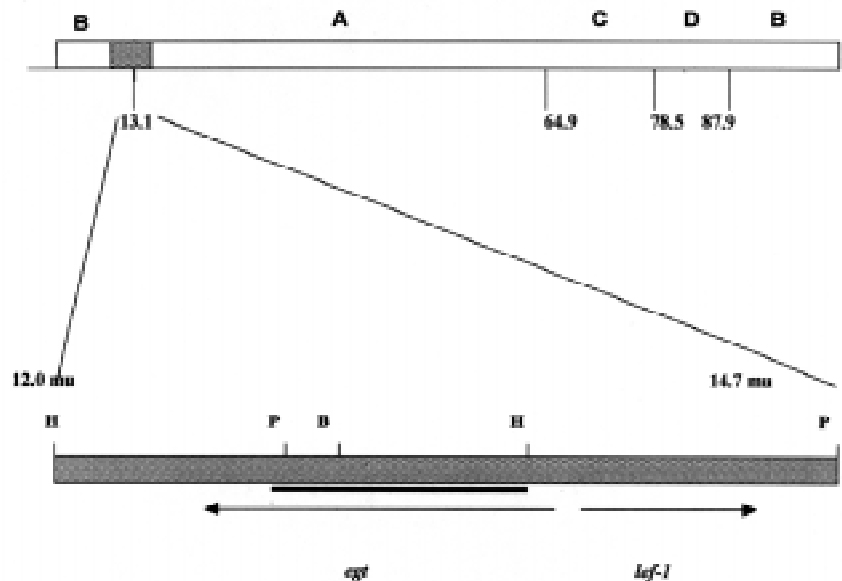


Figura 1. Diagrama do mapa físico do genoma do vírus AgMNPV com a enzima de restrição *Bam* HI (Johnson & Maruniak, 1989). A área marcada em cinza mostra a região do genoma detectada pela sonda específica para o gene *egt* de AgMNPV. Essa região de 3.4 kpb foi clonada no plasmídeo pBluescript. Um esquema detalhado da região do gene *egt* de AgMNPV é mostrado logo abaixo da organização genômica. As ORFs correspondentes ao gene *egt* e *lef-1* são mostradas na figura. A linha escura mostra a localização da sonda derivada de PCR. Os sítios para as enzimas de restrição *Hind* III (H), *Pst* I (P) e *Bam* HI (B) são também mostrados na figura

Como resultado, larvas infectadas por baculovírus não fazem a muda e continuam comendo, levando a um ganho de peso após a infecção e a um aumento na produção de vírus. Por outro lado, larvas infectadas com baculovírus mutantes para o gene *egt* alimen-

al., 1992; Garcia-Maruniak *at al.*, 1996; Liu & Maruniak, 1999; Ribeiro *et al.*, 2001). O genoma de AgMNPV foi mapeado com várias enzimas de restrição e possui por volta de 133 kb (Johnson & Maruniak, 1989). AgMNPV é capaz de replicar eficientemente em cultura

	Número de larvas de <i>A. gemmatalis</i> mortas (h p.i.)							
Virus (50 poliedros/ larva)	72	96	120	144	168	192	216	240
AgMNPV	0	1	1,5	6	9	12,5	13	14
vAgEGTΔLacZ	0	1,5	8	12,5	15	17	17,5	18

Tabela 3. Número de larvas de *A. gemmatalis* mortas após a infecção de 30 insetos (50 poliedros/ larva) com os vírus AgMNPV e vAgEGTΔLacZ. Os dados são a média aritmética de 2 bioensaios diferentes

	Número de larvas de <i>A. gemmatalis</i> mortas h p.i.							
Vírus (100 poliedros/ larva)	72	96	120	144	168	192	216	240
AgMNPV	0	1	1,5	7	10,5	14,5	16,5	17,5
vAgEGTΔ <i>LacZ</i>	0	1	7	10,5	14,5	16,5	19	19

Tabela 4. Número de larvas de *A. gemmatalis* mortas após a infecção de 30 insetos (100 poliedros/ larva) com os vírus AgMNPV e vAgEGTΔ*LacZ*. Os dados são a média aritmética de 2 bioensaios diferentes

de células de *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* e *Anticarsia gemmatalis* (Sieburth & Maruniak, 1988a). Além dos estudos moleculares, o processo de infecção do AgMNPV, *in vitro* e *in vivo* está sendo estudado no laboratório de Microscopia Eletrônica e Virologia da Universidade de Brasília (Silveira *et al.*, 1999; Pombo *et al.*, 1998; Matos *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2001).

Neste trabalho, nós apresentamos a localização, a clonagem, o seqüenciamento do gene *egt* do baculovírus AgMNPV e a construção de um vírus geneticamente modificado contendo o gene *egt* inativado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Células e vírus

Células de *Spodoptera frugiperda* (IPLB-SF-21) e *A. gemmatalis* (UFL-AG-286) (Vaughn *et al.*, 1977; Sieburth & Maruniak, 1988a) foram mantidas em meio TC-100 (Life- Technologies), contendo 10% de soro fetal bovino. As células UFL-AG-286 foram usadas para a propagação do vírus AgMNPV (Sieburth & Maruniak, 1988b).

Identificação do gene *egt* de AgMNPV

Para a identificação do gene *egt* no genoma do AgMNPV, nós usamos a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), com oligonucleotídeos degenerados (1 = EGT+98D 5'GCC GAA TTC TIC CIA CIC CIA (G/T)IT A(C/T)A G(C/T)C 3' e 2 = EGT+1158D 5' GCC GGA TCC ITG (A/G)TC ICC CAT IAI NGG 3'), baseados em regiões conservadas de genes *egt* (correspondentes aos nucleotídeos 98-117 e 1142-1158 da seqüência do gene *egt* do baculovírus AcMNPV, Clarke *et al.*, 1996). Os nucleotídeos sublinhados indicam os sítios de restrição *EcoRI* e *BamHI* que foram adicionados aos oligonucleotídeos para facilitar a clo-

nagem do fragmento de PCR em um plasmídeo. O PCR foi conduzido em um volume de 25 µl contendo 2,5 µl do tampão 10X Taq DNA polymerase buffer (Pharmacia Biotech), 10 ng do DNA do vírus AgMNPV, 1,25 mM de uma mistura de dNTP, 0,5 µg de cada oligonucleotídeo e 5 U da enzima Taq DNA polimerase (Pharmacia Biotech). Trinta ciclos com um passo de desnaturação a 94 °C/ 60 seg, um de anelamento a 45 °C / 90 seg e um de extensão a 72 °C / 90 seg foram feitos em um aparelho Perkin Elmer. O fragmento de PCR foi, então, marcado com digoxigenina usando-se o kit DIG DNA Labeling and Detection kit (Boehringer Mannheim) e usado como sonda para detectar o gene *egt* no genoma do AgMNPV. O DNA do AgMNPV foi digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Pst* I, seguindo as instrução do fabricante (Life-Technologies), separados em um gel de agarose 0.8% e transferidos para uma membrana de nylon. Os fragmentos *Hind*III-V e *Pst*I-Q, que foram detectados pela sonda, foram clonados no plasmídeo pBluescript KS+ (Stratagene) e o plasmídeo resultante (pHHU) foi totalmente seqüenciado no DNA Sequencing Core Facility at Queens University (Kingston, Ontário, Canadá). Os dados da seqüência foram analisados usando-se os programas contidos no UWGCG package (Devereux *et al.*, 1984) e no web site protein structure prediction (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>).

