

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE NA CARACTERIZAÇÃO DE  
FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E PROTEÍNAS DOS BACULOVÍRUS DE  
*Anticarsia gemmatalis* HUEB., 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E  
*Diatraea saccharalis* FABR., 1794 (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

MARIA DAS GRAÇAS ONGARELLI  
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. DARCY MARTINS DA SILVA

Tese apresentada à Escola Superior  
de Agricultura "Luiz de Queiroz",  
da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências - Área de Concentração: Entomologia.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Março - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da  
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

---

Ongarelli, Maria das Graças

- 058a      Aplicação da técnica de eletroforese na caracterização de fragmentos de restrição e proteínas dos baculovírus de Anticarsia gemmatalis HUEB., 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) e Diatraea saccharalis FABR., 1794 (Lepidoptera: Pyralidae). Piracicaba, 1990.  
92p. ilustr.

Tese - ESALQ  
Bibliografia.

1. Baculovírus 2. Broca da cana-de-açúcar 3. DNA de vírus - Caracterização 4. Lagarta da soja 5. Proteína de vírus - Caracterização 6. Vírus entomopatogênico - Caracterização - Eletroforese I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 576.64

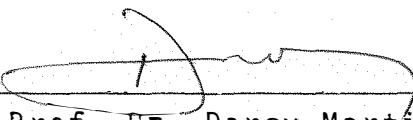
APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE NA CARACTERIZAÇÃO DE  
FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E PROTEÍNAS DOS BACULOVÍRUS DE  
*Anticarsia gemmatalis* HUEB., 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E  
*Diatraea saccharalis* FABR., 1794) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Maria das Graças Ongarelli

Aprovada em: 01/06/1990

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva	ESALQ/USP
Prof. Dr. Evoneo Berti Filho	ESALQ/USP
Prof. Dr. Sérgio Batista Alves	ESALQ/USP
Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira	UNICAMP
Prof. Dr. Mário Sérgio Palma	UNESP/R.Claro



---

Prof. Dr. Darcy Martins da Silva  
Orientador

*A minha mãe ANA (in memoriam)  
que sempre sonhou com a realização  
deste trabalho,*

*Ao meu pai EDGAR,  
pelo amor, carinho,  
compreensão e incentivo,*

**DEDICO.**



## AGRADECIMENTOS

Aos professores do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Ao meu orientador, Prof. Dr. Darcy Martins da Silva, pelos ensinamentos desde meus primeiros passos na pesquisa, pela sua boa vontade, dedicação, compreensão e estímulo junto à minha carreira científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão das bolsas de estudo durante a realização do curso de Pós-Graduação.

Ao Dr. Flávio Moscardi, pesquisador do Centro Nacional de Pesquisas da Soja, CNPSo-EMBRAPA pelo fornecimento dos cristais do vírus da poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgNPV).

Ao Prof. Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, pelo fornecimento dos cristais do vírus da granulose de *Diatraea saccharalis* (DsGV).

Ao Dr. Samuel Goldemberg e Dr. Wim M. Degrave, pesquisadores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro - FIOCRUZ, pelo fornecimento das endonucleases de restrição.

À Dra. Neusa de Lima Nogueira, vice - diretora e pesquisadora do Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CEENA/USP pelo empréstimo do laboratório fotográfico do Setor de Fitovirologia e Microscopia Eletrônica daquele centro de pesquisa.

À Srta. Iracema Yukie Horibe, amiga e companheira de trabalho, pela paciência nos ensinamentos da técnica eletroforética de proteínas e técnica de coloração com prata.

Ao Sr. José Elias Gomes pelo excelente trabalho de revelação e ampliação das fotografias.

Ao Sr. Romeu Aparecido Rocha pela confecção das figuras.

Ao Sr. Jorge Luiz Diorio pela paciência, dedicação e responsabilidade durante os trabalhos de datilografia.

A todos os meus amigos e aqueles que, de uma maneira ou de outra, colaboraram para a realização desta tese.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	04
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1. Extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e DsGV .....	22
3.2. Análise dos ácidos nucleicos do AgNPV e DsGV ao espectrofotômetro .....	30
3.3. Tratamento dos ácidos nucleicos do AgNPV e DsGV com enzimas de restrição .....	31
3.4. Eletroforese "submarina" horizontal dos fragmentos dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV obtidos pela ação de enzimas de restrição .....	32
3.5. Determinação dos pesos moleculares dos fragmentos dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV obtidos pela ação de enzimas de restrição .....	33
3.6. Determinação dos pesos moleculares dos fragmentos do ácido nucleico do AgNPV através da técnica de microscopia eletrônica.....	34
3.7. "Finger-print" do AgNPV e do DsGV .....	35
3.7.1. Eletroforese dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV tratados com enzimas de restrição .....	35
3.7.2. Cromatografia desenvolvida perpendicularmente ao sentido da eletroforese dos ácidos nucleicos .....	36

3.8. Eletroforese de proteínas .....	36
3.8.1. Preparo das amostras de eletroforese de proteínas .....	37
3.8.2. Coloração dos perfis eletroforéticos de proteínas .....	38
3.9. Determinação dos pesos moleculares das proteínas do AgNPV e do DsGV .....	38
4. RESULTADOS .....	39
4.1. Extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV .....	39
4.2. Análise dos ácidos nucleicos virais do AgNPV e do DsGV ao espectrofotômetro e quantificação .....	41
4.3. Tratamentos dos ácidos nucleicos do Ag NPV e do DsGV com enzimas de restrição em eletroforese de gel de agarose - "eletroforese submarina" .....	44
4.4. Eletroforese "submarina" horizontal dos fragmentos dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV obtidos pela ação de enzimas de restrição .....	46
4.5. Determinação dos pesos moleculares dos fragmentos dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV tratados com enzimas de restrição .....	46
4.6. Determinação dos pesos moleculares dos fragmentos do ácido nucleico do AgNPV através da técnica de microscopia eletrônica .....	50
4.7. "Finger-print" dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV .....	52
4.8. Eletroforese de proteínas do AgNPV e do DsGV .....	55
4.9. Determinação dos pesos moleculares das proteínas do AgNPV e do DsGV .....	57

5. DISCUSSÃO .....	62
6. CONCLUSÕES .....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
APÊNDICES .....	90

APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE NA CARACTERIZAÇÃO DE  
FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E PROTEÍNAS DOS BACULOVÍRUS DE  
*Anticarsia gemmatalis* HUEB., 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E  
*Diatraea saccharalis* FABR., 1794) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Autora: Maria das Graças Ongarelli

Orientador: Prof. Dr. Darcy Martins da Silva

## RESUMO

No presente trabalho foram desenvolvidos estudos sobre a natureza nucleoproteica do vírus da poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* Hueb, 1818 (AgNPV) e o vírus da granulose de *Diatraea saccharalis* Fabr., 1794 (DsGV) com a utilização de técnicas que pudessem discriminar diferenças entre esses baculovírus. Fez-se um estudo prévio do processo mais conveniente de extração dos ácidos nucleicos com base na relação de densidade óptica a 260/280 nm. Os tratamentos dos ácidos nucleicos do AgNPV com Eco RI e DsGV com Bsp RI produziram fragmentos de restrição caracterizados no perfil eletroforético em agarose com a determinação dos pesos moleculares. Eco RI produziu 6 fragmentos de restrição no DNA de AgNPV e Bsp RI produziu 4 fragmentos de restrição no DNA de DsGV.

Foram obtidos resultados preliminares da possível caracterização de DNAs dos baculovírus através da técnica de "Finger-print" dos ácidos nucleicos com enzimas de restrição.

As proteínas do AgNPV e do DsGV após sofrerem extração foram corridas em gel SDS - poliacrilamida produzindo perfis eletroforéticos com 22 bandas para o AgNPV e 18 bandas para o DsGV para os quais foram determinados os respectivos pesos moleculares. Foi possível identificar nos perfis de proteínas a poliedrina, a granulina e a proteína 39K que são sintetizadas em grande quantidade pelas células infectadas. A proteína p10 não foi encontrada nos perfis analisados. Foram confrontadas diferenças entre os pesos moleculares das proteínas do DsGV, AgNPV e AcNPV (*Autographa californica*). Levando-se em conta que as divergências entre os vírus da granulose e da poliedrose nuclear são mais acentuadas que entre as granuloses e as poliedroses entre si é possível que as proteínas heterólogas do DsGV (44,4%) e as do AcNPV (40,9%) com relação as proteínas do AgNPV sejam significativas.

ELECTROPHORESIS TECHNIQUE APPLICATION FOR THE CHARACTERIZATION OF RESTRICTION FRAGMENTS AND PROTEINS OF THE BACULOVIRUS OF *Anticarsia gemmatalis* HUEB., 1818 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) AND *Diatraea saccharalis* FABR., 1794 (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Author: Maria das Graças Ongarelli  
Adviser: Prof. Dr. Darcy Martins da Silva

## SUMMARY

Studies have been carried out on the nucleoproteic nature of the nuclear polyhedrosis virus of the *Anticarsia gemmatalis* (Hueb, 1818) (AgNPV) and the granulosis virus of *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (DsGV) using techniques that would help discriminate differences between the two baculoviruses. The most common process of nucleic acid extraction has been previously studied based on optical density relation at 260 and 280 nm. Treatment of the nucleic acids of AgNPV with Eco RI and of DsGV with Bsp RI produced restriction fragments characterized in the electrophoretic profile in agarose with the determination of the molecular weights. Eco RI produced 6 (six) restriction fragments in AgNPV-DNA and Bsp RI produced 4 (four) restriction fragments in DsGV-DNA.

Preliminary results of the possible characterization of the DNA's of the baculoviruses were observed by using the "Finger-print" technique of nucleic acid with restriction enzymes.



The proteins of AgNPV and DsGV after extraction were runned in polyacrilamide - SDS - gel producing profiles with 22 bands for the AgNPV and 18 bands for the DsGV, of which the respectives molecular weights were determined. It was possible to identify on the protein profiles the polyhedrin, the granulin and the 39K protein, which are synthesized in large amounts by the infected cells. The p10 protein was not found in the profiles analyzed. The differences among the molecular weights of the proteins of DsGV, AgNPV and AcNPV (*Autographa californica*) were compared. Taking into account that the divergences between the granulosis virus and polyhedrosis nuclear virus are more evident than among the polyhedrosis and granulosis viruses, it is possible that the heterologous proteins of DsGV (44.4%) and AcNPV (40.9%) in relation to the proteins of AgNPV might be significant.

## 1. INTRODUÇÃO

O Controle Biológico constitui técnica importante e fundamental em programas de Manejo Integrado de Pragas, representando alternativa viável ao uso unilateral de produtos químicos de amplo espectro predominantemente utilizados em muitos cultivos. Dentre os agentes de Controle Microbiano, os vírus de insetos são considerados como de grande potencial para introdução e colonização em populações de pragas, ou mesmo para utilização como bioinseticidas em diferentes agroecossistemas (HEIMPEL, 1965; IGNOFFO, 1965; BURGESS, 1981; ALVES, 1986; HUBER, 1986).

Dentre os grupos de vírus de insetos, o dos baculovírus é que tem sido apontado como de maior potencial para o desenvolvimento de bioinseticidas, sendo o mais estudado e, de fato, o mais utilizado na prática devido a sua especificidade e virulência ao hospedeiro, resistência aos fatores ambientais e ao maior volume de informações quanto à segurança a vertebrados.

No Brasil, o uso prático de vírus de insetos remonta época mais recente, comparada à utilização em outros

países, especialmente Estados Unidos. Esforços pioneiros de desenvolvimento no (CNPSO-EMBRAPA) a partir de 1977, viabilizaram o uso em larga escala do vírus da poliedrose nuclear (NPV) da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, Hueb, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), a nível de campo. Atualmente outro baculovírus, o vírus da granulose (GV) do mandarovã da mandioca, *Erinnyis ello* L., 1758 (Lepidoptera: Sphingidae), vem sendo utilizado na prática, a partir de trabalhos desenvolvidos pela EMPASC-SC. Outro vírus que apresenta algum potencial bioinseticida é o vírus da granulose (GV) da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* Fabr., 1794 (Lepidoptera: Pyralidae) em fase de desenvolvimento pelo PLANALSUCAR / UNICAMP/ ESALQ.

Em vista da importância econômica das culturas de soja e cana-de-açúcar em nosso país e do atual interesse na aplicação de baculovírus para o controle das principais pragas dessas culturas, decidiu-se realizar pesquisas de caráter fundamental sobre fragmentos de ácidos nucleicos e proteínas do NPV de *Anticarsia gemmatalis* (AgNPV) e do GV de *Diatraea saccharalis* (DsGV).

Assim pois, desenvolveu-se um trabalho no sentido de caracterizar fragmentos de ácidos nucleicos e proteínas utilizando-se de algumas técnicas de Biologia Molecular.

De uma maneira mais clara, esta tese visa explorar o poder de discriminação dos segmentos provenientes

dos ácidos nucleicos (DNA) dos dois baculovírus, tratados com endonucleases de restrição, submetidos tanto a eletroforese em agarose como à técnica de "Finger-print", bem como analisar perfis eletroforéticos das principais proteínas que constituem os chamados cristais virais, poliedros, grânulos ou corpos de oclusão.

Trata-se, pois, de uma pesquisa para melhor conhecimento dos dois baculovírus, AgNPV e DsGV, ocorrentes no Brasil, que a despeito de suas relações de parentesco podem ser discriminados pelas técnicas acima citadas, as quais podem distinguir diferenças ou semelhanças químicas entre vírus de espécies diferentes ou mesmo isolados regionais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

De aproximadamente 650 vírus que tem sido isolados de insetos, 83% são de lepidópteros, cerca de 14% de himenópteros e 3% de ortópteros, coleópteros e dípteros. Oito famílias de vírus de insetos são reconhecidas desde os pequenos icosaédricos parvovírus até o mais estruturalmente complexo poxvírus. Inclui-se entre eles a descoberta dos picornavírus. Em três famílias as partículas virais estão incluídas em matriz proteica caracterizando os vírus da poliedrose citoplasmática, entomopoxvírus e baculovírus. A matriz proteica é sintetizada e depositada ao redor dos virions durante a replicação e deve contribuir para a estabilidade dos vírus no campo (TWEETEN et alii, 1981).

A família Baculoviridae (GVs, NPVs, Oryctes e vírus de braconídeos) aparentemente é restrita a hospedeiros de invertebrados sem que nenhuma semelhança morfológica de Baculoviridae tenha sido detectada em vertebrados. Esta única característica tem gerado muito interesse científico neste grupo de vírus. Dos vírus de insetos, somente os baculovírus

(NPVs e GVs) tem sido recomendados para o uso no campo. Uma faixa limitada de hospedeiro é uma importante consideração na utilização, com segurança, dos vírus como inseticidas microbianos, já que não são encontradas publicações científicas sobre esses vírus na Medicina e Veterinária (BURGES et alii, 1980 a, b; TWEETEN et alii, 1981; ALVES, 1986; HUBER, 1986).

Embora esses autores afirmem com certa segurança a não patogenicidade dos baculovírus para vertebrados dois trabalhos foram encontrados na literatura onde KAWANISHI et alii (1982) conseguiram replicação de baculovírus em cultura de células de vertebrados e DOELLER et alii (1983) através de análises imunoeletroréticas detectaram interações imunológicas entre o antígeno do baculovírus com imunoglobulinas humana.

Torna-se óbvio que as propriedades dos baculovírus devem ser bem estudadas quando se pensa no uso deles como agentes de controle de pragas. Existe um aumento do número de isolados de baculovírus de insetos pragas e, até recentemente, pequena metodologia tem estado disponível para distinguir um isolado do outro. Para vencer o problema do sistema de identificação, os pesquisadores tem partido para técnicas bioquímicas utilizadas em estudos de Biologia Molecular e Engenharia Genética.

A limitada especificidade do hospedeiro dos baculovírus, junto ao excessivo custo da produção em larga esca

la dos vírus, da formulação e padronização tem colocado limitações no uso desses vírus como inseticidas microbianos de importância agrícola. Uma alternativa promissora é a Engenharia Genética de baculovírus recombinantes (TWEETEN et alii, 1981; GONZALES et alii, 1989).

Engenharia Genética de baculovírus recombinantes requer estudos de sequenciamento de DNA, clonagem, mapeamento genético, hibridização e caracterização de genoma que começam pela determinação dos pesos moleculares dos DNAs dos baculovírus.

Para estudos desta natureza que envolvem a clivagem do DNA viral em pontos específicos, utiliza-se das chamadas endonucleases ou enzimas de restrição. De acordo com ROBERTS (1987), toda endonuclease que corta moléculas de DNA numa sequência específica tem sido chamada de endonuclease de restrição. Essas endonucleases são chamadas de acordo com a fonte de microorganismo que lhes dão origem.

Se forem consideradas as endonucleases de restrição uma "ferramenta" para estudos de Biologia Molecular e Engenharia Genética, a técnica de eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida também constitui outro instrumento essencial para esses estudos.

O método convencional usado para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA é a eletroforese de gel de agarose, capaz de separar fragmentos que outros métodos co-

mo gradiente de densidade por centrifugação não podem separar. A localização do DNA no gel pode ser determinada diretamente através da coloração em baixa concentração, com brometo de etídeo que é fluorescente à luz ultra violeta (SHARP et alii, 1973; MANIATIS et alii, 1982).

A metodologia da eletroforese "submarina" horizontal originalmente foi descrita por W. Schaffner citado por MANIATIS et alii (1982), na qual o gel é colocado sobre uma placa de vidro removível. A placa é colocada dentro de uma cuba e totalmente submersa no tampão. A resistência à passagem de corrente elétrica do gel é quase a mesma do tampão, assim uma fração considerável da corrente aplicada passa ao longo do comprimento do gel. Geis de agarose são aplicados para separar moléculas de DNA na faixa de 0,2 a 20 kilobases (Kb).

Géis de poliacrilamida são usados para analisar moléculas de DNA menores que 1 Kb de peso molecular. Os géis de poliacrilamida são quase sempre colocados entre duas placas de vidro seguras por presilhas e invariavelmente eletroforizados na posição vertical. Este arranjo faz com que a solução de acrilamida fique protegida da exposição ao ar; assim a inibição da polimerização pelo oxigênio fica confinada a uma estreita camada no topo do gel (MANIATIS et alii, 1982).

Sabendo que géis de acrilamida são aplicados para separar moléculas de DNA de peso molecular até pouco mais



de 1 Kb e que géis de agarose são aplicados a moléculas de 0,2 a 20 Kb, as moléculas de DNA maiores desta faixa não podem ser bem resolvidas pelos processos de eletroforese até agora descritos.

