

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

CLÁUDIA REGINA DAS NEVES SAEZ

**Detecção de contaminação e a investigação da transmissão vertical do
BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*) em raças do banco de
germoplasma de bicho-da-seda da Universidade Estadual de Maringá**

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO - 2012

CLÁUDIA REGINA DAS NEVES SAEZ

Detecção de contaminação e a investigação da transmissão vertical do BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*) em raças do banco de germoplasma de bicho-da-seda da Universidade Estadual de Maringá

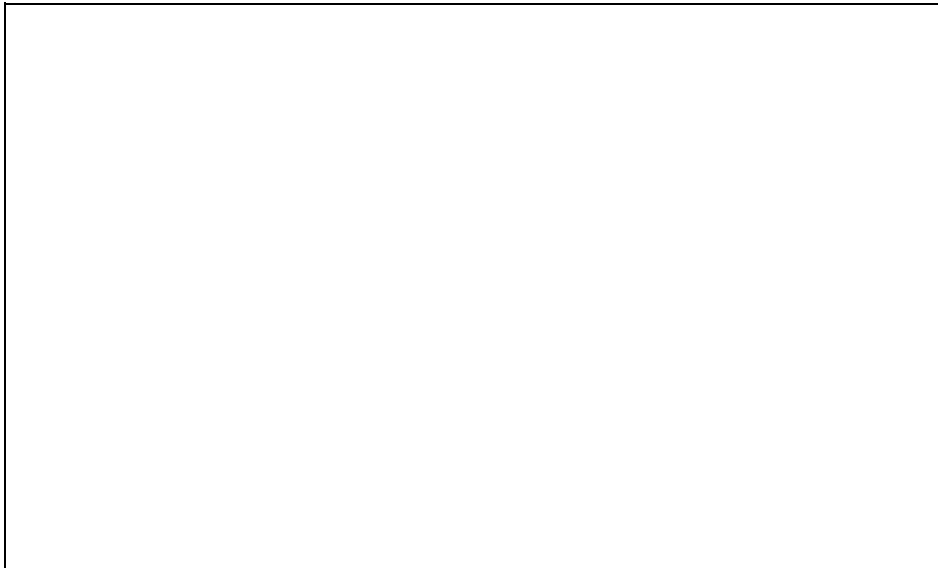
Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
MARÇO - 2012

Imprimir no verso da folha anterior

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM. Maringá, PR, Brasil)



PÁGINA DESTINADA À FOLHA DE APROVAÇÃO

À minha família.
Ao meu namorado, Paulo.
A todos os meus amigos.
Por todo o carinho que sempre recebi,
com respeito e carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, garantir força interior para superar as dificuldades e me suprir em todas as minhas necessidades.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos, que propiciou adequado desenvolvimento da pesquisa.

À minha Orientadora, professora doutora Maria Aparecida Fernandez, pela orientação, confiança e disponibilidade.

Às Coorientadoras, doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, doutora Claudete Aparecida Mangolin e doutora Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz, pela orientação e colaboração em diversas etapas deste trabalho. Em especial à doutora Roxelle, agradeço pela paciência, amizade, ajuda na condução dos experimentos, além do grande incentivo durante toda a realização do Mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo, pela preciosa e imensa ajuda na condução dos experimentos, além do constante apoio e incentivo.

À Empresa Seda e Fibras, pela cooperação internacional realizada com nosso grupo de pesquisa, pela ajuda na manutenção do banco de germoplasma de bicho-da-seda da UEM, em especial à pesquisadora Laura Beatriz Garay, por sua dedicação, amizade e troca de informações tão importantes.

À Empresa Fiação de Seda Bratac, em especial, à pessoa do Sr. José Oda, pela cooperação e fornecimento de ovos e lagartas para o desenvolvimento dos experimentos,.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CLÁUDIA REGINA DAS NEVES SAEZ, filha de Deraldo Saes Pincelli e de Vera Lúcia das Neves Saes, nasceu em 12 de novembro de 1986, na cidade de Maringá, estado do Paraná.

Em dezembro de 2000, concluiu o Ensino Fundamental, na Escola Estadual Marco Antônio Pimenta, na cidade de Maringá, estado do Paraná.

Concluiu o Ensino Médio, em dezembro de 2003, no Colégio Estadual Branca da Mota Fernandes, na cidade de Maringá, estado do Paraná.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em fevereiro de 2005, no Centro Universitário de Maringá - CESUMAR, na cidade de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Licenciatura em Ciências Biológicas em dezembro de 2008.

Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, em março de 2009, na Universidade Estadual de Maringá (UEM), cidade de Maringá, estado do Paraná, obtendo o título de Bacharel em Ciências Biológicas em dezembro de 2009.

Em março de 2010, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento (PGM), da Universidade Estadual de Maringá – UEM, em Maringá, estado do Paraná, Brasil.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. A espécie <i>Bombyx mori</i>	3
2.2. A sericicultura.....	4
2.3. O fio de seda.....	6
2.4. Doenças de <i>Bombyx mori</i> que trazem prejuízos a sericicultura.....	7
2.5. Baculovírus.....	9
2.6. <i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i> (BmNPV).....	12
2.7. A infecção por baculovírus.....	17
2.8. Formas de transmissão de BmNPV.....	19
2.9. Métodos de detecção do nucleopoliedrovírus.....	20
2.10. Aspectos genéticos de BmNPV.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. Material biológico.....	23
3.2. Extração de DNA genômico.....	23
3.3. Obtenção de DNA genômico de BmNPV.....	24
3.4. Extração de DNA de ovos de <i>Bombyx mori</i>	24
3.5. Amplificação do DNA do BmNPV.....	25
3.6. Eletroforese.....	26
3.7. Clonagem e sequenciamento.....	26
3.8. Validação dos dados.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSÃO.....	28
4.1. Identificação de raças do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá contaminadas por BmNPV.....	28
4.2. Clonagem e sequenciamento da ORF 14.....	34
4.3. Investigação da transmissão vertical de BmNPV.....	36
5. CONCLUSÕES.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Matrizes de bicho-da-seda (<i>Bombyx mori</i> L.) do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá, de acordo com a origem geográfica	23
Quadro 2 - Sequências dos primers utilizados para a amplificação da ORF 14 do BmNPV e da Actina A3, segundo Santos et al. (2010).....	25
Quadro 3 - Condições térmicas para amplificação de todos os primers utilizados...	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Bombyx mori nucleopolyhedrovirus</i> : Envelopes nucleares. Micrografia eletrônica. Brancalhão et al., 2009.	10
Figura 2 - Formas de estruturação do baculovírus. Forma envelopada do vírus <i>Budded virus</i> e forma encapsulada do vírus <i>Occlusion derived virus</i> . Viralzone, 2008.	11
Figura 3 - Diagrama do ciclo de vida do <i>Nucleopolyhedrovirus</i> em insetos da ordem Lepidoptera	14
Figura 4 - Produtos de PCR de mariposas sem contaminação pelo vírus BmNPV com os primers da ORF 14.	28
Figura 5 - Produtos de PCR multiplex de mariposas sem contaminação.	29
Figura 6 - <i>Pools</i> gênicos contaminados detectados através da amplificação com primers da ORF 14	30
Figura 7 - Frequência de mariposas contaminadas pelo BmNPV das raças M18-2, M12-2, J1, C25, C75, C24; KR01;M11-A; AS3, B106, M8, M11, C211, E8 e Hindu.....	31
Figura 8 - Produtos de PCR de mariposas contaminadas pelo vírus BmNPV realizada com os primers da ORF 14.....	32
Figura 9 - Produtos de PCR multiplex de mariposas contaminadas pelo vírus BmNPV.....	33
Figura 10 - Clivagem com <i>EcoRI</i> para confirmação da clonagem do fragmento gerado pela ORF 14 de BmNPV	35
Figura 11 - Resultado do sequenciamento gerado após a confirmação da clonagem do fragmento gerado com a amplificação com os primers da ORF 14...35	
Figura 12 - Alinhamento do resultado do sequenciamento da ORF 14 com a sequência do BmNPV, isolado T3.....	36
Figura 13 - Possível transmissão vertical entre casais de mariposas e suas posturas.....	37
Figura 14 - Não ocorrência da transmissão vertical entre um casal de mariposas e sua postura.....	39
Figura 15 - Análise da contaminação por BmNPV de ovos comerciais desinfectados.....	41

RESUMO

SAEZ, Cláudia Regina das Neves, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, março de 2012. **Detecção de contaminação e a investigação da transmissão vertical do BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*) em raças do banco de germoplasma de bicho-da-seda da Universidade Estadual de Maringá.** Orientadora: Maria Aparecida Fernandez. Coorientadores: Claudete Aparecida Mangolin, Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki e Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz.

Neste trabalho reportamos a detecção molecular do BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*), em raças experimentais de *Bombyx mori* pertencentes ao banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá. Para tanto, foi realizada a extração do DNA de 6 mariposas fêmeas de cada raça de *B. mori* (B82, M11-2, M18, C36, F6, M18-2, M12-2, J1, C25, C75, C24, KR01, M11-A, AS3, B106, M8, M11, C211, E8 e Hindu), sendo formados *pools* gênicos individuais. Para obtenção dos fragmentos amplificados, foi desenhado um par de primers baseado em sequências específicas do genoma do baculovírus correspondentes à região da ORF 14 do BmNPV e, para controle, um par de primers referente a um segmento do gene da Actina A3 de *B. mori*. Dos vinte *pools* gênicos analisados, quinze apresentaram a banda de 443 pares de base, pb, que indica a presença do vírus. Somente as populações B82, M11-2, M18, C36 e F6 não apresentaram contaminação. A frequência de mariposas infectadas dentre os quinze *pools* gênicos detectados como contaminados foi investigada mediante ampliações individuais. A frequência de mariposas contaminadas foi: 100% de contaminação para as raças M18-2, M12-2 e J1; 83% para C25, C75, e C24; 66% para KR01; 50% para M11-A; 33% para AS3, B106, M8 e M11 e 16% para as raças C211, E8 e Hindu. Todas as amostras de DNA amplificadas das mariposas por meio da PCR multiplex apresentaram a banda de 721pb que comprova que o DNA amplificado era de *B. mori* e que não ocorreu nenhuma interferência na reação. A detecção de produtos de PCR de tamanho esperado (443pb) em ovos de indivíduos que estavam contaminados não foi conclusiva. Uma das hipóteses da dificuldade de detecção da contaminação por BmNPV em ovos pode estar relacionada à reduzida concentração do vírus na amostra. Esses resultados são promissores para a identificação de

contaminação por BmNPV, evitando a proliferação deste em gerações subsequentes.

Palavras-chave: bicho-da-seda; BmNPV; transmissão vertical.

ABSTRACT

SAEZ, Cláudia Regina das Neves, M.Sc. Universidade Estadual de Maringá, March, 2012. **Detection of contamination and investigation of vertical transmission of BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedroviruses*) in silkworm breeds of the Universidade Estadual de Maringá germplasm bank.** Adviser: Maria Aparecida Fernandez. Committee Members: Claudete Aparecida Mangolin, Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki and Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz.

In the present work we reported the molecular detection of BmNPV (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*) with experimental silkworm breeds of the Universidade Estadual de Maringá germplasm bank. DNA extraction followed routine methodology. DNA of six *Bombyx mori* females moths of each breed (B82, M11-2, M18, C36, F6, M18-2, M12-2, J1, C25, C75, C24, KR01, M11-A, AS3, B106, M8, M11, C211, E8 and Hindu), composed individual pools gene. PCR (Polymerase Chain Reaction (PCR) used a pair of primers that was designed based on specific sequence of the baculovirus genome corresponding to BmNPV ORF 14. Another pair of primers was used to amplify the silkworm Actin A3 gene segment, which was used as positive control. Twenty gene pools were analyzed, and fifteen showed a band of 443 base pairs, bp, that indicates the presence of BmNPV genome. Populations B82, M11-2, M18, C36 and F6 showed no contamination. The frequency of infected moths of the fifteen gene pools detected as contaminated was investigated by individual PCR amplifications. The frequency of contaminated moths were: 100% for silkworm breeds M18-2, M12-2 and J1, 83% for C25, C75 and C24 breeds, 66% for KR01, 50% for M11-A, 33% for AS3, B106, M8 and M11 and 16% for C211, Hindu and E8 breeds. All DNA amplified by multiplex PCR showed a band of 721 bp, which confirms that the amplified DNA was from *B. mori* specimens. The detection of PCR fragments of the expected size (443 pb) in infected individuals eggs was not conclusive. The difficulty in detecting BmNPV contamination in eggs may be due the low concentration of virus in samples. These are promising results for the identification of contamination by BmNPV, thus preventing virus proliferation in subsequent generations.

Key words: *Bombyx mori*, BmNPV, vertical transmission.

1 INTRODUÇÃO

O bicho-da-seda (*Bombyx mori* Linneaus) é um lepidóptero domesticado, cujos casulos são utilizados para a produção de fios de seda. Essa prática se chama sericicultura e vem sendo realizada há cerca de 5.000 anos. *Bombyx mori* são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa, passando por quatro estágios morfológicos distintos durante seu ciclo de vida: ovo, lagarta, pupa ou crisálida e adulto ou mariposa (Hanada e Watanabe, 1986; Nagaraju e Goldsmith, 2002).

A sericicultura tem-se desenvolvido nas pequenas propriedades rurais, onde predomina o trabalho familiar, representando uma alternativa importante para a melhoria da renda dessas famílias e contribuindo de forma significativa para a diminuição do êxodo rural. Além dessas características, a sericicultura é uma atividade de baixo impacto ambiental que contribui para o desenvolvimento sustentável do país (Brancahã, 2002a; Kurin, 2002).

Desde 2005, o Brasil conta com o primeiro acervo genético público deste lepidóptero, pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM). A COCAMAR (Cooperativa Agroindustrial de Maringá), ao encerrar suas atividades nesse setor, doou parte do seu banco de germoplasma de *B. mori* para esta Universidade. O mesmo aconteceu no ano de 2010 com a empresa Fujimura do Brasil. Em consequência disso, a UEM possui hoje um excepcional acervo genético de raças de *B. mori*.

Os maiores problemas que ameaçam a sericicultura no Brasil e no mundo são as doenças causadas por diversos patógenos, como protozoários, vírus, bactérias e fungos, que podem infectar o bicho-da-seda durante seus diferentes estágios do ciclo de vida (Zanetti, 2005a). Boa higienização e desinfecção podem manter as áreas de criação adequadas para a redução de doenças, mas não podem impedir a entrada dos agentes infecciosos (Zanetti, 2005a; 2005b).

De todas as doenças que causam prejuízos à criação do bicho-da-seda, as de origem viral são as mais graves e representam um sério problema para a sericicultura mundial (Sengupta et al., 1990; Brancahã, 2002b). O *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* faz parte do gênero *Alphabaculovirus* (Jehle et al., 2006), sendo um patógeno altamente infectivo que causa uma das mais sérias doenças

virais, conhecida por amarelidão. Este vírus pertence à família *Baculoviridae* e é constituído por uma molécula de DNA dupla fita, a qual se associa a proteínas do capsídeo, formando-se o nucleocapsídeo (Murphy et al., 1995). Esses baculovírus possuem corpos de inclusão poliédrica denominados de poliedros que contêm vários vírions. Sua principal proteína é a poliedrina que apresenta um peso molecular em torno de 30.000 daltons (Summers et al., 1980) e corresponde à cerca de 95% do seu conteúdo protéico (Maruniak, 1986).

A fase pouco estudada e ainda mais crucial na dinâmica da infecção viral é a persistência do vírus entre as gerações (Beukema, 1992). Khurad et al. (2004) buscaram determinar a transmissibilidade de *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) dos pais para progênie e entre as gerações, que é um das condições mais importantes para a indústria de sericultura, indicando que a transmissão vertical ocorre e, desta forma, torna-se desfavorável o uso de mariposas sobreviventes para a produção de ovos, pois pode correr este tipo de transmissão.

A solução mais eficaz para o controle da dispersão do BmNPV é detectar a infecção viral o mais cedo possível a fim de impedir a propagação da doença causada por este baculovírus nas áreas de criação e dentro dos bancos de germoplasma. Portanto, uma técnica que permita a identificação do BmNPV na fase mais precoce da infecção é extremamente necessária.

Os países que criam bicho-da-seda sofrem perdas significativas na produção em consequência de infecções com NPV, infecções estas que podem ocorrer verticalmente entre os *B. mori* contaminados (Neelgund e Mathad, 1978; Richards et al., 1998; Kukan, 1999; Fuxa et al., 1992; Fuxa et al., 2002; Ikuno et al., 2004; Khurad et al., 2004; Khumnoi, 2007). Considerando a importância do banco de germoplasma de bicho-da-seda da Universidade Estadual de Maringá para a sericultura brasileira, este trabalho teve por objetivo padronizar uma metodologia de identificação da contaminação pelo BmNPV em raças do bicho-da-seda do acervo genético da UEM e analisar a transmissão vertical deste baculovírus entre as gerações.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A espécie *Bombyx mori*

Bombyx mori L., popularmente conhecido como bicho-da-seda, é originário da China e vem sendo domesticado pelo homem há aproximadamente 5.000 anos para obtenção de fios de seda, o qual é utilizado para fabricação de roupas e outros utensílios (Brancahã, 2002a).

Descrito por Linnaeus em 1758, *Bombyx mori* pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx*. O bicho-da-seda é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta metamorfose completa, sendo o inseto jovem completamente diferente do inseto adulto (Hanada e Watanabe, 1986).

O *B. mori* apresenta um ciclo de vida típico de Lepidoptera, com quatro estágios distintos: ovos, lagartas, pupa e adulto, finalizando com a metamorfose. As lagartas passam por cinco estágios, classificados em 1°, 2°, 3°, 4° e 5° instar. O bicho-da-seda aumenta quase que setenta vezes seu tamanho e ocupa quatro vezes mais o espaço inicial. Depois de cinco semanas, quando a lagarta está no quinto instar, ela pára de se alimentar, inicia a fiação do casulo e se converte em pupa. Mais tarde, esta se transformará em uma mariposa (Aruga, 1994). Quando a pupa se transforma em mariposa pode-se verificar o dimorfismo sexual, sendo as fêmeas significativamente maiores que os machos (Hanada e Watanabe, 1986).

Quanto à morfologia, a lagarta do bicho-da-seda apresenta corpo cilíndrico dividido em treze segmentos. Na lateral do corpo, existem nove pares de espiráculos, responsáveis pela entrada e saída do ar e vapor d'água (Hanada e Watanabe, 1986). A metamorfose ocorre por meio de um conjunto integrado de processos em que a larva se desenvolve e transforma-se em pupa. Durante a fase de pupa, a ecdisona ativa a expressão gênica em vários tecidos larvais, como as glândulas sericígenas e pró-trorácicas, culminando na morte celular programada e subsequente histólise, enquanto novas partes do adulto são formadas mediante a proliferação e diferenciação celular (Tsuchida e Wells, 1988).