Plasmídeos usados na construção do vírus recombinante vAgEGTΔ*LacZ*

Os plasmídeos usados para a construção do vírus recombinante vAgEGTΔ*LacZ* foram o ΔpHHV, pAcDZ1 (Zuidema *et al.*, 1990) e ΔpHHV-EGTΔ*lacZ*. O plasmídeo ΔpHHV foi construído através da digestão dupla do plasmídeo pHHU (Rodrigues *et al.*, 2001) com as enzimas *Xba* I e *Sma* I, trata-

mento das terminações coesivas com a enzima Klenow para produção de finais abruptos, seguindo as instruções do fabricante (Amerham) e ligação do plasmídeo, usando-se técnicas básicas em biologia molecular (Sambrook *et al.*, 1989). Isso foi feito para remover um sítio de restrição para a enzima *Bam* HI, presente no sítio de multiclonagem do plasmídeo pHHU, deixando um sítio único de *Bam* HI, localizado a + 891 nucleotídeos com relação ao nucleotídeo A do codon de início (ATG) do gene *egt* de AgMNPV. O plasmídeo ΔpHHV contém um fragmento de 3.2 pares de kilobases (pkp) do DNA do vírus AgMNPV (entre 11.9 e 14.7 unidades de mapa, Johnson e Maruniak, 1989), clonado no plasmídeo pBluescript (Stratagene). O plasmídeo pAcDZ1 contém o cassete gênico *hsp70-lacZ* (3.7 pkb), que consiste do gene repórter *lacZ* sob o comando do promotor constitutivo *hsp70* de *Drosophila melanogaster* (Zuidema *et al.*, 1990). Digerindo o pAcDZ1 com *Bam* HI e *Xba* I e o plasmídeo ΔpHHV com *Bam* HI, foi possível separar e isolar o cassete *hsp70-lacZ* e o plasmídeo ΔpHHV linearizado. Os fragmentos foram, então, tratados com a enzima Klenow para a construção de terminações abruptas, ligados e usados para transformar células competentes de *E. coli* (DH5α, Life Technologies) por eletroporação (Sambrook *et al.*, 1989). O clone contendo o cassete gênico *hsp70-lacZ* foi denominado ΔpHHV-EGTΔ*lacZ*.

Ensaio de atividade da proteína EGT

Células IPLB-SF-21 cells (2 x 10⁶) foram infectadas com AgMNPV com 20 pfu / célula. Alternativamente, as células foram transfectadas com 0.5 µg de DNA de vEGTDEL (um vírus mutante de AcMNPV com uma deleção no gene *egt*) e/ou 1 µg de DNA plasmidial, usando-se o método de fosfato de cálcio como descrito em O'Reilly *et al.*