SCHWARTZ & CANTOR (1984) e CANTOR et alii (1988) desenvolveram uma nova técnica de eletroforese para moléculas grandes de DNA em gel de agarose. Enquanto nas eletroforeses convencionais a aplicação de uma diferença de potencial muito alta provoca distorção das moléculas grandes de DNA (50-100 Kb), esta nova técnica está baseada na aplicação de uma diferença de potencial finita, a qual chamamos de pulso. Esta eletroforese é denominada "pulsed-field gel (PFG) ou eletroforese de pulso onde a diferença de potencial é aplicada alternadamente em duas direções num tempo mais curto que o de reorientação da molécula. Este pulso é ligado numa direção e desligado abruptamente na outra, sendo que a separação das moléculas é dada pela perda da reorientação molecular.

De acordo com SWASTIA & PANIJAN (1977) o princípio básico da utilização do SDS na preparação do gel de poli(acrilamida) é cobrir as moléculas de proteínas com SDS visando converter a superfície molecular de todas as proteínas em superfícies com cargas negativas. Esse expediente estabelece uma proporção constante entre SDS e moléculas polipeptídicas, pois cada molécula de SDS cobre três ligações peptídicas. 0

excesso de carga negativa devido ao detergente SDS, na maioria dos casos, não sofre influência ponderável das cargas intrínsecas das cadeias laterais dos aminoácidos pertencentes a cadeia polipeptídica.

Dos trabalhos consultados na literatura sobre a determinação dos pesos moleculares usando a técnica de microscopia eletrônica (FREIFELDER, 1970; BUJARD, 1970), foi escolhido o de STÜBER & BUJARD (1977) cuja precisão é mais alta que os demais. Normalmente as comparações dos valores dos pesos moleculares encontrados na literatura apresentam desvios maiores ou menores entre si. Essas diferenças, ainda que da ordem de 5 a 10% podem ser importantes por dificultar interpretações de estruturas ou mesmo de função da partícula em estudo. Isso naturalmente obriga a um rigor de procedimento compatível com o objetivo da pesquisa. Mas de uma maneira geral, pode-se dizer que para os propósitos discutidos nesta tese os prováveis desvios de valores não chegam a comprometer a interpretação a respeito do DNA viral a ser medido. É preciso lembrar que os valores da densidade linear das fitas do DNA segundo STÜBER e BUJARD (1977) é igual a  $2,08 \pm 0,03 \times 10^6 \text{ D. } \mu\text{m}^{-1}$ . Este valor foi estabelecido após o conhecimento da sequência dos nucleotídeos do DNA do fago  $\phi$ x-174 (SANGER et alii, 1977) levando-se em conta alguns fatores como a relativa influência nos desvios que ocorre principalmente durante a

preparação da suspensão do DNA para exame ao microscópio eletrônico.

Devido ao potencial apresentado pelos baculovírus no Controle Microbiano de Pragas, tem aumentado o interesse dos pesquisadores na Biologia Molecular desses vírus. As informações concernentes a organização e expressão dos genes dos baculovírus no sistema vírus-hospedeiro podem beneficiar esses agentes de controle. O uso desses vírus como vetores de clonagem eucariótica para expressão de DNAs estranhos constitui uma grande "ferramenta" nos estudos de regulação e expressão de genes em células de invertebrados de modo geral.

De acordo com BILIMORIA (1986) a família Baculoviridae consiste em um único gênero *Baculovirus*, o qual é dividido em 3 subgrupos de acordo com a sua morfologia. Vírus do subgrupo A que constituem os vírus da poliedrose nuclear (NPVs), que produzem virions tanto com um nucleocapsídeo por envelope (SNPV) como muitos nucleocapsídeos por envelope (MNPV). No núcleo das células infectadas formam-se os corpos de oclusão (OBs) que contêm MNPVs (poliedros) (ONGARELLI, 1979). Os vírus do subgrupo B constituem os chamados vírus da granulose (GVs) que contêm somente um nucleocapsídeo por envelope e um único virion por corpo de oclusão (grânulo). O subgrupo C consiste de nucleocapsídeos envelopados que não estão ocluídos. Os baculovírus dos subgrupos A, B e C apresentam-se com DNAs circulares, de dupla fita com cerca de 100 a >150 pares de kilobases (Kbp).

A maior característica dos baculovírus dos subgrupos A e B são os poliedros ou grânulos que contêm as partículas de vírus ocluídas nos núcleos das células infectadas. A maior proteína dos corpos de oclusão é a poliedrina, que consta de um polipeptídeo de peso molecular em torno de 30.000 Daltons (D), que conta aproximadamente 95% da massa das proteínas dos corpos de oclusão ou cristais virais. Uma segunda forma de vírus é um nucleocapsídeo envelopado (ENOV), responsável pelo sistema de disseminação da infecção dentro do inseto hospedeiro e de célula para célula nas culturas de tecido. Nas células infectadas a maioria dos ENOVs é sintetizada antes do processo de oclusão (COCHRAN et alii, 1986).

O método mais direto para se pesquisar a diversidade dos baculovírus é o exame da sua distribuição entre as ordens de Insecta. GVs e MNPVs são encontrados somente em Lepidoptera e SNPVs são encontrados em todas as ordens; Lepidoptera é a mais recente ordem envolvida. A ocorrência de somente SNPVs nas ordens mais antigas de insetos e a existência de GVs e MNPVs somente em Lepidoptera sugerem que o ancestral dos baculovírus foi um SNPV que se envolveu com outras ordens e recentemente passou para GVs e MNPVs dentro de Lepidoptera. A distribuição dos baculovírus sugere que esses vírus envolveram-se com seus insetos hospedeiros e derivaram-se de uma recente invasão que se espalhou através das ordens de Insecta (ROHRMANN, 1986).

O grau de parentesco das proteínas entre os organismos pode ser uma indicação do grau de parentesco entre eles. O método mais acurado para se estudar o parentesco dos organismos é comparar diretamente as sequências de aminoácidos das proteínas. Cada gene deve estar presente numa cópia simples no genoma e a proteína comumente usada para esses estudos tem sido o citocromo C (ROHRMANN, 1986).

Comparações de sequências de proteínas funcionalmente equivalentes e genes de uma variedade de organismos tem sido usados para a construção de árvores filogenéticas que são semelhantes às construídas para os estudos de fósseis. Consequentemente a filogenia molecular deve refletir a filogenia do organismo por inteiro. ROHRMANN (1986) apresenta um modelo das sequências de amino-ácidos codificadas pelos genes da poliedrina e granulina e uma árvore filogenética para as espécies de *Baculovirus*.

De acordo com COCHRAN (1986), o uso das endonucleases de restrição que clivam ds-DNA em sequências de nucleotídeos específicos deram origem aos chamados "mapas físicos", que diagramam os locais relativos dos sítios de clivagem das endonucleases de restrição ao longo do comprimento de um segmento de DNA definido. Uma vez construído, o mapa físico torna-se uma referência essencial no estudo da organização genética, transcrição, regulação e expressão dos genes. Os mapas físicos mais estudados até hoje são os do NPV de *Autographa californica* (AcMNPV).

MILLER & DAWES (1979) construíram o primeiro mapa físico para AcMNPV estabelecendo a ordem completa de sete fragmentos de DNA clivados por Bam HI e quatro fragmentos obtidos por Sma I.

SMITH & SUMMERS (1979) construíram mapas físicos para cinco variantes de AcMNPV, TnMNPV e GmMNPV utilizando endonucleases de restrição.

LOH et alii (1981) construíram mapa físico para o genoma de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) e MURINIÁK et alii (1984) construíram mapas físicos para variantes genômicas de SfMNPV.

JOHNSON & MURUNIÁK (1989) construíram mapa físico para um isolado do NPV de *A. gemmatalis* (AgMNPV - 2) encontrando um peso molecular de 133 Kb ou  $88,8 \times 10^6$  D para o DNA.

Conforme COCHRAN et alii (1986), a presença de homologia ou seqüências repetidas em DNA de vírus animal tem sido encontradas em genomas de adenovírus, vírus da vaccinia e herpes, sendo poucos os exemplos na literatura de genomas virais com seqüências homólogas. Para o genoma AcMNPV-HR3 foram encontradas cinco regiões homólogas (rh).

JEWELL & MILLER (1980) encontraram sequências homólogas intergênicas entre seis espécies de baculovírus afetando Lepidoptera indicando certo grau de parentesco entre elas.

GUARINO et alii (1986) encontraram cinco regiões homólogas no genoma de AcMNPV quando clivado por EcoRI.

KELLY (1977) determinou entre quatro espécies de SfMNPV 15 a 75% de homologia intergênica e KNUDSON & TINSLEY (1978) encontraram valores semelhantes em estudos de cultura de células infectadas com SfMNPV.

SMITH & SUMMERS (1978) isolaram nove linhagens de baculovírus e através do uso de endonucleases de restrição detectaram heterogeneidade no genoma de quatro delas. A heterogeneidade do genoma indica o grau de divergência entre as linhagens.

Dois isolados de NPVs de *Spodoptera littoralis* foram coletados em várias regiões de Israel não sendo detectadas sequências homólogas entre eles; isto vem provar certo grau de heterogeneidade entre eles (KISLEV & EDELMAN, 1982).

Através de perfis eletroforéticos com endonucleases de restrição, SMITH & CROOK (1988) detectaram heterogeneidade entre os genótipos do vírus da granulose de *Artogeia rapae* (ArGV3) e o vírus da poliedrose nuclear da *Lymantria dispar* (LdMNPV). Foram isolados de ArGV3 oito genótipos

diferentes e para LdMNPV foram isolados apenas três. A comparação dos mapas físicos dos genótipos obtidos sugere que a diversidade entre estas duas espécies de baculovírus deve ser atribuída a recombinação durante o processo de coinfeção.

HINK & VAIL (1973) estudando AcMNPV em culturas de células de *Trichoplusia ni* mencionaram pela primeira vez a existência de um mutante espontâneo FP. Eles distinguiram dois fenótipos descritos como "many polyhedra" (MP) x "few polyhedra" (FP). Eles notaram que a placa com conotação MP aparecia "brilhante" quando examinada sob iluminação confirmando a presença de muitos poliedros. Os materiais de ambas as placas (MP e FP) foram injetados separadamente na hemolinfa de insetos e se observou que FPs se converteram em MPs e MPs se converteram em FPs rapidamente constituindo assim no que pode-se chamar de geração espontânea de mutantes FP.

BROWN et alii (1979) isolaram vinte e sete mutantes espontâneos de AcMNPV sensíveis de temperatura (ts). De 587 placas examinadas, 4,8% eram ts.

O genoma de AcMNPV e de outros baculovírus podem codificar mais de 100 proteínas (MARUNIAK, 1986). Cerca de 40 proteínas virais tem sido detectadas em células infectadas e mais de 100 proteínas estruturais tem sido resolvidas através da técnica de eletroforese (SINGH et alii, 1983; SINGH et alii, 1985).



Vários autores estudaram a expressão gênica dos baculovírus durante a replicação (LUBBERT & DOERFLER, 1984; MAEDA, 1989; ZUIDEMA et alii 1989) e chegaram a conclusão que a expressão gênica é regulada por quatro classes de genes:  $\alpha$  genes ou genes precoces;  $\beta$  genes ou genes intermediários;  $\gamma$  genes ou genes tardios e  $\delta$  genes onde estão incluídos os genes da poliedrina e p10.

Segundo COCHRAN et alii (1986) poucas das proteínas precoces são reprimidas durante a replicação do DNA, enquanto a maioria das outras continuam sendo sintetizadas por mais tempo durante o ciclo de infecção. Cada classe temporal parece requerer a expressão própria das proteínas de uma classe precedente. O controle de cada classe temporal é também evidente no nível da expressão porque as proteínas virais induzidas não são sintetizadas em quantidades equimolares nas células infectadas.

Talvez somente GRULA et alii (1981) estudaram o papel da RNA polimerase do hospedeiro em células infectadas com NPV. Durante a infecção de AcMNPV em células de *Spodoptera frugiperda*, a maioria da síntese de mRNA específica para AcMNPV foi resistente a  $\alpha$ -amanitina, um potente inibidor da RNA polimerase II. Então a síntese de mRNA polimerase de AcMNPV parece estar sob o comando da atividade de uma RNA polimerase diferente da RNA polimerase I. Em vista da natureza

atípica dos promotores da poliedrina que tem sido sequenciados é comum a existência nos baculovírus do envolvimento de uma RNA polimerase específica quando se trata de transcrição tardia ( $\gamma$ ).

De acordo com COCHRAN et alii (1986) várias proteínas de AcMNPV tem sido sintetizadas in vitro através da RNA poly (A)<sup>+</sup> purificada de células tardias infectadas ( $\gamma$ ). Foi identificado e mapeado um polipeptídeo de 30 K através da técnica de mobilidade eletroforética e também uma nucleoproteína de 41 K. A proteína p10, apesar de representar talvez a de menor peso molecular encontrada nos perfis eletroforéticos, é produzida em grandes quantidades por genes tardios ( $\gamma$ ), expressada coordenadamente com a poliedrina de células infectadas com baculovírus. A função da p10K é ainda desconhecida mas há evidências de que talvez seja o menor componente estrutural da partícula de vírus e que esteja envolvido nos processos de oclusão.

A expressão gênica dos baculovírus é claramente temporal e a regulação de no mínimo alguns genes de AcMNPV ocorre a nível de transcrição. Alguns genes são ligados ou desligados antes da replicação do DNA e outros são ligados após a replicação do DNA, e alguns parecem ser expressados continuamente durante o processo de infecção. As evidências de que alguns genes podem ser controlados por duas ou mais re-

giões promotoras sugerem um mecanismo de regulação da síntese de produtos virais durante as fases precoces e tardias do ciclo de replicação (COCHRAN et alii, 1986).

LÜBBERT & DOERFLER (1984); ROHEL & FAULKNER (1984) e THIEM & MILLER (1989) estudaram a transcrição de mRNAs no genoma de AcMNPV.

SMITH et alii (1982) traduziram no mínimo seis polipeptídeos virais específicos através da RNA poli (A)<sup>+</sup> purificadas de células infectadas com AcMNPV.

Os resultados das pesquisas, até agora, revelam que já estão identificados pelo menos trinta e dois produtos de tradução em cerca de vinte regiões do genoma de AcMNPV. Através da mobilidade eletroforética de anticorpos monoclonais os produtos de tradução podem ser especificamente identificados com respeito aos vários componentes estruturais.

De acordo com COCHRAN et alii (1986), a maioria das espécies de RNA poli (A)<sup>+</sup> foram detectadas em células infectadas, correspondentes aos produtos de tradução e algumas espécies de RNA de tamanhos diferentes foram encontradas sobrepostas, representando que conjuntos de mRNA diferentes podem codificar as mesmas proteínas.

Nas pesquisas de literatura, até agora, somente dois genes de baculovírus foram sequenciados: o gen da poliedrina e o da proteína p10 de AcMNPV.

IATROU et alii (1985) sequenciaram o gen da poliedrina de BmNPV e CHANG et alii (1989) sequenciaram o gen da poliedrina para LymNPV.

CARSTENS (1987) caracterizou recombinantes de AcMNPV através da sequência de nucleotídeos de regiões do genoma de SfMNPV inseridas no genoma de AcMNPV.

De acordo com COCHRAN et alii (1986) a comparação do gen da poliedrina e granulina codificando e controlando sequências de nucleotídeos revela um alto grau de conservação. O gen da poliedrina de AcMNPV tem cerca de 58% das suas proteínas codificando a granulina de PbGV e TnGV e 73% de conservação entre os dois GVs.

Devido ao alto grau de expressão dos promotores do gen da poliedrina dos baculovírus (LUCKOW & SUMMERS, 1989) eles vem sendo usados como vetores da clonagem de genes estranhos principalmente na Medicina.

Aqui estão alguns exemplos de produção de proteínas através dos promotores citados.

1. Produção de  $\beta$  interferon humano (SMITH et alii, 1983);
2. Produção de  $\beta$  galactosidase em células de *Escherichia coli* (PENNOCK et alii, 1984);
3. Produção da proteína humana myc-c (MIYAMOTO et alii, 1985);

4. Produção de três polimerases do vírus da influenza (ST ANGELO et alii, 1987);
5. Produção de hidroxilase tirosina humana (GINNS et alii, 1988).

Como podemos notar, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante (TDR) juntamente com a Biologia Molecular e a Engenharia Genética, vem elucidar a organização e expressão dos genomas dos baculovírus sendo consideradas, portanto, possíveis vias de produção de melhores agentes microbianos para o controle de pragas.

No Brasil, um dos primeiros relatos do vírus da poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* foi de GATTI et alii (1977), apesar que, de acordo com MOSCARDI (1986), desde 1972 este vírus já tinha sido relatado afetando lagartas da soja da região de Campinas-SP (ALLEN & KNELL, 1977). A via bilização do uso do *Baculovirus anticarsia* (NPV) como inseticida microbiano a nível de campo, foi introduzida no Brasil pelo Centro Nacional de Pesquisas da Soja - CNPSo - EMBRAPA, Londrina-PR (MOSCARDI, 1983).

ONGARELLI et alii (1980) detectaram o vírus da granulose de *Erinnyis ello*, mandarovã da mandioca, o *Baculovirus erinnyis* (GV) na região de Curvelo-MG. Os primeiros estudos de introdução deste baculovírus a nível de campo foram realizados por SCHMITT (1985) através da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina - EMPASC-SC.

De acordo com ALMEIDA et alii (1986), o vírus da granulose de *Diatraea saccharalis*, broca da cana-de-açúcar (DsGV), vem sendo produzido em laboratório desde 1982 (PAVAN & BOTELHO, 1982; PAVAN, 1983) sendo que os primeiros estudos de etiologia de infecção e virulência foram realizados por PAVAN et alii (1983). O laboratório do Departamento de Genética da UNICAMP juntamente com a Seção de Entomologia da Coordenadoria Regional-Sul do IAA/PLANALSUCAR, Araras-SP e Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, vem produzindo o DsGV para testes de campo em áreas comerciais, visando incrementar o controle biológico desta praga com a utilização deste patógeno. De acordo com ALVES (1986) o DsGV ocorre de forma enzootica nas populações desse inseto.

O fato da utilização do *Baculovirus anticarsia* como primeiro inseticida microbiano no país a nível de campo e a tentativa de introdução de pelo menos mais duas espécies de *Baculovirus*, torna-se bastante significativo para o país que estudos com a utilização da TDR, Biologia Molecular e Engenharia Genética comecem tomar lugar na pesquisa científica do Brasil.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos desta tese foram utilizados dois tipos de vírus que atacam insetos pragas de importância agrícola, classificados como pertencentes a mesma família Baculoviridae. Os vírus escolhidos foram os da poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgNPV), lagarta da soja e o vírus da granulose de *Diatraea saccharalis* (DsGV), broca da cana-de-açúcar.

Os cristais de AgNPV foram gentilmente cedidos pelo Dr. Flávio Moscardi do Centro Nacional de Pesquisas da Soja (CNPSo-EMBRAPA), Londrina-PR, e os cristais de DsGV foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Octavio Henrique de Oliveira Pavan do Departamento de Genética da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas-SP.

#### 3.1. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV

Várias modificações na metodologia de extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV foram necessárias pa

ra a obtenção de um material adequado que atendesse os objetivos deste trabalho.