O casulo produzido pelo inseto, do qual é extraído o fio de seda, é rico em proteínas produzidas por um par de glândulas chamadas sericígenas (Masmudur e Gopinathan, 2003). Essas glândulas ocupam um terço do corpo do inseto quando

este chega ao quinto instar. Elas secretam as proteínas fibroína, sericina e p25 na forma líquida. Quando entram em contato com o ar, estas proteínas se solidificam estando prontas para formar o casulo (Mondal et al., 2007).

O bicho-da-seda é considerado uma espécie totalmente domesticada, pois não é mais encontrada na natureza sendo totalmente dependente do homem para sobreviver. Provavelmente, a espécie *B. mori* evoluiu da linhagem selvagem *Bombyx mandarina*, que apresenta características semelhantes e capacidade de acasalamento (Goldsmith et al., 2002).

Estima-se que a espécie sofreu mais de quatrocentas mutações, gerando raças geneticamente melhoradas. O bicho-da-seda se alimenta apenas na fase larval e tem uma dieta herbívora, alimentando-se exclusivamente de folhas de amoreira fresca (*Morus* sp.) (Holanda et al., 2004).

Bombyx mori pode ser classificado por meio de diversos parâmetros, podendo ser de acordo com a região nativa, o voltinismo, o número de ecdises ou até mesmo a cor do casulo (Aruga, 1994). Há oito espécies criadas para a produção do fio de seda, sendo a mais importante *B. mori*, que responde por mais de 95% da seda produzida em todo o mundo. As outras espécies pertencem à família Saturniidae: *Antheraea pernyi* Guerin, *A. millita* Drury, *A. yamamai* Guerin, *A. assama* Helfer e *Atlacus ricini* Boisduval, entre outras (Goldsmith et al., 2002).

2.2. A sericicultura

A sericicultura é a atividade de criação do bicho-da-seda para obtenção de casulos destinados à produção de seda. Esta atividade inclui o cultivo da amoreira, a produção dos ovos do bicho-da-seda, criação das lagartas até a produção dos casulos e, finalmente, a fiação e confecção do tecido de seda por parte do setor industrial. No Brasil, as condições climáticas são favoráveis ao cultivo tanto da amoreira quanto do inseto, fazendo com que a produção de casulos seja considerada uma boa alternativa para os produtores (Fernandez et al., 2005).

A China foi a primeira civilização a utilizar a seda. Os primeiros dados encontram-se nas escritas de Confúcio, que falam sobre a criação doméstica do bicho-da-seda nos palácios da imperatriz Siling-Chi no século XVIII a.C. Nestes palácios, o ciclo do bicho-da-seda era controlado e estes insetos eram alimentados com folhas de amoreira e as pupas eram mortas antes de transformar-se em mariposas. Também se conheciam as técnicas do bobinamento dos filamentos, dos

quais eram tecidos fios resistentes que, posteriormente, eram usados para a confecção de tecidos (Álvarez e López, 2003).

Mediante análises de microscopia eletrônica de fragmentos de fibras arqueológicas encontradas em ornamentos de ligas de cobre em Harappa e em esferas de esteatite em Chanhu-daro, dois locais hindus importantes, encontraram-se fibras de seda datando de 2450-2000 a.C., o que coloca em questão a noção histórica tradicional da sericicultura como sendo uma invenção exclusivamente chinesa (Good et al., 2009). Desde a antiguidade, a sericicultura tem sido um meio de subsistência econômica para muitos trabalhadores, tornando-se um importante fator para a globalização, por aproximadamente 2000 anos, durante a chamada “Era da Rota da Seda” (Kurin, 2002).

A Rota da Seda era uma série de rotas interconectadas pelo sul da Ásia, usadas no comércio da seda entre o Oriente e a Europa. Os meios de transporte que rodeavam tais rotas eram as caravanas e embarcações oceânicas que faziam à ligação do Oriente à Europa. No início, a rota ligava a cidade de Changan na China até Antioquia na Ásia, porém sua influência foi aumentando, chegando até a Coréia e ao Japão, formando assim a maior rede comercial do Mundo Antigo. Essas rotas não foram importantes somente para o crescimento e desenvolvimento de regiões e de grandes civilizações, como o Egito Antigo, a Mesopotâmia, a China, a Pérsia, Índia e a Roma, elas foram importantes também para fundamentar o início do mundo moderno (Elisseeff, 1998).

No Brasil, a introdução da sericicultura ocorreu no estado do Rio de Janeiro, no ano de 1848. Em 1992, na cidade de Campinas, São Paulo, foi criada a primeira indústria de seda, a Seda Nacional S.A. (Hanada e Watanabe, 1986). Esta atividade é predominantemente desenvolvida em pequenas propriedades, onde se emprega o trabalho familiar, representando uma alternativa importante para a melhoria da renda dessas famílias e contribuindo de forma significativa para a diminuição do êxodo rural. Somando-se a essas características, a sericicultura contribui para o desenvolvimento sustentável do país, em virtude de seu relevante aspecto social e por se tratar de atividade de baixo impacto no meio ambiente (Pennacchio, 2006).

As indústrias de fiação do Brasil distribuem mudas de amoreiras e lagartas do bicho-da-seda no 3º estágio de desenvolvimento larval para os produtores que realizam o manejo das lagartas até a fase de casulos, os quais são vendidos ao setor empresarial. A participação dos governantes estaduais está na forma de

financiamentos, disponibilizando crédito aos produtores, possibilitando o desenvolvimento da atividade sericícola. Portanto, a sericultura é importante em aspectos socioeconômicos: é uma cultura alternativa, fixa o homem no campo, apresenta pouca dependência climática, tem pequeno custo de produção, além da racionalização da mão-de-obra (Zaneti, 2005a).

No estado do Paraná, o bicho-da-seda aparece pela primeira vez em Cambará, a 15 km de Jacarezinho, na região Noroeste, em 1932. Na mesma cidade, em 1946, surgiu a primeira fábrica paranaense. No final da década de 1960, com o incentivo de algumas indústrias paulistas, iniciou-se na região do Norte Pioneiro, mais especificamente no município de Ibaiti e em outros municípios vizinhos, a criação do bicho-da-seda em escala comercial (Silva, 2008).

A partir de 1970, a atividade começou a crescer no estado. Em 1972, instalava-se no Paraná, no município de Cornélio Procópio, a Kanebo Silk do Brasil – Indústria de Seda. Em 1973 e em 1984, o sistema cooperativista do Paraná passou a participar da cadeia produtiva da seda, com a implantação de um projeto da Cooperativa dos Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá Ltda (Cocamar). Na safra 1985/86, o Paraná tornou-se o maior produtor nacional de casulos verdes (Silva, 2008), permanecendo neste lugar até os dias atuais.

Na safra 2009/2010, o Paraná foi responsável por 92,34% da produção nacional, sendo o maior município produtor de casulos verdes Nova Esperança, com 632 mil quilos, representando 15,41% da produção paranaense (SEAB, 2010).

2.3. O fio de seda

Os casulos dos bichos-da-seda são formados pela fibroína (cadeia leve e pesada), sericina e pela p25 ou fibrohexamerina, que são produtos de secreção da glândula sericígena. As cadeias de fibroína, que são proteínas fibrosas, formam filamentos rígidos juntamente com a sericina e a fibrohexamerina, constituindo os fios de seda (Corradello, 1987). Uma terceira categoria de proteínas, constituintes do casulo, foi caracterizada molecularmente nos lepidópteros *Galleria mellonella* e *B. mori*, denominadas seroína 1 e seroína 2, e essas proteínas atuam como agentes antimicrobianos, protegendo o casulo de fungos e bactérias (Zurovec et al., 1998).

A obtenção do fio de seda pela fiação do casulo ocorre em várias etapas. A primeira delas é a secagem do casulo, com o objetivo de conservar o valor da fibra, manter a qualidade dos fios e impedir que a pupa se desenvolva em mariposa e

rompa o casulo, danificando-o. Após a secagem, os casulos ficam em repouso por duas semanas para a estabilização da sericina (SEAB, 2010).

A segunda fase consiste em limpar o casulo, ou seja, retirar a anafia (seda que a lagarta solta para formar o casulo). Em seguida, são cozidos em água. Esse cozimento é importante, pois amolece a goma de sericina e dá melhores condições às fibras para o processo de fiação, processo feito por máquinas fiandeiras automáticas, que desenrolam os casulos e formam o fio da seda (SEAB, 2010).

A seda é uma fibra natural, antialérgica e de alto valor comercial que reúne características únicas como brilho, suavidade e textura. Além disso, é considerada adequada a todos os climas, pois é má condutora de calor e, quando misturada com outros fios, produz tecidos de resistência inigualável às fibras sintéticas (Silva, 2008).

O fio da seda possui várias finalidades, sendo a mais comum a utilização na indústria têxtil para a fabricação do tecido que, posteriormente, é utilizado para a produção de diversas peças de vestuário. Entretanto, ainda há outras destinações dadas ao fio de seda, como a utilização em produtos de beleza na indústria cosmética e também o uso em suturas de cirurgias. Em alguns países orientais, roupas de seda são usadas para mostrar *status* na sociedade. Além do tecido, alguns lugares utilizam o bicho-da-seda como fonte de alimento, principalmente na sua fase de pupa, pois representa um alto teor de proteínas (Silva, 2008).

2.4. Doenças de *Bombyx mori* que trazem prejuízos a sericultura

Os maiores problemas que ameaçam a sericultura no Brasil e no mundo são as doenças causadas por diversos patógenos, como protozoários, vírus, bactérias e fungos, que podem infectar o bicho-da-seda durante seus diferentes estágios do ciclo de vida (Zanetti, 2005a).

Entre as doenças que afetam o bicho-da-seda e que são causadas por protozoários destacam-se a flâcherie (diarréia do bicho-da-seda) e a pebrina (doença infecciosa que se manifesta pelo aparecimento de manchas negras no tegumento), causadas pelo microsporídio *Nosema bombycis*. Ambas são adquiridas pelas lagartas por via oral mediante a alimentação com folhas de amoreira contaminadas e são transmitidas por meio dos ovos para a próxima geração (Zanetti, 2005b).

Com relação às doenças causadas por fungos, as que apresentam maior incidência são a calcinose branca e a calcinose preta, causadas por *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, respectivamente (Habib e Andrade, 1998b), estes fungos estão presentes principalmente no solo. As doenças fúngicas são adquiridas por contato com folhas de amoreira contaminadas e são transmitidas entre os insetos. Estes fungos necessitam de certas condições ambientais para germinar, as quais coincidem com as condições de criação do bicho-da-seda em relação à temperatura e umidade, o que aumenta a probabilidade de contágio e favorece a reprodução e disseminação destes fungos (Zanetti, 2005b).

Insetos também podem prejudicar a atividade sericícola, como por exemplo: mosca kyojo (*Sturmia sericariae*), mosca tachina (*Tricholyga sorbillans*), mosca uzi (*Tricholyga bombycis*), ácaro da sarna da palha (*Pediculoides ventricosus*), besouro do casulo, formigas, abelhas, entre outros (Zanetti, 2005b) (Hanada e Watanabe, 1986).

As de origem viral são as mais graves de todas as doenças que causam danos à criação do bicho-da-seda, sendo responsáveis por quase 70% da perda da produção, representando um sério problema para a sericultura mundial. Quatro tipos são conhecidos: flacidez infecciosa, denonucleose, poliedrose citoplasmática e poliedrose nuclear (Brancahã, 2002b).

A flacidez infecciosa é altamente contagiosa e encontrada em todos os locais do mundo de criação do bicho-da-seda. É causada pelo vírus *Morator*, o qual é altamente patogênico e resistente às condições ambientais, podendo permanecer no solo por vários anos. A infecção ocorre via oral e o vírus se multiplica no intestino médio. O corpo da lagarta torna-se transparente por estiramento dos anéis segmentares, apresentando inapetência, inatividade, vômitos e diarreia (Zanetti, 2005b).

A denonucleose é uma doença causada por um vírus do gênero *Densovirus* e a infecção ocorre geralmente via oral, multiplicando-se no núcleo das células colunares do intestino médio. Os sintomas apresentados são o retardo no crescimento e flacidez, sendo que o canal alimentar apresenta-se amarelado e sem conteúdo (Zanetti, 2005b).

A poliedrose citoplasmática é a principal doença viral. Ocorre durante o outono e é causada pelo vírus *Smithia*, que forma cristais poliédricos hexagonais ou tetragonais, como meio de proteção. A infecção ocorre também via oral, em que as

lagartas infectadas eliminam cristais, contendo os vírus. Quando a lagarta ingere os cristais poliédricos, juntamente com as folhas de amoreira, o suco digestivo alcalino os dissolve, liberando o material genético dos vírus, que se multiplicam nas células do intestino médio e formam novos cristais poliédricos. Os sintomas se assemelham à flacidez, apresentando inapetência, menor desenvolvimento, o intestino médio torna-se esbranquiçado, além de diarreia e vômito (Zanetti, 2005b).

A poliedrose nuclear é uma das doenças virais mais sérias nos países tropicais e ocorrem durante todo o ano. É causada pelo baculovírus que se multiplicam e formam octaedros truncados no núcleo de várias células do corpo do inseto (Brancahã, 2002a).

2.5. Baculovírus

A história da descoberta dos baculovírus está intimamente relacionada ao desenvolvimento da indústria da seda, que ocorreu na China há 5.000 anos. Como acontece com qualquer atividade desenvolvida no campo, tornou-se de suma importância o entendimento das doenças que causam prejuízos à criação do bicho-da-seda. Com o advento da microscopia de luz, uma característica proeminente de um dos tipos de doença que acometiam as lagartas do *B. mori* foi caracterizada pela presença de corpos de oclusão que eram sintomáticos nos insetos afetados. Estes comumente apresentavam forma de poliedro, o que levou à nomeação da doença associada com estas estruturas como 'poliedrose' por meados de 1800 (Rohrmann, 2008).

Baculovírus é um grupo diversificado de vírus que possuem DNA fita dupla, circular e genomas superenrolados, com tamanhos que variam de 80 a 180 kb e que codificam entre 90 e 180 genes. Destes, um conjunto comum de cerca de 31 genes homólogos foi identificado e há provavelmente outros que não podem ser reconhecidos por causa de mudanças que foram incorporadas ao longo do tempo (Rohrmann, 2008).

O DNA viral apresenta em sua volta um capsídeo protéico. Esta forma constitui a forma infectiva do vírus (nucleocapsídeo). O nucleocapsídeo dos baculovírus tem formato de bastão, com 200 µm de comprimento e 30 µm de diâmetro (Figura 1). Quando envoltos por um envelope de bicamada lipídica, são denominados vírions. Estes vírions são envolvidos por uma matriz protéica, formando o corpo de oclusão (OB, do inglês *Occlusion Body*), estrutura que confere

estabilidade física e biológica às partículas virais. Corpos de oclusão são altamente estáveis e podem resistir em condições ambientais normais, permitindo que os vírions permaneçam no meio ambiente. Evidências sugerem que eles podem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal das aves, o que pode facilitar sua dispersão (Entwistle et al., 1978).

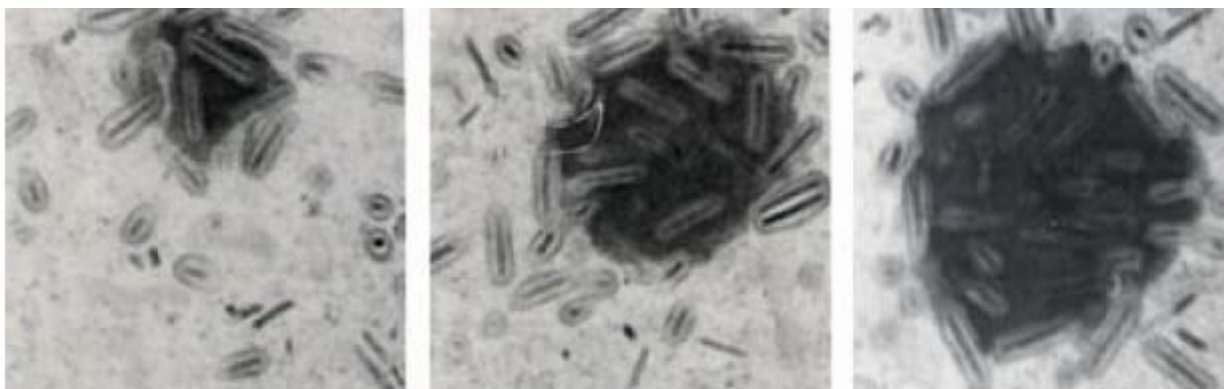


Figura 1 - *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*: Envelopes nucleares. Micrografia eletrônica. Brancalhão et al., 2009.

A terminologia para esses vírus passou por uma série de nomes e foi em 1973 que uma nomenclatura que incluía Borrelinavirus, Bergolidavirus, Smithiavirus, Moratorvirus e Vagoiavirus foi alterada e unificada para Baculoviridae (Vago et al., 1974). O nome baculovírus foi proposto por Mauro Martignoni que sugeriu que todos os baculovírus sejam nomeados como pertencentes à família Baculoviridae e recebam as iniciais de onde estes foram isolados. Os vírus são originalmente chamados pela primeira letra do gênero e espécie de seu hospedeiro (Rohrmann, 2008).

A família Baculoviridae apresenta dois grandes grupos: os vírus de poliedrose nuclear, também chamados de nucleopoliedrovírus ou simplesmente (NPV), e os vírus de granulose ou granulovírus (GVS). Estas designações se referem às proteínas que constituem os corpos de oclusão. Quando a matriz protéica dos corpos de oclusão é formada por poliedrina, estes são denominados poliedros; quando por granulina, grânulos. Um recurso adicional à definição de baculovírus é que eles codificam sua própria RNA polimerase e, com isso, podem explorar o sistema de transcrição da célula hospedeira para expressar seus genes (Rohrmann, 2008).

A família Baculoviridae atualmente pode ser dividida em quatro grupos filogenéticos principais: *Alphabaculovirus* (NPVs de Lepidoptera), *Betabaculovirus* (GVs de Lepidoptera), *Gammabaculovirus* (NPVs de Hymenoptera) e *Deltabaculovirus* (NPVs de Diptera) (Jehle et al., 2006).

Quanto ao aspecto morfológico, os baculovírus podem ser de dois tipos distintos. O primeiro é representado pela forma envelopada do vírus *Budded virus* (BV), que consiste de um único nucleocapsídeo rodeado por um envelope lipídico. A outra forma é chamada vírus encapsulado *Occlusion derived virus* (ODV) (Figura 2) em que múltiplos nucleocapsídeos se encontram embebidos em uma matriz cristalina composta por quase exclusivamente de poliedrina, formando os poliedros que protegem os vírus contra os danos ambientais e beneficiam a entrada do vírus infeccioso ao hospedeiro suscetível (Inceoglu et al., 2001; Je et al., 2001).