1 ATTTGGTCCACATTAGTGTACTTGCACGGC

31 GCGATGTAGGGCGTCTATAAAATCGGGTCCACGGCTTTTAAFTGTACACACTGTTTTAAA

91 GAGCAGCAGCAATTGAACTGCATTTACGATGATTTTTATTTTACTAACACGGCTTTTAGC
M I F I L L T T L L A -

151 AATAAGCGGAGCAAAAACCGCAAAATATTCTAGCGGTGTACCCACGGCCGCTTATAGCCA
V S G A K T A N I L A V L P T P A Y S H -
 HindIII

211 TCACCTGGTGTATCAAGCGTACCGTGCAGCTTTGGCAGACAATGOCACACCGTACCGT
H L V Y Q A Y V Q A L A D E C H N V T V -

271 GGTCAAGCGCAGCACTTTTTGATTACGATGCGGCAAAACAAGACGCTGCGGTGCTATCGA
V K P Q L F D I D A A N K Q R C G R I E -

331 GCAGATGGAGCGAGACATGTCTTCCAGCAATACAAAAAAGTGTGCAAAATTCGGCCAC
Q I D A D M S S Q Q Y E K L V A S S Q T -

391 GPTTCCCAAACCGCGGCTGCTGTCAGACGAAACCCCGTCAOCCGGGACAAATTACATGGG
F R E R Q V V S D E T T V T A D N Y M G -

451 GTTASTGGAAATGTTTCGGACCCAGTTTGACAACGTTCCAGCTGAAAATTTTTGGCCAC
L V E M F R D Q F D N V H V E N F L A T -

511 AAACCGCACTTTTGGAGTGTGASTGGTAGASSGTTTTGGGATTATGCGCTGCTATTTGG
N R T F D V V V Y E A F A D Y A L V F G -

571 TCACCTGTTTCCGAGCGCCCGTGTATCCAGATGCGCGCCGCTACGGCCCTGGCCGAAA
H L F R P A P V I Q I A P G Y Q L A E N -

631 CTTTGCAGCCCTTGGCGCTGTGGGACGCCACCCGATCCACTACCCGAACTTTGGCGCAG
F D A V G A V G R E P I H Y P N I M R S -

691 TAGCTGCAATGGCAACCGGACCGGACGCGCTAATGCAATGGCGTCTGTACACCAATTTGA
S S I S N A D G A L I E W R L Y N E F E -

751 ATTTGTTGGCGCGCGCTTCCGAGCGCGTGTCAAACTGCAATTTGGCCCAACACGCGCTAC
L L A R R S D A L L K L Q F Q P N T P T -

811 TATACGGCAATTTGGCAACAACCTGCAGCTGCTATTGCTTAACTAGACCCCGTGTACGA
I R Q L R N N V Q L L L L N L N P V Y D -

871 CAACAATGCAACCGGTTGGCGCTAGTGGCAATTTTGGCGGAGGATTGCAATTTGACACT
N N R P V P P S V Q Y L G G Q L H L T L -

931 CGAGCCACCACAACCCCTTAGATATTGAGCTTGAANAACCGCTTAATGGCTGCGTAAACGG
E P P Q P L D I E L E K R L N A S V N G -
 BamHI

991 GGCGGTGTACCTGACCTTTGGATCCAGTATTGACACCAATTCATTCACCGCGAAATTTT
A V Y V S F S S S I D T N S I H A E F L -

1051 GCAAAATGCTTTGGACACGTTTGGCAACTGGACAAACCGCAACCGTGTATGGAAAGTGGG
Q M L T L G D T F A K L E D N R T V L N K V D -

1111 CGAGCCCTGGCAGCGCTTTTGGTGTGCTCGCAACCGTAATTTGCCGAAAATGTTTAA
D A V A A S L V L P R N V I A Q K W F N -

1171 TCAACCGCGCGCTCTTAACCAACCAACCGTTGTGGCGTTTGGTTACCGCAGCGCGCCCTACA
Q R S V L N H P N V V A F V T Q G Q L Q -

1231 ATCCAGCGAGCGAGCGTTACATGCGCGCGTGCCTATGTTGTGTTTGCCTATGATGGGTGA
S S D E A L H A R V P M V C L P M M G D -

1291 TCAATTTGACCAATCTGCAAACTGCAACAAATTTGGAGTGGCAGCGCGCAATTAACACTGT
Q F H H S A K L E Q F Q V A R A L N T V -
 PstI

1351 CACCGTTTCTGCAGCGCAACTGCACTTGCAGTGGCGGACGGTATCGCCAAACCGACTGSC
T V S A A Q L A L A V G D V I A N R L A -

1411 GATCAATTTGGCAGTACTGATTACTCAACGTTGTAGCGTTGACGCAAGCCACCGCGCTGC
Y Q L R M T D L L N V V A F D E A T P A -

1471 TGATAAAGCTATCAAAATTCAGCGGACCGGTAATTCGATTCGGTTCATGACATCACTCGGTC
D E A I E F T E R V I R F G H D I T R S -

1561 GCGCGTTCGCTGAAATCAACATCCGCAACACAGATTATTCAGATTATTTTGTACGCTT
A C S L E S P S A N T E D Y S D Y F V R F -

1591 TCCATTTGAAATGATTCAAAATTCAGGATAAATACCTAAATAATACATGTAATACGCA
P L *

1651 AACATTTGGTTTTTTTTTGGCC 1671

Figura 2. Sequência de nucleotídeos do gene *egt* de AgMNPV e sequência de amonoácidos predita. Possíveis seqüências regulatórias (TATA box e CATT) são mostradas em negrito e o sítio de poliadenilação em itálico. A seta aberta para baixo indica o provável final da possível seqüência sinal e o início da proteína madura. A seta acima da seqüência indica o códon de início da tradução do gene *lef-1*. A localização dos sítios para as enzimas de restrição *Hind*III, *Bam*HI e *Pst*I, é também mostrada * = Códon de parada. O motivo de UDP-glicosiltransferase é mostrado sublinhado (aminoácidos 349 a 392 da proteína EGT)

(1992). Quarenta e oito h após a infecção (p.i.), ou 7 dias após a transfecção, 10 µl do sobrenadante da cultura de células foram incubados na presença de 1 mM UDP-glicose, 0,25µCi ³H ecdisona (DuPont, 89 Ci / mmol) em 10 mM tris-maleato, pH 7,4, 1 mM MgCl₂, por 1 h a 37 °C com descrito em O'Reilly & Miller (1989). Um µl do sobrenadante da cultura de SF21 infectada com AcMNPV foi usado no ensaio como controle positivo. Ecdisona e ecdisona conjugada foram separadas por cromatografia de camada fina em placas de sílica gel. As placas de TLC foram secadas e expostas a um filme de raio-X, por 24 h, à temperatura ambiente, e visualizados por autoradiografia.

Purificação de DNA viral

Células UFL-AG-286 (5 x 10⁶ células por placa de 100 mm em diâmetro) foram infectadas com AgMNPV (1 pfu / célula) e mantidas a 27 °C por 7 dias. Trinta e três ml de meio derivado de células infectadas foram usados para a purificação de vírus extracelular por ultracentrifugação em um colchão de sacarose, como descrito em O'Reilly *et al.* (1992). Após a centrifugação, o sobrenadante foi eliminado, e o sedimento contendo o vírus foi ressuspenso em 1 ml de tampão de lise de vírus [10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM EDTA; 0,25 % SDS]. Proteinase K foi adiciona-

da para uma concentração final de 500 µg / ml e a mistura incubada a 37 °C, por 4 h. O DNA viral foi, então, purificado por extrações sucessivas com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:25:1), precipitado com etanol, e ressuspensão em 40 µl of TE (10 mM TrisHCl, pH 8 1 mM EDTA) (Sambrook *et al.*, 1989).

Construção do vírus recombinante vAgEGTΔLacZ

Células de UFL-AG-286 (0,5 x 10⁶ células) foram adicionadas a um frasco de 35 mm de diâmetro e incubadas a 27°C, por 1 h, e cotransfectadas com a seguinte mistura: 0,5 µg de DNA viral (AgMNPV), 1,0 µg do DNA do plasmídeo ΔpHHV-EGTΔ-lacZ, 30 µL de Lipofectin reagent (Life-Technologies), 1,0 ml de meio TC-100 sem soro fetal bovino. O frasco foi, então, incubado por 4 h, com agitação leve (40 rpm), à temperatura ambiente. Após esse período, 3 ml de meio TC-100 com 10 % de soro fetal bovino foram adicionados e as células mantidas a 27 °C, durante 7 dias. Recombinação homóloga entre regiões do DNA viral e plasmidial, no núcleo das células transfectadas, permitem a formação de vírus recombinantes (vAgEGTΔlacZ), que são capazes de expressar, durante a infecção, a enzima β-galactosidase. Essa enzima é capaz de degradar o substrato incolor X-gal (Amersham) em um produto de cor azul. Os vírus recombinantes são purificados pelo método de diluição seriada em placa de 96 poços (O'Reilly *et al.*, 1992). O meio de poços azuis foram coletados e 300 µl de tampão de lise [NaCl 0,4 M; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 2 mM pH 8,0] foram adicionados às células de cada poço. O extrato celular foi transferido para um tubo de microcentrífuga e 100 µl de 10 % SDS e 100 µl de proteinase K (5 µg / ml stock) foram adicionados. A mistura foi incubada a 50 °C, por 2 h, e 400 µl de NaCl 5,0 M foram adicionados ao tubo e este foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min em uma microcentrífuga (Eppendorf, 5415 C). O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e 0,7 x o volume de isopropanol foi acrescentado à mistura incubada por 1 h, a -20 °C. O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm, por 5min, o sobrenadante descartado, o sedimento lavado com 100 µl de etanol 70 %, e o DNA