Inicialmente foi estudada a melhor concentração da amostra entre as concentrações de cristais de 1, 2, 5, 10, 25, 50 e 100 mg/ml de tampão TBS 0,05 M, pH 7,4 para cada extração. Posteriormente decidiu-se ampliar a faixa de concentração dos cristais e então nova pesquisa foi feita com amostras contendo 200, 300, 400, 500 e 1000 mg/ml.

Finalmente, dentre as concentrações experimentadas selecionou-se a de 1000 mg/ml por amostra, concentração esta que satisfaz os requisitos desejáveis na purificação dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV, com uma margem de segurança no que diz respeito a um bom perfil eletroforético.

Os ácidos nucleicos obtidos pelo método de desnaturação de proteínas com fenol e precipitação com etanol, foram posteriormente tratados de diversas maneiras para se obter boa relação das densidades ópticas (D<sub>0</sub>) e 260 a 280 nm e também livres de fenol.

Seguem-se alguns esquemas de alternativas utilizadas para a escolha da metodologia mais adequada para a extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV (Figuras 1 a 5). O esquema nº 5 (Figura 5) foi o adotado neste trabalho.



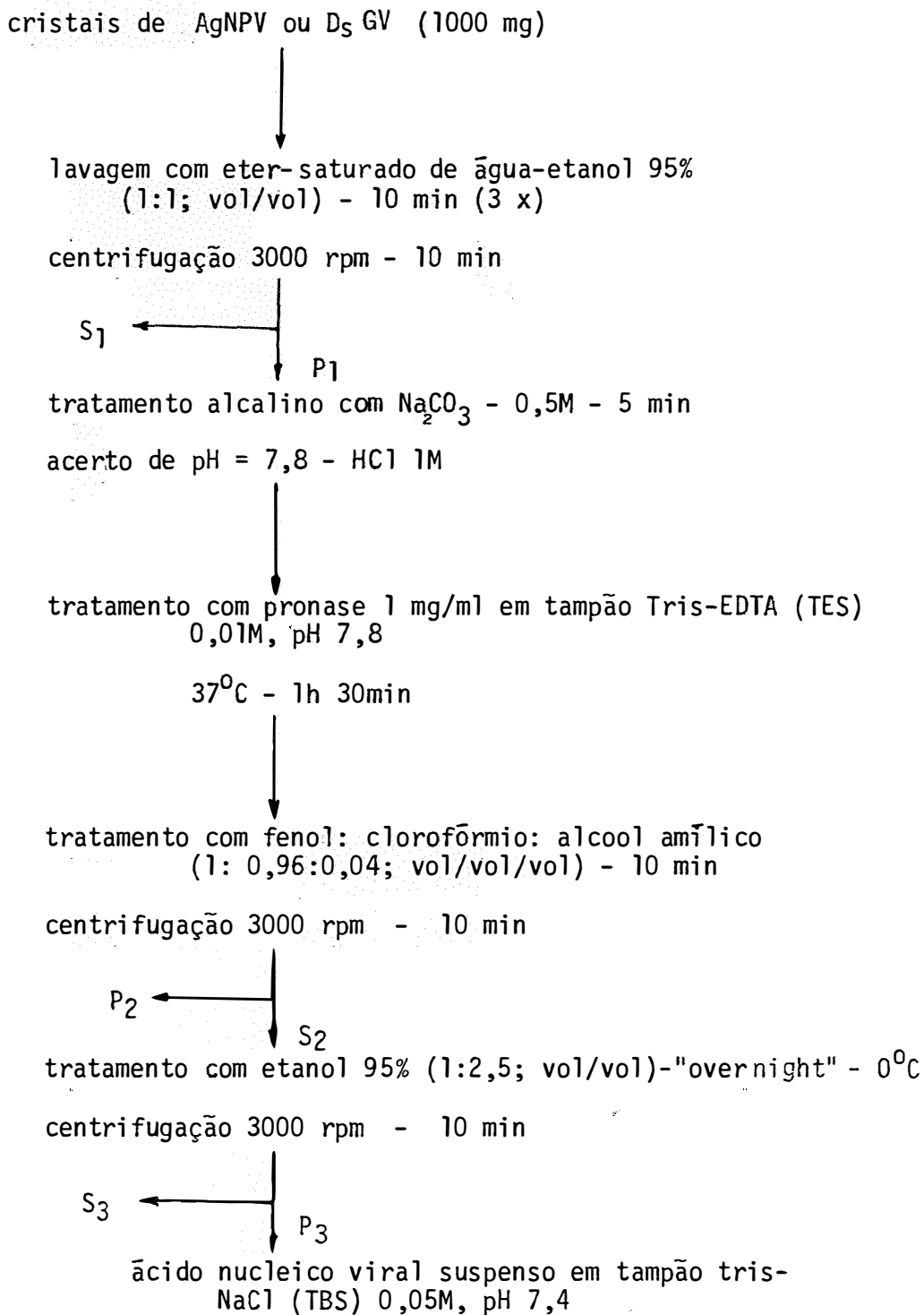


Figura 1. Método 1 de extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do D<sub>5</sub>GV.

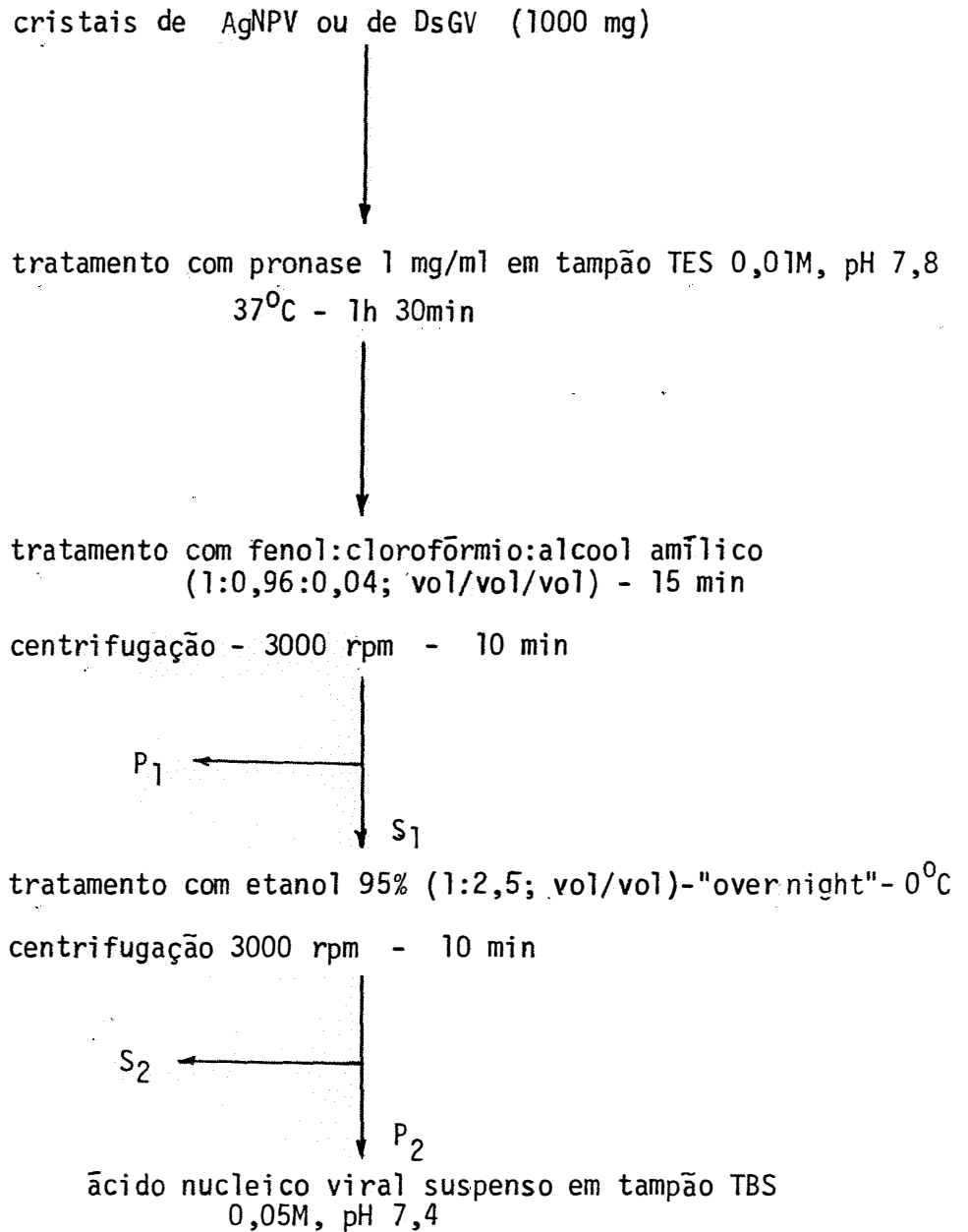


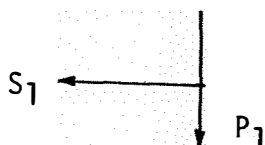
Figura 2. Método 2 de extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do Ds GV.

cristais de AgNPV ou de DsGV (1000 mg)



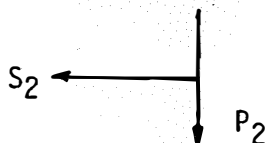
tratamento com ácido tricloro-acético (TCA) 10%  
4°C - 30 min

centrifugação 3000 rpm - 10 min

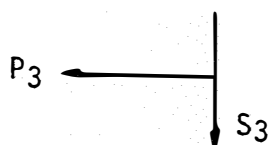


lavagem com éter saturado de água-etanol 95% (1:1; vol./vol)(3x)

Centrifugação 3000 rpm - 10 min (3x)

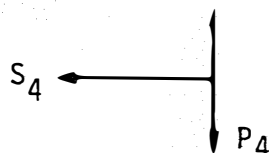


tratamento com fenol:clorofórmio:alcool amílico  
(1:0,96:0,04; vol/vol/vol) - 10 min



tratamento com etanol (1:2,5; vol/vol)"overnight" - 0°C

centrifugação 3000 rpm - 10 min



ácido nucleico viral suspenso em tampão TBS  
0,05M, pH 7,4

Figura 3. Método 3 de extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV.

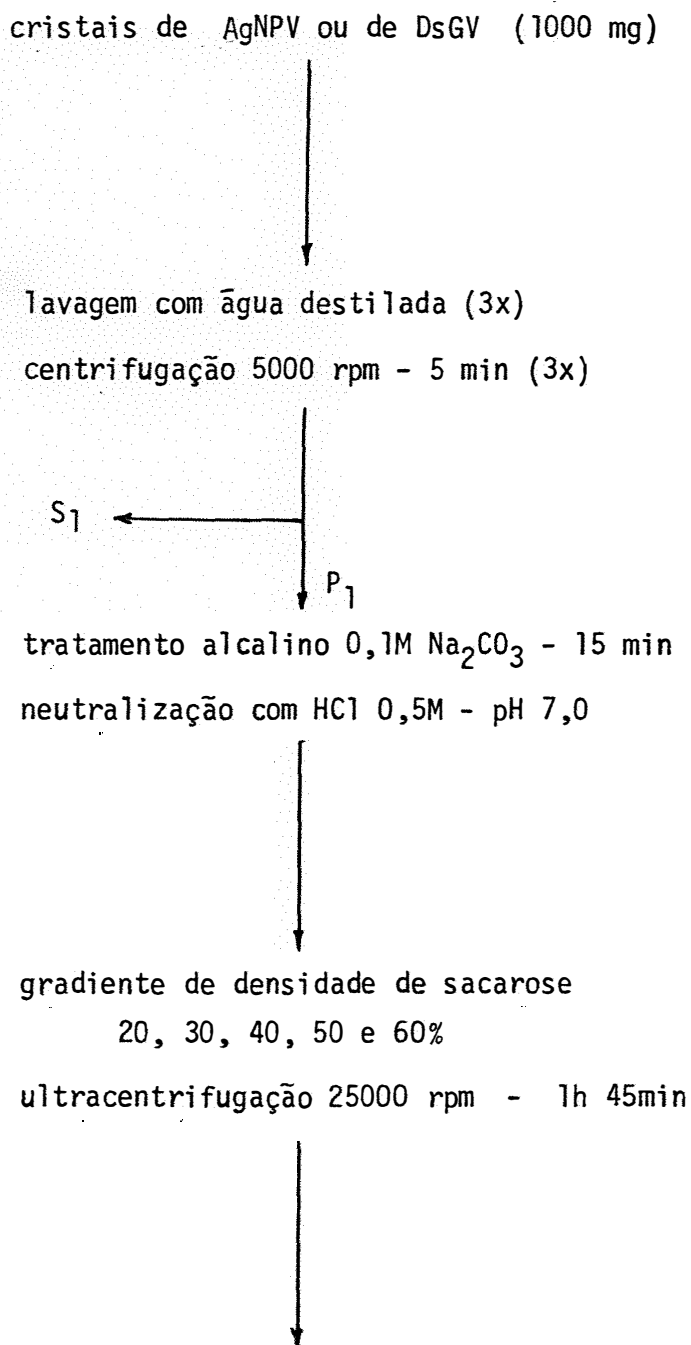


Figura 4. Método 4 de extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do D<sub>S</sub>Gv. (LOH et alii, 1981, modificado).

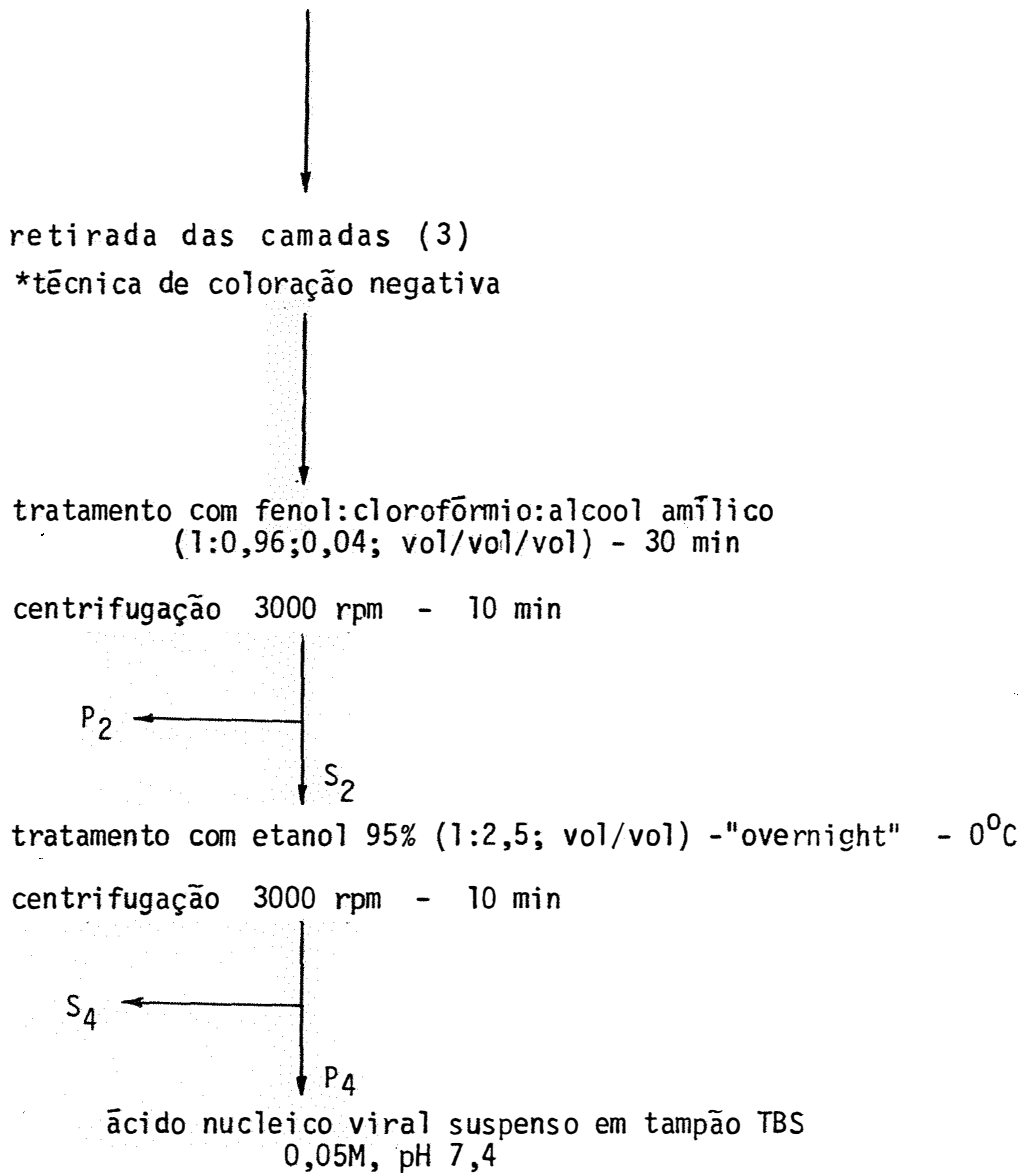


Figura 4 - (continuação)

\* Técnica de coloração negativa

De cada uma das 3 camadas obtidas no gradiente de densidade de sacarose foi retirada uma amostra, que sofreu tratamento através da técnica de coloração negativa (BRENNER & HORNE, 1959). Cada amostra foi colocada sobre grade de cobre de 400 mesh, coberta com parafina 2%, colorida com ácido fosfotungstico (PTA) 2,0%, pH 7,2 e levada para exame ao microscópio eletrônico.

cristais de AgNPV ou de DsGV (1000 mg)



tratamento com pronase 2 mg/ml em tampão TES 0,01M, pH 7,8  
37°C - 2h



tratamento com fenol:clorofórmio:alcool amílico  
(1:0,96 0,04; vol/vol/vol) - 30 min

centrifugação - 3000 rpm - 20 min

P<sub>1</sub>

S<sub>1</sub>

tratamento com etanol 95% - 0°C gota a gota (1:4; vol/vol)

S<sub>2</sub>

P<sub>2</sub>

ácido nucleico viral enrolado em bastonete de vidro,  
lavado com etanol 95% e suspenso em tampão TBS,  
pH 7,4

Figura 5. Método 5 de extração dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV.

### 3.2. ANÁLISE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AGNPV E DO DSGV AO ESPECTROFOTÔMETRO

O controle de qualidade das amostras dos ácidos nucleicos virais, foi obtido através de curvas de densidade óptica (DO) ao espectrofotômetro SPECTRONIC 2000 - Bausch & Lomb, na faixa de comprimento de onda variável entre 200 e 300 nm.

Uma das características dos ácidos nucleicos que foi tomada como critério auxiliar de pureza é a relação das DO a 260 e 280 nm com um valor ao redor de 1,8 (MANIATIS et alii, 1982).

Para a obtenção do valor  $R = DO_{260nm}/DO_{280nm}$  as amostras de ácidos nucleicos obtidas através dos processos de extração anteriormente descritos foram levadas diretamente ao espectrofotômetro ou submetidas aos seguintes pré-tratamentos visando a retirada de resquícios de fenol.