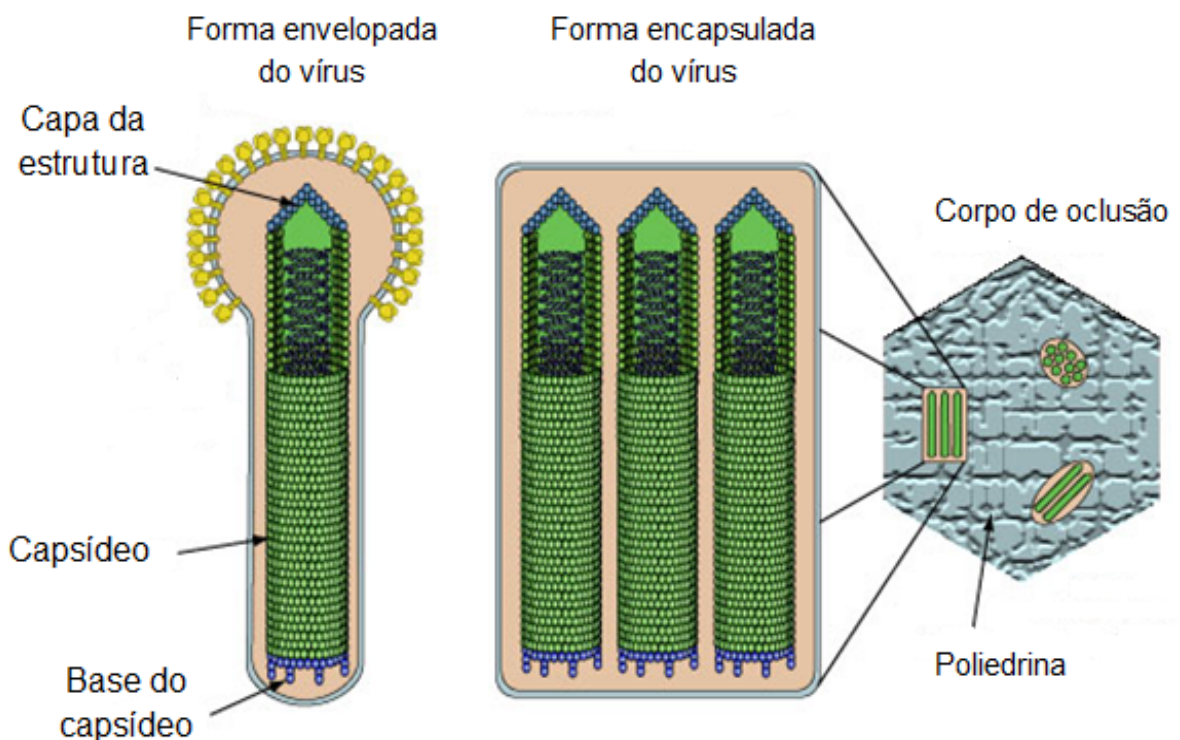


Figura 2 - Formas de estruturação do baculovírus. Forma envelopada do vírus e forma encapsulada do vírus. Viralzone, 2008.

Estes dois tipos morfológicos apresentam a estrutura do nucleocapsídeo semelhante e possuem a mesma informação genética. Embora estes tipos de vírions sejam semelhantes em sua estrutura do nucleocapsídeo, eles diferem na origem e composição dos seus envelopes e seus papéis no ciclo infeccioso. Os BV são

responsáveis pela infecção sistêmica no hospedeiro (célula a célula), enquanto os ODV são responsáveis pela transmissão horizontal da doença (inseto para inseto), sendo infecciosa apenas se ingerida pelo hospedeiro (Rohrmann, 2008).

Os vírus são incapazes de se reproduzir sem um hospedeiro; são parasitas obrigatórios, onde os baculovírus não são exceção. As células do corpo do hospedeiro são assumidas pela mensagem genética realizada dentro de cada virion e forçados a produzir mais partículas virais até que a célula e, finalmente, o inseto, morra (Rohrmann, 2008).

No Brasil, alguns baculovírus são utilizados em programas de controle biológico, onde suas características patogênicas são exploradas para a eliminação de insetos-pragas, como no caso de *Anticarsia gemmatalis* (AgNPV), (Brancahão et al., 2002).

Sobre o tamanho dos genomas de baculovírus, os vírus de Hymenoptera contêm o menor genoma, um pouco mais de 80 kb. O pequeno tamanho desses genomas pode ser atribuído ao ciclo de vida restrito deste, ocorrendo a replicação nas células do intestino deste inseto (Lauzon et al., 2006). Os NPVs da ordem Lepidoptera mostram um alto grau de variação no tamanho do genoma (Hashimoto et al., 2000).

O sequenciamento dos genomas de baculovírus tem sido realizado há anos. O mapa genético do Baculovírus de AgNPV, por exemplo, com seus 133 mil pares de base, foi sequenciado no Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática (Lemb), da Universidade de São Paulo (USP), unidade de referência viral no país, em 2003. O DNA do AgNPV tem 10 vezes o tamanho do genoma do vírus do HIV. Há vários genomas de baculovírus sequenciados em todo o mundo, entre eles os *Autographa californica* NPV (AgNPV), *Bombyx mori* NPV (BmNPV), *Orgyia pseudosugata* NPV (OpNPV), *Lymantria dispar* NPV (LdNPV), *Spodoptera exigua* NPV (SfNPV), *Plutella xylostella* GV (PxGV) e *Xestia nigrum* GV (XnGV) (Oliveira et al., 2006).

2.6. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)

O vírus da poliedrose nuclear (NPV) ou *nucleopolyhedrovirus* de *B. mori* é um patógeno altamente infectivo que causa uma das mais sérias doenças virais, conhecida por amarelidão. Este vírus produz estruturas de resistência que são capazes de persistir por um longo período de tempo no meio ambiente. Até o

momento, não existe tratamento para o amarelidão. Por este motivo, uma vez identificada a presença da doença na criação, se faz necessária a eliminação de todas as lagartas do barracão contaminado (Brancahã, 2002a).

Os NPVs são importantes patógenos de artrópodes, infectando predominantemente insetos holometábolos, particularmente os da ordem Lepidoptera, sendo específicos ao estágio larval de seus hospedeiros (Inceoglu et al., 2001). Esses vírus são espécie-específicos, sendo o baculovírus que infecta o bicho-da-seda denominado *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV), cujo genoma de 130 kb já foi totalmente sequenciado e tem a capacidade de codificar mais de 100 genes diferentes. Originalmente isolado por Bergold em 1947 (Gomi et al., 1999), a primeira observação notificada do BmNPV no Brasil foi feita por Gatti et al. (1976), nas culturas híbridas do bicho-da-seda no estado de São Paulo. No estado do Paraná, a primeira descrição do vírus foi realizada por Brancahã (2002b).

O isolado geográfico de BmNPV obtido por Brancahã et al. (2002) apresenta alta virulência, o que foi comprovado pelo curto intervalo de tempo que se passou desde a contaminação até o início das mortes das lagartas e pela alta taxa de mortalidade, sendo que 80% das lagartas morreram até o final dos experimentos. Os 20% de lagartas restantes construíram casulos de baixa qualidade e, em sua maioria, morreram na fase de pupa, manchando o casulo.

Dados ultraestruturais obtidos por Brancahã (2002a) revelaram a presença de múltiplos nucleocapsídeos por envelope, característica diagnóstica para MNPV - Múltiplo Nucleopoliedrovírus (Granados e Williams, 1986; Murphy et al., 1995). O MNPV é um genótipo virulento, uma vez que apresenta maior número de nucleocapsídeos por envelope (Tanada e Kaya, 1993).

A contaminação no bicho-da-seda pelo BmNPV se dá por meio da ingestão de partículas virais presentes nas folhas de amoreira usadas em sua alimentação. Após a ingestão, os vírions são liberados mediante a dissolução dos corpos de oclusão nas condições alcalinas ($\text{pH} > 7,5$) e sob ação de proteases no intestino médio do inseto. Em contato com as microvilosidades intestinais, os nucleocapsídeos invadem as células epiteliais, onde se multiplicam no núcleo da célula sem ainda produzirem corpos de oclusão, formando BV e caracterizando o que é conhecido como infecção primária (Figura 3) (Lehane, et al., 1996).

Os vírus extracelulares, quando alcançam a hemolinfa da larva hospedeira, podem gerar uma infecção sistêmica. A partir de então, ocorre a produção de grandes quantidades de nucleocapsídeos e posterior formação dos corpos de oclusão no núcleo das células dos tecidos suscetíveis da lagarta, caracterizando a infecção secundária. O trato gastrointestinal dos insetos é então o local da infecção inicial e várias características importantes da biologia dos baculovírus evoluíram para acomodar e explorar este ambiente único (Lehane et al., 1996).

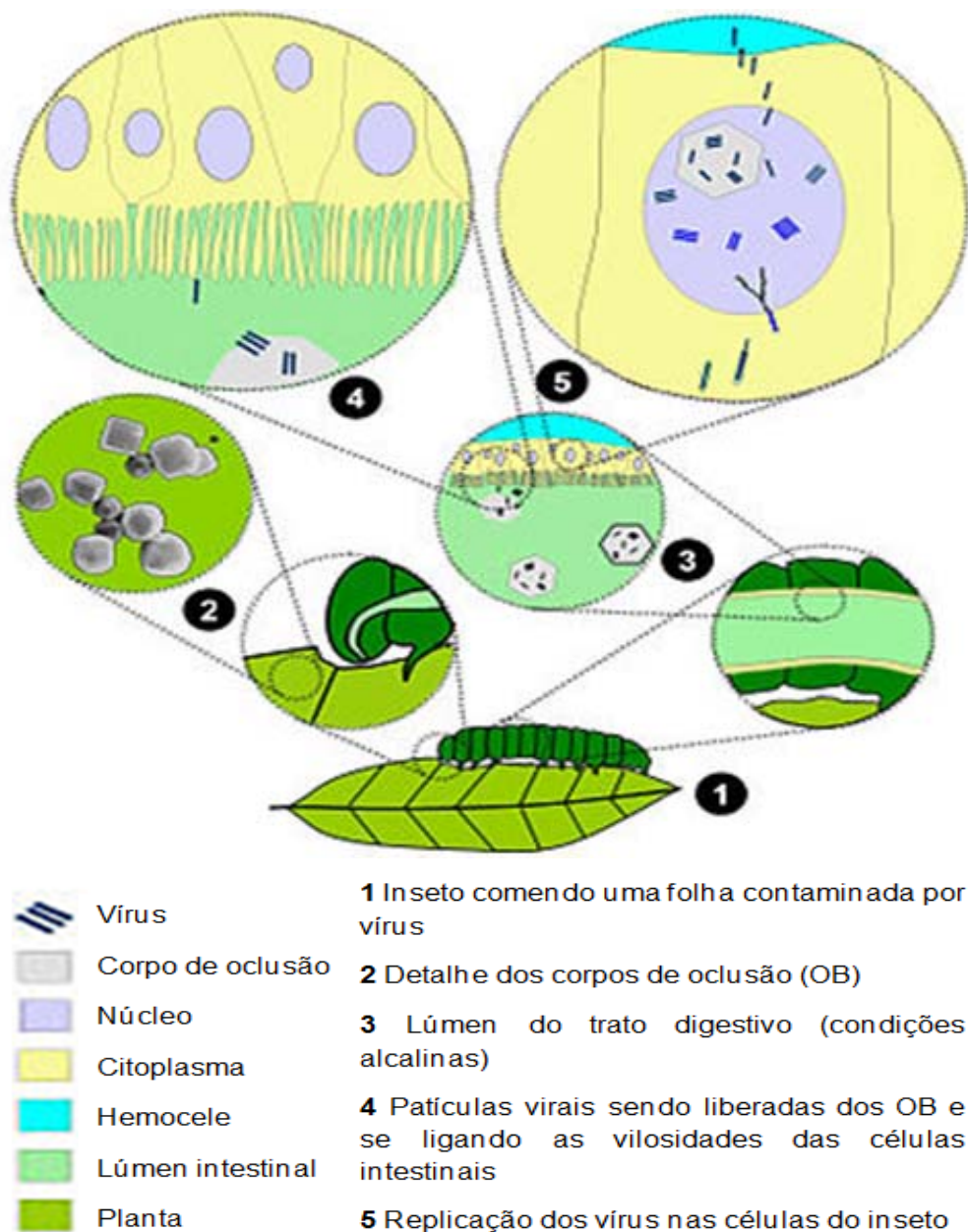


Figura 3 - Diagrama do ciclo de vida do *Nucleopolyhedrovirus* em insetos da ordem Lepidoptera. Brito, 2010.

Quando a lagarta é infectada nos primeiros instares, pode morrer entre 1 e 2 dias após a ingestão do patógeno. No entanto, quando a infecção ocorre após o terceiro instar, os sintomas não são observados até o sexto dia após a inoculação (Ikuno et al., 2004). Os primeiros sinais de disfunção metabólica são: perda de apetite, mudanças no comportamento da lagarta e na cor do tegumento (Bilimoria, 1991), podendo ser observadas manchas amareladas no tegumento da lagarta infectada e manchas pretas na superfície corporal da pupa que surgem pouco antes de sua morte (Ikuno et al., 2004).

Quando a infecção ocorre nos últimos instares, as lagartas infectadas podem sobreviver até completarem a metamorfose. A morte ocorre pela liquefação e desintegração dos tecidos internos seguidos pela quebra da cutícula, que é fina e frágil, liberando os fluídos corporais contendo milhares de poliedros (Tinoco, 2000). Também foi verificada a eliminação de poliedros pela boca, por meio da regurgitação, e pelo ânus (Brancahão et al., 2002). Em algumas infecções por baculovírus, o estágio larval é prolongado o que beneficia a reprodução viral (Tanada e Kaya, 1993).

No início da infecção, os núcleos tornam-se hipertróficos com a presença do viroplasm. No prosseguimento dos efeitos citopatológicos, os poliedros começam a ser formados e no final do ciclo ocorre a citólise e os poliedros maduros são liberados no meio extracelular. Verifica-se uma asincronia no ciclo infeccioso do BmNPV (Brancahão e Ribeiro, 2003).

Sobre a alteração na coloração do tegumento, esta se acentua com a evolução da doença, uma vez que ocorre um aumento no conteúdo de fosfolipídios, colesterol e ácidos graxos livres na hemolinfa que, somado à presença de poliedros torna-se branco-amarelada (Brancahão, 1998). Com o avanço da doença, ocorre a infecção de um maior número de células, inclusive as do epitélio tegumentar, acentuando esta característica (Brancahão e Ribeiro, 2003).

Os baculovírus produzem algumas proteínas que auxiliam no processo infectivo, como a GP64. Outras proteínas são produzidas na fase tardia da infecção, quitinase e cisteína-protease, que agem provavelmente na dissolução dos tecidos do inseto, rompendo a cutícula larval e liberando os poliedros no meio externo (Hawtin et al., 1997).

A variedade mais virulenta do NPV pode causar a morte do hospedeiro em 2 a 5 dias após a infecção, enquanto as menos virulentas demoram de 2 a 3 semanas (Granados e Williams, 1986). Geralmente, condições adversas, tais como alta temperatura e folhas novas úmidas, ajudam no aparecimento de focos da doença. Isoladamente, essas condições não trazem grandes problemas, mas se houver a ocorrência simultânea de diversas condições adversas, o surto da moléstia será grande (Hanada e Watanabe, 1986).

Se as lagartas sadias forem criadas na mesma cama onde ocorreu contaminação por BmNPV e sem a tomada das devidas medidas profiláticas, estas também podem contrair a doença, pois os poliedros podem contaminar os alimentos e infectar as lagartas. Outra possibilidade é por meio da transmissão vertical (dos pais para a progênie) ou horizontal da doença (de inseto para inseto). Conseqüentemente, a moléstia pode se espalhar rapidamente pela cama de criação inteira comprometendo toda a criação, levando a grandes prejuízos (Hanada e Watanabe, 1986; Andreadis, 1987; Khurad et al., 2004).

Assim sendo, ao ser detectada a presença deste vírus no barracão de criação do bicho-da-seda, deve ser imediatamente interrompida a prática de utilizar os resíduos de criação deste inseto como adubo nas plantações de amoreira. De acordo com Vasconcelos (1996), os vírus podem permanecer no solo, nas folhas e nos caules da amoreira. Assim, a dispersão viral no amoreiral pode ocorrer tanto por meio de chuvas como pela forma de adubação, reintroduzido os vírus nos barracões de criação, os quais podem ser ingeridos pelas lagartas nas próximas criações de bicho-da-seda (Brancahão et al., 2002).

Uma vez que os vírus podem permanecer no solo, alcançarem e ficarem aderidos às folhas e caules da amoreira (Vasconcelos, 1996), tanto por meio das chuvas, como pela forma de adubação, pode haver a dispersão viral no amoreiral, pois o vírus pode ser reintroduzido nos barracões de criação e ser ingerido pelas lagartas das próximas criações de bicho-da-seda (Brancahão et al., 2002).

A maioria das investigações sobre a base molecular ou especificidade de hospedeiro dos baculovírus têm sido realizados usando BmNPV, AcMNPV, entre outros. Esses vírus podem ser cultivados em cultura de células e estão intimamente relacionados com ORFS (quadro de leitura aberta) homólogas, os quais apresentam 90% e 93% de identidade de sequência de aminoácidos (Gomi et al, 1999). Apesar da similaridade de AcMNPV e BmNPV, o AcMNPV infecta um conjunto mais

diversificado de insetos e linhagens de células de insetos que BmNPV (Kuzio et al., 1999).

2.7. A infecção por baculovírus

Os baculovírus evoluíram para começar a infecção no intestino médio dos insetos. Isto levou a duas características principais destes, o corpo de oclusão ambiente estável, mas álcali-solúvel, e os virions ocluídos que têm um envelope e proteínas associadas que permitem a sobrevivência e a infecção no ambiente alcalino do intestino médio que contém também uma variedade de enzimas digestivas (Rohrmann, 2008).

Uma característica comum do ciclo de vida de todos os baculovírus é a presença de virions incorporados em corpos de oclusão, produzidos na fase final do ciclo de replicação e liberados após a morte e desintegração do inseto. Corpos de oclusão servem para estabilizar os vírus no meio ambiente e normalmente só são dissolvidos sob condições alcalinas. Ambientes de pH elevado são raramente ou nunca encontrados na maioria dos ecossistemas e, normalmente, estão presentes no intestino médio de alguns insetos suscetíveis (Rohrmann, 2008).