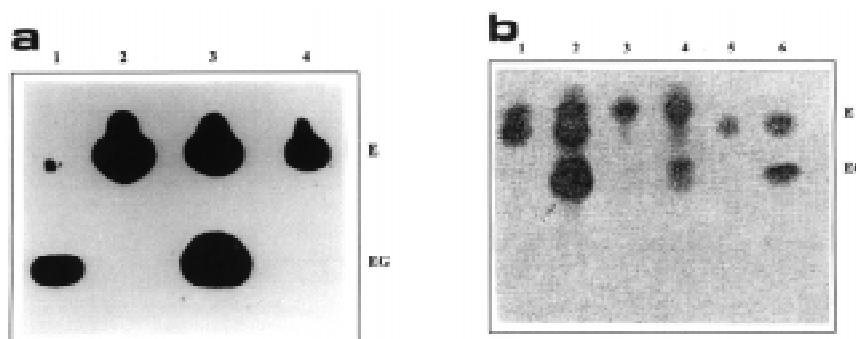


Figura 3. Ensaio enzimático para ecdisteróide UDP-glicosiltransferase de células SF21 infectadas (a) e transfectadas (b). (a) Sobrenadante de células infectadas com o vírus AcMNPV foi usado como controle positivo (amostra 1) e sobrenadante de células “mock”-infectadas como controle negativo (amostra 2). E mostra a posição da ecdisona não conjugada e EG indica a posição da ecdisona conjugada. A presença de ecdisona conjugada no sobrenadante de células infectadas com o vírus AgMNPV (amostra 3) indica a presença de um gene *egt* funcional. [³H]Ecdisona foi adicionada na amostra 4. (b) Ensaio de expressão transiente do gene *egt* de AgMNPV clonado. Células de SF21 foram transfectadas com o DNA do plasmídeo contendo o gene *egt* de AgMNPV (pHHU) e DNA viral (vEGTDEL, um mutante *egt*- de AcMNPV) (amostra 2), pHHU sozinho (amostra 3) e pHHU + pBGLIIF (um plasmídeo contendo o gene *ie-1* de AgMNPV) (amostra 4). DNA do vírus vEGTDEL foi usado na amostra 1 e DNA do plasmídeo pBGLIIF sozinho na amostra 5. O sobrenadante de células infectadas com AcMNPV foi incluído como controle positivo (amostra 6)

ressuspensão em 15 µl de TE.

A purificação do vírus recombinante vAgEGTΔlacZ foi acompanhada e confirmada por PCR. Nós usamos os oligonucleotídeos F3-Reverse: 5'-CAA GTG CGA GTT GCG CTG-3' (de +1260 a +1243 nucleotídeos relativos ao nucleotídeo A do códon de início da tradução do ATG do gene *egt* de AgMNPV) e R4-Forward: 5'-GAT CGA CGC AGA CAT GTC-3' (de +215 a +232 nucleotídeos relativos ao nucleotídeo A do códon de início da tradução, ATG, do gene *egt* de AgMNPV). O programa de PCR usado para a amplificação foi o seguinte: {94 °C / 2 min; [92 °C / 20 seg, 55 °C / 30 seg, 68 °C / 4min] x10; [92 °C / 20 seg, 55 °C / 30 seg, 68 °C / 4 min*] x 25; 68 °C / 7 min}. * A temperatura de polimerização foi aumentada em 20 seg em cada ciclo, como recomendado pelo fabricante do kit para amplificação, via PCR, de fragmentos grandes de DNA, Expand long template PCR kit (Boehringer Mannheim).

O DNA dos vírus selvagem (AgMNPV) e recombinante (vAgEGTΔLa-

cZ) foram purificados, como descrito acima, e 0.5 µg de cada DNA foi digerido com as enzimas Bam HI and Sma I. O DNA do vírus selvagem possui 3 sítios de restrição para Sma I, que estão localizados a 9,09, 47,68 e 64,31 unidades de mapa (u.m.) do genoma (Maruniak *et al.*, 1999), e 4 sítios para a enzima Bam HI, que estão localizados a 13,1, 64,9, 78,5 e 87,92 u.m. (Johnson & Maruniak, 1989; Maruniak *et al.*, 1999). O gene *egt* de AgMNPV está localizado entre 11.9 e 14.7 u.m. (Rodrigues *et al.*, 2001). Dessa forma, o gene possui um sítio interno de Bam HI site (13,1 m.u.). O DNA de AgMNPV digerido duplamente com as enzimas Bam HI e Sma I produzem, entre outros fragmentos, um de 5,2 pkb (localizado entre 9,09 e 13,1 u.m.). Por outro lado, no DNA do vírus recombinante vAgEGTΔlacZ, a digestão dupla com as enzimas Bam HI e Sma I produzem um novo fragmento de 9,0 pkb devido à inserção, no sítio de Bam HI a 13,1 u.m., de um fragmento de 3,7 pkb (*bsp70-LacZ* cassette).