1. dialisadas "overnight" contra gradiente de água destilada;
2. precipitadas com etanol 95%;
3. precipitadas com eter saturado de água-clorofórmio (1:1; vol/vol);
4. precipitadas com eter saturado de água-etanol (1:1; vol/vol);

5. enroladas em bastonete de vidro, lavadas em etanol 95% e suspensas em tampão TBS 0,05 M, pH 7,4.

Com respeito a quantificação dos ácidos nucleicos o critério adotado foi o D0 referencial a 260 nm em que 50 µg/ml é igual a 1. Em vista da proporcionalidade entre quantidade de ácido nucleico e a D0 foram calculadas as concentrações dos ácidos nucleicos (MANIATIS et alii, 1982).

### 3.3. TRATAMENTO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os ácidos nucleicos tanto do AgNPV como do DsGV que apresentaram relação D0260nm/D0280nm próxima ou igual a 1,8 foram submetidos a 9 enzimas de restrição: Ava I, Bam HI, Bsp RI, Eco RI, Hind III, Kpn I, Sal I, Sma I e Pst I, a fim de poder selecionar as que fossem mais adequadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Para se determinar as quantidades de enzimas de restrição e as de ácido nucleico em cada repetição utilizou-se a metodologia de MANIATIS et alii (1982).



### 3.4. ELETROFORESE "SUBMARINA" HORIZONTAL DOS FRAGMENTOS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV OBTIDOS PELA AÇÃO DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

O gel da eletroforese foi constituído de agarose 0,7% (HELLING et alii, 1974) dissolvida em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 0,02M, pH 8,0 e 50 µl de brometo de etídio 0,5%. Este gel foi solidificado sobre uma placa de acrílico de 130x4x75 mm (compr.x esp.x alt.) posteriormente colocada dentro de uma cuba de vidro pirex de 250x150x45 mm (compr.x larg.x alt.) coberta com tampão TBE (MANIATIS et alii, 1982).

As amostras de ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV foram incubadas a 45<sup>0</sup>C durante 5 minutos. Acrescentadas as enzimas de restrição Ava I, Bam HI, Bsp RI, Eco RI, Hind III, Kpn I, Sal I, Sma I e Pst I, as amostras foram incubadas por 2 horas a 37<sup>0</sup>C e 20 minutos a 65<sup>0</sup>C (MANIATIS et alii, 1982). O ácido nucleico do bacteriófago lâmbda ( $\lambda$ ) que serviu como padrão também foi incubado por 5 minutos a 45<sup>0</sup>C e adicionado a enzima Hind III. As amostras que serviram de controle sofreram o mesmo tipo de tratamento, menos a adição de enzimas de restrição.

Os respectivos materiais, com a ajuda de micro pipetas, foram colocados nas canaletas do gel de agarose correndo por 4 h a 100 V e 50 mA. Após este tempo de "corrida"

os resultados das eletroforeses foram examinados sob luz ultra-violeta (UV), esquematizados em papel ou fotografados em filme ILFORD, branco e preto, 50 ASA.

### 3.5. DETERMINAÇÃO DOS PESOS MOLECULARES DOS FRAGMENTOS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DSGV OBTIDOS PELA AÇÃO DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os pesos moleculares dos fragmentos dos ácidos nucleicos obtidos pela ação de enzimas de restrição foram determinados através da equação utilizada por IIZUKA & FAUST (1982) baseada na relação peso molecular e mobilidade relativa das bandas.

Expressão da equação da reta:

$$\log_{10}(\text{PM}) = \log_{10}(\text{PM})^* - b (\log_e \text{MR} + 1)$$

onde:

$$\log_{10}(\text{PM}) = y$$

$$\log_{10}(\text{PM})^* = a \text{ ou seja ponto de intersecção da reta com a ordenada } (\log_{10}\text{PM})$$

$b$  = coeficiente angular da reta

$$\log_e(\text{MR} + 1) = x$$

$\text{MR}$  = mobilidade relativa

Serviram como padrão os pesos moleculares dos fragmentos do ácido nucleico do bacteriófago  $\lambda$  obtidos pela ação da enzima de restrição Hind III. Os valores dos pesos moleculares (D) dos fragmentos de  $\lambda$ , utilizados como padrão foram: 14,93; 5,99; 4,16; 2,68; 1,42; 1,23 (RODRIGUEZ & TAIT, 1983).

### 3.6. DETERMINAÇÃO DOS PESOS MOLECULARES DOS FRAGMENTOS DO ÁCIDO NUCLEICO DO AgNPV ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROSCÓPIA ELETRÔNICA

Após a corrida do ácido nucleico do AgNPV em eletroforese de agarose as bandas correspondentes aos fragmentos foram recortadas do gel e colocadas no fundo de tubos de ensaio. O gel foi coberto com tampão TBS pH 7,4 e os tubos foram mantidos a 4°C "overnight". No dia seguinte coletou-se com pipeta de Pasteur uma gota do tampão que continha os fragmentos do DNA do AgNPV difundidos, depositando-a sobre grade de cobre de 400 mesh que foi submetida a metalização (BRADLEY, 1967). Com ouro-paládio e levada ao microscópio eletrônico para obtenção das eletrofotomicrografias.

Para a determinação do peso molecular do DNA do AgNPV, mediu-se o comprimento dos fragmentos encontrados nas eletrofotomicrografias. A seguir dividiu-se o comprimen-

to ( $\mu\text{m}$ ) pelo valor da ampliação, a fim de determinar o tamanho real de cada fragmento. Finalmente determinou-se o peso molecular de cada fragmento multiplicando-se o comprimento ( $\mu\text{m}$ ) por  $2,08 \times 10^6 \text{D}$  (STÜBER & BUJARD, 1977).

### 3.7. "FINGER-PRINT" DO AgNPV E DO DsGV

#### 3.7.1. Eletroforese dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV tratados com enzimas de restrição

Conforme o método "Finger-print" de RUSHIZKY & KNIGHT (1960) utilizou-se uma cuba de acrílico de 310 x 80 x 240 mm (compr. x larg. x alt.) onde foi colocado papel Whatman 3MM, dobrado ao meio, sobre um bastão de vidro. O papel foi embebido em tampão de ácido fórmico (98%) na concentração de 3 ml/l, pH 2,7, ajustado com  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Cada amostra de ácido nucleico do AgNPV tratada com Eco RI e do DsGV tratada com Bsp RI, (MANIATIS et alii, 1982), foi depositada com auxílio de micropipeta na extremidade esquerda do papel dobrado. Após 5 horas de "corrida" de eletroforese a 150 V e 6,5 mA o papel foi pendurado, deixado secar e examinado sob luz ultra-violeta (UV) e delineadas as manchas encontradas.

### 3.7.2. Cromatografia desenvolvida perpendicularmente ao sentido da eletroforese dos ácidos nucleicos

Após a secagem do papel contendo os resultados da eletroforese observados sob luz ultra-violeta (UV), utilizou-se uma cuba de vidro de 490 x 290 mm (compr.xdiam.) contendo butanol 99% e tampão de ácido fórmico 98% na concentração de 3 ml/l, pH 2,7 (1:1; vol/vol), onde foi colocado o papel da eletroforese em sentido perpendicular ao anterior e deixado "correr" por 10 a 12 horas. Então o papel foi pendurado para secar e examinado sob luz ultra-violeta (UV) novamente, delineando-se as manchas a fim de se comparar os resultados das diversas repetições do "Finger-print" do DNA do AgNPV e do DsGV.

## 3.8. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

O método de análise eletroforética utilizado para o perfil das proteínas foi basicamente o descrito por LAEMMLI (1970), modificado por HAMES (1982).

Empregou-se eletroforese em sistema descontínuo em gel de SDS e poliacrilamida. Os géis de empacotamento e resolução foram feitos em aparato vertical de vidro com di

mensões de 185x4x150 mm (compr.xesp.xalt.). As concentrações de cada constituinte dos géis e as demais soluções utilizadas encontram-se no apêndice 2.

Os padrões dos pesos moleculares utilizados foram albumina bovina (6600 D), ovalbumina (45000 D), pepsina (34700 D), tripsinogenio (24000 D),  $\beta$ -galactoglobulina (18400 D) e lizosima (13400 D).

### 3.8.1. Preparo das amostras de eletroforese de proteínas

O método utilizado na preparação das amostras foi o de RODRIGUES (1989), com pequenas modificações.

Utilizou-se 0,2 mg/ml de cristais de AgNPV e DsGV dissolvidos em tampão da amostra. Estes materiais foram aquecidos a 100°C durante 5 minutos para inativação da protease alcalina que quando em pH alcalino degrada as proteínas em polipeptídeos menores.

A esses materiais foi adicionada uma solução alcalina de  $\text{Na}_2\text{CO}_3^-$  0,5 M, NaCl -0,17M, EDTA-0,01M, pH 11 e deixados à temperatura ambiente durante 30 minutos. Centrifugou-se a 1500 rpm durante 20 minutos e adicionou-se a "pellet" 0,3 ml de tampão da amostra. Os materiais foram mantidos a 0°C, "overnight", ou até serem levados com auxílio de

micropipetas às canaletas do gel. O tempo de corrida da eletroforese foi de 2,5 horas a 100 V e 4 mA.

### 3.8.2. Coloração dos perfis eletroforéticos de proteínas

O método utilizado para a coloração dos perfis eletroforéticos de proteínas foi o da impregnação com prata (Ag) descrito por BLUM et alii (1987).

## 3.9. DETERMINAÇÃO DOS PESOS MOLECULARES DAS PROTEÍNAS DO AgNPV E DO DsGV

Os pesos moleculares das proteínas do AgNPV e do DsGV foram determinados através da equação proposta por IIZUKA & FAUST (1982), já utilizada na determinação dos pesos moleculares dos fragmentos dos ácidos nucleicos.

## 4. RESULTADOS

### 4.2. EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV

Os primeiros testes realizados com os cristais de AgNPV e DsGV mostraram que as concentrações de 1, 2, 5, 10, e 25 mg/ml para cada extração não foram satisfatórias, já que não se observou nenhum tipo de "banda" nos perfis eletroforéticos; só a partir da concentração de 50 mg/ml é que se conseguiu algum resultado. Os resultados foram se tornando mais significativos com o aumento das concentrações para 100, 200, 300, 500 e 1000 mg/ml sendo esta última concentração a escolhida para atingir os objetivos desta tese.

No que se trata das metodologias de extração dos ácidos nucleicos o método 1 (Figura 1) apresenta tratamento alcalino (0,5M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 0,5M NaCl) e tratamento com enzima pronase (1 mg/ml) com subseqüentes tratamentos fenol-etanol. O método 2 difere do método 1 (Figuras 2 e 1) pela ausência do tratamento alcalino o qual foi considerado bastante drástico no que diz respeito à quebras dos ácidos nucleicos. A retirada do



tratamento alcalino do método 2 mostrou alguma melhora no processo de extração dos ácidos nucleicos em estudo, mas não o suficiente para atingir os objetivos.

No método 3 (Figura 3) o tratamento com ácido tricloro-acético (TCA) e as lavagens com éter-etanol nada modificaram os resultados anteriores, fazendo-se partir para novo processo de extração (LOH et alii, 1981, modificado). Este método representado na Figura 4 mostrou-se bom mas com baixa eficiência de extração dos ácidos nucleicos, já que se obteve do gradiente de sacarose os seguintes resultados ao microscópio eletrônico.

Camada 1 - camada escura; cristais de vírus arrebatados e muita sujeira;

Camada 2 - camada branca; cristais de vírus não arrebatados e material mais limpo que o anterior;

Camada 3 - "nata"; grande número de partículas de vírus.

Deduziu-se que a perda de material (ácidos nucleicos) neste caso não foi compensatória em relação a metodologia empregada e portanto partiu-se para o método 5 (Figura 5) que diferiu basicamente do 2 pelo aumento da concentração da enzima pronase de 1 mg/ml para 2 mg/ml e tempo de incubação de 1h 30min para 2h a 37°C.

Concluiu-se que o método 5 foi o mais adequado para os objetivos do trabalho, sendo portanto o menos drástico em termos de quebra dos ácidos nucleicos e o mais eficiente em termos de quantidade de material extraído.

O tratamento dos cristais tanto de AgNPV como de DsGV com a enzima pronase (MANIATIS et alii, 1982) foi o mais eficiente na dissolução das proteínas que envolvem as partículas dos vírus (poliedrina e granulina) permitindo assim uma maior eficiência da desnaturação das proteínas pelo fenol e subsequente obtenção dos ácidos nucleicos.

A técnica de enrolamento dos ácidos nucleicos no bastonete de vidro foi bastante satisfatória para o AgNPV e menos satisfatória para o DsGV, permitindo obter ácidos nucleicos mais íntegros e livres de fenol.

#### 4.2. ANÁLISE DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV AO ESPECTROFOTÔMETRO E QUANTIFICAÇÃO

O controle da qualidade das amostras dos ácidos nucleicos virais foi realizado através de curvas de densidade óptica (DO) ao espectrofotômetro.

A relação (R)  $D_{0260\text{nm}}/D_{0280\text{nm}} = 1,8$ , segundo MANIATIS et alii (1982), indica uma boa qualidade dos ácidos nucleicos.

A Tabela 1 indica os valores de R obtidos durante os experimentos com a utilização das 5 metodologias de extração dos ácidos nucleicos virais.

Tabela 1. Valores de  $R = D_{0260nm}/D_{0280nm}$  durante as pesquisas das 5 metodologias de extração dos ácidos nucleicos virais.

	AgNPV	DsGV
Método 1 —	0,90	0,60
Tendência de melhora ↓	1,36	0,92
	1,37	0,96
	1,48	1,00
	1,53	1,10
	1,58	1,18
	1,61	1,25
	1,65	1,27
	1,67	1,30
	1,69	1,32
	1,71	1,35
	1,75	1,36
Método 5 —	1,78	1,56
	1,79	1,67

A seguir são apresentados os resultados mais representativos das curvas de densidade óptica (DO) à UV.

Na Figura 6 pode-se observar a DO para a faixa de radiação com comprimento de onda entre 200 e 300 nm. Os números na parte superior representam os comprimentos de onda ( $\lambda$ ) em nanômetro (nm) com as densidades ópticas correspondentes (DO) as relações  $D_{0260nm}/D_{0280nm}$ .

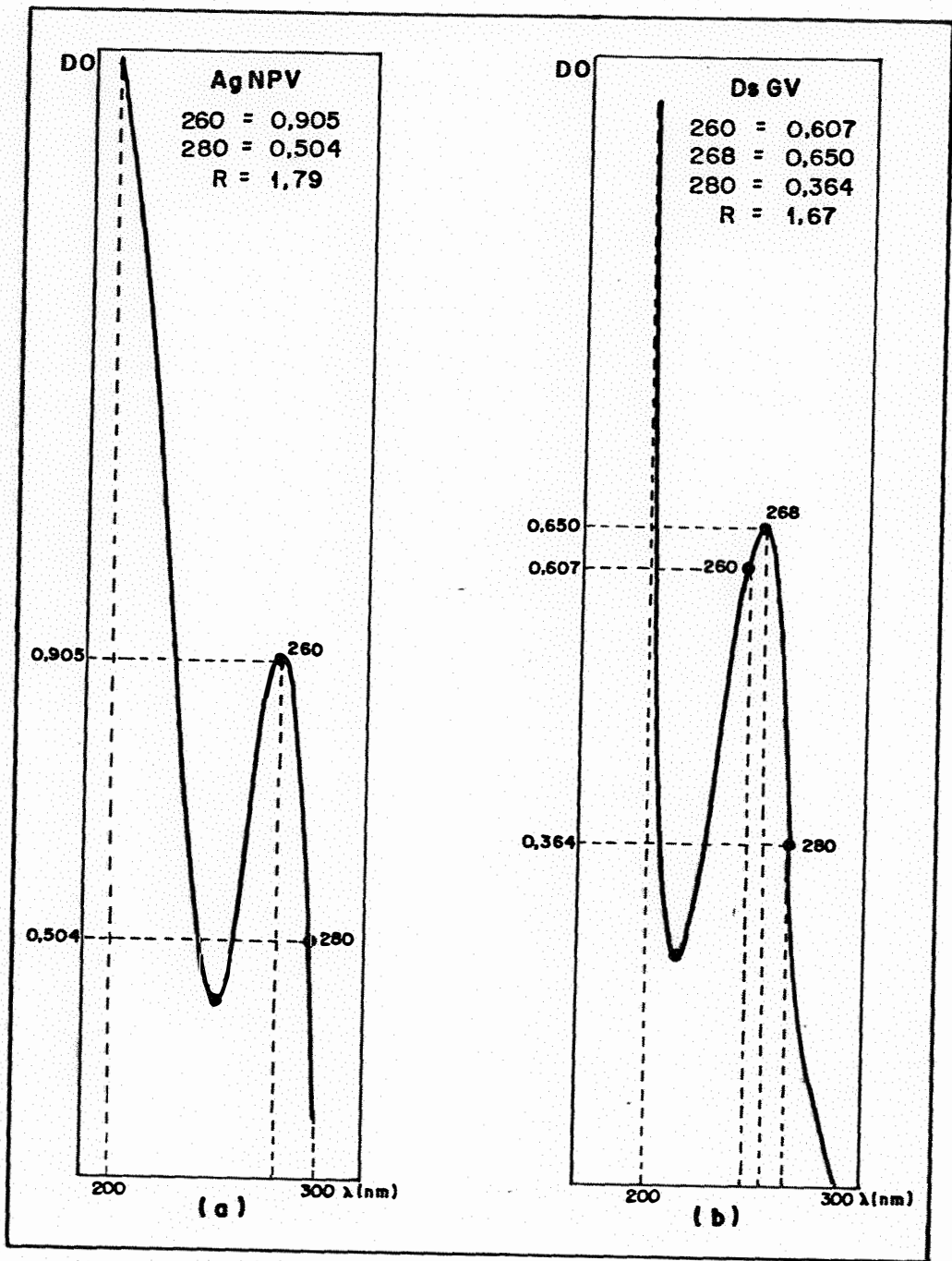


Figura 6 - Curvas de densidade óptica (DO) obtidas ao espectrofotômetro referentes a obtenção dos ácidos nucleicos do AgNPV(a) e do DsGV (b).

Adotado o critério de quantificação de ácidos nucleicos de MANIATIS et alii (1982) onde  $D_{0260nm} = 1$  representa uma concentração de ácido nucleico igual a  $50 \mu\text{g/ml}$ , encontrou-se os valores de  $45,3 \mu\text{g DNA/ml}$  quando a  $D_{0260nm}$  foi igual a 0,90 para o AgNPV (Figura 6a) e  $30,5 \mu\text{g DNA/ml}$  quando a  $D_{0260nm}$  foi igual a 0,61 para o DsGV (Figura 6b).