Os insetos têm uma variedade de barreiras de proteção para resistir à infecção de patógenos. Muitos desses mecanismos de defesa são semelhantes aos de organismos superiores e incluem barreiras físicas, juntamente com as respostas locais e sistêmicas. Estas últimas incluem a produção de peptídeos antimicrobianos e células altamente especializadas chamadas hemócitos, que são células circulantes encontradas na hemolinfa de insetos e outros artrópodes e são semelhantes aos neutrófilos que realizam papéis na imunidade. A primeira linha de defesa é a proteção do intestino médio pela matriz peritrófica, os hemócitos estão no celoma e são responsáveis (ou não) pela infecção sistêmica, juntamente com o sistema traqueal (Rohrmann, 2008).

Os vírus são dependentes de uma variedade de funções celulares para infectar com sucesso um organismo. Para uma infecção produtiva, estruturas celulares e vias moleculares devem ser compatíveis com os vírus, para todos os eventos importantes na replicação destes, como, por exemplo, a entrada, o desencapsulamento, a replicação, entre outros. Insetos, como outros organismos, possuem métodos que evoluíram para inibir ou bloquear as infecções por vírus (Rohrmann, 2008).

A habilidade de um vírus para acessar o epitélio do intestino médio seria um dos primeiros problemas quando é iniciada a infecção. Em alguns insetos resistentes à infecção, verificou-se que diferentes características da matriz peritrófica pode influenciar a suscetibilidade de um inseto à infecção viral. Em *Anticarsia gemmatalis*, por exemplo, observou-se que os insetos resistentes à infecção mostraram um aumento na espessura relativa da matriz peritrófica (Levy et al., 2007).

Existe a possibilidade da propagação dos baculovírus em estado latente em insetos. Esta possível presença de baculovírus persistentes tem sido sugerida com base em surtos espontâneos em colônias de insetos criados, ou ainda quando há infecção pela exposição dos insetos a alguns fatores como, por exemplo, estresse causado pelo frio (Biever e Wilkinson, 1978).

Com o advento da biologia molecular, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi possível investigar essas observações. Uma infecção latente de baculovírus foi relatada em algumas culturas de *Mamestra brassicae*, a traça do repolho.

O vírus MbNPV (*Mamestra brassicae nucleopolyhedrovirus*) persiste na maioria das populações de *M. brassicae* no Reino Unido. Neste caso, o vírus latente é ativado quando os insetos infectados são alimentados com um outro vírus intimamente relacionado como, por exemplo, o AcMNPV. Análises por PCR identificaram sequências de genes do MbNPV que foram ativadas em todas as fases do inseto, incluindo ovos, lagartas, pupas e adultos (Burden et al., 2006).

A PCR também tem demonstrado um grande potencial na identificação de baculovírus, por meio da extração de DNA do vírus diretamente de lagartas infectadas ou de formulações comerciais e que são usados como molde em reações de PCR. A técnica envolve o uso de pares de primers homólogos ao DNA molde, desenhados para a amplificação de uma determinada região do genoma. As condições de PCR são então otimizadas para cada gene a ser amplificado (Burden et al., 2006).

Evolutivamente, alguns obstáculos tiveram que ser superados de modo a permitir que os baculovírus infectassem com sucesso os lepidópteros. Primeiro, eles tiveram que desenvolver um método de infecção efetivo. Normalmente, os baculovírus infectam lepidópteros por meio do trato digestivo. Ao ingerirem alimentos contaminados com baculovírus, estes atingem o intestino através de células que não apresentam superfície quitinosa e resistente. Segundo, os lepidópteros tiveram que

desenvolver um método de persistência para que pudessem sobreviver aos intervalos entre os ciclos da população de seus hospedeiros. Terceiro, eles tiveram que sobreviver no intestino médio de insetos, uma vez que este atinge um dos mais altos níveis de pH registrados na natureza. Na entrada e saída do intestino médio, o pH é próximo de 7,0. No entanto, na região central, os níveis são mais elevados, chegando o pH a 9,0 (Dow, 1992).

A infecção de insetos requer que os virions ocluídos possam ser liberados a partir da matriz protéica e isso é feito pelas condições alcalinas encontradas no intestino médio. Para iniciar a infecção sob estas condições, precisa-se de uma tarefa altamente especializada e muitas das proteínas envolvidas neste processo são conservadas, não só na família Baculoviridae. Muitos dos que são considerados os mais primitivos baculovírus parecem limitar a infecção das células do intestino. No entanto, quando limitada a este tecido, o seu potencial reprodutivo é reduzido, porque eles não têm acesso a uma infecção sistêmica, em particular, para as células do corpo gorduroso que compõem o principal órgão metabólico das lagartas de lepidópteros (Rohrmann, 2008).

2.8. Formas de transmissão de BmNPV

O BmNPV possui fácil disseminação e alto poder infectivo. Existem duas formas de transmissão deste patógeno que pode envolver tanto indivíduos da fase jovem quanto da fase adulta de *B. mori*: a transmissão horizontal e a vertical.

Na transmissão horizontal, os patógenos são transmitidos entre os indivíduos dentro de uma geração de inseto para inseto, enquanto a transmissão vertical ocorre a partir dos pais para os filhos (Andreadis, 1987). Na transmissão vertical tem-se a transmissão transovariana, da mãe para os filhos, e a transmissão venérea, do pai para os filhos (Khurad et al., 2004).

Mesmo tomando-se todas as medidas de prevenção da doença causada pelo BmNPV, observou-se uma alta incidência de infecção em lagartas. Kukan (1996) provou que o vírus poderia ser transmitido da mãe para a progênie de lepidópteros e pode ser encontrado em lagartas criadas a partir da superfície descontaminada de ovos, com formol, por exemplo.

Khurad et al. (2004) buscaram determinar a transmissibilidade de BmNPV dos pais para progênie, que é uma das condições mais importantes para a indústria sericícola, indicando que a transmissão vertical ocorre e desta forma sendo

desfavorável o uso de lagartas sobreviventes à doença amarelidão para a produção de ovos.

Atualmente, ovos livres de doenças de raças do bicho-da-seda são utilizados na sericicultura. As mariposas fêmeas são inspecionadas após a oviposição e, se estiverem infectadas, todos os seus ovos são descartados. Para alguns patógenos, a descontaminação da superfície do ovo com formaldeído foi citada como sendo particularmente importante para evitar a transmissão transovariana de *nucleopolyhedrovirus* não apenas em *B. mori* (Krishnaswami et al., 1979), mas também na criação de alguns insetos-praga (Henneberry e Kishaba, 1966).

Durante a criação, outras medidas preventivas como o uso de desinfetantes, a remoção de insetos doentes, limpeza geral e técnicas de saneamento defendidas por Krishnaswami et al. (1979) são utilizadas pelos sericultores e pesquisadores.

2.9. Métodos de detecção do nucleopoliedrovírus

Diversos são os métodos possíveis para detecção do nucleopoliedrovírus em bicho-da-seda. Kaewwises (2006) descreve e discute alguns métodos, dentre estes, a detecção via microscopia, onde os corpos de oclusão podem ser vistos e assim pode ser detectada a doença; pelo teste ELISA (ensaio imunoenzimático), que pode detectar baixa concentração do vírus, neste método os resultados podem ser facilmente visualizados a partir de mudança de cor e tem se provado ser um método sensível e confiável para a detecção da doença (Vanapruk et al., 1992); pelo método de imunofluorescência, onde um anticorpo fluorescente é utilizado e uma fluorescência é detectada no citoplasma de células infectadas, o que sugere que as proteínas do corpo de oclusão são sintetizados no citoplasma (Krywienczyk, 1963); a técnica de PCR (Burand et al., 1992; Faktor e Raviv, 1996; Otta et al., 2003; Ikuno et al., 2004; Khumnoi, 2007; Galal, 2009), entre outras.

Vários avanços na biologia molecular disponibilizam muitas técnicas mais aprimoradas e práticas para realizar a detecção de baculovírus. Muitos métodos são baseados na detecção do ácido nucléico do agente causador da doença. A utilização do método de PCR foi adaptada para a detecção do DNA viral em vários insetos infectados (Faktor e Raviv, 1996; Otta et al., 2003). Além disso, a técnica de PCR já foi utilizada para detectar sequências de DNA de baculovírus que contaminam a superfície dos ovos do bicho-da-seda. Ovos colocados por mariposas artificialmente infectadas foram usadas para demonstrar a detecção do BmNPV por

PCR. Os resultados revelaram que o DNA de BmNPV pode ser detectado quando se utiliza até mesmo uma amostra pequena de ovos (Burand et al., 1992).

Webb et al. (1991) relataram o uso da PCR para detectar a expressão de clones recombinantes de baculovírus em culturas de células. Burand et al. (1992) detectaram sequências de DNA de baculovírus presentes na superfície de ovos contaminados colocados por mariposas ciganas (*Lymantria dispar*). Galal (2009), utilizando um par de primers, realizou a detecção rápida de nucleopoliedrovírus em várias espécies através da PCR.

Charpentier et al. (2003) usou três sondas de DNA específicas para a detecção de NPV no genoma de mariposa cigana, onde uma dessas sondas foi obtida por PCR. Usando uma combinação de hibridização e de PCR, a contaminação de ovos destas mariposas foi detectada.

Kaewwises et al. (2004) desenvolveram um método baseado em PCR para a detecção precoce de NPV em *B. mori*, na Tailândia, com base na presença do gene da poliedrina em bichos-da-seda contaminados. A PCR podia detectar o gene em todas as fases do bicho-da-seda. O método foi suficientemente sensível para se visualizar o gene da poliedrina em apenas um indivíduo infectado com NPV. Em fases de pupa e adultos, o gene foi detectado tanto em machos infectados como também em fêmeas. Relatos anteriores revelaram outros métodos para a identificação de BmNPV em todos os estágios de desenvolvimento como, por exemplo, sondas de DNA (Attathom et al., 1994), no entanto esses métodos são mais sofisticados.

2.10. Aspectos genéticos de BmNPV

O genoma do NPV linhagem T3 que infecta *Bombyx mori* já foi totalmente sequenciado e analisado. Este genoma possui 128.413 nucleotídeos no qual há 40% de guanina e citosina e 136 quadros de leitura aberta (ORFs). Embora fenotipicamente diferentes, a organização do genoma de BmNPV e AcMNPV estão intimamente relacionados. A quantidade de aminoácidos correspondentes entre BmNPV e AcMNPV é de 90% (Gomi et al., 1999).

Santos et al. (2010) amplificaram, clonaram e sequenciaram as ORFs 10 e 14 de BmNPV. A análise dos nucleótídeos destes genes com a de outros baculovirus mostraram que estes são altamente conservados. A proteína p10 da ORF10 de BmNPV tem 70 aminoácidos semelhantes a de quatro outras linhagens

conhecidas de BmNPV. O alinhamento da ORF14 de BmNPV mostrou uma maior identidade com o *nucleopolyhedrovirus* da ORF14 do baculovírus BmNPV e de *Autographa californica*. Uma análise filogenética demonstrou que a proteína da ORF14 de BmNPV tem grande similaridade com a ORF14 do BmNPV e com a ORF23 de *A. californica*. As proteínas produzidas pelas ORFs 10 e 14 de BmNPV são altamente conservadas, indicando a importância destas proteínas durante todo o ciclo de infecção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Foram utilizadas 20 matrizes de *B. mori* do banco de germoplasma da UEM (Quadro 1):

Quadro 1 - Matrizes de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá, de acordo com a origem geográfica

Linhagem/matriz/raça	Origem geográfica
C211	China
C24	China
C25	China
AS3	China
C75	China
C36	China
KR01	China
B82	Índia
Hindu	Índia
B106	Índia
M11	Japão
M11-A	Japão
M11-2	Japão
M12-2	Japão
M18-2	Japão
J1	Japão
F6	Japão
M8	Japão
M18	Japão
E8	Japão

Após a eclosão dos ovos, as lagartas foram criadas em caixas plásticas, alimentadas com folhas frescas de amoreira, três vezes ao dia, em sala com controle de umidade e temperatura, simulando as condições nos barracões de criação.

O período larval dura em média 27 dias. No final do quinto instar, teve início a confecção do casulo, quando as pupas completaram seu desenvolvimento e emergiram as mariposas.

3.2. Extração de DNA genômico

Seis mariposas fêmeas de cada matriz do banco de germoplasma da UEM foram coletadas e maceradas individualmente em cadinho previamente resfriado no

freezer a -20°C. O DNA genômico foi extraído, de acordo com o protocolo de Monesi et al. (1998) com algumas modificações. Foram utilizados posteriormente 50ng de cada DNA para compor os *pools* gênicos de cada matriz. O DNA foi purificado com fenol-clorofórmio, precipitado com etanol, ressuspenso em tampão TE (10 mM, Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20 °C.

Para investigar a ocorrência da transmissão vertical do baculovírus BmNPV, foram extraídos DNAs de mariposas fêmeas e de machos previamente identificados e cruzados, obtendo-se ovos destes casais para a realização da extração de DNA.

3.3. Obtenção de DNA genômico de BmNPV

O DNA viral foi obtido por Santos et al. (2010), no Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (LORF) da UEM por meio do isolado geográfico do BmNPV cedido pelas professoras Dra. Rosemeire Costa Brancalhão e Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, ambas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). Este DNA foi utilizado como controle positivo das reações de PCR. Os autores utilizaram para a obtenção do DNA do BmNPV o protocolo de Yang et al. (1997) com algumas modificações.

3.4. Extração de DNA de ovos de *Bombyx mori*

O DNA foi extraído a partir de ovos dos bichos-da-seda do banco de germoplasma da UEM, utilizando o método de KOH modificado (Takahashi et al., 1925; Hatakeyama e Hayasaka, 2003). Os ovos foram contados e transferidos para microtubos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de KOH 60%. As amostras foram deixadas no shaker por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente até que a cor dos ovos mudasse para vermelha. Após a mudança de cor, o KOH foi removido e os ovos dos bichos-da-seda foram lavados duas vezes com 500 µL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 500 µL de HCl 1M para evitar a formação de sais de neutralização e o HCl foi retirado. Em seguida, os ovos foram lavados novamente duas vezes com água destilada.

Posteriormente, adicionou-se tampão para digestão para Proteinase K (1M Tris HCl pH 9,0; 0,5 M EDTA pH 8,0; SDS 20% e Sacarose 16%) e macerou-se com pistilo dentro do microtubo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante foi recuperado, sendo posteriormente adicionada

proteínase K. As amostras foram deixadas no shaker por 2 horas a 50°C. Após, o DNA foi purificado com fenol-clorofórmio, precipitado com etanol, ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a -20 °C.

3.5. Amplificação do DNA do BmNPV

Para amplificação do DNA do BmNPV por PCR, foram desenhados primers sintetizados pela empresa Alpha DNA, utilizando sequências conhecidas do genoma deste baculovírus (Gomi et al., 1999). Segundo Santos et al. (2010), o quadro de leitura aberta 14 (ORF 14) codifica uma proteína que se localiza no envelope viral do NPV e está associada à resposta ao stress, como a causada pela infecção do baculovirus nas células alvo de *B. mori*. Um par de primers para o gene da Actina A3 de *B. mori* foi utilizado para comprovar que o DNA que estava sendo utilizado nas amplificações com os primers da ORF 14 era de *B. mori* e que a reação de amplificação era possível. Os primers, suas respectivas sequências e o tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb) estão listados no Quadro 2.

Quadro 2 - Sequências dos primers *utilizados* para a amplificação da ORF 14 do BmNPV e da Actina A3, segundo Santos et al. (2010)

Primer	Sequência do primer	Pares de base (pb)
ORF 14 Forward	ATGGACGGTGTAAGTTGCTGG	443
ORF 14 Reverse	TCAAATCAACGCCGTCGTC	
Actina Forward	AGATGACCAGATCATGTTCCG	721
Actina Reverse	GAGATCCACATCTGTTGGAAG	

A ORF14 possui 2022 pb (compreende do nucleotídeo 13586 até 15607 do genoma do BmNPV, Genbank: NC_001962.1). O primer *Forward* desta ORF se liga do nucleotídeo 13586 ao 13607 e o primer *Reverse*, do nucleotídeo 14009 ao 14028. A Actina A3 possui 4035 pb (Genbank: U49854). O primer *Forward* desta se liga do nucleotídeo 2880 ao 2900, enquanto o primer *Reverse* se liga do nucleotídeo 3580 ao 3600.

A amplificação foi realizada em um mix de reação de 15 µL, contendo tampão de *Taq* polimerase 1X (Biolabs), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP e 1 U de *Taq* DNA polimerase (Biolabs) com 20 ng do DNA genômico e 1,2 µM de cada primer, em termociclador Mastercycler gradiente (Eppendorf), sendo repetidas no mínimo duas vezes. As condições térmicas para amplificação estão descritas no Quadro 3.

Além das reações de amplificação utilizando-se os primers para ORF14 ou actina individualmente, foram também realizadas algumas PCRs multiplex com ambos os pares de primers da actina e da ORF 14 na mesma reação.

Quadro 3 - Condições térmicas para amplificação de todos os primers utilizados

Fase do PCR	Temperatura/tempo	Nº de ciclos
Temperatura inicial-denaturação do DNA	94°C / 5 min.	
Denaturação	94°C / 1 min.	
Temperatura de anelamento	61°C / 1 min.	35
Extensão ou amplificação do DNA	72°C / 1 min.	
Extensão final	72°C /30 min.	

3.6. Eletroforese

Os produtos da reação de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% em um sistema horizontal utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (45 mM Tris-borato; 1 mM EDTA, pH 8.0). Após a migração, os géis foram fotografados sob luz U.V. e documentados utilizando-se o sistema de fotodocumentação UVP *Biolmaging System*. Os resultados foram analisados através da presença e ausência de bandas. Os padrões de tamanho molecular utilizados foram o 100pb da Biolabs e 100pb da Invitrogen. O isolado geográfico do BmNPV foi cedido pelas professoras Rosemeire Costa Brancalhão e Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e foi utilizado como controle positivo das reações.

3.7. Clonagem e sequenciamento

Para confirmar que o fragmento de 443pb gerado pelo par de primers da ORF 14 era realmente de BmNPV, foi realizado a clonagem e o sequenciamento de um destes fragmentos pertencente a uma mariposa da raça C25.

O produto de PCR (443 pb) do indivíduo da raça C25 foi clonado em vetor de clonagem pGEM - T Easy Vector System (Promega) e inserido por meio de transformação por choque térmico na bactéria *Escherichia coli* cepa *DH5a*. Os plasmídeos recombinantes foram obtidos com o kit de extração *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante, e uma alíquota do

material obtido por meio deste procedimento foi clivado com *EcoRI* para a confirmação dos clones.