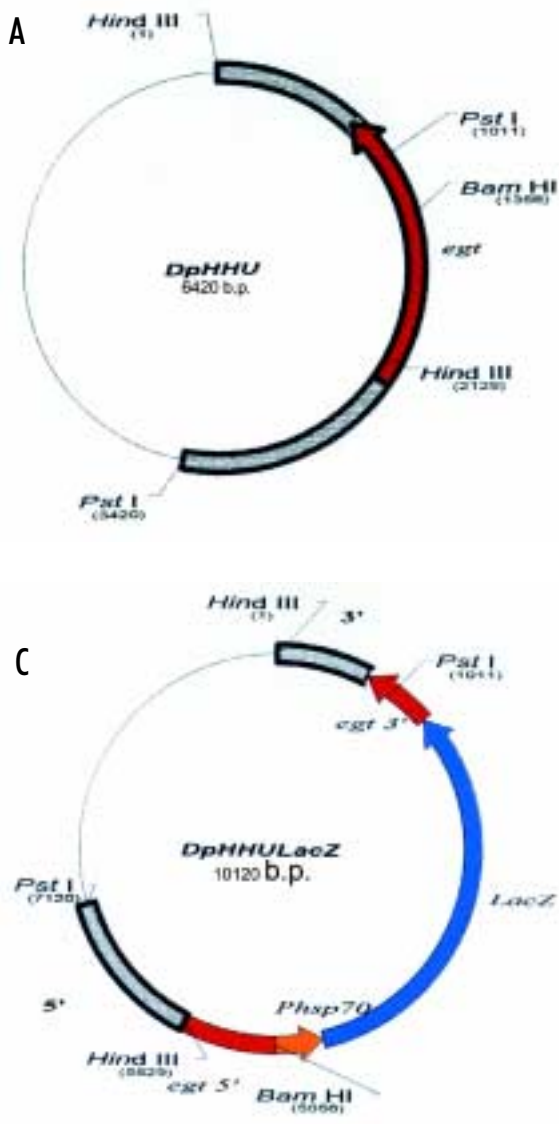


Figura 4. Esquema mostrando os mapas dos plasmídeos Δ pHHU, pAcDZ1 e Δ pHHULacZ. (A) Mapa do plasmídeo Δ pHHU mostrando a região de 3.420 pb clonada no plasmídeo pBluescript (Stratagene). A ORF do gene *egt* de AgMNPV está mostrada em vermelho. Apenas os sítios para as enzimas de restrição *Pst* I, *Hind* III e *Bam* HI são mostrados na figura. (B) Mapa do plasmídeo pAcDZ1 mostrando a localização do cassete gênico *hsp70-LacZ*. Apenas os sítios para as enzimas *Bam* HI e *Xba* I são mostrados. *Ppolh* = promotor do gene da poliedrina do vírus AcMNPV; SV40 poly(A) = sítio de poliadenilação derivado do vírus SV40; *Pbsp70* = promotor *hsp70* de *D. melanogaster*. (C) Mapa do plasmídeo Δ pHHULacZ mostrando o cassete gênico *hsp70-LacZ* inserido no sítio de *Bam* HI do plasmídeo Δ pHHU, interrompendo a ORF do gene *egt* de AgMNPV. As regiões flangeadoras do gene *egt* são mostradas na figura como 5' e 3'. As porções 5' (*egt* 5') e 3' (*egt* 3') do gene *egt* também estão indicadas na figura. Apenas os sítios para as enzimas *Hind* III, *Pst* I e *Bam* HI são mostrados

Insetos

Para a análise de patogenicidade dos vírus selvagem e recombinante, usamos larvas de *A. gemmatalis* no 3º estágio de desenvolvimento, gentilmente cedidas pelos Drs. Daniel Sosa Gomes, Embrapa-Soja (Londrina, PR), e Maria Elita Batista de Castro (Embrapa-Cenargen, Brasília, DF).

Bioensaios

Para o cálculo da LC_{50} , larvas de 3º estágio de *A. gemmatalis* (60 larvas / dose) foram infectadas, separadamente, com os vírus AgMNPV e vAgEGT Δ LacZ, através da mistura de 5 doses do vírus na dieta artificial (20, 60, 180, 540, 1600 ou 4860 poliedros por ml de dieta). Os insetos foram incubados entre 26º e 29 ºC, e a mortalidade analisada diariamente. Os dados foram

analisados por análise de Probit (Finney, 1971). Para o cálculo da LT_{50} , 2 grupos de 50 larvas de *A. gemmatalis*, no 3º-estádio, foram inoculados, respectivamente, com 50 e 100 poliedros (AgMNPV ou vAgEGT Δ LacZ), via oral, com a ajuda de uma microseringa (Hamilton). Os insetos foram mantidos em dieta artificial (Greene *et al.*, 1976) entre 24º e 28 ºC. Vinte e quatro h após a inoculação, 30 insetos, que não sofreram traumas na inoculação, foram escolhidos. A mortalidade foi avaliada 2 vezes ao dia.

RESULTADOS

Identificação, clonagem e análise da seqüência do gene *egt* de AgMNPV

Através da hibridação de uma sonda de PCR, específica para o gene *egt*

de AgMNPV, com o DNA do vírus AgMNPV digerido com *Hind*III e *Pst*I (dados não mostrados), o gene *egt* foi localizado entre 12,0 e 14,7 u.m. do genoma do AgMNPV, compreendendo os fragmentos *Hind*III-V e *Pst*I-Q (Figura 1). Essa região foi clonada no plasmídeo pBluescript KS+, formando o plasmídeo pHHU, e foi totalmente seqüenciada e usada em ensaios de expressão transientes.

A seqüência do plasmídeo pHHU mostrou a presença de uma fase aberta de leitura ou ORF (do inglês: "open reading frame") de 1482 pb com homologia a genes *egt* de diferentes baculovírus. (Figura 2). Uma seqüência conservada de "TATA box" e um motivo de promotor da fase de expressão precoce "CATT" foram identificados, respectivamente, a -73 nt e -8 nt do nucleotídeo A do codon de início da tradução (ATG) do gene. Um sinal de

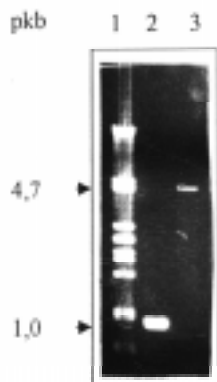


Figura 5. Gel de agarose 1 % mostrando os produtos de uma reação de PCR com o DNA do vírus selvagem AgMNPV (amostra 2) e recombinante vAgEGT Δ LacZ (amostra 3). As setas indicam os fragmentos amplificados de 1 e 4,7 pkb. A amostra 1 mostra o marcador de massa molecular DNA do fago Lambda digerido com a enzima de restrição *Pst* I

poliadenilação AATAAA foi identificada a 19 nt depois do codon de terminação do gene. O gene *egt* foi localizado em uma orientação anti-horária em relação ao gene da poliedrina. Uma ORF foi identificada a -85 nucleotídeos do códon de início da tradução do gene *egt* em orientação contrária ao gene *egt*, que possui homologia com os gene *lef-1* de diferentes baculovírus (dados não mostrados). A proteína EGT do AgMNPV possui 494 aminoácidos e 95,9 % identidade de sequência com a proteína EGT do vírus *Choristoneura fumiferana* DEF nucleopolyhedrovirus (CfDEF) (Tabela 1). Um sinal de poliadenilação (compreendendo os primeiros 18 aminoácidos) também está presente na proteína EGT, sugerindo que a proteína EGT do AgMNPV seja secretada durante a infecção. Quatro possíveis sítios de N-glicosilação (aminoácidos 48, 132, 286, e 323) e um motivo de UDP-glicosil transferase (aminoácidos 349 a 392, Figura 2) foram encontrados na sequência de aminoácidos da proteína EGT.