#### 4.3. TRATAMENTOS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO SUBMETIDOS À ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE - "ELETROFORESE SUBMARINA"

Os resultados obtidos com as enzimas de restrição Eco RI para o AgNPV e Bsp RI para o DsGV foram os mais satisfatórios em relação as outras enzimas testadas como Ava I, Bam HI, Hind III, Kpn I, Sal I, Sma I e Pst I.

Os esquemas dos resultados obtidos com as enzimas de restrição utilizadas durante os experimentos são mostrados na Figura 7.

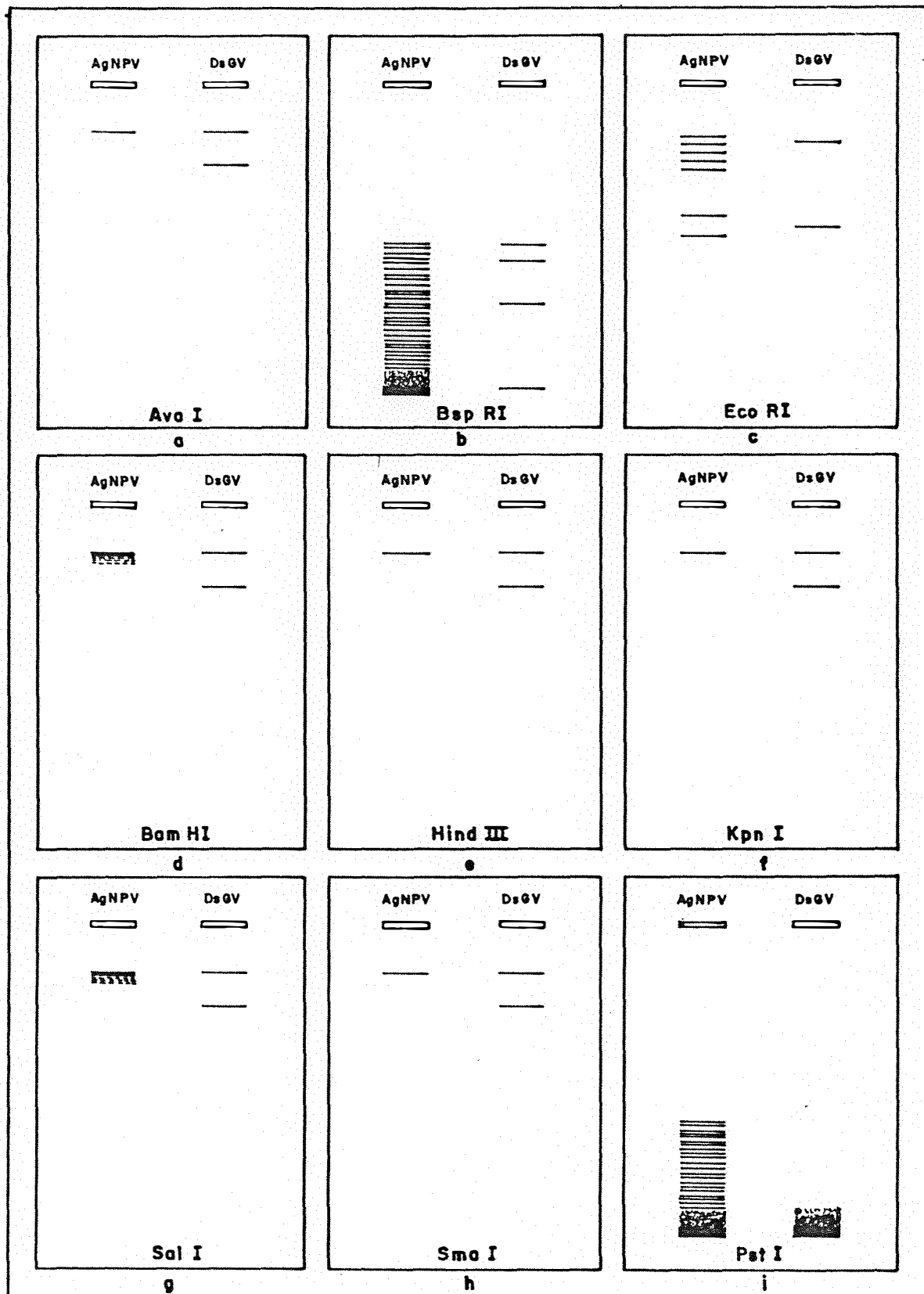


Figura 7 - Número de fragmentos obtidos com a ação das enzimas de restrição *Ava* I, *Bsp* RI, *Eco* RI, *Bam* HI, *Hind* III, *Kpn* I, *Sal* I, *Sma* I, *Pst* I utilizadas nos experimentos com os ácidos nucleicos AgNPV e DsGV.

#### 4.4. ELETROFORESE "SUBMARINA" HORIZONTAL DOS FRAGMENTOS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV OBTIDOS PELA AÇÃO DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Os resultados das eletroforeses de 15 repetições em gel de agarose dos ácidos nucleicos em estudo tratados com enzimas de restrição (Eco RI e Bsp RI) podem ser vistos nas Figuras 8 e 9. As distâncias da canaleta até as "bandas" representam a média das mobilidades relativas (mm) das repetições.

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DOS PESOS MOLECULARES DOS FRAGMENTOS DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DsGV TRATADOS COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para a determinação dos pesos moleculares dos fragmentos dos ácidos nucleicos virais foi utilizado o método de IIZUKA & FAUST (1982) baseado na relação peso molecular e mobilidade relativa das bandas. Os cálculos são encontrados na Tabela 2.

Expressão da equação da reta:

$$\log_{10}(\text{PM}) = \log_{10}(\text{PM})^* - b (\log_e \text{MR} + 1)$$

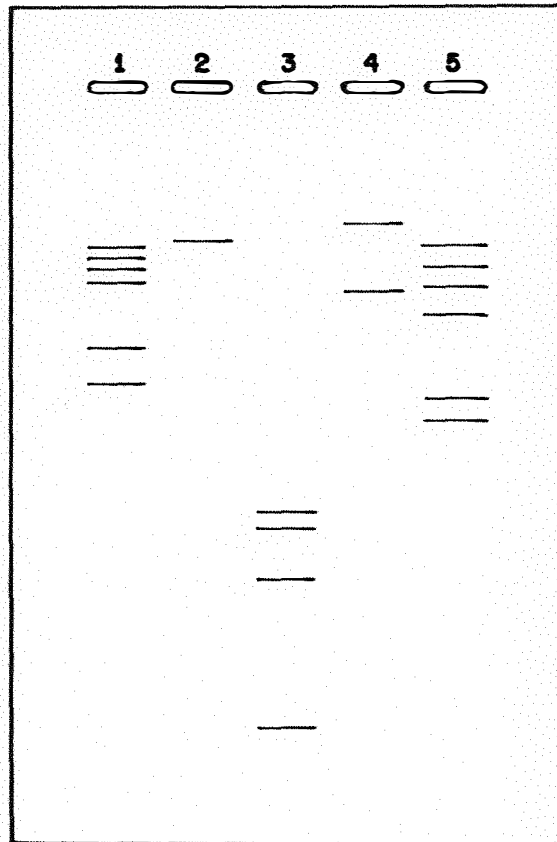
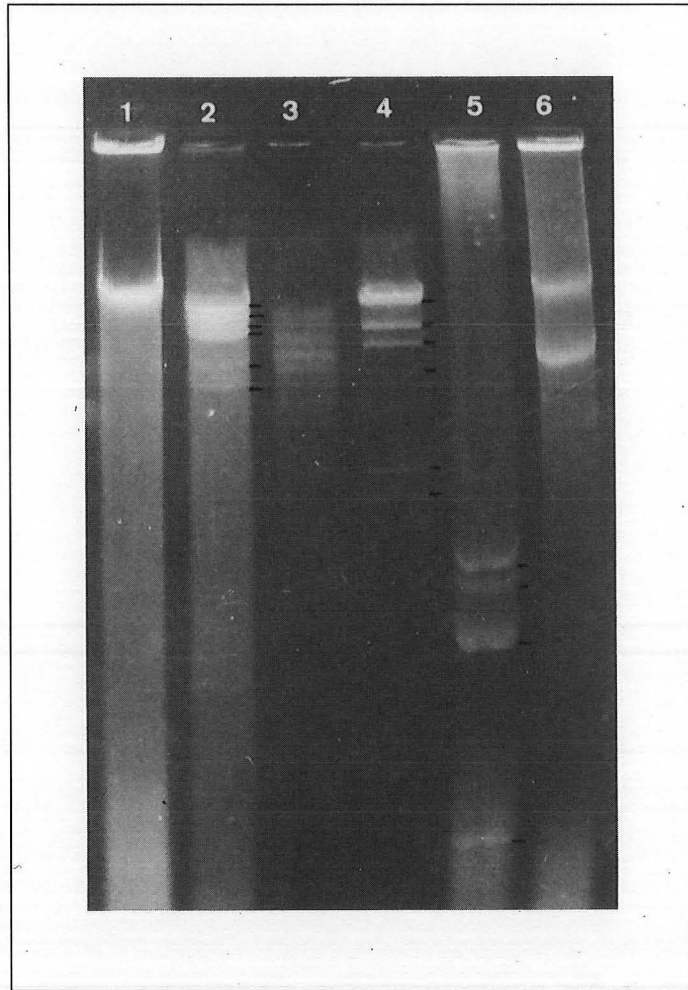


Figura 8 - Esquema padrão das médias dos perfis eletroforético do DNA do AgNPV e do DsGV tratados com Eco RI e Bsp RI respectivamente; AgNPV + Eco RI (1); AgNPV (2); DsGV + Bsp RI (3); DsGV (4);  $\lambda$  + Hind III (5).





**Figura 9** - Perfis eletroforéticos dos DNAs do AgNPV e do DsGV tratados com **Eco** RI e **Bsp** RI respectivamente;  $\lambda$  + **Eco** RI e  $\lambda$  + **Hind** III são marcadores de peso molecular. 1. AgNPV; 2. AgNPV + **Eco** RI; 3.  $\lambda$  + **Eco** RI; 4.  $\lambda$  + **Hind** III; 5. DsGV + **Bsp** RI; 6. DsGV.

Tabela 2 - Determinação dos pesos moleculares (PM) dos fragmentos dos DNAs do AgNPNV e do DsGV tratados com enzimas de restrição.

	Bandas	dist (mm)	(MR+1)	$\log_e(MR+1)$ (x)	$\log_{10}PM(y)$	PM( $\times 10^6$ D)	PM(Kb)
$\lambda$ + Hind III (padrao)	1	19,9	1,6838	0,5211	1,1741	14,93	23,70
	2	22,8	1,7835	0,5786	0,7774	5,99	9,50
	3	25,1	1,8625	0,6219	0,6191	4,16	6,60
	4	29,1	2	0,6931	0,4281	2,68	4,25
	5	40,3	2,3849	0,8692	0,1523	1,42	2,25
	6	43,0	2,4777	0,9073	0,0900	1,23	1,95
AgNPNV + Eco RI	1	20,0	1,6872	0,5231	0,7048	5,0680	8,05
	2	21,6	1,7422	0,5551	0,6930	4,9319	7,83
	3	23,4	1,8041	0,5901	0,6801	4,7873	7,60
	4	24,8	1,8522	0,6164	0,6704	4,6814	7,43
	5	28,3	1,9725	0,6793	0,6471	4,4376	7,05
	6	30,3	2,0412	0,7135	0,6345	4,3104	6,84
DsGV + Bsp RI	1	54,8	2,8832	1,0589	0,5070	3,2133	5,10
	2	57,1	2,9622	1,0859	0,4970	3,1404	4,98
	3	63,8	3,1924	1,1608	0,4693	2,9466	4,68
	4	83,3	3,8625	1,3513	0,3990	2,5059	3,98

Equação da reta:  $y = a - bx$ ;  $a = 0,8980$ ;  $b = -0,3693$ ;  $r = 95\%$

onde:

$$\log_{10}(PM) = y$$

$$\log_{10}(PM)^* = \text{ponto de intersecção da reta com a ordenada } (\log_{10}PM)$$

$$b = \text{coeficiente angular da reta}$$

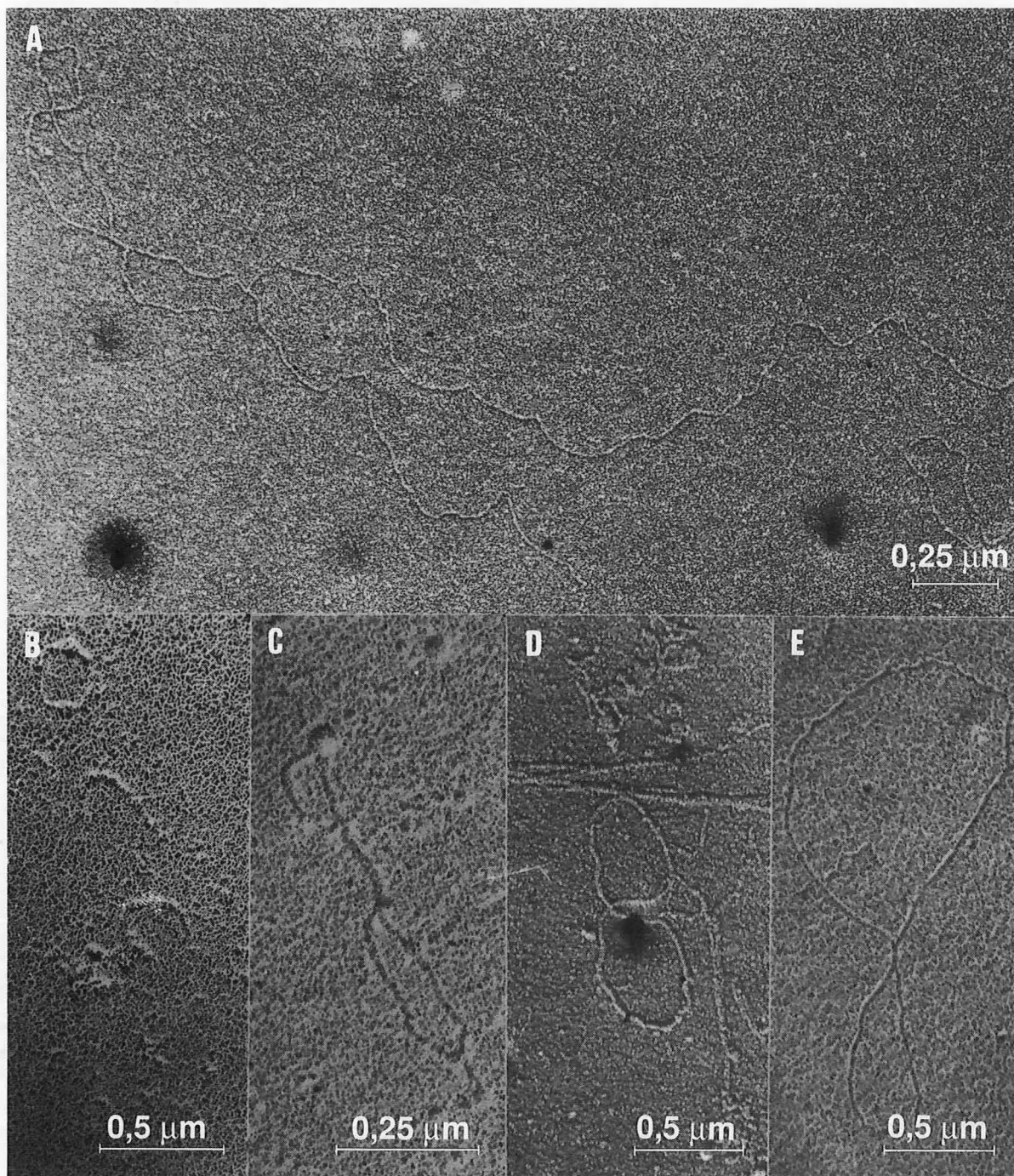
$$\log_e(MR+1) = x$$

$$MR = \text{mobilidade relativa.}$$

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DOS PESOS MOLECULARES DOS FRAGMENTOS DO ÁCIDO NUCLEICO DO AgNPV ATRAVÉS DA TÉCNICA DE MICROSCÓPIA ELETRÔNICA

Para a determinação dos pesos moleculares dos fragmentos do ácido nucleico do AgNPV através da técnica de microscopia eletrônica utilizou-se o método de STÜBER & BUJARD (1977) onde o comprimento do DNA ( $\mu\text{m}$ ) é multiplicado por  $2,08 \times 10^6 \text{D} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ .

Foram determinados os pesos moleculares dos fragmentos de DNA do AgNPV de 4 eletrofotomicrografias (Figura 10).



**Figura 10** - Eletrofotomicrografias de fragmentos de DNA do AgNPV (A, B, C, D, e E).  
Técnica de sombreamento de BRADLEY (1967).

Na Figura 10 foram determinados os pesos moleculares dos fragmentos:

A - a = 53350x ;	20,3 x 10 <sup>6</sup> D ou 32,22Kb
B - a = 38800x ;	1,59 x 10 <sup>6</sup> D ou 2,52Kb
C - a = 89240x ;	3,15 x 10 <sup>6</sup> D ou 5,00Kb
D - a = 34920x ;	6,18 x 10 <sup>6</sup> D ou 9,80Kb
E - a = 34920x ;	10,86 x 10 <sup>6</sup> D ou 17,24Kb

onde a = aumento da foto; PM = peso molecular; D = Daltons e Kb = Kilobases.

#### 4.7. "FINGER-PRINT" DOS ÁCIDOS NUCLEICOS DO AgNPV E DO DSGV

Pode-se observar, através dos esquemas a seguir (Figuras 11 e 12), a tendência de quebras do DNA viral em grupos de oligonucleotídeos provocados pela ação das enzimas de restrição. Para o AgNPV tratado com Eco RI (Figura 11) observou-se 2 grupos de oligonucleotídeos e para o DsgV tratado com Bsp RI observou-se 3 grupos de oligonucleotídeos.

Os tratamentos dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsgV com as enzimas de restrição Eco RI e Bsp RI foram relativamente satisfatório para a obtenção do "Finger-print".