A reação de sequenciamento foi realizada a partir do produto de PCR e as amostras foram amplificadas com o Kit DyEnamic ET Dye Terminator (Amersham Bioscience) seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado 150ng do produto de PCR, 10 pMol de *primer*, 4 µL de ET Dye Terminator e água ultrapura para completar 10 µL de reação. Os ciclos foram realizados em termociclador Eppendorf Gradient, a 94°C, por 15 segundos. A temperatura de anelamento foi a mesma usada para a primeira reação por 15 segundos e a extensão de 60°C, por 15 segundos, sendo repetido esse ciclo por 25 vezes. O produto resultante desta amplificação foi precipitado com acetato de amônio 7,5 M e etanol.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático MegaBACE 1000, seguindo o protocolo do fabricante. O alinhamento da sequência obtida e a verificação da homologia e identidade foram obtidos mediante a utilização das ferramentas online EMBL e Blastn do NCBI, comparando-se com os bancos de dados biológicos disponíveis.

3.8. Validação dos dados

A amplificação foi realizada utilizando o par de primers da ORF 14 para a confirmação da contaminação pelo BmNPV ou não das amostras e o par de primers da Actina para controle da reação e do DNA utilizado.

A validação foi realizada com a utilização de controle positivo (amostra de DNA do vírus) e controle negativo (amostra controle). Uma das amostras positivas, ou seja, com a banda de contaminação, foi clonada e sequenciada para confirmação de que o fragmento amplificado correspondia ao BmNPV, como descrito no item 3.7.

4. RESULTADOS E DISCUSÃO

4.1. Identificação de raças do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá contaminadas por BmNPV

Foram realizadas amplificações mediante a utilização de PCR multiplex, utilizando ao mesmo tempo os primers específicos para a ORF 14 e os primers específicos para a actina de *B. mori*. Todos os DNAs das mariposas do banco de germoplasma da UEM amplificados por meio da PCR multiplex apresentaram a banda de 721pb, comprovando que o DNA amplificado era de *B. mori*.

Os resultados permitiram estimar o número de mariposas contaminadas em cada uma das 20 raças do banco de germoplasma da UEM.

As raças B82, M11-2, M18, C36 e F6 não apresentaram a banda de 443pb que indica a presença do baculovírus, demonstrando que estas raças estão livres de contaminação (Figura 4). Esta afirmação pode ser inferida pela amostra de seis mariposas de cada raça.

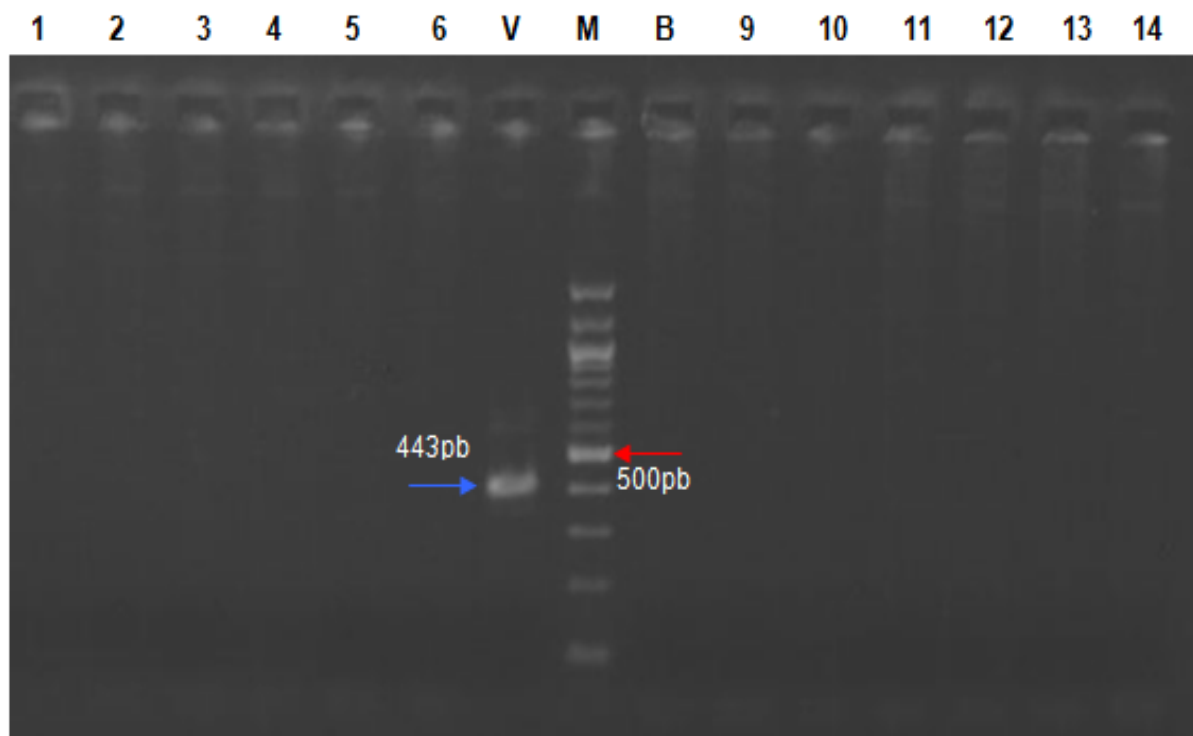


Figura 4 - Produtos de PCR de mariposas sem contaminação pelo vírus BmNPV com os primers da ORF 14. Raias 1 a 6 - Raça B82; V - DNA do vírus BmNPV (controle positivo); B - Controle negativo; M - Marcador de tamanho molecular 100pb Biolabs; Raias 9 a 14 - Raça M11-2. Gel de agarose 1,5%.

As mariposas das raças que foram identificadas como livres de contaminação apresentaram apenas a amplificação do fragmento de 721pb (Figura 5).

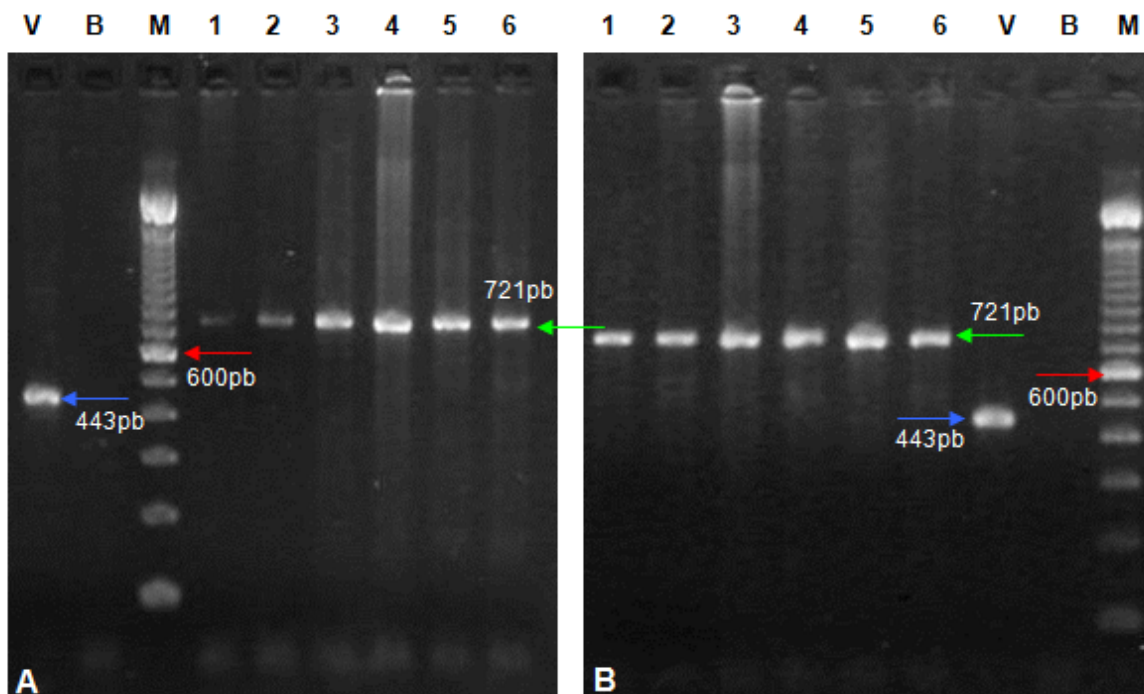


Figura 5 - Produtos de PCR multiplex de mariposas sem contaminação. V - DNA do vírus BmNPV (controle positivo); B - Controle negativo; M - Marcador de tamanho molecular 100pb Invitrogen. A = Raias 1 a 6 - Raça M18; B = Raias 1 a 6 - Raça C36. Gel de agarose 1,5%.

Dos vinte *pools* gênicos (DNA de seis mariposas de bicho-da-seda homogeneizados) que foram analisados, quinze apresentaram a banda de aproximadamente 443pb, indicando a presença do vírus BmNPV nestes insetos. Na Figura 6, são apresentados os resultados de 8 dessas amostras. A frequência de mariposas infectadas dentre os quinze *pools* gênicos identificados como contaminados foi investigada mediante ampliações individuais do DNA de mariposas de cada linhagem. A frequência de mariposas contaminadas foi: 100% de contaminação para as raças M18-2, M12-2 e J1; 83% para C25, C75, e C24; 66% para KR01; 50% para M11-A; 33% para AS3, B106, M8 e M11 de contaminação e 16% para a raça C211, E8 e Hindu (Figura 7).

Mariposas contaminadas apresentaram na PCR multiplex a banda de 721pb e a de 443pb (Figura 9).

Foi verificado elevado número de mariposas contaminadas pelo BmNPV, acima de 50%, no banco de germoplasma da UEM (M18-2, M12-2, J1, C25, C75,

C24, KR01 e M11-A). Esta taxa reflete a alta infestação deste patógeno dentre os espécimes do banco de germoplasma. Vários podem ser os motivos que levaram a estes elevados índices de contaminação, tais como a ausência de desinfecção com formol dos ovos e das instalações de criação, manejo inadequado de amoreiras e lagartas e ainda a transmissão vertical durante o processo de manutenção e multiplicação do acervo genético.

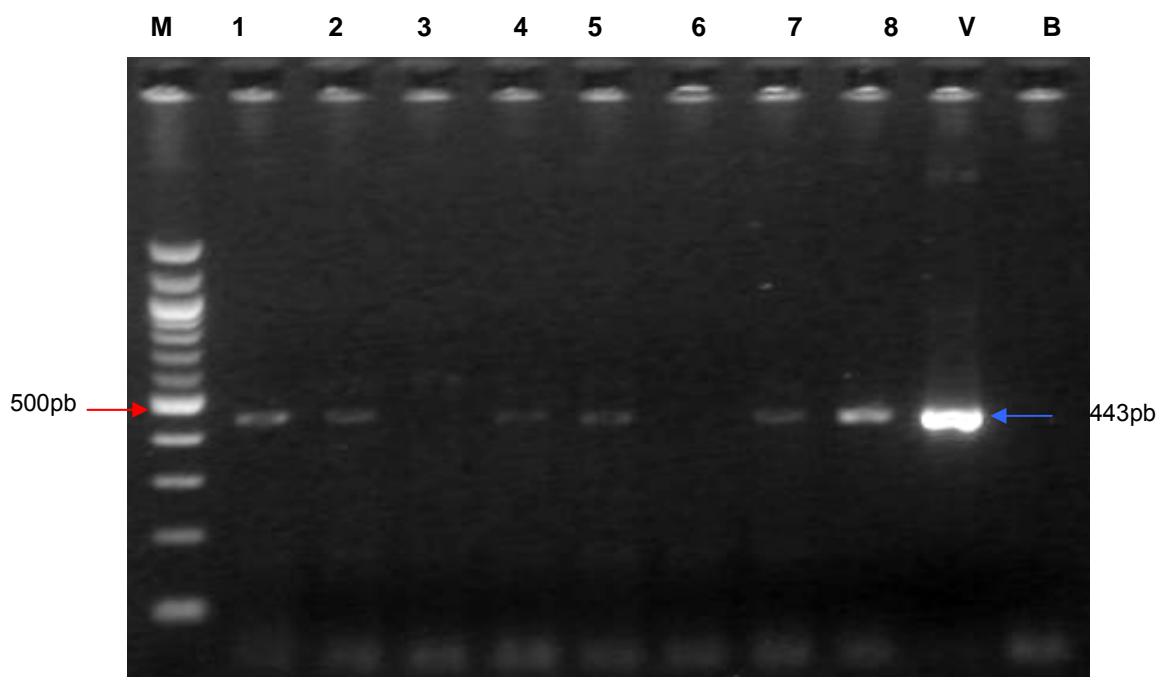


Figura 6 - *Pools* gênicos contaminados detectados através da amplificação com primers da ORF 14. M - Marcador de tamanho molecular 100pb Biolabs; Raia 1 - Raça M18-2; Raia 2 - Raça M12-2; Raia 3 - Raça B82; Raia 4 - Raça M11-A; Raia 5 - Raça B106; Raia 6 - Raça M11-2; Raia 7 - Raça C24; Raia 8 - Raça C25; V - DNA do vírus BmNPV (controle positivo); B - Controle negativo. Gel de agarose 1,5%.

Um banco de germoplasma pode ser definido como uma unidade conservadora de material genético. A manutenção e multiplicação das raças de bicho-da-seda são fundamentais para a preservação da espécie e para sua exploração comercial. Deve-se tomar a precaução de manter as raças com suas características originais e manter as condições sanitárias a fim de preservar o estoque genético e mantê-los sem a infecção pelo vírus (Basavaraja et al., 2005).

Durante o processo de manutenção do banco de germoplasma de bicho-da-seda da UEM, os ovos são incubados em baixas temperaturas e descontaminados com formol antes do tratamento químico com ácido clorídrico para quebra de sua

diapausa. Somente para os experimentos desta dissertação, não se procedeu a desinfecção dos ovos, visando o estudo da contaminação e transmissão vertical do baculovírus. As instalações de criação nem sempre podem ser desinfectadas adequadamente, pois muitas vezes as lagartas das raças vêm sendo criadas em salas de criação dentro do próprio laboratório onde seria inviável o procedimento da utilização do formol 3% como agente profiláticos no combate ao BmNPV.

É extremamente importante realizar a detecção da contaminação por BmNPV em todas as fases de desenvolvimento do bicho-da-seda para não ocorrer a disseminação desta doença entre estes insetos e assim haver o risco da perda de raças dos bancos de germoplasmas existentes. Realizamos a detecção em mariposas do banco de germoplasma da UEM para verificar o nível de infestação do vírus entre as raças presentes neste e assim evitar transmissões verticais deste baculovírus. Os ovos de mariposas detectadas como contaminadas foram descartados para não haver riscos de perder raças valiosas existentes no respectivo banco. Ovos de mariposas infectadas, ao eclodirem, poderão passar a doença para outras lagartas saudáveis e, portanto, o descarte de todos estes ovos deve ser realizado.

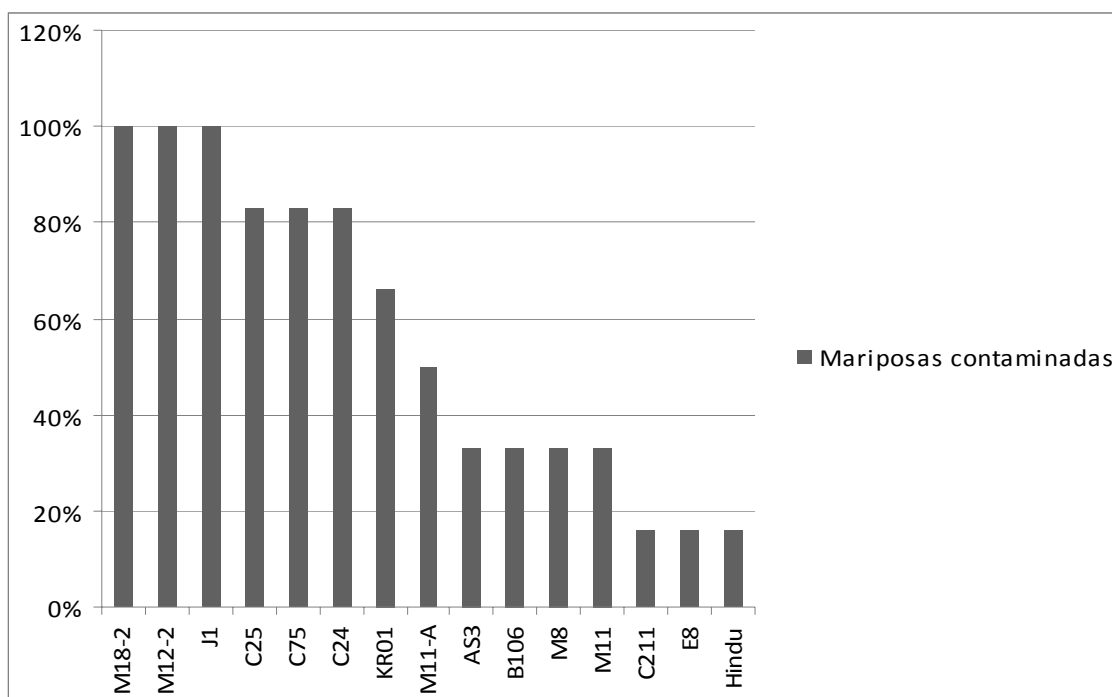


Figura 7 - Frequência de mariposas contaminadas pelo BmNPV das raças M18-2, M12-2, J1, C25, C75, C24; KR01;M11-A; AS3, B106, M8, M11, C211, E8 e Hindu.

As Figuras 8 e 9 apresentam os resultados para as raças M18-2, B106, C211 e M8, C211, J1 e KR01, respectivamente.