Ensaio da proteína EGT

O sobrenadante de células IPLB-SF-21 infectadas com o vírus AgMNPV foi usado para detecção da presença de atividade de EGT. O sobrenadante de células IPLB-SF-21 infectadas com

AcMNPV foi usado como controle positivo (Figure 3). Atividade de EGT foi observada, tanto no sobrenadante de células infectadas com AgMNPV, como no sobrenadante de células infectadas com AcMNPV, indicando que o vírus AgMNPV é capaz de produzir uma proteína EGT funcional. Para se confirmar que a atividade de EGT era devido ao gene *egt*, ensaios de expressão transientes foram conduzidos, envolvendo a transfeção do plasmídeo pHHU em células IPLB-SF-21. Nenhuma atividade de EGT foi detectada no sobrenadante de células transfectadas com o plasmídeo pHHU sozinho; entretanto, quando o plasmídeo pHHU foi co-transfectado com o DNA de um vírus mutante de AcMNPV (vEGTDEL), contendo uma deleção no gene *egt*, a atividade de EGT foi detectada (Figura 3). Esses dados indicam que o plasmídeo pHHU codifica um gene *egt* ativo que necessita ser transativado por outro, ou outros genes, do vírus. Em outro trabalho (dados não mostrados), nós localizamos o gene *ie-1* do vírus AgMNPV no fragmento BgIIIF do genoma viral. A cotransfecção do plasmídeo pHHU e pBgIIIF em células IPLB-SF-21 também foi capaz de produzir atividade de EGT (Figura 3), sugerindo que o gene *egt* de AgMNPV é transativado pelo gene *ie-1*.

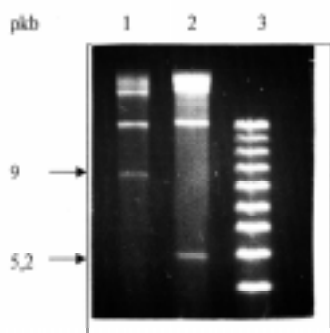


Figura 6. Gel de agarose 0,7 % mostrando o perfil de restrição do DNA dos vírus recombinante vAgEGT Δ LacZ (amostra 1) e selvagem AgMNPV (amostra 2), derivados de uma dupla digestão com as enzimas *Sma* I e *Bam* HI. A amostra 3 mostra o marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder DNA (Life Technologies). As setas indicam os fragmentos diferentes entre os 2 vírus

Construção e purificação do vírus recombinante vAgEGT Δ LacZ

Para a construção do vírus recombinante de AgMNPV contendo o gene *egt* inativado, nós introduzimos o cassette gênico *bsp70-lacZ* derivado do plasmídeo pAcDZ1 (Figura 4A) na ORF do gene *egt* (sítio de *Bam* HI) presente no plasmídeo Δ pHHV (Figura 4B). O plasmídeo resultante (Δ pHHV-lacZ) (Figura 4C) foi purificado e usado em uma cotransfecção com o DNA do vírus selvagem AgMNPV em células UFL-AG-286. O vírus recombinante vAgEGT Δ LacZ foi, então, purificado em placas de 96 poços, por diluição seriada, na presença de X-gal, após 4 passagens em células de UFL-AG-286. A cada passagem, a técnica de PCR foi utilizada para confirmar a presença do vírus recombinante. A reação de PCR usando os oligonucleotídeos F3 e R4 amplificaram um fragmento de 1,0 pkb a partir do DNA de AgMNPV. Por outro lado, os mesmos oligonucleotídeos amplificaram um fragmento de 4,7 pkb a partir do DNA do vírus recombinante vAgEGT Δ LacZ (Figura 5). Para a confirmação da correta inserção do gene repórter e para o isolamento do vírus recombinante, nós digerimos duplamente o DNA do AgMNPV e do vAgEGT Δ LacZ com as enzimas *Bam* HI e *Sma* I (Figure 6). O DNA do vírus selvagem AgMNPV digerido com *Bam* HI e *Sma* I produziu fragmentos de 0,7, 5,2, 12,2, 17,7, 21,6, 27,6 e 45,0 pkb (Figura 6). O fragmento em que o cassette gênico foi inserido corresponde ao fragmento de 5,2 pkb. O DNA do vírus vAgEGT Δ LacZ é diferente do DNA do vírus selvagem pelo aparecimento de um fragmento de 9,0 pkb no lugar do fragmento de 5,2 pkb (Figura 6), devido à inserção do cassette gênico (*bsp70-LacZ*) com cerca de 3,7 pkb.

Análise da patogenicidade do vírus recombinante vAgEGT Δ LacZ

Não houve diferença significativa entre as LC₅₀ (concentração de vírus na dieta necessária para matar 50% dos indivíduos testados no bioensaio) dos vírus recombinante e selvagem. A LC₅₀ para o vírus recombinante foi de 25 poliedros, com limites de confiança variando de 12 a 48 poliedros e de 78 para o vírus selvagem, com limites de

confiança variando de 41 a 174 poliedros, (Tabela 2). Nós também observamos o tempo necessário para a morte dos insetos quando infectados com uma dose fixa de cada vírus. Quando os insetos foram infectados com 50 poliedros do vírus recombinante, 50 % (15) dos insetos testados morreram até 168 h após a infecção (p.i.) (Tabela 3). Já para os insetos infectados com o vírus selvagem, os mesmos 50% morreram até 240 h p.i. Usando-se 100 poliedros, os resultados foram, respectivamente, 168 h p.i. e 200 h p.i. para o recombinante e o selvagem (Tabela 4).

DISCUSSÃO

A localização do gene *egt* no genoma do vírus AgMNPV é similar ao descrito para outros baculovírus. Por exemplo, os gene *egt* dos vírus AcMNPV, *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (OpMNPV), *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus (CfMNPV) foram localizados na região inicial do genoma. Além disso, o gene *lef-1* foi encontrado adjacente e em direção oposta ao gene *egt* em, pelo menos, 3 baculovírus diferentes (Pearson *et al.*, 1993; Barret *et al.*, 1995). O gene *egt* de AgMNPV foi mapeado entre as regiões 12,8-14,1 u.m. e parte da seqüência do gene *lef-1* foi identificada na direção oposta ao gene *egt* com o sítio de início da tradução posicionado na região promotora do gene *egt*.