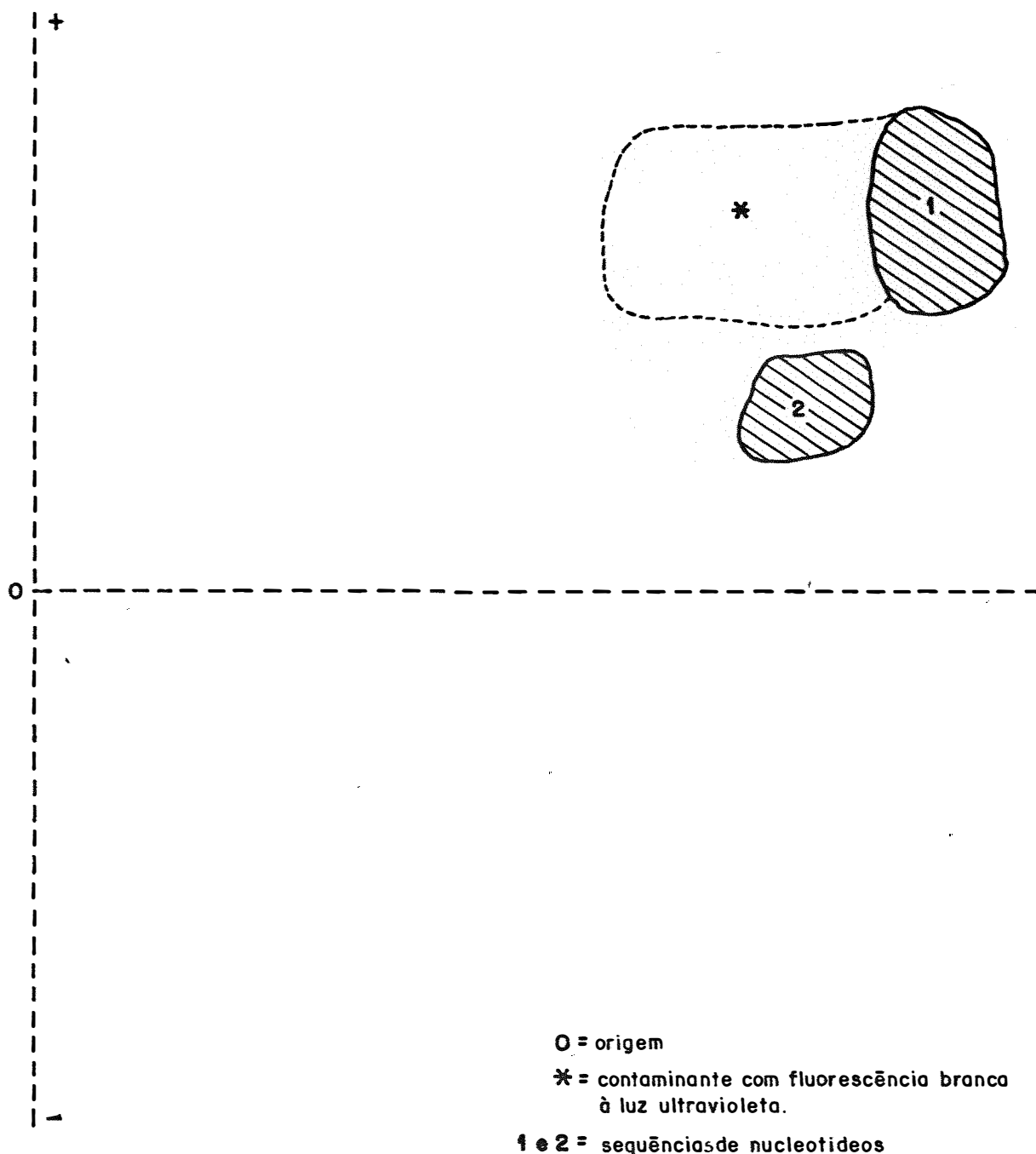


Figura 11. "Finger-print" do AgNPV tratado com Eco RI em papel Whatman 3MM.

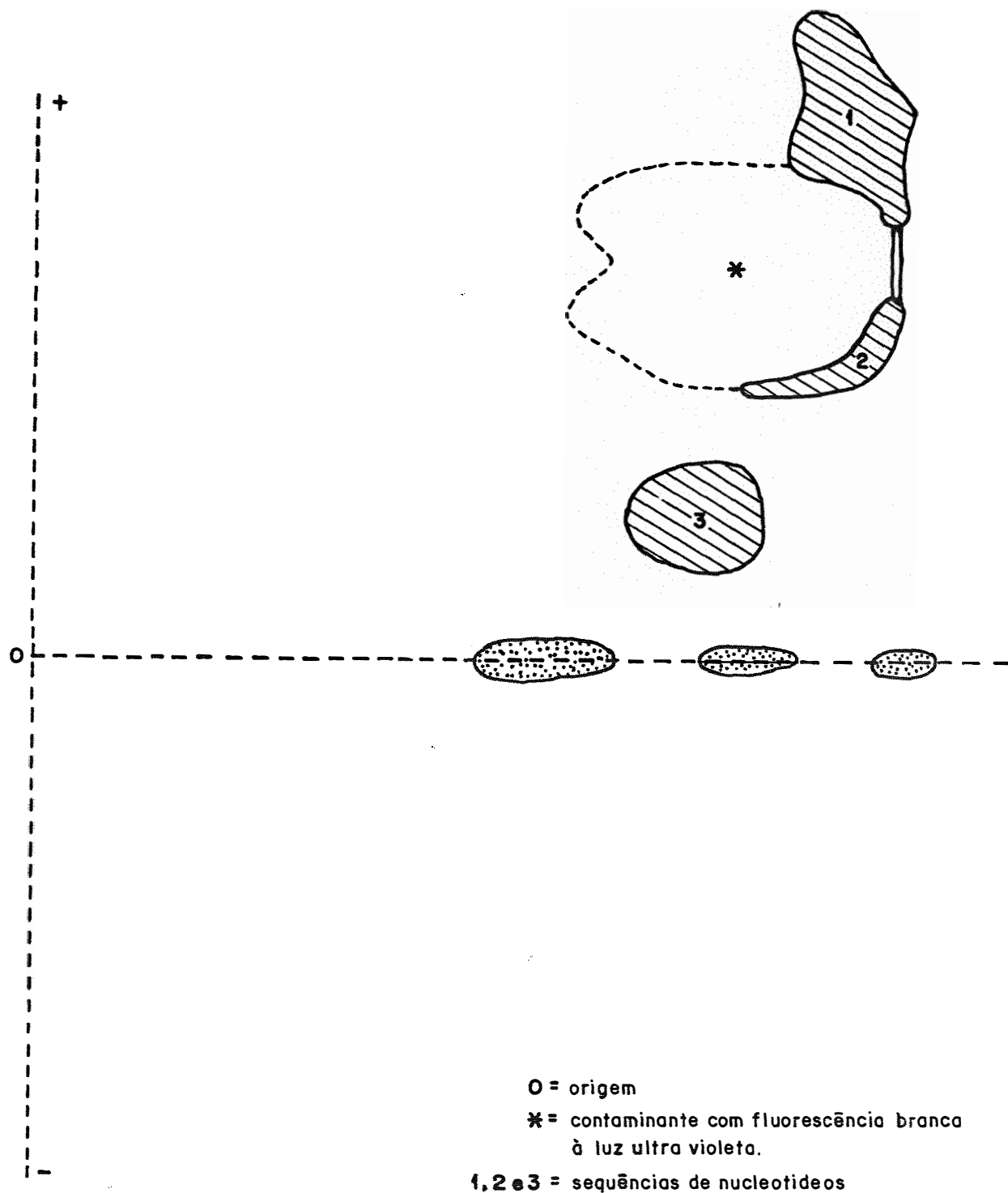


Figura 12. "Finger-print" do DsGV tratado com Bsp RI em papel Whatman 3MM.

O exame dos "Finger-print" revelou que as amostras, tanto eletroforizadas como cromatografadas em papel, apresentaram em maior ou menor intensidade, mobilidade influenciada por contaminantes de natureza não determinada, ou seja, manchas brancas à UV.

#### 4.8. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS DO AgNPV E DO DsGV

Os cristais do AgNPV e do DsGV foram submetidos à eletroforese em gel de SDS e poliacrilamida para a análise das suas proteínas.

Na Figura 13 encontra-se esquematizado perfis eletroforéticos das proteínas dos cristais do AgNPV e do DsGV. Na Figura 14 encontra-se fotografias dos 2 perfis.

Foram detectadas 22 "bandas" polipeptídicas diferentes para o AgNPV e 18 "bandas" polipeptídicas para o DsGV e determinados os respectivos pesos moleculares. (Figura 13).



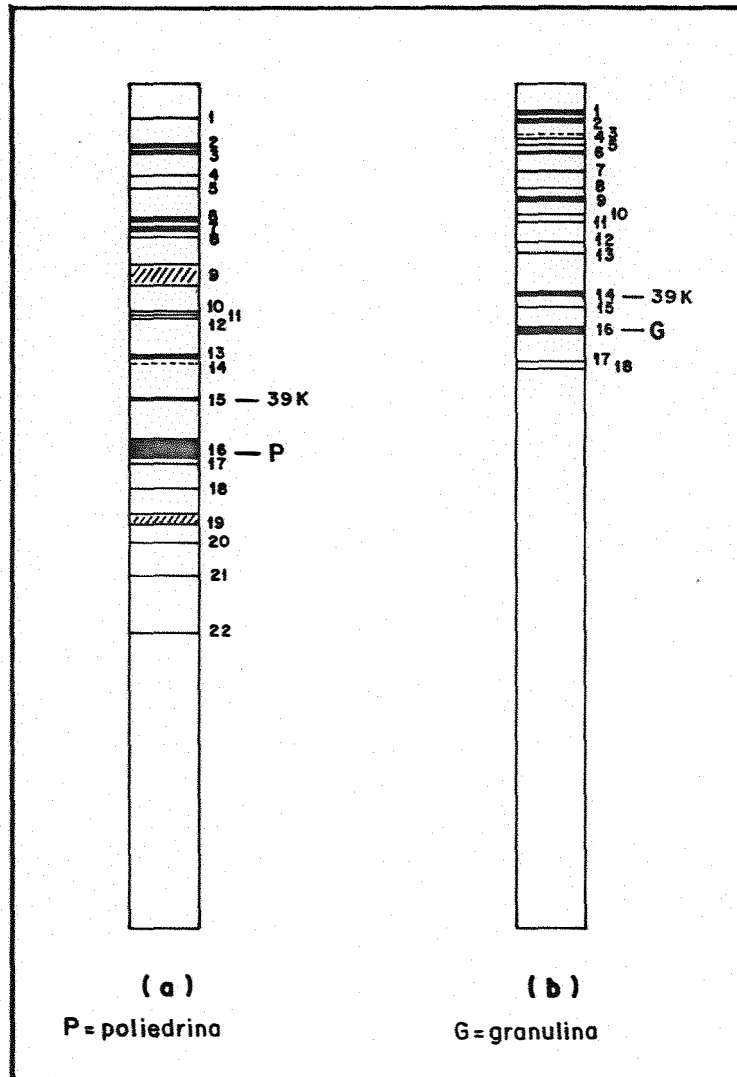
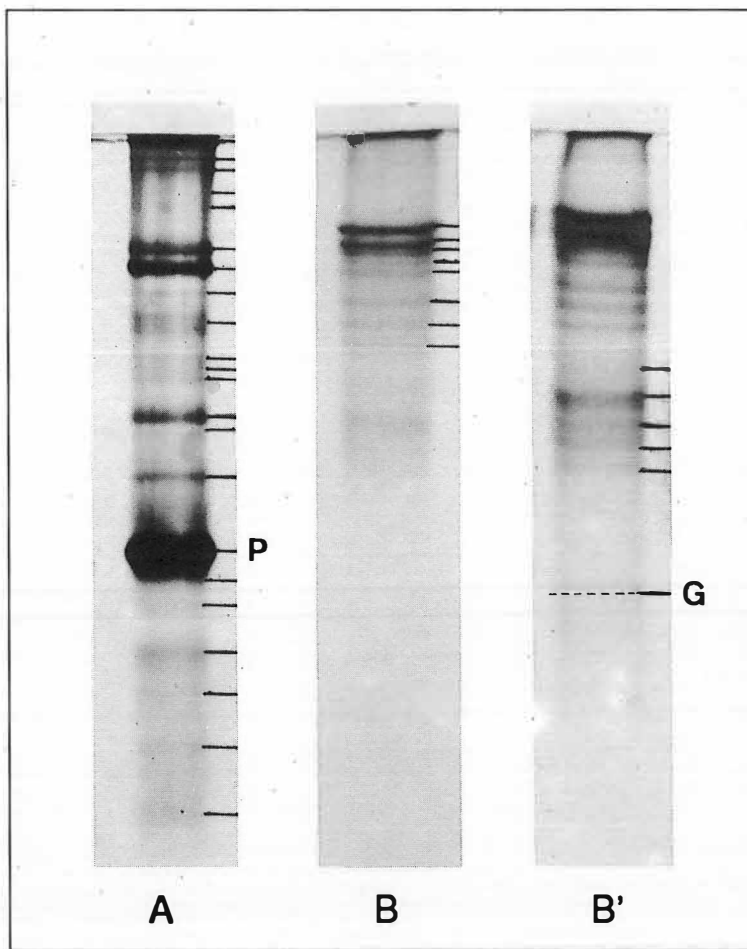


Figura 13 - Esquema padrão dos perfis eletroforéticos das proteínas dos cristais do AgNPV(a) e do DsGV(b).



**Figura 14** - Perfis eletroforéticos das proteínas dos cristais do AgNPV (A) e do DsGV (B e B'). Em B, com menor concentração da amostra, bandas superiores mais nítidas. Em B', com maior concentração da amostra, bandas inferiores mais nítidas. P = poliedrina, G = granulina.

#### 4.9. DETERMINAÇÃO DOS PESOS MOLECULARES DAS PROTEÍNAS DO AgNPV E DO DsGV

Para a determinação dos pesos moleculares das proteínas dos cristais do AgNPV e do DsGV foi utilizado o método de IIZUKA & FAUST (1982) já mencionado para os ácidos nucleicos (4.5). Nas Tabelas 3, 4 e 5 encontram-se os valores dos pesos moleculares das referidas proteínas.

Tabela 3 - Determinação dos valores de a e b da equação  $y=a-bx$  (Ítem 3.5) a partir dos pesos moleculares das proteínas padrões (Ítem 3.8) para os cálculos dos pesos moleculares das proteínas do AgNPV e do DsgV.

Bandas	dist (mm)	(MR + 1)	$\log_e(MR+1)(x)$	PM(D)	$\log_{10}PM(y)$
1	25,5	1,4679	0,3838	66000	4,8195
2	36,0	1,6605	0,5071	45000	4,6532
3	38,5	1,7064	0,5344	34700	4,5403
4*	54,5	2	0,6931	24000	4,3802
5	65,0	2,1927	0,7851	18400	4,2648
6	69,0	2,2660	0,8180	13700	4,1367

equação da reta:  $y = a-bx$ ;  $a = 5,3611$ ;  $b = 1,4541$ ;  $r = 98,99\%$ ; reta que correlaciona os valores dos pesos moleculares das proteínas padrões com as mobilidades relativas na eletroforese.

\* banda referencial

Tabela 4. Determinação dos pesos moleculares (PM) das proteínas dos cristais do AgNPV  
 MR = mobilidade relativa.

Bandas	dist (mm)	(MR + 1)	log <sub>e</sub> (MR+1)(x)	log <sub>10</sub> PM(y)	PM(D)
1	4,5	1,0796	0,0766	5,2598	181886
2	8,0	1,1416	0,1324	5,1783	150765
3	9,0	1,1593	0,1478	5,1558	143153
4	12,0	1,2124	0,1926	5,0904	123140
5	13,5	1,2390	0,2143	5,0587	114472
6	17,5	1,3097	0,2698	4,9776	94973
7	18,5	1,3274	0,2832	4,9581	90803
8	20,0	1,3540	0,3031	4,9290	84918
9	24,5	1,4336	0,3602	4,8456	70081
10	29,5	1,5221	0,4201	4,7581	57293
11	30,0	1,5310	0,4259	4,7496	56182
12	30,5	1,5398	0,4317	4,7412	55106
13	35,5	1,6283	0,4875	4,6597	45677
14	36,5	1,6460	0,4983	4,6439	44045
15*	41,0	1,7257	0,5456	4,5748	37566
16**	47,5	1,8407	0,6101	4,4806	30241
17	49,0	1,8673	0,6245	4,4596	28814
18	52,5	1,9292	0,6571	4,4120	25823
19***	56,5	2	0,6931	4,3594	22877
20	59,5	2,0530	0,7193	4,3211	20946
21	64,0	2,1327	0,7574	4,2655	18429
22	71,5	2,2655	0,8178	4,1772	15038

\* proteína 39K

\*\*poliedrina

\*\*\*banda referencial

Tabela 5. Determinação dos pesos moleculares (PM) das proteínas dos cristais do DsGV  
 MR = mobilidade relativa.

Bandas	dist (mm)	(MR + 1)	$\log_e(MR+1)(x)$	$\log_{10} PM(y)$	PM(D)
1	4,0	1,1081	0,1026	5,2219	166686
2	5,0	1,3151	0,1267	5,1867	153709
3	6,5	1,1757	0,1619	5,1352	136521
4	7,0	1,1892	0,1733	5,1186	131401
5	8,0	1,2162	0,1957	5,0859	121870
6	9,0	1,2432	0,2177	5,0537	113161
7	11,5	1,3108	0,2706	4,9765	94732
8	12,5	1,3378	0,2910	4,9467	88450
9	15,0	1,4054	0,3403	4,8747	74937
10	17,0	1,4595	0,3781	4,8195	65993
11	18,0	1,4865	0,3964	4,7927	62044
12	20,5	1,5541	0,4409	4,7277	53419
13	22,0	1,5946	0,4666	4,6902	49000
14*	27,5	1,7432	0,5557	4,5600	36307
15	29,0	1,7838	0,5787	4,5265	33162
16**	32	1,8649	0,6232	4,4615	28940
17	36	1,9730	0,6796	4,3791	23938
18***	37	2	0,6931	4,3594	22877

\* proteína 39K  
 \*\* granulina  
 \*\*\* banda referencial

## 5. DISCUSSÃO

As primeiras metodologias de extração dos DNAs dos baculovírus estudados mostraram-se pouco convenientes, revelando através da eletroforese em gel de agarose, que os mesmos haviam sofrido degradação, razão pela qual todo ácido nucleico era encontrado em regiões distantes das canaletas do gel.

Por esse motivo, diversas metodologias foram pesquisadas visando obter maior eficiência e melhor preservação dos DNAs virais a partir de poliedros e de grânulos. Ao final, foi adotado a metodologia constante na Figura 5, que constou da eliminação do tratamento alcalino, duplicação da concentração da enzima pronase, precipitação controlada com etanol, alteração do tempo de incubação e enrolamento do ácido nucleico em bastonete de vidro.

Com esta metodologia, foi possível obter diversas preparações de ácidos nucleicos com curvas de densidade óptica características de DNA com valores de  $R = 260_{\text{nm}}/280_{\text{nm}}$  ao redor de 1,8. As preparações obtidas com o método 5 apre-

sentaram bandas de DNA muito próximas da canaleta, revelando assim fragmentos de ácidos nucleicos de peso molecular relativamente grande.

A razão pela qual o método de enrolamento das fitas de DNA do vírus da granulose não foi tão satisfatório como o DNA do vírus da poliedrose nuclear, não é bem conhecida, contudo é possível que as preparações do DsGV apresentassem algum contaminante indesejável ou maior intensidade de clivagem do DNA natural.

As razões entre as D.O. a 260 e 280 nm dos ácidos nucleicos indicaram que as extrações foram melhoradas no decorrer das pesquisas sistemáticas sobre a metodologia a ser selecionada para obtenção dos DNAs virais (Tabela 1).