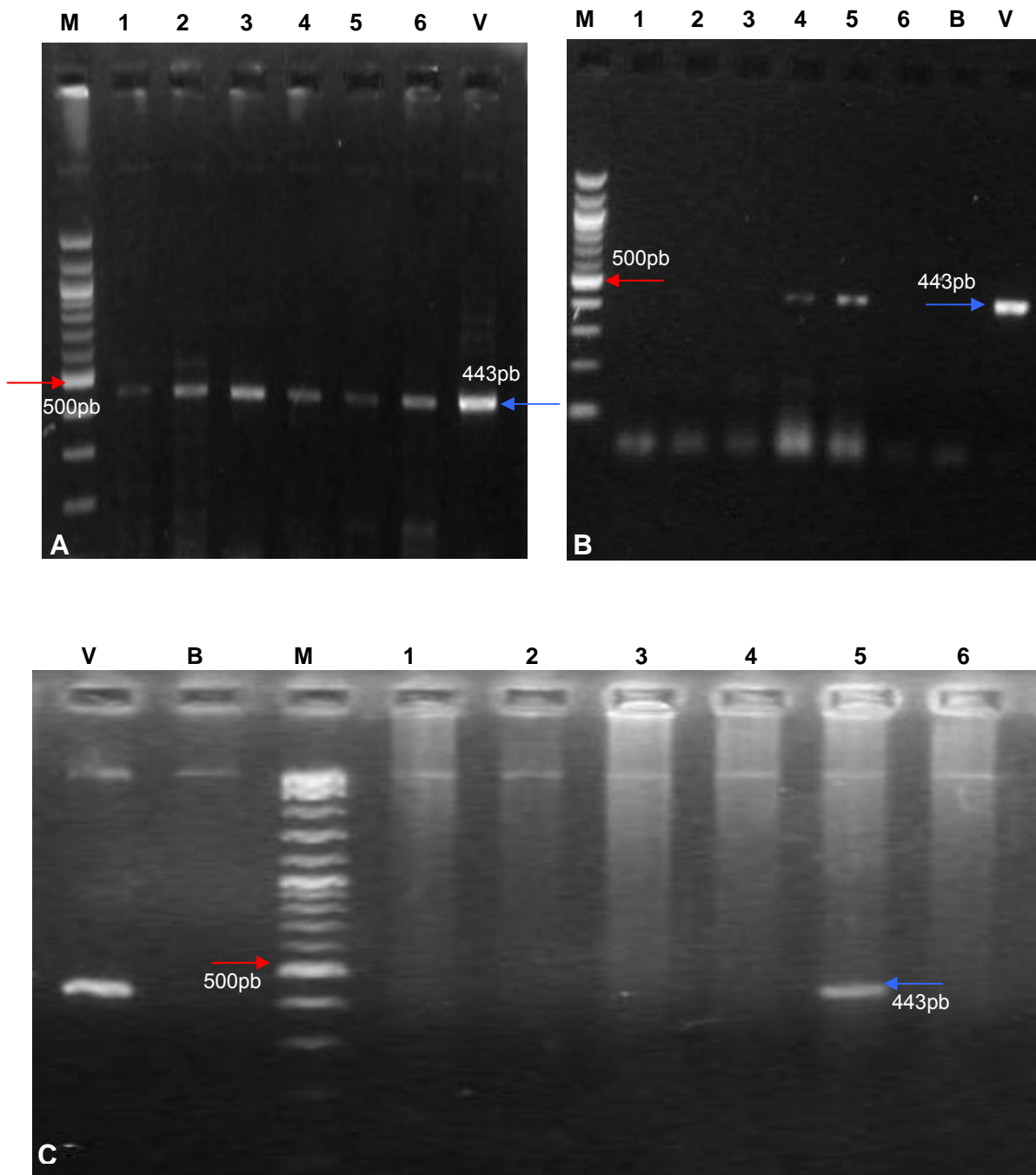


Figura 8 - Produtos de PCR de mariposas contaminadas pelo vírus BmNPV realizada com os primers da ORF 14. M – Marcador de tamanho molecular 100pb Biolabs; V - DNA do vírus BmNPV (controle positivo); B - Controle negativo. A = Raias 1 a 6 - Raça M18-2; B = Raias 1 a 6 - Raça B106, apresentando contaminação apenas nas raias 4 e 5; C = Raias 1 a 6 - Raça C211 apresentando contaminação apenas na raia 5. Gel de agarose 1,5%.

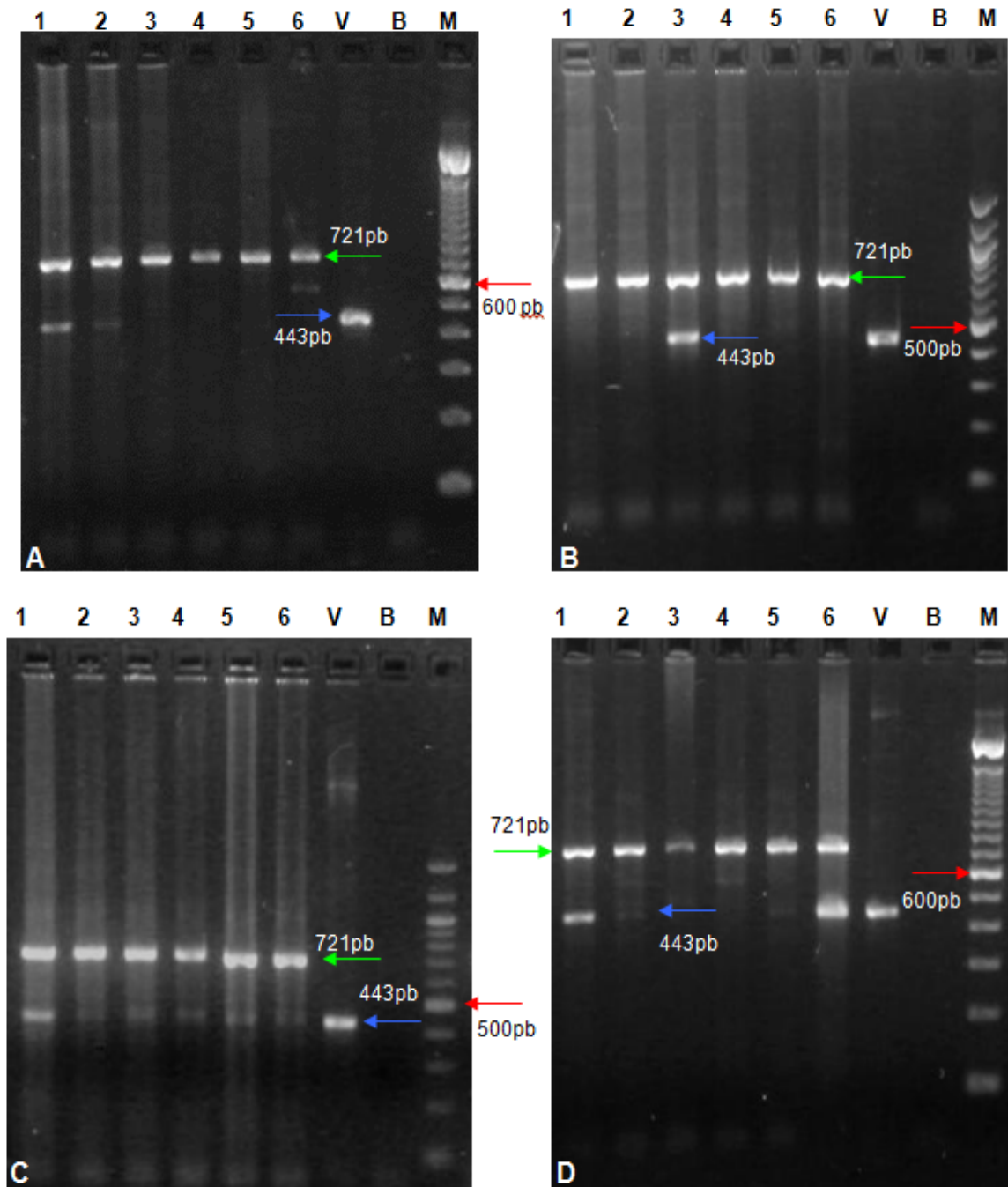


Figura 9 - Produtos de PCR multiplex de mariposas contaminadas pelo vírus BmNPV. M - Marcador de tamanho molecular 100pb Invitrogen (A e D) e Biolabs (B e C); V - DNA do vírus BmNPV (controle positivo); B - Controle negativo. A = Raias 1 a 6 - Raça M8 apresentando contaminação nas raias 1 e 2; B = Raias 1 a 6 - Raça C211 apresentando contaminação apenas na raia 3; C = Raias 1 a 6 - Raça J1 toda contaminada; D = Raça KR01 apresentando contaminação nas raias 1, 2, 5 e 6. Gel de agarose 1,5%.

Vários avanços na biologia molecular disponibilizam muitas técnicas mais aprimoradas e práticas para realizar a detecção de baculovírus. Muitos métodos são

baseados na detecção do ácido nucléico do agente causador da doença. A utilização do método de PCR foi adaptado para a detecção do DNA viral em vários insetos infectados (Faktor e Raviv, 1996; Otta et al., 2003).

A técnica de PCR foi escolhida para a detecção neste trabalho por já ter sido comprovada como eficaz na detecção da infecção por BmNPV em outros trabalhos, além de ser eficaz, rápida, confiável e prática.

Os resultados do presente trabalho concordam com os trabalhos Khurad et al. (2004) e Kaewwises et al. (2004), que detectaram a infecção de BmNPV em mariposas adultas de bichos-da-seda, por meio da PCR, utilizando primers específicos para a detecção deste baculovírus.

Um bom conjunto de primers para a identificação do nucleopoliedrovírus é uma poderosa ferramenta para grandes *screenings* de amostras que estão contaminadas com esse patógeno (Galal, 2009).

O presente e os demais trabalhos encontrados na literatura fornecem evidências de que a PCR é uma ferramenta eficiente para a detecção de BmNPV em mariposas de *B. mori*. Por meio desta técnica, é possível a identificação da doença conhecida como amarelidão, evitando que esta doença se espalhe por toda a criação dos bichos-da-seda.

No caso de bancos de germoplasmas, esta metodologia poderá auxiliar na erradicação de mariposas contaminadas que podem perpetuar o baculovírus colocando em risco o acervo genético. É importante ressaltar que, para diminuir o risco de contaminação em massa, outros cuidados com o manejo são essenciais.

4.2. Clonagem e sequenciamento da ORF 14

Para verificar se os fragmentos que estavam sendo gerados após a amplificação mediante a utilização de primers específicos para a ORF 14 eram do BmNPV, um fragmento de DNA amplificado da raça C25 foi clonado e sequenciado. O DNA desta raça foi escolhido, pois apresentou a banda de aproximadamente 443pb igual a do controle positivo das reações (DNA do vírus amplificado com os primers da ORF 14).

O produto amplificado por meio de PCR referente à região da ORF 14 do baculovírus da raça C25 foi clonado e, após a confirmação da clonagem através da clivagem com a enzima *EcoRI* (Figura 10), os clones positivos foram sequenciados.

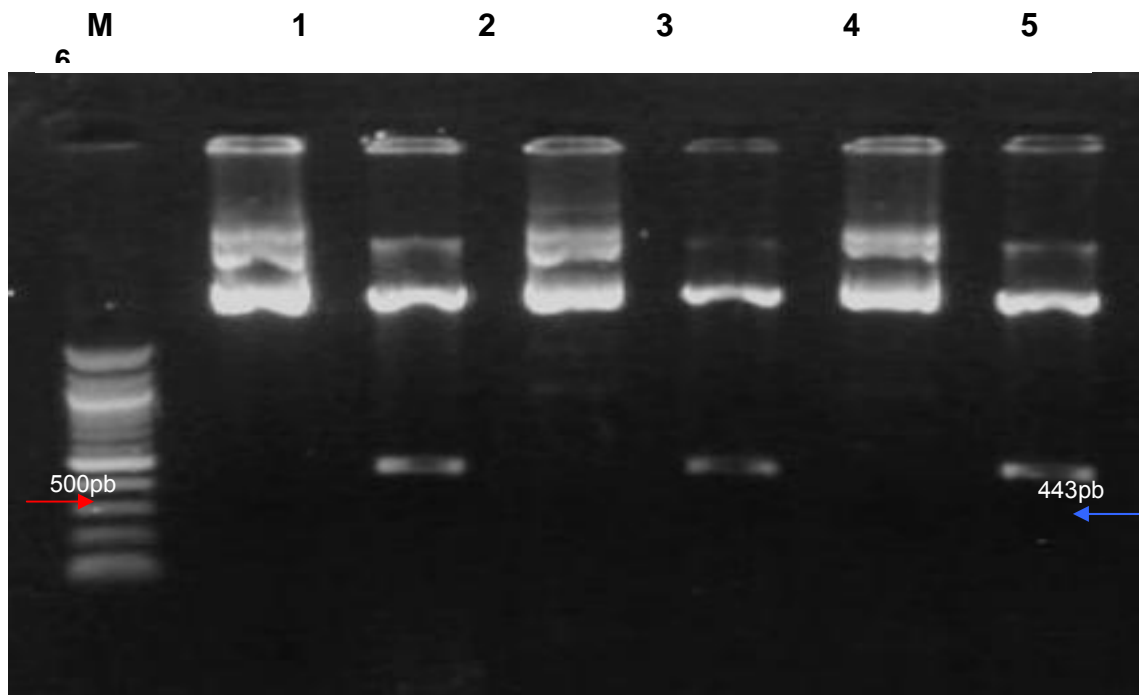


Figura 10 - Clivagem com *EcoRI* para confirmação da clonagem do fragmento gerado pela ORF 14 de BmNPV.

O alinhamento ClustalW das sequências nucleotídicas pertencentes ao fragmento da mariposa da raça C25 e a ORF 14 do BmNPV (Figura 11) foi comparado com outras sequencias depositadas no *Genbank* e realizadas com o auxílio do BLAST (Altschul et al., 1990), revelando que esta sequência do BmNPV apresenta 100% de identidade com o BmNPV, isolado T3 (Figura 12) e 99% de identidade com a ORF 23 de *Autographa californica* MNPV, cujo produto está relacionado a uma proteína de envelope viral (Gomi et al., 1999).

>BmNPVC/CidaPlaca180310newRun03_Cp312_MD1/F03.esd 648 MegaBACE

```

ATGGACGGTGTAAGTTGCTGGGGACGTGCGCGCTAATAATTTTGTATCGACGACGAA
TACAGTTGTCGGTCGTGACCGTATCACGTTTACGCCGATAGAAGATAGCGCAGGCCTC
GTGTTTGAACGCATGTACGGTTTGCACATCATAACAGACGAAAGATTTGTGTTTGTGAAA
AAATTCAATTTTGTCTTCGGTGCTGCAAGAGCTCAATAATATCAAATCTAAAATTGAATTAT
ATGAAGCGCAAGTTTTCGACTTGCAAAAACGTCAGACAAATAAAACAAAACAGATCGAGT
AACATCAAAACCCGCATTGAAAAGCAGCTGCAGTTTTTTGACGCCGCTTAACAAAATTTTC
ATCACATACTCTGTGGAAGACAGCATTTC AAGCAACGAAGTGCTGGACAACATCGATTT
GGAATATGACGACGGCGTTGATTTTGA

```

Figura 11 - Resultado do sequenciamento gerado após a confirmação da clonagem do fragmento gerado com a amplificação com os primers da ORF 14.

A sequência nucleotídica pertencente à raça C25 e à ORF 14 do BmNPV (Figura 11) foi comparada com outras sequências que estão depositadas no *Genbank* com o auxílio do BLAST (Altshul et al., 1990). O alinhamento ClustalW revelou que a sequência do BmNPV apresentou 100% de identidade com o BmNPV, isolado T3 (Figura 12) e 99% de identidade com a ORF 23 de *Autographa californica* MNPV cujo produto esta relacionado a uma proteína de envelope viral (Gomi et al., 1999).

```
> gb|L39180.1|NPHT3COMP Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus isolate T3,
complete genome
Length=128413

Score = 800 bits (886), Expect = 0.0
Identities = 443/443 (100%), Gaps = 0/443 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      ATGGACGGTGTAAAGTTGCTGGGGACGTGCGCGCTAATAATTTTGTATCGACGACGAAT 60
            |||
Sbjct 13586   ATGGACGGTGTAAAGTTGCTGGGGACGTGCGCGCTAATAATTTTGTATCGACGACGAAT 13645

Query 61     ACAGTTGTCGGTTCGT GACCGTATCACGTTTACGCCGATAGAAGATAGCGCAGGCCTCGTG 120
            |||
Sbjct 13646   ACAGTTGTCGGTTCGT GACCGTATCACGTTTACGCCGATAGAAGATAGCGCAGGCCTCGTG 13705

Query 121    TTTGAACGCATGTACGGTTTGCAGACATCATAACAGCAGAAAGATTTGTGTTTGTGAAAAA 180
            |||
Sbjct 13706   TTTGAACGCATGTACGGTTTGCAGACATCATAACAGCAGAAAGATTTGTGTTTGTGAAAAA 13765

Query 181    TTCAATTTTGCTTCGCTGCTGCAAGAGCTCAATAATATCAAATCTAAAATTGAATTATAT 240
            |||
Sbjct 13766   TTCAATTTTGCTTCGCTGCTGCAAGAGCTCAATAATATCAAATCTAAAATTGAATTATAT 13825

Query 241    GAAGCGCAAGTTTCGACTTGCAAAAACGTCAGACAAATAAAAACAAAACAGATCGAGTAAC 300
            |||
Sbjct 13826   GAAGCGCAAGTTTCGACTTGCAAAAACGTCAGACAAATAAAAACAAAACAGATCGAGTAAC 13885

Query 301    ATCAAAACCCGCATT GAAAAGCAGCTGCAGTTTTTGACGCCGCTTAACAAAATTTTCATC 360
            |||
Sbjct 13886   ATCAAAACCCGCATT GAAAAGCAGCTGCAGTTTTTGACGCCGCTTAACAAAATTTTCATC 13945

Query 361    ACATACTCTGTGGAA GACAGCATTTCAGCAACGAAGTCTGGACAACATCGATTTGGAA 420
            |||
Sbjct 13946   ACATACTCTGTGGAA GACAGCATTTCAGCAACGAAGTCTGGACAACATCGATTTGGAA 14005

Query 421    TATGACGACGGCGTT GATTTTGA 443
            |||
Sbjct 14006   TATGACGACGGCGTT GATTTTGA 14028
```

Figura 12 - Alinhamento do resultado do sequenciamento da ORF 14 (Query) com a sequência do BmNPV, isolado T3 (Sbjct).

4.3 Investigação da transmissão vertical de BmNPV

Em alguns casos, a amplificação do DNA de ovos de bichos-da-seda oriundos de mariposas detectadas como contaminadas pelo BmNPV (Figura 13) mostrou que pode ter ocorrido a transmissão vertical, mas os resultados obtidos no presente trabalho não são conclusivos. Kaewwises (2006) detectou a presença de BmNPV em ovos de *B. mori* por meio de PCR, utilizando primers específicos para o

gene da poliedrina, onde os ovos analisados eram derivados de mariposas que foram infectadas artificialmente durante a fase larval.

No caso do presente trabalho, as lagartas não foram infectadas experimentalmente. Foi realizado um *screening* das mariposas pertencentes ao banco de germoplasma da UEM que podiam estar ou não naturalmente contaminadas. Para esta varredura, foram investigadas se as mariposas estavam contaminadas e, se o resultado fosse positivo, os ovos de suas respectivas posturas teriam seu DNA extraído, sendo posteriormente realizada a amplificação com os primers da ORF 14 e da Actina, visando à verificação da contaminação. Nesta etapa, tomou-se o cuidado de não realizar a desinfecção dos ovos com formol com o objetivo de analisar se estava ocorrendo a transmissão vertical da doença amarelidão.