O gene *egt* de AgMNPV possui 1,482 bp, que codificam para uma proteína de 494 aminoácidos com identidade de seqüência com outras proteínas EGT de baculovírus (O'Reilly & Miller, 1990; Riegel *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1996). O alinhamento da seqüência predita de aminoácidos de diferentes proteínas EGT de baculovírus (Tabela 1) mostrou que o AgMNPV possui maior similaridade com os vírus CfDEF (96.7 %) e OpMNPV (79.0 %). Baseado nas seqüências de aminoácidos da Poliedrina e EGT, o vírus AgMNPV pode ser classificado como um nucleopolyhedrovirus do tipo I (Zanotto *et al.*, 1993).

Um motivo TATA-box (Kornberg, & Baker, 1992) foi identificado no promotor do gene *egt* de AgMNPV. Esse motivo está presente na maioria dos promotores estudados até o momento (O'Reilly & Miller, 1990; Barret

et al., 1995; Riegel *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1996; Smith & Goodale, 1998; Toister-Achituv & Faktor, 1997). O motivo TATA-box é um típico elemento de promotor de eucarioto, o que é consistente com o fato de que os baculovírus usam a RNA polimerase II da célula hospedeira para a expressão de seus genes da fase precoce de expressão (O'Reilly *et al.*, 1992). A seqüência consenso CAG/TT, característica de promotores de genes de baculovírus da fase precoce de expressão, foi identificado a 5 nucleotídeos antes do ATG do gene *egt*. Entretanto, nenhum motivo característico de genes da fase tardia de expressão foram encontrados no promotor do gene *egt* de AgMNPV. Dessa forma, os dados derivados da seqüência do promotor sugerem que o gene *egt* de AgMNPV seja transcrito como um gene da fase precoce de expressão. Entretanto, a análise de transcrição do gene *egt* de AgMNPV mostrou que ele é expresso tanto na fase precoce como na fase tardia da infecção (Rodrigues *et al.*, 2001). Os transcritos do gene *egt* podem ser detectados a partir de 3 h p.i. e até 96 h p.i. (Rodrigues *et al.*, 2001). Smith & Goodale (1998) mostraram que o gene *egt* do baculovírus LoGV é transcrito nas fases precoce e tardia da infecção. Entretanto, na maioria dos casos, os transcritos do gene *egt* não são detectados na fase tardia da infecção (O'Reilly & Miller, 1990; Barret *et al.*, 1995). Consistente com a análise transcricional do gene, nós detectamos, por western-blot, uma proteína de 56 kDa nas fases precoce e tardia da infecção (Rodrigues *et al.*, 2001).

A demonstração de que o gene *egt* clonado no plasmídeo pHHU codifica uma proteína EGT funcional foi feita a partir da co-transfecção desse plasmídeo, juntamente com um mutante de AcMNPV defectivo no gene *egt* (vEGT-DEL) em células de inseto. A transfecção de apenas o plasmídeo pHHU não produziu atividade detectável da proteína EGT. Isso claramente indica que outro ou outros fatores virais são necessários para a expressão do gene *egt*. A transativação foi também necessária para a detecção da atividade de EGT nos genes clonados, derivados dos baculovírus AcMNPV, SpliMNPV e MbMNPV (Toister-Achituv & Faktor, 1997, Clarke *et al.*, 1996). Nós apresentamos evidências de que a proteína IE-1 do

AgMNPV é capaz de transativar o promotor do gene *egt*. Esse resultado está de acordo com as observações feitas por Toister-Achituv & Faktor (1997), que demonstraram que o gene IE1 de AcMNPV é capaz de transativar o promotor dos gene *egt* de AcMNPV e SpliMNPV.

A inativação do hormônio ecdisona pela expressão do gene *egt* dos baculovírus atrasa a progressão dos estádios larvais e a formação da pupa nos insetos, mantendo a larva infectada se alimentando por mais tempo. Essa mudança ajuda na multiplicação do vírus, que provavelmente utiliza a energia disponível pelo aumento do consumo de alimento. Um dos maiores problemas associados ao uso de baculovírus para o controle de pragas é o seu modo de ação lento. Uma lagarta infectada pode levar de 4 a 14 dias para morrer (Moscardi *et al.* 1999). Dessa forma, vários pesquisadores vêm estudando uma maneira de melhorar a eficiência dos baculovírus como biopesticidas, através da engenharia genética. Genes de toxinas de escorpiões, aranhas, anêmonas-do-mar, e bactérias foram inseridos no genoma do baculovírus AcMNPV (Stewart, *et al.*, 1991; McCutchen, *et al.*, 1991; Ribeiro & Crook, 1993) com a finalidade de diminuir o prazo entre o tempo de infecção e a morte do inseto hospedeiro. O'Reilly & Miller (1990) construíram um AgMNPV recombinante capaz de matar o inseto hospedeiro 25 % mais rápido do que o vírus selvagem, pela simples inativação do gene *egt*.

O gene *egt* de AgMNPV possui 1.482 pb e é transcrito nos estágios iniciais da infecção e sua proteína é facilmente detectada no meio de cultura de células de inseto infectadas (Rodrigues *et al.*, 2001). Nós inativamos o gene *egt* de AgMNPV pela construção de um AgMNPV recombinante (vAgEGT Δ LacZ), através da inserção do cassete gênico *hsp70-lacZ* com 3.7 pkb a +800 pb do ATG. O efeito dessa modificação foi analisada pela infecção de larvas de *A. gemmatalis* de 3º estágio com o vírus modificado. Os valores de LC₅₀ para os vírus AgMNPV e vAgEGT Δ LacZ foram similares, indicando que a deleção do gene *egt* de AgMNPV não diminuiu a infectividade do vírus contra seu hospedeiro. Da mesma forma, O'Reilly & Miller (1991) também demonstraram que o vírus

AcMNPV contendo o gene *egt* inativado (vEGTDEL) não diminuiu sua infectividade contra a lagarta de *Spodoptera frugiperda*, quando comparado com o vírus selvagem. Logo, os nossos resultados indicam que o gene *egt* de AgMNPV é um gene não essencial para a replicação e infectividade do vírus AgMNPV. Entretanto, o tempo necessário para o vírus recombinante matar o inseto hospedeiro diminuiu em até 30 % em relação ao vírus selvagem.

O gene *egt* do AgMNPV é extremamente importante para o desenvolvimento de um vírus mais patogênico, como demonstrado no nosso trabalho. A partir da inativação do gene *egt* do AgMNPV, nós construímos um vírus recombinante capaz de acelerar a morte de seu hospedeiro e, conseqüentemente, diminuir o dano causado pela lagarta à lavoura antes de sua morte. Esse recombinante poderá ser testado em uma grande escala pela Embrapa-Soja (Londrina-Paraná) para o monitoramento de sua eficiência e comportamento em uma grande população do inseto-praga. Além disso, outros genes que codificam proteínas com atividade inseticida poderão ser expressos no locus do gene *egt* com a finalidade de melhorar ainda mais a atividade inseticida do baculovírus AgMNPV.