Diversas preparações revelaram que o fenol utilizado para a desnaturação das proteínas permanecia como contaminante do ácido nucleico (Figura 6b). Uma vez constatado ao espectrofotômetro a presença do fenol, a preparação era submetida a tratamentos com diálise ou precipitações com etanol 95% ou tratamento com éter saturado de água-clorofórmio ou tratamento com éter saturado de água e etanol. Este cuidado se fez necessário para que o ácido nucleico pudesse ser digerido pelas enzimas de restrição, caso contrário as endonucleases de restrição seriam inibidas ou degradadas pelo fenol, sem produzir a clivagem desejada.



A análise da Figura 7 vem revelar os resultados dos tratamentos do AgNPV com as enzimas de restrição.

A - Enzimas de restrição que estabeleceram grandes diferenças entre os ácidos nucleicos virais estudados:

- 1 - Eco RI (Figura 7c)
- 2 - Bsp RI (Figura 7b)
- 3 - Pst I (Figura 7i)

B - Enzimas de restrição que produziram perfis com pequenas diferenças entre os ácidos nucleicos virais estudados:

- 1 - Bam HI (Figura 7d)
- 2 - Sal I (Figura 7g)

C - Enzimas de restrição que não revelaram perfis diferentes entre os ácidos nucleicos virais estudados:

- 1 - Ava I (Figura 7a)
- 2 - Hind III (Figura 7e)
- 3 - Hpn I (Figura 7f)
- 4 - Sma I (Figura 7h)

A Figura 10, de certo modo, vem confirmar os resultados da Tabela 1 que, por sua vez, indicou o progresso ocorrido na pesquisa das diversas metodologias de extração dos DNAs.

As Figuras 10B e 10C apresentam um DNA de peso molecular da ordem de 1 a  $3 \times 10^6$  D, tamanho este suficientemente pequeno, explicando a grande distância dos ácidos nucleicos em relação as canaletas do gel, obtidas nas primeiras extrações do DNA com fenol/etanol.

A Figura 10D apresenta um peso molecular da ordem de  $6 \times 10^6$  D que corresponde, talvez, a um fragmento de DNA situado logo acima da banda 1 do DNA clivado com Eco RI (Tabela 2 e Figura 9).

Em relação a Figura 10E pode-se dizer que ela ilustra um DNA de peso molecular um pouco menor que o fragmento 1 do DNA do bacteriófago  $\lambda$  obtido pela clivagem com a endonuclease de restrição Hind III, que foi utilizada como padrão para determinação dos pesos moleculares (Tabela 2 e Figura 9).

A Figura 10A ilustra o tamanho dos maiores fragmentos de ácidos nucleicos obtidos com a metodologia 5 (Figura 5) ou seja, DNA com peso molecular na faixa de 20 a  $30 \times 10^6$  D (Tabela 2 e Figura 9).

A partir dos resultados obtidos com a análise da Figura 7, foram escolhidas as enzimas de restrição Eco RI para clivar o DNA do AgNPV e Bsp RI para clivar o DNA do DsGV

as quais proporcionaram um perfil com bandas razoavelmente distanciadas entre si facilitando, desta maneira, os cálculos para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos de restrição.

Pode-se observar que as 5 sequências de Eco RI com terminais coesivos ( $\begin{matrix} \downarrow \\ \text{GAATCC} \\ \text{CTTAA} \end{matrix}$ ) localizadas no DNA do AgNPV, parecem se situar mais ou menos equidistantes à semelhança do que acontece com as 3 sequências alvos de Bsp RI com terminais abruptos ( $\begin{matrix} \text{GGCC} \\ \text{CCGG} \end{matrix}$ ), quando se analisa os valores da coluna 4 da Tabela 2 para a clivagem do AgNPV com Eco RI e para o DsGV com Bsp RI.

Em relação aos resultados obtidos com os ácidos nucleicos através da técnica de "Finger-print" (Figuras 11 e 12) pode-se dizer que foi possível detectar diferenças entre os DNAs dos baculovírus AgNPV e DsGV, contudo, a metodologia proposta por RUSHIZKY & KNIGHT (1960) precisa ser melhor estudada, a fim de que seu potencial de discriminação entre ácidos nucleicos de diversas espécies de baculovírus possa ser ampliado.

A comparação entre os pesos moleculares das proteínas do DsGV e AcNPV com AgNPV, como referencial, dão uma indicação de parentesco maior entre os NPVs. Na comparação entre AgNPV e AcNPV foram encontradas 13 proteínas homólogas e 9 heterólogas, enquanto que entre AgNPV e DsGV foram encontradas 10 proteínas homólogas e 8 heterólogas (Tabela 6). Adotou-se como critério que as diferenças maiores que 5% entre

os pesos moleculares das proteínas seriam classificadas como proteínas heterólogas. Assim, confrontando o número de proteínas do DsGV e AcNPV considerado heterólogas nota-se que o DsGV tem 44,4% de heterologia em relação ao AgNPV, enquanto o número de proteínas heterólogas do AgNPV em relação ao AcNPV é pouco menor, isto é, 40,9%.

É possível que as diferenças entre o DsGV e o AgNPV sejam maiores que as entre os dois NPVs, contudo para maior esclarecimento, o perfil eletroforético, que reflete o tamanho ou os pesos moleculares das proteínas, precisaria de um estudo bem mais sistemático. A pequena diferença percentual entre as proteínas heterólogas do DsGV e AgNPV, quando confrontadas com as do AcNPV e AgNPV, num estudo mais rigoroso poderá ser maior e mais significativa. Aliás, proteínas com idênticos pesos moleculares podem ser realmente diferentes, e de outro lado, as indicações da filogenia entre os baculovírus tem revelado maiores divergências evolutivas entre os GVs e NPVs do que entre os NPVs de diversas espécies de insetos. AcMNPV, AgMNPV, SfMNPV, SeMNPV, OpMNPV, PdMNPV, HaMNPV, PsMNPV, MbMNPV, TnSNPV, HzSNPV, PiSNPV, TnGV, SfGV, HaGV, PiGV (série proposta por COCHRAN et alii, 1986) em graus decrescentes de homologia).

Provavelmente no perfil eletroforético das proteínas do AgNPV tal como acontece com o AcNPV (RODRIGUES, 1989) as bandas polipeptídicas de nºs 15 e 16 do AgNPV (Figura 13a; Tabela 4) poderiam representar as proteínas 39K e poliedrina

respectivamente transcritas e traduzidas ativamente, situadas entre 0-5  $\mu\text{m}$ , 20-24  $\mu\text{m}$  e 88 a 90  $\mu\text{m}$  no genoma, respectivamente (Figura 15). Em relação ao DsGV as bandas polipeptídicas de nºs 14 e 16 (Figura 13b; Tabela 5) poderiam representar as proteínas 39K e granulina respectivamente. Não se sabe, contudo, porque não foi encontrada a proteína p-10 (Figura 15).

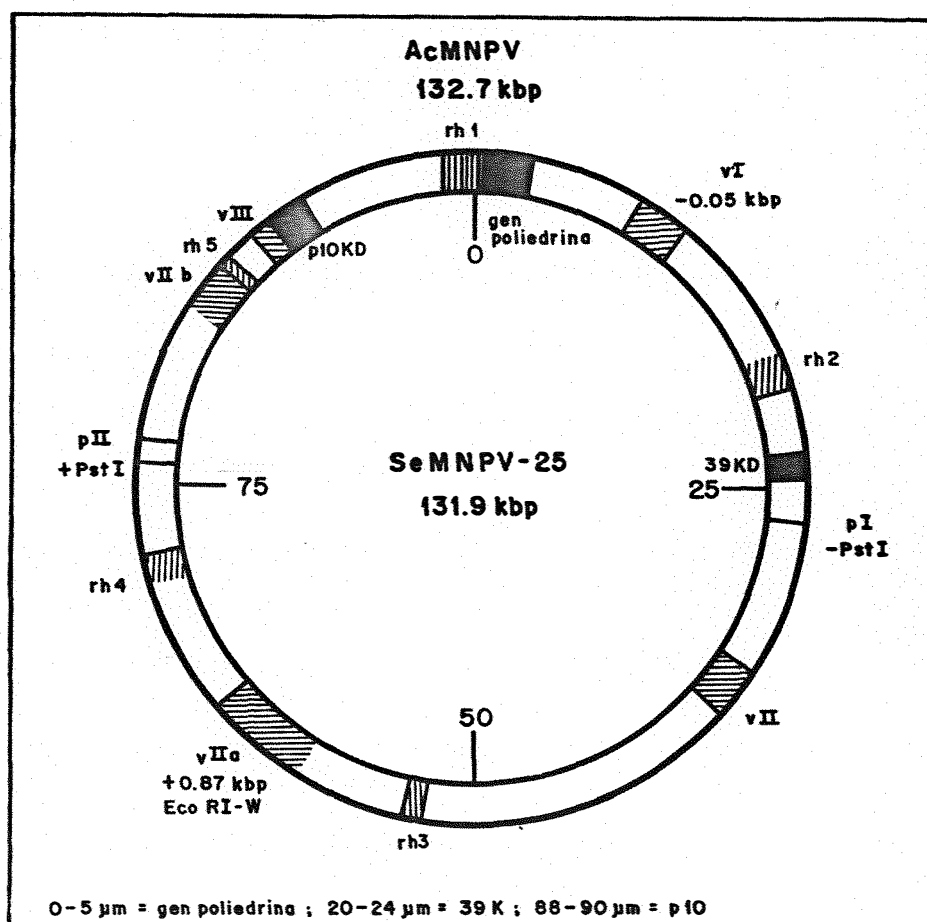


Figura 15 - Mapa físico dos DNAs de AcMNPV e SeMNPV-25. Círculo interno, SeMNPV-25; círculo externo AcMNPV-E<sub>2</sub>. São indicadas as regiões homólogas (rh 1,2,3,4,5) e as regiões heterólogas (vI, vII, vIIa, vIIb e vIII), localização dos gens da poliedrina, 39K e p-10 (COCHRAN et alii, 1986, modificado).

Tabela 6 - Pesos moleculares das proteínas do AgNPV (D) comparados com os pesos moleculares do NPV de *Autographa californica* (AcNPV) e com os pesos moleculares do DsGV.

DsGV		AgNPV		AcNPV <sup>1</sup>		
Prot. He <sup>2</sup>	Prot. Ho <sup>3</sup>	$\Delta\%$ <sup>4</sup>	Prot.	$\Delta\%$	Prot. Ho <sup>3</sup>	Prot. Ho <sup>2</sup>
166.683		8,0	181.886	-	-	-
	153.709	2,0	150.764	-	-	-
	136.521	5,0	143.152	-	-	-
131.401	121.870	1,0	123.140	-	-	-
	113.161	1,0	114.472	-	-	-
	94.732	0,9	94.973	-	-	-
	88.450	3,0	90.803	-	-	-
79.937	-	12,0	84.918	2,0	82.000	
65.993	-	6,0	70.081	1,0	70.700	74.000
62.044	-	8,0	57.293	5,0	60.300	63.700
	-		56.182	3,0	57.700	
	53.419	3,0	55.106	2,0	54.300	
49.000	-	7,0	45.667	8,0	-	52.000
	-		44.045	2,0	43.000	49.300
	36.307	3,0	37.566	1,0	37.300	47.200
33.612	28.940	4,0	30.241	3,0	31.300	41.200
23.938	-	7,0	28.814	2,0	29.500	
	-		25.823	3,0	25.000	
	22.877	0,0	22.877	3,0	22.200	23.300
			20.946	5,0	20.000	
			18.429	3,0	19.000	
			15.038	8,0	-	16.800
						16.200

<sup>1</sup> Pesos moleculares do AcNPV (RODRIGUES, 1989).

<sup>2</sup> Prot. He = proteína heteróloga em relação à proteína do AgNPV.

<sup>3</sup> Prot. Ho = proteína homóloga em relação à proteína do AgNPV.

<sup>4</sup>  $\Delta\%$  = diferença em porcentagem entre o peso molecular do DsGV ou AcNPV em relação à proteína do AgNPV.

A expectativa das grandes diferenças na composição dos DNAs e proteínas do AgNPV e DsGV estudados neste trabalho viu-se fundamentada pela consideração da árvore filogenética.

Pela filogenia de ROHRMANN (1986) acredita-se que as poliedroses nuclear seguiram caminhos evolutivos divergentes durante a evolução e portanto já devem ter ácidos nucleicos e proteínas com consideráveis diferenças (Figuras 16, 17 e 17'). Nas Figuras 17 e 17' podemos notar as diferenças e semelhanças entre as seqüências de aminoácidos em alinhamento na síntese de poliedrina de baculovírus de espécies diferentes.

Pode-se observar da literatura que de acordo com a morfologia dos baculovírus, eles já estão separados em subgrupos A, B e C (BILIMORIA, 1986).

O confronto do que foi obtido através da eletroforese com as proteínas e que tem sido apresentado na literatura científica, sugere alguns comentários sobre a multiplicação, tradução e até sobre a transcrição dos DNA virais (COCHRAN et alii, 1986).

Em primeiro lugar deve-se lembrar, que o material inicial dos dois baculovírus eram cristais, portanto, os vírus de uma maneira geral já estavam maduros e imersos na matriz de poliedrinas ou de granulinas. Evidentemente, contaminações diversas dos cristais poderiam ocorrer, contudo, essas contaminações foram reduzidas pelas manipulações durante a

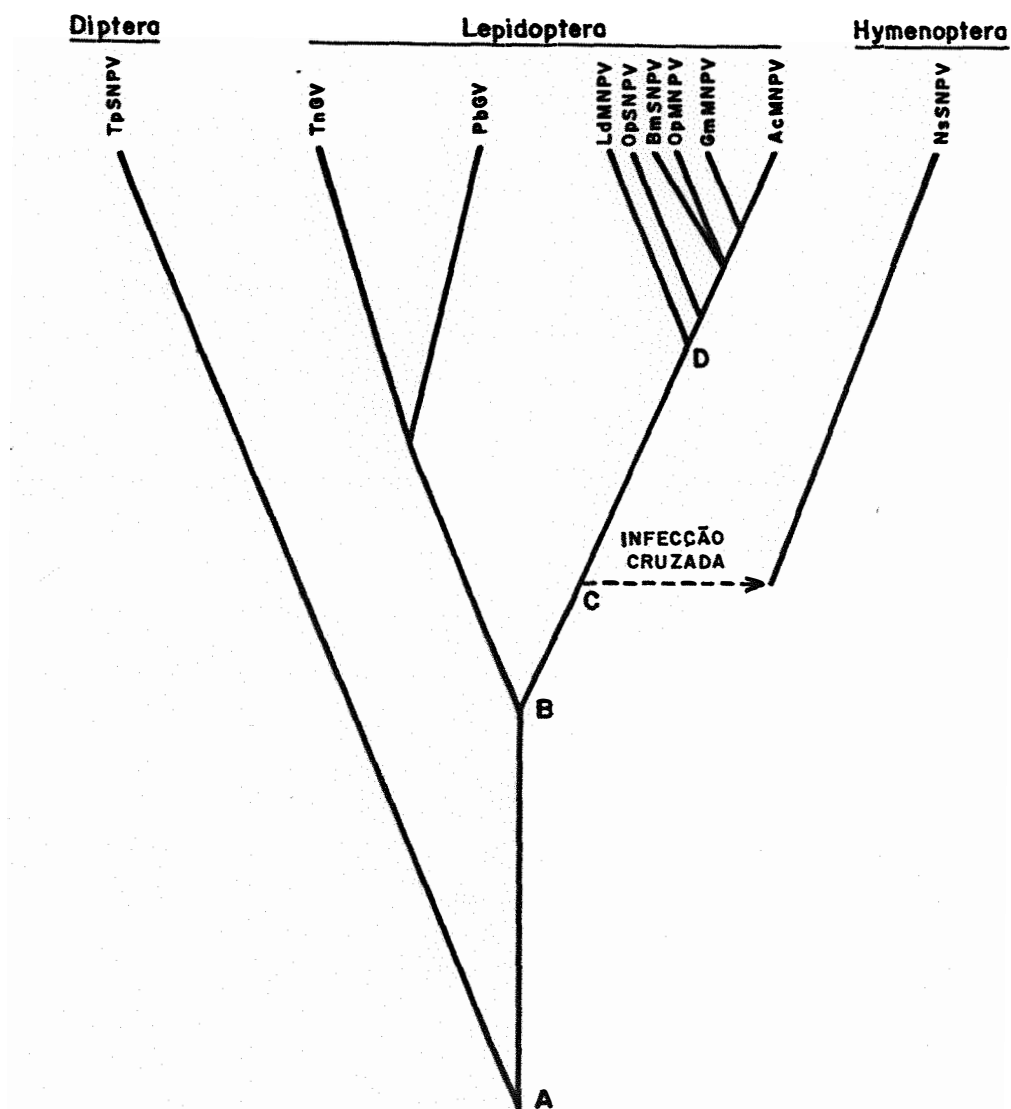


Figura 16 - Árvore filogenética das espécies de *Baculovirus* (ROHRMANN, 1986).







extração do DNA, de tal sorte, que sua baixa concentração nas amostras não viriam comprometer os resultados e conclusões deste trabalho.

Trabalhando com poliedros ou grânulos os resultados com proteínas devem refletir a composição dos capsídios e das subunidades da matriz. De um modo geral, não se espera quantidades significativas de proteínas, DNAs, m-RNA, do hospedeiro. Por outro lado, sabe-se que em geral os NPVs e GVs apresentam variações temporais na expressão fenotípica de m-RNA e proteínas, processos esses que na maioria dos casos devem contribuir pouco para os resultados da presente tese, ao menos ao nível dos estudos realizados. Contudo, não se pode esquecer que os genes das poliedrinas e granulinas tem uma atividade de expressão maior que os demais genes dos baculovirus (COCHRAN et alii, 1986) e por isso suas proteínas são relativamente fáceis de serem detectadas em eletroforese gel de poliacrilamida, embora sua alta produção seja realizada pela expressão do gen em período anterior à formação dos cristais. Acredita-se que o gen da proteína p-10 esteja envolvido juntamente com o gen da poliedrina no processo de formação dos poliedros e que estão situados próximos de regiões homólogas e variáveis do genoma (Figura 15).

Embora as diferenças encontradas entre DsGV e AgNPV não sejam muito grandes, elas apresentam uma razoável importância entre os baculovirus quando se considera que os mesmos pertencem a um grupo homogêneo. As pequenas diferenças

encontradas entre os baculovirus estudados podem ser suficientes para discriminá-los em 2 subgrupos, quando observamos a série homóloga de *Baculovirus* proposta por COCHRAN et alii (1986).

## 6. CONCLUSÕES

1. Concluiu-se que o método 5 foi o mais adequado para os objetivos do trabalho, sendo portanto o menos drástico em termos de quebra dos ácidos nucleicos e o mais eficiente em termos de quantidade de material extraído.