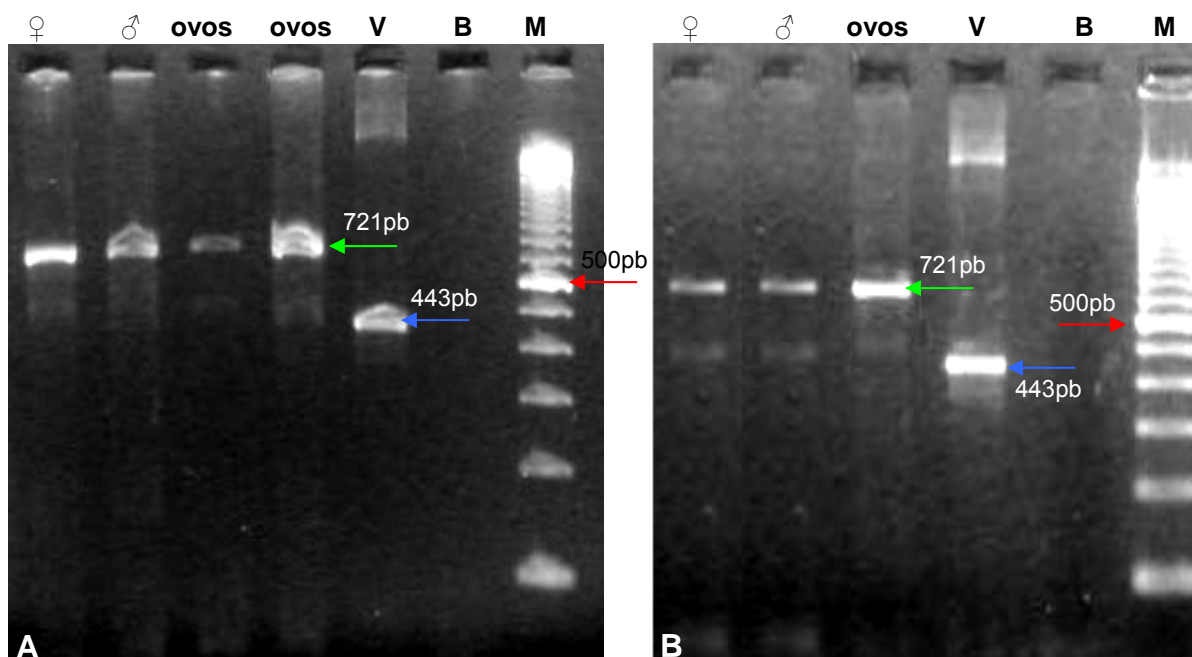


Figura 13 - Possível transmissão vertical entre casais de mariposas e suas posturas. A = raça M18-2; B = Raça C75; V - DNA do vírus (controle positivo); B - Controle negativo; M - Marcador de tamanho molecular 100pb Biolabs. Gel de agarose 1,5%.

Ridhards et al. (1998) e Kukan (1999) verificaram que a dispersão do baculovírus por meio das mariposas pode ocorrer após a transmissão vertical para a progênie destas através do interior dos ovos ou da superfície destes. Hamm e Young (1974) relataram que o nucleopoliedrovírus de *Heliothis zea* foi transmitido pela contaminação da superfície dos ovos deste inseto. Neelgund e Mathad (1978)

encontraram a transmissão vertical de NPV dentro dos ovos e na superfície destes em *Mythimna separata*.

Fuxa et al. (1992) relataram a transmissão vertical do NPV em *Spodoptera frugiperda* por meio da infecção de lagartas e pupas que transmitiram de forma vertical este baculovírus para as lagartas do primeiro instar. Khurad et al. (2004) relataram a transmissão vertical do NPV em bichos-da-seda pela inoculação oral de corpos de oclusão em lagartas do quinto instar.

No presente estudo, mariposas inteiras foram trituradas e o DNA das raças pertencentes ao banco de germoplasma da UEM foram purificados. Essas amostras foram utilizadas para a detecção através da PCR da contaminação de seus ovos. O resultados deste estudo indicam similaridade ao relato de Vanapruk et al. (1992) que, utilizando a técnica ELISA, detectaram BmNPV em várias fases do bicho-da-seda.

Alguns resultados alcançados neste trabalho, no entanto, não corroboram a tese da transmissão vertical. Em algumas mariposas não foi detectada a presença do vírus, assim como em alguns ovos de mariposas contaminadas (Figura 14). Os ovos de mariposas contaminadas podem não ter sido considerados como contaminados devido à baixa concentração do vírus na amostra. Utilizamos o método de PCR tradicional para a detecção do BmNPV nestes ovos, não sendo realizada uma metodologia de quantificação da carga viral que poderia possibilitar a detecção deste baculovírus. Esta metodologia de detecção do BmNPV em ovos precisa ser otimizada e mais estudos sobre a sensibilidade da PCR poderão proporcionar detecções mais eficientes. Trabalhos futuros utilizando técnicas como a PCR em tempo real poderão ser empregadas para determinar quantitativamente os baculovírus.

Duas hipóteses podem ser discutidas em relação às mariposas que não foram detectadas como contaminadas. Uma dessas hipóteses prevê uma carga viral reduzida, o que impossibilitou a detecção. Outro motivo pode ser decorrente da existência de algum mecanismo antiviral durante a fase de lagarta e a infecção viral pode ter sido bloqueada e assim o DNA viral não foi detectado.

Como uma das vias de infecção é por meio do alimento, pode haver mecanismos antivirais existentes no suco intestinal das lagartas de bichos-da-seda. Funakoshi e Aizawa (1989) relataram que o bicho-da-seda possui alguns mecanismos contra a infecção por vírus como, por exemplo, o fator inibitório viral,

encontrado na hemolinfa deste inseto. Diversas substâncias antibacterianas e antivirais também foram identificadas e isoladas a partir da hemolinfa e de fluídos intestinais de bichos-da-seda. Os trabalhos pioneiros de Hayashiya e Matsubara (1971) e de Hayashiya e Nishida (1976) relataram a presença de uma proteína fluorescente vermelha (RFP), que possui atividade antiviral e pode inativar o BmNPV no intestino. Embora o mecanismo da ação antiviral de RFP ainda seja desconhecido, acredita-se que ele destrói o nucleocapsídeo do BmNPV ou bloqueia a multiplicação deste ou aglutina o vírus, sendo excretado junto com as fezes.

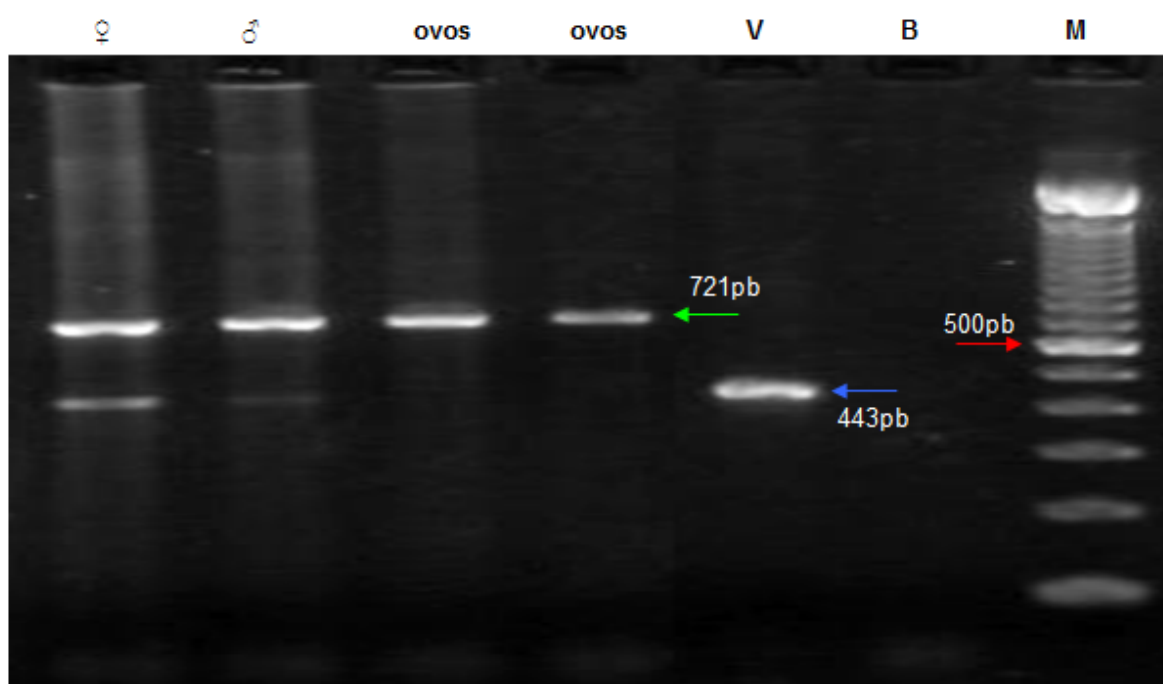


Figura 14 - Não ocorrência da transmissão vertical entre um casal de mariposas e sua postura. Raça M11-A; V - DNA do vírus (controle positivo); B - controle negativo; M = Marcador de tamanho molecular 100pb Biolabs. Gel de agarose 1,5%.

Benz (1963) estudou o início do ciclo de infecção por NPV em tecidos gonodais em lagartas suscetíveis de *B. mori*. Ele descobriu que ambos os testículos e ovários foram infectados em elevados níveis nas fases posteriores à infecção. Da mesma forma, Khurad et al. (2004) encontraram a infecção de BmNPV na gordura corporal e nos testículos e ovários de bichos-da-seda infectados pelo BmNPV. A contaminação persistiu nos ovos e espermatozóides.

A transmissão vertical de NPV foi estudada anteriormente por muitos pesquisadores. Entre estes, Abul-Nasr et al. (1979) observaram a mortalidade de 38-48% na progênie de *Spodoptera littoralis* que estavam infectadas. Ikuno et al. (2004)

usaram o método baseado em PCR para a detecção de BmNPV em ovos depositados por fêmeas infectadas. Os resultados revelaram que BmNPV pode ser detectado quando se utiliza o DNA de uma amostra tão reduzida como um ovo.

Khumnoi (2007) detectou a transmissão vertical de BmNPV em uma variedade tailandesa de bicho-da-seda, por meio da determinação com base na presença de DNA viral, utilizando primers para o gene da poliedrina de BmNPV. Os resultados da amplificação por PCR que foram semelhantes aos do presente trabalho confirmaram que algumas das lagartas que a autora infectou com o vírus sobreviveram e as mariposas derivadas de tais lagartas conseguiram transmitir o vírus verticalmente para sua prole. Esta autora confirmou que, usando o método baseado em PCR, o BmNPV pode ser detectado em ovos e em todos os estágios de desenvolvimento. O mesmo método foi usado por Fuxa et al. (2002), que confirmaram a transmissão vertical em populações de *Trichoplusia ni* e *Autographa californica* utilizando a PCR.

No passado, os cientistas acreditavam que apenas a pebrina era transmitida por meio de ovos colocados por mariposas infectadas. Assim, a maioria dos relatos sobre a detecção de doenças em bichos-da-seda por meio dos ovos relaciona as doenças à pebrina e, raramente, a doenças virais.

BmNPVs foram detectados por outros autores em taxas mais elevadas, principalmente no final da fase larval dos bichos-da-seda. Aruga (1994) relatou que, em *B. mori*, os híbridos da F1 são mais resistentes ao baculovírus que as linhagens parentais, talvez também devido a este fato não foi detectada a presença do vírus em alguns ovos colocados por matrizes contaminadas.

A detecção de BmNPV nas mariposas devidamente identificadas das raças do banco de germoplasma servirá para que se tenha conhecimento de infecção, quando da análise por amostragem. Em casos de raças com poucas posturas, pode-se avaliar a permanência ou não de posturas contaminadas com a finalidade de eliminar a eclosão destes ovos nas próximas gerações.

No presente trabalho, o DNA extraído de mariposas infectadas foi amplificado usando primers específicos para a ORF 14 e para um segmento do gene da Actina. Produtos de PCR de tamanho esperado foram obtidos. O DNA extraído a partir de mariposas saudáveis não apresentou nenhum produto de PCR de 443pb que corresponde à contaminação por BmNPV. As mariposas que estavam contaminadas colocaram ovos de forma irregular, em comparação com as mariposas

saudáveis. Este estudo de avaliação mostrou que a doença amarelidão dos bichos-da-seda pode ser detectada pela PCR. A detecção pode ser feita em ambos os sexos do bicho-da-seda e em ovos.

Em trabalhos anteriores, o método de PCR foi utilizado para demonstrar a sua eficácia na detecção de BmNPV em amostras coletadas tanto de raças de bancos germoplasmas quanto de germoplasmas comerciais de *B. mori*. Em experimentos conduzidos por Nakazawa et al. (2004), mariposas do bicho-da-seda foram infectadas, acasalaram e depositaram seus ovos. Depois disso, a detecção BmNPV foi realizada por PCR nos ovos e, de 30 amostras analisadas, o BmNPV foi detectado em 30% dos machos, 10% das fêmeas e 37% dos ovos

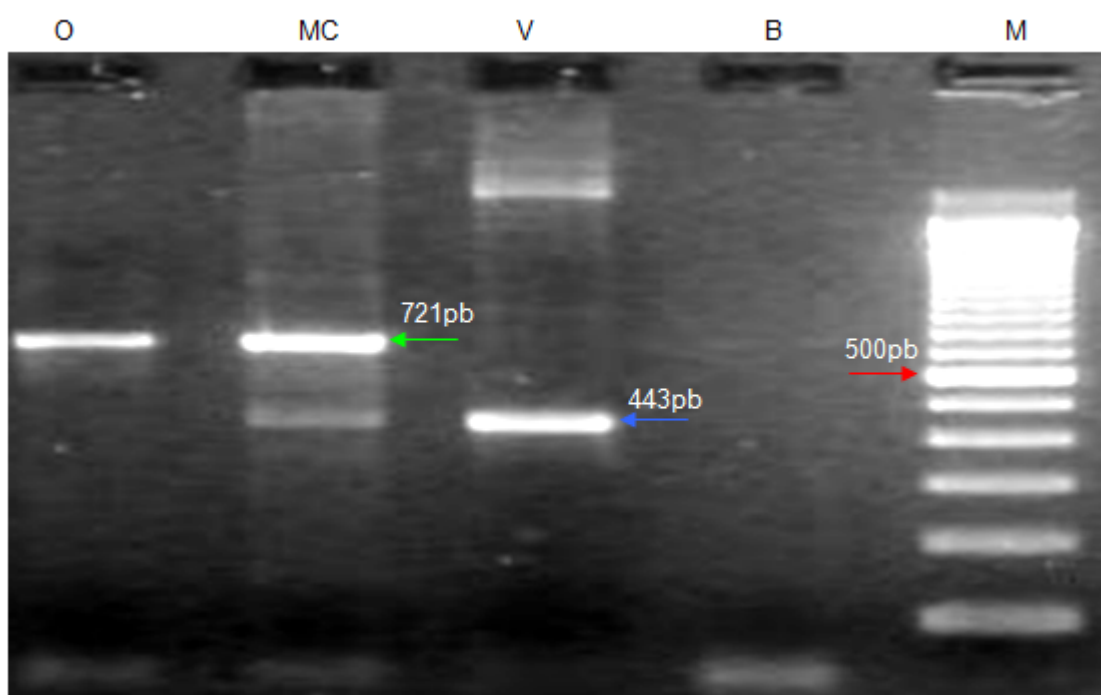


Figura 15 - Análise da contaminação por BmNPV de ovos comerciais desinfetados. O = Amostra de ovos; MC = Mariposa Contaminada; V = Vírus (controle positivo); B = Controle negativo; M = Marcador de tamanho molecular 100pb Biolabs. Gel de agarose 1,5%.

Adicionalmente aos estudos realizados com a detecção do baculovírus em mariposas e ovos de raças do banco de germoplasma da UEM, também foram realizadas extrações de ovos comerciais doados por uma empresa sericícola que se dedica à criação de ovos e lagartas para distribuição aos produtores. Os ovos provenientes desta empresa eram de híbridos comerciais e foram anteriormente descontaminados por formol. Nestas condições, é possível que o vírus presente na

superfície dos ovos contaminados tenha sido destruído (Figura 15). As amostras amplificadas no presente trabalho não apresentaram contaminação pelo baculovírus devido a esta descontaminação ou devido aos mecanismos antivirais relatados anteriormente ou o nível do vírus da amostra ser reduzida.

Khurad et al. (2004) afirmam em seu trabalho que adultos sobreviventes de lagartas infectadas, ao serem utilizados pela indústria da sericicultura para a produção de ovos, fazem com que ocorra um grande efeito desfavorável sobre a produção dos casulos produzidos pela prole devido à transmissão vertical do NPV. Por isso, é importante confirmar se os ovos estão ou não contaminados pelo BmNPV antes destes eclodirem e serem distribuídos para os sericultores.

A técnica de detecção baseada em PCR relatada no presente trabalho oferece uma forma eficaz, rápida, confiável e prática para a detecção de BmNPV em mariposas do bicho-da-seda e deve ainda ser otimizada para detecção em ovos. Portanto, mostra-se adequada para a promoção de uma prática comum para instituições governamentais e setores privados envolvidos com a sericicultura, podendo ser rotineiramente usada para monitorar e proteger a propagação do BmNPV na sericicultura. No entanto, mais estudos sobre a sensibilidade da PCR irão proporcionar, principalmente em ovos de *B. mori*, detecções ainda mais eficientes, evitando assim que amostras onde não foi possível a detecção viral causem prejuízos à produção sericícola.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos são promissores para a identificação de mariposas contaminadas com baculovírus, evitando, assim, a proliferação deste nas gerações subsequentes.

O vírus detectado em mariposas das raças do banco de germoplasma da UEM apresenta a mesma sequência nucleotídica que o BmNPV, isolado T3, e apresenta 99% de identidade com a ORF 23 de *Autographa californica* MNPV, cujo produto está relacionado a uma proteína de envelope viral.

Os dados resultantes deste trabalho podem auxiliar no manejo adequado das raças de bichos-da-seda de forma a proteger o acervo genético da espécie *B. mori* da UEM.

A PCR foi eficaz na detecção da presença do baculovírus causador do amarelidão em mariposas de bicho-da-seda. No entanto, a detecção em ovos e a decorrente análise da transmissão vertical ainda precisam ser otimizadas.

Trabalhos futuros utilizando técnicas como a PCR em tempo real poderão ser realizados para determinar quantitativamente os baculovírus e assim promover melhor detecção deste em ovos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUL-NASR, S.E.; AMMAR, E.D.; ABUL-ELA, S.M. Effects of nuclear polyhedrosis virus on various developmental stages of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). **Applied Entomology and Zoology**, 88:181-187, 1979.

ÁLVAREZ, F.A.; LÓPEZ, A.E.C. **Sericicultura**. Madri: Ediciones Díaz de Santos, 2003. 231p.

ANDREADIS, T.G. Transmission. In: ANDREADIS, T.G. **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley, 1987. p. 159-176.

ARUGA, H. Silkworm and its Strains. In: ARUGA, H. **Principles of sericulture**. India: CRC Press, 1994. p. 97-111.