Agradecimentos

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e PRONEX. As figuras 1, 2, 3 e a tabela 1 foram reproduzidas do trabalho Rodrigues *et al.* (2001) com permissão da Kluwer academic publishers.

Referências bibliográficas

- AHRENS, C.H. *et al.* (1997). *Virology* 229, 381-399.
- AYRES, M. D. *et al.* (1994). *Virology* 202, 586-605.
- BARRETT, J. W. *et al.* (1995). *J. Gen. Virol.* 76, 2447-2456.
- BLISSARD, G. W. & ROHRMANN, G. F. (1990). *Annu. Rev. Entomol.* 35, 127-155.
- BURAND, J.P. *et al.* (1996). *Insect Biochem Mol. Biol.* 26, 845-852.
- CLARKE, E.E. *et al.* (1996). *J. Gen. Virol* 77, 2865-2871.
- DEVEREUX, J. *et al.* (1984). *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- EVANS, O.P., & O'REILLY, D.R. (1999). *J. Gen. Virol.* 80, 485-492.
- FEDERICI, B.A. (1986). In the Biology of Baculoviruses, (Granados, R.R. & Federici, B.A., eds). Academic press. pp. 61-88.
- FINNEY, D.J. (1971). Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRIESEN, P. D. (1997). In The Baculoviruses. Miller, L.K. (ed.) Plenum Press, New York. pp.141-170.
- GARCIA-MARUNIAK A. *et al.* (1996). *Virus Research* 41, 123-132.
- GOMI, S. *et al.* (1999). *J. Gen. Virol.* 80, 1323-1337.
- GREENE, G.L. *et al.* (1976). *J. Econ. Entomol.* 69, 487-488.
- GRONER, A. (1989) In Safety of Microbial Insecticides. (Lacey, L. & Davison, E.W., eds.). CRC Press. pp. 135-147.
- IJKEL, W.F. *et al.* (1999). *J. Gen. Virol.* 80, 3289-304.
- JARVIS, D.L. (1997). In The Baculoviruses. Miller, L.K. (ed.) Plenum Press, New York. pp. 389-431.
- JOHNSON, D. W. & MARUNIAK, J. E. (1989). *J. Gen. Virol.* 70, 1877-1883.
- KORNBERG, A. & BAKER, T.A. (1992). DNA replication, 2nd Ed., New York. W.H. Freeman and Company.
- KUZIO, J. *et al.* (1999). *Virology* 253, 17-34.
- LIU, J.C. & MARUNIAK, J.E. (1999). *Virus Research* 64, 187-196.
- LU, A. & MILLER, L.K. (1997). In The Baculoviruses. Miller, L.K. ed. Plenum Press, New York. pp. 193-216.
- MARUNIAK, J.E. *et al.* (1999). *Arch. Virol.* 144, 1991-2006.
- MATOS, T. G. T. *et al.* (1999). *Int. J. Insect Morphol. Embriol.* 28, 193-199.
- MCCUTCHEEN, B.F. *et al.* (1991). *Bio/technology* 9, 848-52.
- MORRIS, T.D. & MILLER, L.K. (1992). *J. Virol.* 66, 7397-7405.
- MOSCARDI, F. (1999). *Ann. Rev. Entomol.* 44, 257-289.
- MURPHY, F.A. *et al.* (1995). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Wien, New York.
- O'REILLY, D. R. & MILLER, L. K. (1989). *Science* 245, 1110-1112.
- O'REILLY, D. R. & MILLER, L. K. (1990). *J. Virol.* 64, 1321-1328.
- O'REILLY, D. R. & MILLER, L. K. (1991). *Bio/Technology* 9, 1086-1089.
- O'REILLY, D. R. *et al.* (1992). Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual. W. H. Freeman and Co., Salt Lake City, Utah.
- O'REILLY, D.R. (1995). *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 541-550.
- PEARSON, M. N. *et al.* (1993). *Virology* 197, 715-725.
- POMBO *et al.* (1998). *J. Inv. Pathol.* 72, 239-245.
- POSSEE, R.D. (1997). *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 569-572.
- RIBEIRO, B. M. *et al.* (1998). Taxonomia, Caracterização Molecular e Bioquímica de Vírus. Organizado por: Sérgio Batista Alves Controle Microbiano De Insetos:ed. 2 ed., Piracicaba, SP, Brasil., Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz-FEALQ, p. 481-507.
- RIBEIRO, B.M. & CROOK, N.E. (1993). *J. Inv. Pathol.* 62, 121-130.
- RIBEIRO, B.M. *et al.* (2001). *Arch. Virol.* 146, 1355-1367.
- RIEDEL, C.I. *et al.* (1994). *J. Gen. Virol.* 75, 829-838.
- RODRIGUES, J. C. M. *et al.* (2001). *Virus Genes* 22, 103-112.
- SAMBROOK, J. *et al.* (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGEETA, N *et al.* (1997). *Virus Genes* 14, 95-104.
- SIEBURTH, P. J. & MARUNIAK, J. E. (1988a). *In Vitro Cell. Develop. Biol.* 24, 195-198.
- SIEBURTH, P. J. & MARUNIAK, J. E. (1988b). *J. Invertebr. Pathol.* 52, 453-458.
- SILVEIRA, E. B. *et al.* (1999). *J. Sub. Cytol. Pathol.* 31, 1-8.
- SMITH, I. & GOODALE, C. (1998). *J. Gen. Virol.* 79, 405-413.
- STEWART, L.M.D. *et al.* (1991). *Nature* 352, 85-88.
- TOISTER-ACHITUV, M. & FAKTOR, O (1997). *J. Gen. Virol.* 78, 487-491.
- TOMALSKI, M. & MILLER, L.K. (1991). *Nature* 352, 82-85.
- VAUGHN, J.L. *et al.* (1977). *In Vitro* 13, 213-217.
- ZANOTTO, P. M. A. *et al.* (1992). *J. Gen. Virol.* 73, 1049-1056.
- ZANOTTO, P. M. A. *et al.* J. E. (1993). *J. Inv. Pathol.* 62, 147-164.
- ZUIDEMA, D. *et al.* (1990). *J. Gen. Virol.* 71, 2201-2209. †