2. Os ácidos nucleicos utilizados na clivagem com enzimas de restrição apresentaram um valor de  $R_{260nm/280nm}$  ao redor de 1,8, constituindo-se em substrato adequado para a ação das endonucleases de restrição.

3. Dos experimentos realizados através da eletroforese em agarose dos ácidos nucleicos do AgNPV e do DsGV, os tratamentos com Eco RI e Bsp RI permitiram discriminar diferenças entre os ácidos nucleicos dos citados baculovírus.

4. A técnica de "Finger-print", embora pouco trabalhada, revelou um certo potencial de discriminação dos ácidos nucleicos, razão pela qual pesquisas mais aprofundadas

sobre esta metodologia poderão torná-la útil as pesquisas com ácidos nucleicos dos mais diversos vírus.

5. Análises dos perfis eletroforéticos em agarose revelaram que a partir de fragmentos com pesos moleculares ao redor de  $30 \times 10^6$  D (AgNPV) e  $11 \times 10^6$  D (DsGV) foi possível ter uma idéia da distribuição das sequências alvos das enzimas de restrição utilizadas nos experimentos.

6. A comparação dos perfis eletroforéticos das proteínas dos nucleocapsídeos, poliedrinas e granulinas dos baculovírus AgNPV e DsGV, a despeito de algumas diferenças, sugere a existência de proteínas comuns traduzidas de mRNA transcritas em regiões homólogas dos DNAs.

7. Entre as proteínas do AgNPV foram encontradas a poliedrina e a proteína 39K, que são produzidas em grande quantidade graças a expressão de 2 genes ativos. No perfil do DsGV foram encontradas a granulina e a proteína 39K. A proteína não foi observada nos perfis eletroforéticos obtidos nas condições dos experimentos realizados.

8. Comparações dos perfis eletroforéticos das proteínas do AgNPV e DsGV evidenciaram menor parentesco entre

eles do que entre AgNPV e AcNPV, o que confirma certo grau de divergência assinalada na árvore filogenética de ROHRMANN (1986).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, G.E. & KNELL, J.D. A nuclear polyhedrosis virus of *An-ticarsia gemmatalis*. I. ultrastructure, replication and pathogenicity. Florida Entomologist, Winter Haven, 60 (3): 233-40, 1977.
- ALMEIDA, L.C.; BOTELHO, P.S.M.; PAVAN, O.H.O. Avaliação do vírus da granulose para o controle da broca da cana-de-açúcar. In: ALVES, S.B., ed. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986. p.203-9.
- ALVES, S.B. Vírus entomopatogênicos. In: \_\_\_\_\_, coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986. p. 171-87.
- BILIMORIA, S.L. Taxonomy and identification of baculovirus. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., ed. The biology of baculoviruses; biological properties and molecular biology. Boca Raton, CRC, 1986. v.1, p.37-59.
- BLUM, H.; HILDBURG, B.; CROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrilamid gels. Electrophoresis, Weinheim, 8: 93-9, 1987.



- BRADLEY, D.E. Replica and shadowing techniques. In: KAY, D., ed. Techniques for electron microscopy. 2.ed., Oxford, Blackwell. Scientific, 1967. p.96-152.
- BRENNER, S. & HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, 34: 103, 1959.
- BROWN, M.; CRAWFORD, A.M.; FAULKNER, P. Genetic analysis of a baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. I. Isolation of temperature-sensitive mutants and assortment into complementation groups. Journal of Virology, Washington, 45(3): 961-70, 1979.
- BUJARD, H. Electron microscopy of single stranded DNA. Journal of Molecular Biology, London. 49: 125-37, 1970.
- BURGES, H.D. Safety, safety and quality control of microbial pesticides. In: BURGES, H.D., ed. Microbial control of pests and plant diseases; 1970-1980. New York, Academic Press, 1981. p.737-67.
- BURGES, H.D.; CROIZIER, G.; HUBER, J. A review of safety tests on baculovirus. Entomophaga, Paris, 25(4): 329-40, 1980a.
- BURGES, H.D.; HUBER, J.; CROIZIER, G. Guidelines for safety tests on insect viruses. Entomophaga, Paris, 25(4): 341-8, 1980b.
- CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; MATHEW, K.M. Pulsed-field gel electrophoresis of very large DNA molecules. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, Palo Alto, 17: 287-304, 1988.

- CARSTENS, E.B. Identification and nucleotide sequence of the regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome carrying insertion elements derived from *Spodoptera frugiperda*. Virology, San Diego, 161: 8-17, 1987.
- CHANG, M.T.; LANNER-HERRERA, C.; FIKES, M. Nucleotide sequence of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. Journal of Invertebrate Pathology, San Diego, 53: 241-6, 1989.
- COCHRAN, M.A.; BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L. Organization and expression of the baculovirus genome. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., ed. The biology of baculoviruses; biological properties and molecular biology. Boca Raton, CRC, 1986. v.1, p.239-58.
- DOELLER, G.; MATTHAEUS, W.; FLEHMIG, B.; LORENZ, R.J. Non-immunological interactions between baculovirus antigen and human immuno globulins. Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie, Hamburg, 95(4): 379-89, 1983.
- FREIFELDER, D. Molecular weights of coliphages and coliphage DNA. Journal of Molecular Biology, London, 54: 567-77, 1970.
- GATTI, I.M.; SILVA, D.M.; CORSO, I.C. Polyhedrosis occurrence in caterpillars of *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818) in the south of Brazil. IRCS Medical Science. Ser. Cell Membrane Biological; Environmental, Essex, 5: 136, 1977.
- GINNS, E.I.; REHAVI, M.; MARTIN, B.M.; WELLER, M.; O'MALLEY, K.L.; LAM ARCA, M.E.; MCALLISTER, C.G.; PAUL, S.M. Expression of human tyrosine hydroxylase complementary DNA in invertebrate cells using a baculovirus vector. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, 263(15): 7406-10, 1988.

- GONZALES, M.A.; SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D. Insertion of the SfMNPV polyhedrin gene into a AcMNPV polyhedrin deletion mutant during viral infection. Virology, San Diego, 170: 160-75, 1989.
- GRULA, M.A.; BULLER, P.L.; WEAVER, R.F. Alpha-amanitin resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus - infected *Heliothis zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. Journal of Virology, Washington, 38: 916-20, 1981.
- GUARINO, L.A.; GONZALES, M.A.; SUMMERS, M.D. Complete sequence and enhancer function of the homologous DNA regions of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Journal of Virology, Washington, 60(1): 224-9, 1986.
- HAMES, B.D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B.D. & RICKWOOD, D., ed. Gel electrophoresis of proteins; a practical approach. Oxford, IRL Press, 1982. cap. 1. p.2-91.
- HEIMPEL, A.M. Microbial control of insects. World Review of Pest Control, Cambridge, 4: 150-61, 1965.
- HELLING, R.B.; GOODMAN, H.M.; BOYER, H.W. Analysis of endonuclease R.Eco RI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. Journal of Virology, Washington, 14(5): 1235-44, 1974.
- HINK, W.F. & VAIL, P.V. A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper (TN-368) cell line. Journal of Invertebrate Pathology, San Diego, 22: 168-75, 1973.

- HUBER, J. Use of baculoviruses in pest management programs. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., ed. The biology of baculoviruses; biological properties and molecular biology. Boca Raton, CRC, v.2, p.181-263.
- IATROU, K.; ITO, K.; WITKIEWICZ, H. Polyhedrin gene of *Bombux mori* nuclear polyhedrosis virus. Journal of Virology, Washington, 54(2): 436-45, 1985.
- IGNOFFO, C.M. Entomopathogens as insecticides. Environmental Letters, New York, 8: 23-40, 1965.
- IIZUKA, T. & FAUST, R.M. Detection and characterization of naturally occurring plasmids in *Bacillus cereus* isolates by agarose gel electrophoresis. Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University, Hokkaido, 50(4): 263-74, 1982.
- JEWELL, J.E. & MILLER, L.K. DNA sequence homology relationships among six lepidopteran nuclear polyhedrosis viruses. Journal of General Virology, Reading, 46: 161-70, 1980.
- JOHNSON, D.W. & MARUNIAK, J.E. Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus AgMNPV - 2DNA. Journal of General Virology, Reading, 70(7): 1877-88, 1989.
- KAWANISHI, C.Y.; HUANG, Y.S.; HUANG, C.H. Evidence for baculovirus replication in cultured vertebrate cells. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 82., Atlanta, 1982. Abstracts. Apud Abstracts of Entomology, Philadelphia, 13(10): A11, 1982.
- KELLY, D.C. The DNA contained by nuclear polyhedrosis viruses isolated from four *Spodoptera* sp. (Lepidoptera, Noctuidae): genome size and homology assessed by DNA reassociation kinetics. Virology, San Diego, 76: 468-73, 1977.

- KISLEV, N. & EDELMAN, M. DNA restriction pattern differences from geographic isolates of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. Virology, San Diego, 119: 219-22, 1982.
- KNUDSON, D.L. & TINSLEY, T.W. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell line of *Spodoptera frugiperda*: partial characterization of the DNA, comparative DNA-DNA hybridization, and patterns of DNA synthesis. Virology, San Diego, 87: 42-50, 1978.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, London. 227: 680-5, 1970.
- LOH, L.C.; HAMM, J.J.; HUANG, E.S. *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome: physical maps for restriction endonucleases Bam HI and Hind III. Journal of Virology, Washington, 38: 922-31, 1981.
- LUBBERT, H. & DOERFLER, W. Transcription of overlapping sets of RNAs from the genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a novel method of mapping RNAs. Journal of Virology, San Diego, 52(1): 255-65, 1984.
- LUCKOW, V.A.; SUMMERS, M.D. High level expression of non-fused foreign genes with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. Virology, San Diego, 170: 31-9, 1989.
- MAEDA, S. Expression of foreign genes in insects using baculovirus vectors. Annual Review of Entomology, Palo Alto, 34: 351-72, 1989.

- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning; a laboratory manual. New York, CSH, 1982. 545p.
- MARUNIAK, J.E. Baculovirus structural patterns and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., ed. The biology of baculoviruses; biological properties a molecular biology. Boca Raton, CRC, 1986. v.1, p.189-98.
- MARUNIAK, J.E.; BROWN, S.E.; KNUDSON, D.L. Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. Virology, San Diego, 136: 221-34, 1984.
- MILLER, L.K. & DAWES, K.P. Physical map of the DNA genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Journal of Virology, Washington, 29: 1044-50, 1979.
- MIYAMOTO, C.; SMITH, G.E.; FARREL-TOWT, J.; CHIZZONITE, R.; SUMMERS, M.D. JU, G. Production of human C-MYC protein in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Molecular and Cellular Biology, Washington, 5(10): 2860-5, 1985.
- MOSCARDI, F. Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle da lagarta da soja, Anticarsia gemmatalis. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 1983. 21p. (EMBRAPA/CNPSo. Comunicado técnico, 23).
- MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja. In: ALVES, S.B., coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, Manole, 1986. p.187-202.
- ONGARELLI, M.G. Alterações e modo de ação das partículas do vírus da poliedrose nuclear e estudos autoradiográficos em células de *Bombyx mori* L., 1758 (Lep., Bombycidae). Piracicaba, 1979. 62p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- ONGARELLI, M.G.; SILVA, D.M.; CARVALHO, C.F. Vírus da granulose em células do mandorovã da mandioca (*Erinnys ello* L., 1758). Revista de Agricultura, Piracicaba, 55(3): 174, 1980.
- PAVAN, O.H.O. O vírus da granulose de *Diatraea saccharalis* Fabr. (broca da cana-de-açúcar). Saccharum, São Paulo, 25: 27-9, 1983.
- PAVAN, O.H.O. & BOTELHO, P.S.M. Produção de *Baculovirus* em lagartas da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA., 34., Campinas, 1982. Resumos. Ciência e Cultura, São Paulo, 34(7): 123, 1982.
- PAVAN, O.H.O.; BOUCIAS, D.G.; ALMEIDA, L.C.; GÁSPAR, J.O.; BOTELHO, P.S.M.; DEGASPARI, N. A granulosis virus of *Diatraea saccharalis* (Fabr.): I. Pathogenicity, replication and ultrastructure. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 18., Havana, 1983. Proceedings. Havana, ISSCT, 1983. v.2, t.2, p.643-59.
- PENNOCK, G.D.; SHOEMAKER, C.; MILLER, L.K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* beta galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. Molecular and Cellular Biology, Washington, 4(3): 399-406, 1984.
- ROBERTS, R.J. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. In: CHRIKJIAN, J., ed. Gene amplification and analysis. New York, Elsevier, 1987. v.5, p. 1-49.
- RODRIGUES, J.J.S. Seleção genética do vírus de poliedrose nuclear de *Autographa californica* (Baculoviridae) em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). Campinas, 1989. 94 p. (Mestrado - Universidade de Campinas).

- RODRIGUEZ, R.K. & TAIT, R.C. Recombinant DNA techniques: an introduction. Reading, Addison-Wesley, 1983. 236p.
- ROHEL, D.Z. & FAULKNER, P. Time course analysis and mapping of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts. Journal of Virology, Washington, 50(3): 739-47, 1984.
- ROHRMANN, G.F. Evolution of occluded baculoviruses. In: GRADNADOS, R.R. & FEDERICI, B.A., ed. The biology of baculoviruses; biological properties and molecular biology. Boca Raton, CRC, 1986. v.1, p.203-38.
- RUSHIZKI, G.W. & KNIGHT, C.A. An oligonucleotide-mapping procedure and its use in the study of tobacco mosaic virus nucleic acid. Virology, San Diego, 11: 236-49, 1960.
- SANGER, F.; AIR, G.M.; BARREL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A. R.; FIDDES, J.C.; HUTCHINSON III, C.A.; STOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$  x-174 DNA. Nature, London, 265: 687-95, 1977.
- SCHIMITT, A.T. Eficiência da aplicação de Baculovirus erinnyis no controle do mandarova da mandioca. Florianópolis, EMPASC, 1985. 7p. (EMPASC. Comunicado técnico, 23).
- SCHWARTZ, D.C. & CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, Cambridge, 37: 67-75, 1984.
- SHARP, P.A.; SUDGEN, B.; SAMBROOK, J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose. Biochemistry, Washington, 12: 3055-63, 1973.



- SINGH, S.P.; GUDAUSKAS, R.T.; HARPER, J.D. High resolution two-dimensional gel electrophoresis of structural proteins of baculovirus of *Autographa californica* and *Porthetria (Lymantria) dispar*. Virology, San Diego, 125: 370-88, 1983.
- SINGH, S.P.; GUDAUSKAS, R.T.; HARPER, J.D.; EDWARDS, J. Two-dimensional gel electrophoresis of basic proteins of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Journal of Invertebrate Pathology, San Diego, 45: 249-59, 1985.
- SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. DNA homology among subgroups A, B, and C baculovirus. Virology, San Diego, 37: 42-9, 1978.
- SMITH, G.E. & SUMMERS, M.D. Restriction maps of five *Autographa californica* MNPV variants, *Trichoplusia ni* MNPV, and *Galleria mellonella* MNPV DNAs with endonucleases Sma I, Kpn I, Bam HI, Sac I, Xho I and Eco RI. Journal of Virology, Washington, 30: 828-39, 1979.
- SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D.; FRASER, M.J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Molecular and Cellular Biology, Washin gton, 3(12): 2156-65, 1983.
- SMITH, G.E.; VLAR, J.M.; SUMMERS, M.D. In vivo translation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus early and late mRNAs. Journal of Virology, Washington, 44: 199-206, 1982.
- SMITH, I.R.L. & CROOK, N.E. In vivo isolation of baculovirus genotypes. Virology, San Diego, 166: 240-4, 1988.

ST ANGELO, C.; SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D.; KRUG, R.M. Two of three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors a complex in insect cells. Journal of Virology, Washington, 61(2): 361-5, 1987.

STÜBERT, D. & BUJARD, H. Electron microscopy of DNA: determination of absolute molecular weights of linear density. Molecular and General Genetics, Berlin, 154: 299-303, 1977.

SWASTIA, T.; PANIJPAN, B., SDS polyacrylamide gel electrophoresis: a simple explanation of why it works. Journal of Chemical Education, Washington, 54: 560-2, 1977.

THIEM, S.M. & MILLER, L.K. A baculovirus gene with a novel transcription pattern incodes a polypeptide with a zinc finger and a leucine zipper. Journal of Virology, Washington, 63(11): 4489-97, 1989.

TWEETEN, K.A.; BULLA Jr., L.A.; CONSIGLI, R.A. Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. Microbiological Reviews, Washington, 45(3): 379-408, 1981.

ZUIDEMA, D.; KLINGE-ROODE, E.C.; VAN LENT, J.W.N.; VLAK, J. M. Construction and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutant lacking the polyhedral envelope. Virology, San Diego, 173: 98-108, 1989.

A P E N D I C E S

APENDICE 1Soluções tampão

- a - Tampão TES - pronase
- |  |       |
|--|-------|
| tris (tris-hidroximetil-amino-metano) pH 7,8 | 0,01M |
| EDTA (etileno-diamina tetracetato disódico)  | 0,01M |
| SDS (dodecil sulfato de sódio) .....         | 0,5%  |
- b - Tampão TBS - amostra de ácidos nucleicos
- |                       |       |
|-----------------------|-------|
| tris-HCl pH 7,4 ..... | 0,05M |
| NaCl .....            | 0,15M |
- c - Tampão - endonucleases de restrição
- |                   | "low" | "medium" | "high" |
|-------------------|-------|----------|--------|
| NaCl              | -     | 50mM     | 100mM  |
| tris-HCl pH 7,5   | 10mM  | 10mM     | 50mM   |
| MgCl <sub>2</sub> | 10mM  | 10mM     | 10mM   |
| dithiothreitol    | 1mM   | 1mM      | 1mM    |
- d - Tampão TBE pH 8,0 (5x) - eletroforese de ácidos nucleicos
- |                    |      |
|--------------------|------|
| tris .....         | 0,5M |
| ácido bórico ..... | 0,5M |
| EDTA .....         | 1 mM |

APÊNDICE 2Eletroforese de proteínas

## a - Tampão da amostra

tris .....	0,124 M
SDS .....	4 %
2-mercaptoetanol .....	10 %
glicerol .....	20 %
azul de bromofenol .....	0,02 %

## b - Tampão de corrida, pH 8,3 a 8,7 (10x)

tris .....	0,25M
glicina (ácido amino acético) .....	1,92M
SDS .....	1 %

## c - Gel de solução-12%

acrilamida .....	30 %
bisacrilamida .....	0,8 %
tampão tris-HCl, pH 8,8 .....	1 M
SDS .....	20 %
água destilada	
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamida puro	
persulfato de amônio .....	1,5 %

## d - Gel de empacotamento-3,5%

acrilamida .....	30 %
bisacrilamida .....	0,8 %
tampão tris-HCl, pH 6,8 .....	1 M
SDS .....	10 %
água destilada	
TEMED puro	
persulfato de amônio .....	1,5 %