ATTATHOM, T.; ATTATHOM, S.; KUMPRATUEANG, S.; AUDTHO, M. Early detection of grassie disease of silkworm, *Bombyx mori* by DNA probe. In: PROCEEDING OF 32nd KASETSART UNIVERSITY ANUAL CONFERENCE, 1994, Thailand. **Proceeding...** Bangkok: Kasetsart University, 1994. p. 257-271.

BENZ, G.T. Physiopathology and histochemistry. In: BENZ, G.T. **Insect pathology: an advance treatise**. New York: Academic Press, 1963. p. 299-338.

BASAVARAJA, H.K.; ASHWATH, S.K., SURESH KUMAR, N.; MAL REDDY, N.; KALPANA, G.V. **Silkworm Breeding and Genetics**. Bangalore: Central Silk Board, 2005. 523p.

BEUKEMA, S.J. **Towards more realistic models of disease and insect population dynamics: virus-tent caterpillar interactions**. Vancouver: University of British Columbia, 1992. 78p. Dissertação (Mestrado em Matemática).

BIEVER K.D.; WILKINSON J.D. A stress-induced granosis virus of pieris rapae. **Environmental Entomology**, 7:572-573, 1978.

BILIMORIA, S.L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses. In: KURSTAK, E. **Viruses of invertebrates**. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 1-72.

BRANCALHÃO, R.M.C. **Nucleopolyhedrovirus em *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. 99p. Tese (Doutorado em Zoologia).

BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002a.

BRANCALHÃO, R.M.C. Vírus entomopatogênicos no bicho-da-seda: taxonomia e citopatologia causada por nucleopolyhedrovirus em células de *Bombyx mori*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 24:54-58, 2002b.

BRANCALHÃO, R.M.C.; RIBEIRO, L.F.C. Citopatologia da infecção causada por BmNPV no tegumento de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, 1:15-20, 2003.

BRANCALHÃO, R.M.C.; SOUZA, V.B.V.; SOARES, M.A.M. Infecção causada por nucleopolyhedrovirus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, 2:57-63, 2002.

BRANCALHÃO, R.M.C.; TORQUATO, E.F.B.; FERNANDEZ, M.A. Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, 1:162-172, 2009.

BRITO, A. **Npv life cycle**. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Npv-life_cycle.jpg>. Acesso em: 25, julho, 2012.

BURAND, J.P.; HORTON, H.M.; RETNASANI, S.; ELKINTON, J.S. The use of polymerase chain reaction and shortwave UV irradiation to detect baculovirus DNA on the surface of gypsy moth eggs. **Journal of Virological Methods**, 36:141-150, 1992.

BURDEN, J.P.; POSSEE, R.D.; SAIT, S.M.; KING, L. A.; HAILS, R. S. Phenotypic and genotypic characterisation of persistent baculovirus infections in populations of the cabbage moth (*Mamestra brassicae*) within the British Isles. **Archives of Virology**, 4:635-49, 2006.

CHARPENTIER, G.; DESMARTEAUX, D.; BOURASSA, J. P.; BELLONCIK, S.; ARELLA, M. Utilization of the polymerase chain reaction in the diagnosis of nuclear

polyhedrosis virus infections of gypsy moth *Lymantria dispar*, Lep., Lymantriidae populations. **Journal of Applied Entomology**, 127:405-412, 2003.

CORRADELLO, E.F.A. **Bicho-da-seda e amoreira**: da folha ao fio a trama de um segredo milenar. São Paulo: Ícone, 1987. 101p.

DOW, J.A. PH gradients in lepidopteran midgut. **Journal of Experimental Biology**, 1:355-375, 1992.

ELISSEEFF, V. **The silk roads**: highways of culture and commerce. Berghahn Books, 1998. 332p.

ENTWISTLE, P.F.; ADAMS, P.H.; EVANS, H.F. Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus in European spruce sawfly (*Gilpinia hercyniae*): the rate of passage of infective virus through the gut of birds during cage tests. **Journal of Invertebrate Pathology**, 3:307-312, 1978.

FAKTOR, O.; RAVIV, D. A polymerase chain reaction for the detection of nucleopolyhedroviruses in infected insects: the fate of the *Spodoptera littoralis* virus in *Locusta migratoria*. **Journal of Virological Methods**, 61:95-101, 1996.

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.F.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. A utilização da biotecnologia na sericultura brasileira. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 35:52-57, 2005.

FUNAKOSHI, M.; AIZAWA, K. Antiviral substance in the silkworm gut juice against a nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2:151-155, 1989.

FUXA, J.R.; WEIDNER E.H.; RICHTER, A.R. Polyhedra without virions in a vertically transmitted nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, 60:53-58, 1992.

FUXA, J.R.; RICHTER, A.R.; AMEEN, A.O.; HAMMOCK, B.D. Vertical transmission of TnSNPV, TnCPV, AcMNPV and possibly recombinant NPV in *Trichoplusia ni*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 79:44-50, 2002.

GALAL, F.H. Universal primer for early and rapid detection of nucleopolyhedroviruses of multiple species using polymerase chain reaction **Egyptian Academic Journal of Biological Sciences**, 1:57-64, 2009.

GATTI, I.M.; SILVA, D.M.; MATYS, J.C.; NOGUEIRA, N.L.; OLIVEIRA, A.R. Constatação ao microscópio eletrônico de poliedroses em bicho da seda (*Bombyx mori* L.). In: V COLÓQUIO BRASILEIRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA, Piracicaba, 1976. **Resumos...** Piracicaba: A Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1976. p. 88-89.

GOLDSMITH, M.R.; SHIMADA, T.; ABE, H. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. **Annual Review of Entomology**, 50:71-100, 2002.

GOMI, S.; MAJIMA, K.; MAEDA, S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, 80:1323-1337, 1999.

GOOD, I.L.; KENOYER, J.M.; MEADOW, R.H. New evidence for early silk in the indus civilization. **Archeometry**, 51:457-466, 2009.

GRANADOS, R.R.; WILLIAMS, K.A. In vivo infection and replication of baculoviruses. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. **The biology of baculoviruses**. Florida: CRC Press, 1986. p. 89-108,

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S.B. (eds.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-381.

HAMM, J.J.; YOUNG, J.R. Mode of transmission of nuclear polyhedrosis virus to progeny of adult *Heliothis zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 24:70-81, 1974.

HANADA, Y.; WATANABE, J.K. **Manual de criação do bicho-da-seda**. Curitiba: Cocamar, 1986. 224p.

HASHIMOTO, Y.; HAYAKAWA, T.; UENO, Y.; FUJITA, T.; SANO, Y.; MATSUMOTO, T. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. **Virology**, 2:358-372, 2000.

HATAKEYAMAA, Y.; HAYASAKAA, S. A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR. **Journal of Invertebrate Pathology**, 82:148-151, 2003.

HAWTIN, R.E.; ZARKOWSKA, T.; ARNOLD, K.; THOMAS, C.K.; GOODAY, G.W.; KING, L.A.; KUZIO, J.A.; POSSEE, R.D. Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. **Virology**, 238:243-253, 1997.

HAYASHIYA, K.; MATSUBARA, F. Comparative experiments with the silkworm larvae reared on mulberry leaves and artificial diets: comparison of antiviral activities in the digestive juice of larvae reared on natural and artificial diets. **Bulletin of the Faculty of Textile**, 6:87-100, 1971.

HAYASHIYA, K.; NISHIDA, J. The mechanism of formation of the red fluorescent protein in the digestive juice of silkworm larvae - the formation of chlorophyllide-a. **Applied Entomology and Zoology**, 20:37-43, 1976.

HENNEBERRY, T.J.; KISHABA, A.N. Mass-rearing cabbage loopers. In: SMITH, C.N. **Insect Colonization and Mass Production**. New York: Academic Press, 1966. p. 461-478.

HOLANDA, P.R.H.; MATA, S.F.; LIMA, A.G.B. Propriedades físicas e secagem de casulos do bicho-da-seda em leito fixo: uma investigação teórica e experimental. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 2:101-114, 2004.

IKUNO, A.A.; MARGATHO, L.F.F.; HARAKAVA, R.; AKAMATSU, M.A.; MARTINS, E.M.F.; PORTO, A.J.; FERREIRA, V.C.A. Direct application of the new PCR protocol for evaluation and monitoring of *Bombyx mori* infection by nucleopolyhedrovirus. **Arquivos do Instituto Biológico**, 3:309-315, 2004.

INCEOGLU, A.B.; KAMITA, S.G.; HINTON, A.C.; HUANG, Q.; SEVERSON, T.F.; HAMMOCK, B.D. Recombinant baculoviruses for insect control pest management science. **Pest Management Science**, 10:981-987, 2001.

JE, Y.H.; JIN, H.C.; KIM, M.H.; ROH, J.Y.; JIN, B.R.; O'REILLY, D.R. The use of defective *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genomes maintained in *Escherichia coli* for the rapid generation of occlusion-positive and occlusion-negative expression vectors. **Biotechnology Letters**, 23:1809-1817, 2001.

JEHLE J.A.; BLISSARD, G.W.; BONNING, B.C.; CORY, J.S.; HERNIOU, E.A.; ROHRMANN, G.F.; THEILMANN, D.A.; THIEM, S.M.; VLAK, J.M. On the

classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology**, 7:1257-66, 2006.

KAEWWISES, M.; ATTATHOM, T.; CHAEYCHOMSRI, S.; CHOWPONGPANG, S. Detection of nucleopolyhedrovirus of mulberry silkworm, *Bombyx mori* by PCR technique. In: 42nd KASETSART UNIVERSITY ANUAL CONFERENCE, 2004, Bangkok. **Proceedings...** Bangkok: Kasetsart University, 2004. p. 174-182.

KAEWWISES, M. **Potential application of PCR-based method for early detection of grasserie disease of silkworm *Bombyx mori***. Bangkok: Kasetsart University, 2006. 128p. Tese (Doutorado em Ciências).

KHUMNOI, S. **Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in Thai mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae)**. Bangkok: Kasetsart University, 2007. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências).

KHURAD, A.M.; MAHULIKAR, A.; RATHOD, M.K.; RAI, M.M.; KANGINAKUDRU, S.; NAGARAJU, J. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Invertebrate Pathology**, 87:8-15, 2004.

KRISHNASWAMI, S.; NARASIMHANNA, M.N.; SURYNARAYAN, S.K. **Sericulture**. Roma: FAO, 1979. 131p.

KRYWIENCZYK, J. Demonstration of nuclear polyhedrosis in *Bombyx mori* (Linnaeus) by fluorescent antibody technique. **Journal of Invertebrate Pathology**, 5:309-317, 1963.

KUKAN, B. **The occurrence and persistence of nuclear polyhedrosis virus in fluctuating populations of tent caterpillars**. Vancouver: University of British Columbia, 1996. 126p. Tese (Doutorado em Filosofia).

KUKAN, B. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, 74:103-111, 1999.

KURIN, R. The silk road: connecting cultures, creating trust. Talk story, center for folklife and cultural heritage. **Fall**, 21:1-11, 2002.

- KUZIO, J.; PEARSON, M.N.; HARWOOD, S.H.; FUNK, C.J.; EVANS, J.T.; SLAVICEK, J.M.; ROHRMANN, G.F. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. **Virology**, 253:17-34, 1999.
- LAUZON, H.A.; MARCIA-MARUNIAK, A.; ZANOTTO, P.M.; CLEMENTE, J.C.; HERNIOU, E.A.; LUCAROTTI, C.J.; ARIF, B.M.; MARUNIAK, J.E. Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. **Journal of General Virology**, 6:1477-89, 2006.
- LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. **Biology of the insect midgut**. Londres: Chapman and Hall, 1996. 486p.
- LEVY, S.M.; FALLEIROS, A.M.F.; MOSCARDI, F.; GREGÓRIO, E.A. Susceptibility/resistance of *Anticarsia gemmatalis* larvae to its nucleopolyhedrovirus (AgMNPV): Structural study of the peritrophic membrane. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2:183-186, 2007.
- MARUNIAK, J.E. Baculovirus structural proteins and protein synthesis. In: GRANADOS, R.R.; FEDERICI, B.A. (eds.). **The biology of baculoviruses**. Florida: CRC Press, 1986. p.129-146.
- MASMUDUR, R.M.D.; GOPINATHAN, K.P. Bombyx mori nucleopolyhedrovirus-based surface display system for recombinant proteins. **Journal of General Virology**, 84:2023-2031, 2003.
- MONDAL, M; TRIVEDY, K; NIRMAL KUMAR, S. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* L. **Caspian Journal of Environmental Sciences**, 5:63-76, 2007.
- MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M.; PACO-LARSON, M.L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, 8:559-569, 1998.
- MURPHY, F.A.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; GHABRIAL, S.A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G.P.; MAYO, M.A.; SUMMERS, M.D. **Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses**. Philadelphia: Raven Publishers, 1995. 586p.

NAGARAJU, J.; GOLDSMITH, M.R. Silkworm genomics - progress and prospects. **Current Science**, 83:411-425, 2002.

NAKAZAWA, H.; TSUNEISHI, E.; PONNUVEL, K.M.; FURUKAWA, S.; ASAOKA, A.; TANAKA, H.; ISHIBASHI, J.; YAMAKAWA, M. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. **Virology**, 321:154-162, 2004.

NEELGUND, Y.F.; MATHAD, S.B. Transmission of nuclear polyhedrosis virus in laboratory population of the armyworm, Mythimna (*Pseudaletia*) separata. **Journal of Invertebrate Pathology**, 31:143-147, 1978.

OLIVEIRA, J.V.; WOLFF, J.L.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B.M.; DE CASTRO, M.E.; DE SOUZA, M.L.; MOSCARDI, F.; MARUNIAK, J.E.; ZANOTTO, P.M. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, 11:3233-50, 2006.

OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNSAGAR, I. Detection of monodon baculovirus and whitespot syndrome virus in apparently healthy penaeus monodon postlarvae from India by polymerase chain reaction. **Aquaculture**, 220:59-67, 2003.

PENACCHIO, H.L. **Casulo de seda**: proposta de preço mínimo safra 2006/2007. Disponível em: <www.conab.gov.br/conabweb/download/precos_minimos/proposta_de_precos_minimos_safra_2006_07.pdf> Acesso em: 20, outubro, 2011.

RIDHARDS, A.; MATTHEWS, M.; CHRISTAIN, P. Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. **Annual Review of Entomology**, 43:493-517, 1998.

ROHRMANN, G.F. **Baculovirus molecular biology**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>> Acesso em: 30, janeiro, 2012.

ROSINSKI, M.; REID, S.; NIELSEN, L. K. Kinetics of baculovirus replication and release using real-time quantitative polymerase chain reaction. **Biotechnology and Bioengineering**, 4:476-480, 2002.

SANTOS, S.A.; SILVA, J.L.C.; BALANI, V.A.; SEIXAS, F.A.V.; FERNANDEZ, M.A. Conserved baculoviral ORFs 10 and 14 from *Bombyx mori* multiple nucleopolyhedrovirus. **Genetics and Molecular Research**, 1:457-470, 2010.

SEAB. **Análise da conjuntura agropecuária - Safra 2009/2010**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/file/florestais/textos_tecnicos/produtosflorestais_2009_10.pdf> Acesso em: 20, outubro, 2011.

SENGUPTA, K.; KUMAR, P.; BAIG, M. **Handbook on pest and disease control of mulberry and silkworm**. Bangkok: Unescap, 1990. 88p.

SILVA, D.O. **Transformações no espaço rural do Norte pioneiro paranaense: estratégias de resistência e/ou permanência dos agricultores familiares no município de Jacarezinho/PR**. Presidente Prudente: Universidade Estadual Paulista, 2008. 284p. Tese (Doutorado em Geografia).

SUMMERS, M.D.; SMITH, G.E.; KNELL, J.D.; BURAND, J.P. Physical maps of *Autographa californica* and *Rachiplusia* nuclear polyhedrosis virus recombinants. **Journal of Virology**, 34:694-703, 1980.

TAKAHASHI, K.; TAKAKU, M.; HASEGAWA, M. A experiment of dissection and transparent method with silkworm egg. **Sanshishinpu**, 33:47-59, 1925.

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

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 24:4876-4882, 1997.

TINOCO, S.T.J. **Manual de sericultura**. Campinas: Cati, 2000. 75p.

TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A.; Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval instar of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. **Insect Biochemistry**, 18:263-268, 1988.

VAGO, C.; AIZAWA, K.; IGNOFFO, C.; MARTIGNONI, M.E.; TARASEVITCH, L.; TINSLEY, T.W. Present status of the nomenclature and classification of invertebrate viruses. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2:133-134, 1974.

VANAPRUK, P.; ATTATHOM, T.; SANBATSIRI, K.; ATTATHOM, S. Comparison of methods for the detection of nuclear polyhedrosis virus in silkworm, *Bombyx mori* Linn. In: 30th KASETSART UNIVERSITY ANUAL CONFERENCE, 1992, Bangkok. **Proceeding...** Bangkok: Kasetsart University, 1992. p. 237-243.

VASCONCELOS, S.D. Alternative routes for the horizontal transmission of a nucleopolyhedrovirus. **Journal of Invertebrate Pathology**, 68:269-274, 1996.

VIRALZONE. **Gammabaculovirus**. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/540.html>. Acesso em: 23, julho, 2012.

WEBB, A.C.; BRADLEY, M.K.; PHELAN, S.A.; WU, J.Q.; GEHRKE, L. Use of the polymerase chain reaction for screening and evaluation of recombinant baculovirus clones. **Biotechniques**, 4:512-519, 1991.

WATANABE, H. Resistance of the silkworm, *Bombyx mori*, to viral infections. **Agriculture Ecosystems and Environment**, 15:131-139, 1986.

YANG, F.; WANG, W.; CHEN, R.Z.; XU, X. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus DNA. **Journal of Virological Methods**, 67:1-4, 1997.

YOUNG, S.Y.; YEARIAN, W.C.; SCOTT, H.A. Detection of nuclear polyhedrosis virus infection in *Heliothis* spp. by agarose gel double diffusion. **Journal of Invertebrate Pathology**, 26:309-312, 1975.

ZANETTI, R. **Bicho-da-seda, notas de aula de ENT 100 – Sericicultura**. Disponível em: <<http://www.den.ufla.br/professores/ronald/disciplinas/notas%20<aula/sericicultura%20bichodaseda.pdf>. DEN/UFLA, 2005a>. Acesso em: 20, novembro, 2011.

ZANETTI, R. **Doenças e pragas do bicho-da-seda, notas de aula de ENT 100 – Sericicultura**. Disponível em: <<http://www.den.ufla.br/professores/ronald/disciplinas/>

notas%20aula/sericicultura%20doencasbicho.pdf.den/ufla, 2005b.> Acesso em: 21, novembro, 2011.

ZUROVEC, M.; YANG, C.; KODRÍK, D.; SEHNAL, F. Identification of a novel type of silk protein and regulation of its expression. **Biological Chemistry**, 25:15423-15428, 1998.